مجله دنیای میکروب‌ها
سال نهم شماره چهارم (پیاپی ۲۹) زمستان ۱۳۹۵
صفحات ۳۱۴-۳۰۷

Original Article

جداسازی و تعیین توالی ژن مقاومت به جیوه در باکتری *رائولتلا پلانتی کولا*

اشرف رضایی[۱]، مجید مقبلی[۲*]

[۱] کارشناس ارشد، گروه میکروب شناسی، دانشکده علوم، واحد دامغان، دانشگاه آزاد اسلامی، دامغان، [۲] استادیار، گروه میکروب شناسی، دانشکده علوم، واحد دامغان، دانشگاه آزاد اسلامی، دامغان.

چکیده

سابقه و هدف: جیوه یکی از منابع آلوده کننده محیط زیست، گیاهان و انسان می باشد. میکروارگانیسم ها با مکانیسم های مختلف نسبت به جیوه مقاومند که اصلی ترین این مکانیسم ها احیای جیوه سمی به جیوه عنصری می باشد. این توانمندی با واسطه ژن های مختلف در باکتری ها می باشد. هدف از این تحقیق بررسی وجود ژن مقاومت به جیوه در باکتری *رائولتلا پلانتی کولا* از طریق واکنش زنجیره ای پلی مراز و تعیین توالی می باشد.

مواد و روش ها: از باکتری *رائولتلا پلانتی کولا* که قبلا از پساب جدا شده بود، DNA ژنومی و پلاسمید جدا شد. سپس با استفاده از پرایمرهایی که بر اساس وجود ژن *merA* در باکتری *کلبسیلا اکسی توکا* طراحی شده بود واکنش زنجیره پلی مراز انجام پذیرفت. محصول به دست آمده تعیین توالی گردید و با استفاده از سایت NCBI، توالی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

یافته ها: با استفاده از واکنش زنجیره ای پلی مراز بر روی پلاسمید و DNA ژنومی جدا شده از باکتری، باند ۱۷۰۰ جفت بازی به دست آمد. از Blast توالی به دست آمده مشخص گردید که ژن تکثیر شده ۹۹ درصد مشابه ژن *merA* در باکتری های *انتروباکتر کلوآکه، اشریشیا کلی، سراشیا مارسسنس، کلبسیلا اکسی توکا* و *آسینتوباکتر* است.

نتیجه گیری: برای اولین بار در این تحقیق مشخص گردید که *رائولتلا پلانتی کولا* جدا شده از منابع طبیعی ایران با داشتن ژن *merA* نسبت به جیوه مقاوم است. به همین دلیل این باکتری می تواند کاندید مناسبی به منظور استفاده در کاهش یا حذف جیوه در پساب های صنعتی باشد.

واژگان کلیدی: ژن *merA*، جیوه، واکنش زنجیره ای پلی مراز، *رائولتلا پلانتی کولا*.

دریافت مقاله: شهریور ماه ۹۵ پذیرش برای چاپ: آبان ماه ۹۵

مقدمه

جیوه یک ترکیب سمی است که به طور گسترده در محیط زیست وجود دارد و می تواند در زنجیره غذایی تجمع یابد. انسان با فعالیت های مختلف مانند استفاده گسترده از مواد ضد میکروبی، آمالگان و معادن باعث گسترش روز افزون این آلودگی می شوند (۱ و ۲). میکروارگانیسم ها به شکل تعجب آوری دارای سیستم های مقاومت علیه سمیت در محیط زیست می باشند. جیوه در طبیعت به سه شکل عنصری (Hgo)، فلزی (Hg^2) و آلی (MeHg) وجود دارد و هر سه شکل جیوه سمی می باشد. اما جیوه فلزی و جیوه آلی سمیت بیشتری برای تمامی موجودات زنده دارند (۳ و ٤).

ورود سمی ترین‌شکل جیوه یعنی متیل مرکوری در بدن انسان، بیماری میناماتا ایجاد می کند. این بیماری اولین بار در دهۀ ۱۹۵۰ در خلیج میناماتای ژاپن مشاهده شد. بروز این بیماری در انسان با عوارض گوناگون عصبی از جمله اختلال در حواس پنجگانه، بروز آلزایمر در سنین پیری و در موارد حاد با مرگ بیمار، همراه است. با وجود اینکه مقادیر اندک جیوه برای

* آدرس برای مکاتبه: دامغان جاده چشمه علی، دانشگاه آزاد اسلامی، گروه میکروب شناسی.
تلفن: ۰۹۱۲۲۲۱۸۶۱۲ پست الکترونیک: Moghbeli552@gmail.com

تمام موجودات زنده سمی و خطرناک می باشد، اما برخی از باکتری های ساکن مناطق آلوده می توانند در برابر اثرات سمی جیوه مقاوم شوند. عوامل تعیین کننده مقاومت به جیوه در طیف وسیعی از باکتری های گرم مثبت و گرم منفی جدا شده از محیط های مختلف یافت شده اند.

این باکتری ها در ماهیت و تعداد ژن های شرکت کننده و رمز گذاری شده به وسیله اپرون *mer* متفاوتند و معمولاً بر روی پلاسمید یا کروموزوم و یا می توانند قطعاتی از ترانسپوزون و یا اینتگرون ها باشند (۸-۵).

اپرون *mer* از ژن های *merRTPABD* تشکیل شده است. محصول ژن های *merP* و *merT* در انتقال *HgII* به درون سیتوپلاسم باکتری نقش دارند. *MerR* و *MerD* بیان ژن های اپرون را تنظیم می کنند. محصول ژن *merA* آنزیمی به نام مرکوریک ردوکتاز را کد می کند که نقش اصلی را در حذف جیوه به عهده دارد. این آنزیم طبق مکانیسمی HgII را به Hg (0) که سمیت کمتری دارد، تبدیل می کند. Hg (0) بسیار فرار است و به سرعت از سیتوپلاسم و محیط اطراف باکتری خارج می شود و بدین ترتیب باکتری ها قادر به حذف این فلز سمی و خطرناک از محیط اطراف خود هستند. *MerB* نیز موجب تجزیه جیوه آلی می گردد.

اولین تحقیقات در زمینه مقاومت باکتری ها به جیوه به وسیله مور (Moore) و همکاران در سال ۱۹۶۰ انجام شد. این افراد مقاومت باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* (*S. aureus*) جدا شده از نمونه های بالینی به ترکیبات جیوه را گزارش کردند (۸-۶). میکرو ارگانیسم های مختلف از جمله باکتری ها و قارچ ها، جلبک ها و مخمرها قادر به انجام انواع فعالیت های زیستی از جمله تولید انواع فرآورده های صنعتی، غذایی و دارویی هستند. اما پتانسیل کارایی میکروارگانیسم ها به همین موارد محدود نمی شود.

از سایر توانایی های این جانداران، می توان به تصفیه انواع آلاینده ها از جمله فلزات سنگین اشاره نمود. روش های رایج در تصفیه فیزیکی و شیمیایی فلزات سنگین عبارت است از: فیلتراسیون، رسوب دهی، تعویض یونی، اکسیداسیون و احیا، اسمز معکوس، بازیابی الکتروشیمیایی و جداسازی غشایی. اغلب در تحقیقات از کلرید جیوه به دلیل حلالیت بالا استفاده می شود (۹ و ۱۰).

گونه هایی از *سیتروباکتر* (*Citrobacter*)، *سودوموناس* (*Pseudomonas*)، *استافیلوکوکوس* (*Staphylococcus*)، *باسیلوس* (*Bacillus*)، *کلبسیلا* (*Klebsiella*) و *رودوکوکوس* (*Rodococcus*) در پاکسازی زیستی جیوه مورد استفاده قرار گرفته اند (۱۰ و ۱۱). در سال ۲۰۱۱ باکتری *رائولتلا پلانتی کولا* (*Raoultella planticul*) از پساب صنعتی جداسازی و مقاومت آن به جیوه به وسیله روش MIC بررسی گردید (۱۲). هدف از انجام این تحقیق بررسی وجود ژن مقاومت به جیوه در این باکتری و تعیین ترادف بازی آن می باشد تا بتوان از این باکتری در تصفیهٔ پساب های صنعتی حاوی جیوه استفاده نمود.

مواد و روش ها

الف) باکتری مورد استفاده: باکتری *رائولتلا پلانتی کولا* استفاده شده در این تحقیق در سال ۲۰۱۱ از پساب کارخانه صنعتی سرامیک جداسازی شد و در بانک ژن جهانی با شماره KC525133 ثبت گردید. طبق بررسی هایی که قبلاً انجام شده مشخص گردید که این باکتری قادر به رشد در ۵۲ ppm جیوه می باشد و می تواند در درمان زیستی جیوه در پساب آلوده استفاده شود (۱۲).

ب) جداسازی DNA ژنومی و پلاسمید: برای این کار ابتدا باکتری در ۱۰ میلی لیتر محیط مایع لوریا برتانی (LB) (Luria Bertani broth) (میکرومدیا، مجارستان) تلقیح و به مدت ۱۶ ساعت در ۳۷ درجه سلسیوس با دور ۱۵۰ rpm قرار داده شد. سپس از ۵ میلی لیتر نمونه باکتری با استفاده از کیت (پویا ژن آزما، ایران) DNA ژنومی و از ۵ میلی لیتر دیگر با استفاده از کیت (پویا ژن آزما، ایران) پلاسمید استخراج گردید. نمونه های DNA ژنومی و پلاسمید بر روی ژل آگاروز ۱ درصد الکتروفورز شدند.

ج) تکثیر ژن مقاومت به جیوه merA: پرایمرهای استفاده شده جهت تکثیر ژن مقاومت به جیوه بر اساس ژن *merA* باکتری

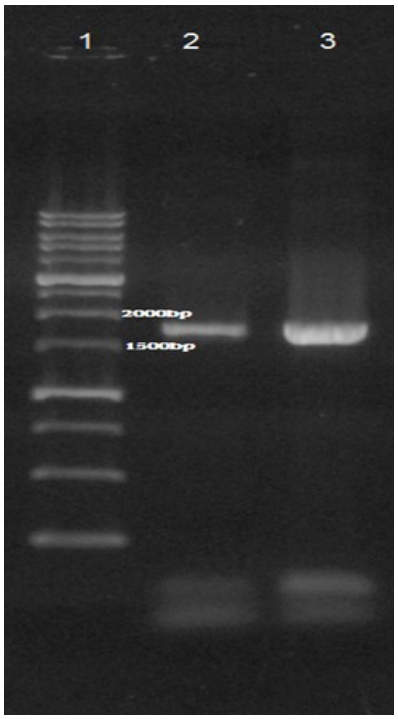
کلبسیلا اکسی توکا طراحی گردید. زیرا بر اساس مطالعات انجام شده تاکنون ترادفی از ژن مقاومت به جیوه در *رائولتلا* گزارش نشده بود. این توالی شامل merA-R: 5'-AGCACGAAAGCTGCTTCACG-3' و merAF: 5'-ATGACCACCCTGAAAATCACC-3' می باشد. واکنش PCR با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۱۲/۵ میکرولیتر مسترمیکس (پویا ژن آزما، ایران) ۱ میکرولیتر پرایمر فورواد (۰/۱ پیکومول)، ۱ میکرولیتر پرایمر ریورس (۰/۱ پیکومول)، ۱ میکرو لیتر پلاسمید (۵۰ نانوگرم) و ۹/۵ میکرو لیتر آب مقطر استریل انجام شد. مراحل تکثیر ژن *merA* در دستگاه ترموسایکلر (Peqlab, Germany) شامل واسرشت اولیه در ۹۵ درجه سلیسیوس به مدت ۵ دقیقه، پس از آن ۳۵ سیکل شامل ۹٤ درجه سلیسیوس به مدت ۱دقیقه، اتصال در ۵۸ درجه مدت ٤۰ ثانیه و مرحلهٔ گسترش در ۷۲ درجه سلیسیوس به مدت ۲ دقیقه و یک مرحله گسترش نهایی در ۷۲ درجه سلیسیوس به مدت ۵ دقیقه انجام گرفت. محصول PCR با استفاده از ژل آگاروز ۱ درصد بررسی شد. محصول PCR توسط شرکت ماکروژن (کره جنوبی) تعیین توالی گردید. توالی به دست آمده در بانک جهانی ژن آنالیز شد.

یافته ها

الف) جداسازی DNA ژنومی: از الکتروفورز DNA ژنومی جدا شده از باکتری باند شارپ و قوی بدست آمد.

ب) جداسازی پلاسمید: از الکتروفورز پلاسمید جدا شده از باکتری یک باند ضعیف بدست آمد که دال بر تعداد کپی کم این پلاسمید در باکتری *رائولتلا پلانتی کولا* می باشد.

ج) بررسی حضور ژن merA در باکتری رائولتلا پلانتی کولا: در این بررسی که با روش PCR و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن *merA* صورت گرفت، قطعه ۱۷۰۰ جفت بازی از پلاسمید و DNA ژنومی به دست آمد. این امر نشان دهنده وجود این ژن بر روی هر دو عنصر ژنتیکی باکتری می باشد (شکل ۱). محصول PCR تعیین توالی گردید و توالی به دست آمده در بانک ژن blast شد. نتایج نشان داد که این ژن ۹۹ درصد



شکل ۱: الکتروفورز محصول PCR بر روی پلاسمید و DNA ژنومی. ستون ۱) مارکر یک کیلو جفت بازی، ستون ۲) قطعه ۱۷۰۰ جفت بازی تکثیر شده از پلاسمید، ستون ۳) قطعه ۱۷۰۰ جفت بازی تکثیر شده از DNA ژنومی.

مشابه ژن *مقاومت به جیوه* در باکتری های *انتروباکتر کلوآکه*، *اشریشیا کلی*، *سراشیا مارسسنس*، *کلبسیلا اکسی توکا* و *آسینتوباکتر* می باشد.

بحث

در اثر استفاده از ترکیبات شیمیایی انسان محیط انتخابی تمام ارگانیسم ها را به گونه ای تغییر می دهد که اثرات شدیدی به ویژه بر روی ارگانیسم های با دوره تقسیم کوتاه مثل باکتری ها دارد. افزایش سطح فلزات سنگین در محیط و استفاده زیاد از آنتی بیوتیک ها و ترکیبات آلی، محیط باکتریایی را تغییر داده و منجر به انتخاب ژنوتیپ های خاص مانند مقاومت به فلزات سنگین و آنتی بیوتیک ها می شود.

در فرآیند تکامل، میکرو ارگانیسم ها با مکانیسم های مقاومت به فلزات، خود را به منظور سازگاری با محیط های مختلف بهبود می بخشند. محصولات کد شده به وسیله ژن های مقاومت می توانند سمیت فلزات سنگین را کاهش داده و یا

حذف نمایند (۱۰ و ۱۳). در دهه های اخیر بر هم کنش فلزات و باکتری ها از لحاظ زیست محیطی، تجاری، اقتصادی، سم شناسی و بیو شیمیایی مورد توجه زیادی قرار گرفته است.

به عنوان نمونه بررسی مکانیسم های مقاومت باکتری ها بر علیه فلزات سنگین مانند آهن، کبالت، نیکل، مس، روی، سرب، آرسنیک و اورانیوم کمک زیادی برای یافتن راه های بیوتکنولوژی و زیست سازگار برای استخراج معادن و بازیافت فلزات سنگین نموده است. در تکنولوژی پاکسازی زیستی می توان از میکرو ارگانیسم ها در جهت کاستن، حذف، ممانعت و تبدیل آلاینده های موجود در خاک و آب و هوا استفاده کرد. در این مورد افراد مختلف آزمایشات گوناگونی را انجام داده اند تا تاثیر میکرو ارگانیسم ها برای پاکسازی مواد آلاینده را بررسی کنند (۱۳).

در سال ۲۰۱۳ مایتی (Maiti) و همکاران به جداسازی و توصیف گونه های مقاوم به جیوه از رسوب رودخانه Dock در منطقه Halida پرداختند. باکتری های جدا شده در این تحقیق متعلق به جنس های *سراشیا* ، *استرپتوکوکوس* و *انتروکوکوس* بوده و قادر به رشد در ۸/۰ میلی مولار کلرید جیوه بودند. نتایج این مطالعه نشان دادند که گروه های متنوع باکتری های دریایی قادر به تحمل میزان بالایی از جیوه می باشند و برای از بین بردن سمیت جیوه در این منطقه آلوده می توانند استفاده شوند (۱٤).

در مطالعه دیگری که توسط اخوان سپهی (Akhavan Sepahi) و همکاران در سال ۲۰۱۱ انجام شد، سویه های مقاوم به فلزات سنگین از پساب های خانگی، صنعتی و قسمت های مختلف سیستم تصفیه پساب شهر اراک جدا شد. در بین گونه های جداسازی شده حداقل تراکم متوقف کننده رشد نسبت به نیکل و جیوه در باکتری *کلبسیلا* اندازه گیری شد و مقاومت ۱ میلی مولاری نسبت به جیوه در *کلبسیلا* به دست آمد (۱۵).

در تحقیق دیگری در سال ۲۰۰٦ کفیل زاده (Kafilzadeh) و همکاران به جداسازی باکتری های مقاوم به جیوه از طریق غنی سازی و کشت مستقیم در محیط جامد حاوی جیوه اقدام کردند. میزان مقاومت باکتری ها ppm ۱۰-۹ ارزیابی شد. بیشترین توانایی حذف جیوه در *باکتری سودوموناس* اندازه گیری شد (۱٦). در مطالعه مقبلی (Moghbeli) و همکاران در سال ۲۰۱۱ باکتری *رائولتلا* مقاوم به جیوه جدا شد که میزان MIC این باکتری نسبت به جیوه ppm ۵۲ برابر با ٤ میلی مولار به دست آمد (۱۲).

لیپتی (Lipthay) و همکاران در سال ۲۰۰۷ نشان دادند که تنوع ژن *merA* در بیش از ۲۰۰ باکتری جدا شده از خاک بالاست. با بررسی در NCBI مشخص گردید که پروتئین های کد شده توسط این ژن ها کمتر از ۹۵ درصد در ترکیب اسید آمینه ای به یکدیگر شباهت دارند. همچنین پلاسمید کانجوگیتیو حامل ژن مقاومت به جیوه از تعداد زیادی از نمونه های باکتری خاک جدا کردند (۱۷).

اورگارد (Oregaard) و همکاران در سال ۲۰۰۷ باکتری هایی از خاک جدا کردند که متعلق به جنس های *آزوسپیریلیوم* (*Azospirilium*)، *برادی ریزوبیوم* (*Bradyrhizobium*)، *ریزوبیوم* (*Rhizobium*) و *اسفینگوموناس* (*Sphingomonas*) بودند. آنها نشان دادند که این باکتری ها حامل ژن *merA* می باشند. اما این ژن در باکتری های جدا شده متنوع بوده و شباهت آنها به یکدیگر کمتر از ۹۵٪ می باشد. همچنین نشان دادند که مقاومت باکتری های خاک به جیوه احتمالا به دلیل انتقال افقی پلاسمید حامل ژن *merA* به این باکتری ها می باشد (۱۸).

آدریانا (Adriana) و همکاران نشان دادند که ژن *merA* در باکتری *کلبسیلا نمونیه* بر روی پلاسمید می باشد (۱۹). کارگر (Kargar) و همکاران در سال ۲۰۱۲ باکتری هایی از جنس های *سودوموناس* ، *سراشیا* و *اشریشیا کلی* از رودخانه کر جدا کردند که حامل پلاسمیدی با اندازه ۳/۱۲ kb بودند (۲۰).

ضیاء الله (Zeyaullah) و همکاران در سال ۲۰۱۰ از باکتری *اشریشیا کلی* جدا شده از محیط، ژن *merA* با اندازه ۱٦۹۵ bp جدا کردند (۲۱). مولر (Moller) و همکاران در سال ۲۰۱۳ نیز نشان دادند که در بین ژن های *merA* باکتری های جدا شده از برف و آب شیرین تنوع بالایی وجود دارد و از ۷۱ باکتری جدا شده از برف، آب شیرین و آب شور یخ زده، ۷ ژن *merA*

مختلف جدا کردند (۲۲ و ۲۳).

تت (Tett) و همکاران در سال ۲۰۰۷ ثابت کردند که اوپرون mer بر روی عناصر متحرک ژنتیکی مانند ترانسپوزون Tn_{5042}، Tn_{5058}، Tn_{4051} نیز یافت می شود (۲٤).

مولر (Moller) در سال ۲۰۱۳ ، موسوویک (Musovic) در سال ۲۰۰٦ و میتوا (Miteva) در سال ۲۰۰۸ نشان دادند که یک نوع پلاسمید با گستره میزبانی گسترده از باکتری های مختلف جدا شده است که نشان دهنده انتقال افقی این پلاسمید در بین باکتری ها بوده و باعث مقاومت آنها به جیوه در خاک می باشد (۲٦-۲۳). در تحقیقی که چین (Chien) و همکاران در سال ۲۰۱۰ انجام دادند قطعه *merA* با ۱۲٤٦ جفت باز جداسازی گردید (۲۷). همچنین در تحقیق دیگری که توسط ناریتا (Narita) در سال ۲۰۰۳ برای جداسازی ژن *merA* از گونه های *باسیلوس* مقاوم به جیوه صورت گرفت قطعه ۱/۳ kb به دست آمد (۲۸). در تحقیق حاضر با استفاده از پرایمرهای طراحی شده بر اساس ژن مقاومت به جیوه در *کلبسیلا پلانتی کولا* وجود ژن *merA* در باکتری *رائولتلا پلانتی کولا* برای اولین بار اثبات گردید که قطعه به دست آمده ۱۷۰۰جفت باز می باشد. همچنین مشخص شد که این ژن ۹۹ درصد مشابه ژن *merA* درباکتری های *انتروباکترکلوآکه*، *اشریشیا کلی*، *سراشیا مارسسنس* و *کلبسیلا اکسی توکا* می باشد و بر روی پلاسمید و DNA ژنومی هر دو قرار گرفته است.

نتیجه گیری

نتایج این پژوهش نشان داد که *رائولتلا پلانتی کولا* واجد ژن مقاومت به جیوه می باشد. با توجه به مقاومت بالای این سویه به جیوه و وجود ژن مقاومت در آن، این باکتری می تواند کاندید مناسبی جهت استفاده در کاهش یا حذف جیوه در پساب های صنعتی باشد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از کارکنان آزمایشگاه تحقیقات بیوتکنولوژی پویا ژن آزما به دلیل همکاری صمیمانه در اجرای این پژوهش کمال امتنان را دارند.

References

1. Wali F, Kepel B, Yusuf I, Badaruddin F, Natsir R, Retnoningrum D. Isolation and characterization of partial sequence of *merA* gene from mercury resistant bacterium *Klebsiella pneumoniae* isolated from Sario River Estuary Manado. Res J Environ Earth Sci. 2014; 6(3): 156-160.
2. Jan AT, Murtaza I, Ali A, Rizwanul Haq QM. Mercury pollution: An emerging problem and potential bacterial remediation strategies. J Microbiol Biotechnol. 2009; 25: 1529-1537.
3. Summers AO, Silver S. Mercury resistance in a plasmid-bearing strain of *Escherichia coli*. J Bacteriol. 1972 ; 112: 1228-1236.
4. Poulain AJ, Ni Chadhain SM, Ariya PA. Potential for mercury reduction by microbes in the high Arctic. Appl Environ Microbiol. 2007; 73(11): 3769.
5. Griffin HG, Foster TJ, Silver S, Misra TK. Cloning and DNA sequence of the mercuric and organo mercurial-resistance determinants of plasmid pDU1358. Proc Natl Acad Sci USA. 1987; 84: 3112-3116.
6. Bhriain NN. Foster TJ. Polypeptides specified by the mercuric resistance (mer) operon of plasmid R100. Gene. 1986; 42(3): 323-330.
7. Misra TK, Brown NL, Fritzinger DC, Pridmore RD, Barnes WM, Haberstroh L, Silver S. The mercuric-ion resistance operons of plasmid R100 and transposon Tn501: The beginning of the

operon including the regulatory region and the first two structural genes. Proc Natl Acad Sci USA. 1984; 81: 5975-5979.

8. Liebert CA, Hall RM, Summers AO. Transposon Tn21, flagship of the floating genome. Microbiol Mol Biol. 1999; 63: 507-522.

9. Lu Y, Wilkins E. Heavy metal removal by caustic treated yeast immobilized in alginat. J Haz Mat. 1996; 49(2-3): 165-179.

10. Schelert J, Divixt V, Hoang V, Simbahan J, Drozda M, Blum P. Occurrence and characterization of mercury resistance in the hyper thermophilic archaeon *sulfolobus solfataricus* by use gene disruption. J Bacteriol. 2004; 186(2): 427-437.

11. Adeniji A. Bioremediation of arsenic, chromium, lead and mercury. NSCEP. Available at: http://nepis.epa.gov. (2004).

12. Moghbeli M, Shakeri F, Hashemi Moghaddam H. Separation of mercury resistant bacteria from wastewater of milk, detergent and ceramic industry. J Chemi Health Risks. 2011; 1(1): 19-22.

13. Wei G, Fan L, Zhu W, Fu Y, Yu J, Tang M. Isolation and characterization of the heavy metal resistant bacteria CCNWRS33-2 isolated from root nodule of *Lespedeza cuneata* in gold mine tailing in China. J Hazard Mat. 2009; 162(1): 50-56.

14. Maiti A, Bhattacharyya S. Isolation and characterization of mercury resistant bacteria from Haldia river sediments. IOSR J Environ Sci Toxic Food Tech. 2013; 5(3): 23-28.

15. Akhavan Sepahy A, Sharifian S, Zolfaghari A, Khalili Dormani M. Evaluation of resistance in intestinal coli forms isolated from industrial wastewater, domestic wastewater and various parts of the wastewater treatment system of Arak city. Cell Mole Res J. 2014; 27(2): 167-178. [In Persian]

16. Kafilzadeh F, Aram M, Sharifi A, Naghmachi M. Isolation and survey growth kinetics of mercury resistant bacteria in Lake Maharloo. Iran J Med Microbiol. 2012; 6(1&2): 28-38. [In Persian]

17. Lipthay JRd, Rasmussen LD, Oregaard G, Simonsen K, Bahl MI, Kroer N. The adaptive potential of subsurface microbial communities to mercury. FEMS Microbiol Ecol. 2007; 3(2): 1766-1770.

18. Oregaard G, Sørensen SJ. High diversity of bacterial mercuric reductase genes from surface and sub-surface floodplain soil (Oak Ridge, USA). Int Soc Microbiol. 2007; 1: 453-467.

19. Adriana SM, Michele SDJ, Michele L, Josino CM, Ana Luzia LF, Paulo Rubens GB. A conservative region of the mercuric reductase gene (*merA*) as a molecular marker of bacterial mercury resistance. Braz J Microbiol. 2008; 39(2): 173-179.

20. Kargar M, Jahromi MZ, Najafian M, Khajeaian P, Nahavandi R, Jahromi SR, Firoozinia M. Identification and molecular analysis of mercury resistant bacteria in Kor River, Iran. Afr J Biotechnol. 2012; 11(25): 6710-6717.

21. Zeyaullah Md, Islam B, Ali A. Isolation, identification and PCR amplification of *merA* gene from highly mercury polluted Yamuna river. Afr J Biotech. 2010; 9(24): 3510-3514.

22. Moller AK, Søborg DA, Abu Al-Soud W, Sørensen SJ, Kroer N. Bacterial community structure in High-Arctic snow and freshwater as revealed by pyro sequencing of *16S rRNA* genes and cultivation. Polar Res. 2013; 32: 17390.

23. Moller Mk, Barkay T, Hansen MA, Norman A, Hansen LH. Mercuric reductase genes (*merA*)

and mercury resistance plasmids in High Arctic snow, freshwater and sea-ice brine. FEMS Microbiol Ecol. 2013; 87: 52-63.

24. Tett A, Spiers AJ, Crossman LC. Sequence-based analysis of pQBR103; a representative of a unique, transfer proficient mega plasmid resident in the microbial community of sugar beet. Int Soc Microbial Ecol J. 2007; 1: 331-340.

25. Musovic S, Oregaard G, Kroer N, Sørensen SJ. Cultivation-independent examination of horizontal transfer and host range of an IncP-1 plasmid among Gram-positive and Gram-negative bacteria indigenous to the barley rhizosphere. Appl Environ Microbiol. 2006; 72: 6687-6692.

26. Miteva V, Lantz S, Brenchley J. Characterization of a cryptic plasmid from a Greenland ice core *Arthrobacter* isolate and construction of a shuttle vector that replicates in psychrophilic high G+C Gram-positive recipients. Extremophiles. 2008; 12: 441-449.

27. Chien MF, Lin KH, Chang JE, Huang CC, Endo G, Suzuki S. Interdisciplinary studies on environmental chemistry biological responses to contaminants, from molecular to community level, interdisciplinary studies on environmental chemistry. 2003; 3: 31-36.

28. Narita M, Chiba K, Nishizawa H, Ishii H, Huang CC, Kawabata Z, Silver S, Endo G. Diversity of mercury resistance determinants among *Bacillus* strains isolated from sediment of Minamata Bay. FEMS Microbiol Letters. 2003; 226(2): 415.

Journal of Microbial World
Volume 9, No. 4, February 2017

Original Article

Isolation and sequencing of mercury resistance gene in *Raoultella planticula* bacteria

Ashraf Rezaei[1], Majid Moghbeli[2]

[1]M.Sc, Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Damghan branch, Islamic Azad University, Damghan, Iran.
[2]Assistant Professor, Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Damghan branch, Islamic Azad University, Damghan, Iran.

Abstract

Background & Objectives: Mercury is one of the polluting sources of the environment, plants as well as human. Microorganisms are resistant to mercury through different mechanisms. The main mechanism involves reduction of the toxic mercury to the elemental form which is mediated through a variety of bacterial genes. The aim of this study is to investigate the presence of mercury resistance gene in *Raoultella planticula* bacteria using polymerase chain reaction (PCR) and sequencing methods.

Materials & Methods: Genomic and plasmid DNA was extracted from wastewater *R. planticula* isolates. PCR was set up with primers designed based on the presence of *mer A* gene in *Klebsiella oxytoca*. The PCR products were sequenced and analyzed using NCBI database.

Results: Using PCR on plasmid and genomic bacterial DNA, a 1700 bps bond was obtained. Blasting the sequence, it was found that the amplified gene has 99% sequence homology to *merA* gene in *Enterobacter cloacae, E. coli, Serratia marcescens, Klebsiella oxytoca* and *Acinetobacter.*

Conclusion: For the first time in this study, we found that *Raoultella planticula* isolated from Iran natural sources are resistant to mercury due to the presence of *merA* gene. Therefore, *R. planticula* can be considered an appropriate candidate to reduce or remove mercury from industrial wastewaters.

Keyword: *merA* gene, Mercury, PCR, *Raoultella planticula.*

Correspondence to: Majid Moghbeli

Tel: +98 9122218612

E-mail: Moghbeli552@gmail.com

Journal of Microbial World 2017, 9(4): 307-314.