



بررسی ژن مقاومت به روی در سودوموناس استوتزری مقاوم به روی و نانوذرات اکسید روی جداسازی شده از خاک

شهلا سلطانی نژاد^{۱*}، محمد ربانی خوراسگانی^۲، گیتی امتیازی^۳

^۱استادیار، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد جیرفت، گروه زیست‌شناسی، دانشیار، دانشگاه اصفهان، گروه میکروبی شناسی، ^۳استاد دانشگاه اصفهان، گروه میکروبی شناسی

چکیده

سابقه و هدف: آلودگی محیط با فلزات سنگین سمی مشکل جهانی می‌باشد. میکروارگانیسم‌ها مکانیسم‌های مختلفی را به منظور کاهش غلظت درون سلولی فلزات و سایر آلوده‌کننده‌های سمی محیطی دارند. این مطالعه با هدف بررسی ژن مقاومت به روی در سودوموناس استوتزری مقاوم به روی و نانوذرات اکسید روی جداسازی شده از خاک انجام شد.

مواد و روش‌ها: این مطالعه بر روی سویه سودوموناس استوتزری جدا شده از خاک غنی شده با MTBE (Methyl Tertiary Butyl Ether) در پژوهش‌های قبلی انجام شد. بالاترین غلظت قابل تحمل این سویه در حضور یون‌های روی، نانوذرات اکسید روی و آنتی‌بیوتیک‌های مختلف بررسی گردید. از روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز برای بررسی ژن *czcC* استفاده شد. توالی نوکلئوتیدی به توالی پروتئینی ترجمه شد و با توالی‌های جزئی پروتئین *CzcC* در دیگر باکتری‌های مقاوم به روی هم تراز گردید.

یافته‌ها: بالاترین غلظت قابل تحمل نشان داد که این سویه توانایی رشد در غلظت‌های بالای یون‌های روی (تا ۴ mM) و نانوذرات اکسید روی (تا ۶۰۰ $\mu\text{g ml}^{-1}$) را دارا می‌باشد. پرایمرهای استفاده شده برای تکثیر ژن مقاوم به روی *czcC* تقریباً یک باند ۲۵۰ جفت بازی ایجاد نمودند. مقایسه *czcC* با توالی‌های دیگر در بانک ژن شباهت ۱۰۰ درصدی با ژن *czcC* در باکتری سودوموناس استوتزری 1501 را نشان داد.

نتیجه‌گیری: نتایج این پژوهش نشان داد که خاک‌های آلوده به فلزات سنگین منابع بالقوه‌ای برای جداسازی سویه‌های مقاوم به فلزات سنگین و نانوآکسیدهای فلزی می‌باشند. درک اساس ژنتیکی مقاومت به فلزات سنگین در باکتری‌ها می‌تواند به استفاده بهتر از این مکانیسم‌های طبیعی برای بهبود محیط زیست همه موجودات زنده منجر گردد.

واژگان کلیدی: سودوموناس استوتزری، ژن *czcC*، یون روی، نانوذرات اکسید روی.

دریافت مقاله: شهریور ماه ۹۳ پذیرش برای چاپ: آذر ماه ۹۳

مقدمه

سمی را دارند. بنابراین محیط‌های آلوده به فلزات سنگین دارای میکروارگانیسم‌هایی با قابلیت مقاومت در برابر این فلزات هستند. روی فلزی ضروری است که در فرآیندهای سلولی زیادی دخالت دارد و نقش مهمی به عنوان عنصر نادر ضروری در تکامل، رشد و تمایز همه سیستم‌های زنده از باکتری تا انسان دارد. همچنین این عنصر کوفاکتور بیش از ۳۰۰ آنزیم و

میزان فلزات در محیط به دلیل فعالیت‌های صنعتی و استفاده از کشاورزی مدرن افزایش یافته است. باکتری‌ها راهبردهای مختلفی را به منظور کاهش غلظت درون سلولی آلوده‌کننده‌های

(* آدرس برای مکاتبه: کرمان، جیرفت، دانشگاه آزاد اسلامی واحد جیرفت گروه زیست‌شناسی.
تلفن: ۰۹۱۳۳۴۷۱۸۵۹ پست الکترونیک: Soltanibiotech@gmail.com

نانوذرات اکسید فلزی به دلیل ویژگی های منحصر به فرد نوری، الکتریکی و مغناطیسی مورد علاقه می باشند و گروه مهمی از نیمه رساناها هستند که در محیط های ذخیره مغناطیسی، انتقال دهنده های انرژی خورشیدی، الکترونیک، حسگرهای گازی و کاتالیزورها کاربرد دارند (۴). نانوذرات اکسید روی (ZnO) به عنوان نانوحسگر، جاذب اشعه ماورای بنفش و کاتالیزور استفاده می شوند. از آنجایی که این نانوذرات برای انسان بی خطر تشخیص داده شده اند و همچنین به دلیل انعکاس بهتر نور ماورای بنفش نسبت به میکروذرات، به وفور در لوازم آرایشی مورد استفاده قرار می گیرند (۵ و ۶). استفاده تجاری زیاد و تولید در مقیاس بالای نانوذرات باعث می شود که انسان و محیط به طور غیر عمد در معرض این ذرات قرار بگیرند (۷).

هدف از این پژوهش بررسی حضور ژن مسئول مقاومت به روی (czcC) در سودوموناس استوتزری مقاوم به روی و نانو اکسید روی بود.

مواد و روش ها

الف) مواد شیمیایی و سویه باکتریایی: در این مطالعه از نانوذرات پودری اکسید روی (سیگما، آمریکا) با درجه خلوص بیش از ۹۹ درصد، اندازه ۴۵-۳۵ نانومتر، رنگ سفید شیری و تقریباً کروی شکل استفاده گردید. این نانوذرات به وسیله XRD (PANalytical XPert Pro Eindhoven هلند) مورد آنالیز قرار گرفتند. محلول ذخیره با سوسپانسیون نمودن نانوذرات در آب دو بار تقطیر استریل جهت تهیه غلظت نهایی ۱۰۰ میلی گرم در میلی لیتر فراهم شد. این سوسپانسیون به مدت ۳۰ دقیقه با ۳۰ w اولتراسونیک شد تا سوسپانسیون کلوئیدی یکنواختی فراهم گردد (۸). از نمک روی $ZnSO_4$ (مرک، آلمان) استفاده گردید. سویه سودوموناس استوتزری SEE-1 (با شماره دستیابی HQ 438282) جداسازی شده از خاک غنی شده با MTBE، از آزمایشگاه تحقیقاتی میکروبی شناسی دانشگاه اصفهان تهیه شد.

ب) رسم منحنی رشد برای تعیین فاز لگاریتمی رشد: به منظور

منحصرأً به عنوان کاتیون Zn^{2+} عمل می نماید (۱). این یون نقش برجسته ای در بیان ژن به عنوان ترکیب ساختاری در تعداد زیادی از عوامل نسخه برداری وابسته به Zn^{2+} ایفا می کند. با این وجود مقادیر زیاد آن می تواند از زنجیره تنفس هوازی ممانعت نماید و به دلیل سمیت زیاد به عنوان تخریب کننده قدرتمند سیستم های بیولوژیکی عمل می کند. بنابراین توانایی حفظ غلظت درون سلولی Zn^{2+} در محدوده مورد نیاز، ویژگی بنیادی همه سلول های زنده می باشد. مقاومت به سطح سمی روی می تواند ناشی از تجمع خارج سلولی، تجزیه به وسیله متالوتیونین ها، تجزیه فیزیکی داخل سلولی و انتشار به خارج باشد (۲).

بهترین مکانیسم مقاومت به روی سیستم Czc است که در باکتری خاک زی گرم منفی *رالستونیا (Ralstonia)* مطالعه شده است. این سیستم، مقاومت به کادمیوم، روی و کبالت را باعث می شود که به عنوان آنتی پورتر کاتیون/پروتون پمپ کننده کاتیون ها به خارج سلول عمل می کند و از سه ژن ساختاری تشکیل شده است. CzcC یک پروتئین غشای خارجی است که به طور مؤثر از عرض غشای خارجی انتقال می یابد. CzcB به پروتئین ترکیب غشایی شباهت دارد. در فضای پری پلاسمی گسترده می باشد و از رها شدن کاتیون های آزاد جلوگیری می کند.

بر اساس ساختار پیش بینی شده، پیشنهاد شده که CzcB غشای خارجی را در نزدیکی آنتی پورتر CzcA قرار می دهد. CzcA یک آنتی پورتر کمیواسمزی کاتیون/پروتون است که از ۱۲ پلی پپتید عرض غشایی تشکیل شده است (۳). تولید زیاد و استفاده وسیع از ذرات نانو در صنایع مختلف موجب رهاسازی زیاد آنها در محیط می گردد. نانو ذرات به صورت عمدی یا غیر عمدی مثل انتشار اتمسفری و جریان مواد فرار مایع یا جامد از محل تولید وارد محیط می شوند. به دلیل ویژگی های فیزیکی، شیمیایی، الکترونیکی، الکتریکی، مکانیکی، مغناطیسی، گرمایی، دی الکتریکی، نوری و بیولوژیکی بیش از یک دهه است که نانوذرات مورد مطالعه قرار گرفته اند.

ه) تعیین MTC آنتی بیوتیک‌ها: برای تعیین MTC سویه مورد نظر علیه آنتی بیوتیک‌های مختلف، محلول ذخیره‌ای از سفتریاکسون (200 mg l^{-1})، سفازولین (100 mg l^{-1})، آموکسی سیلین (200 mg l^{-1})، آمپی سیلین (200 mg l^{-1})، استرپتومایسین (200 mg l^{-1})، تتراسیکلین (100 mg l^{-1}) و جنتامایسین (100 mg l^{-1}) ساخت شرکت پادتن طب ایران تهیه شد. کشت‌های فاز لگاریتمی بر روی محیط MHA حاوی غلظت‌های مختلف آنتی بیوتیک کشت و در دمای 30°C درجه سیلیسیوس به مدت ۴۸ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند.

ز) تکثیر بخشی از ژن مسئول مقاومت به روی (czcC): در ابتدا DNA ژنومی باکتری مورد نظر با استفاده از کیت استخراج DNA (DNP™ Kit)، ساخت شرکت سیناژن، ایران) استخراج گردید. بخشی از ژن czcC با پرایمرهای اختصاصی طراحی شده بر اساس DNA الگوی باکتری سودوموناس استوتزری ATCC 17588 به وسیله واکنش زنجیره‌ای پلی مرز تکثیر شد. پرایمر رفت دارای توالی 5'-CGTGAGCGCGTCAACCT-3' و پرایمر برگشت دارای توالی 3'-CGCTTCCACGGTTCGCTGT-5' بود.

در این مطالعه واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۲/۵ میکرولیتر PCR buffer 10X، ۰/۵ میکرولیتر مخلوط dNTPs (۵۰ میلی مولار)، یک میکرولیتر MgCl_2 (۵۰ میلی مولار)، ۰/۵ میکرولیتر از هر پرایمر (غلظت ۱۰ پیکومول)، ۵ واحد (۰/۳ میکرولیتر) آنزیم Taq DNA polymerase و ۲ میکرولیتر از DNA الگو (۱۰۰ نانوگرم) انجام شد.

واکنش PCR در دستگاه مستر سایکلر گرادینانت ساخت شرکت اپندرف آلمان با شرایط دمایی ۵ دقیقه واسرشت شدن ابتدایی در دمای 94°C درجه سیلیسیوس و در ادامه ۳۵ چرخه شامل واسرشت شدن در دمای 94°C درجه سیلیسیوس به مدت ۴۵ ثانیه، اتصال در دمای 56°C درجه سیلیسیوس به مدت ۴۰ ثانیه، گسترش در دمای 72°C درجه سیلیسیوس به مدت ۴۵ ثانیه و در نهایت گسترش نهایی در دمای 72°C درجه سیلیسیوس به مدت ۵ دقیقه انجام شد. محصول PCR با استفاده از ژل آگارز ۱/۵ درصد و

تعیین فاز لگاریتمی رشد، منحنی رشد از طریق اندازه‌گیری کدورت رسم گردید. به این صورت که ابتدا سویه مورد نظر در ۲۵ میلی لیتر محیط LB تلقیح و به مدت ۲۴ ساعت در 30°C درجه سیلیسیوس و دور 200 g گرمخانه‌گذاری شد. سپس این کشت به ۲۰۰ میلی لیتر از همان محیط تلقیح شد و مجدداً در همان شرایط قبلی گرماگذاری گردید. برای رسم منحنی رشد، جذب نوری در طول موج 600 nm به وسیله اسپکتروفتومتر (Bio Wave (WPA)) در زمان‌های مختلف اندازه‌گیری شد. سپس میزان جذب بر حسب زمان روی نمودار برده شد و منحنی رشد رسم گردید (۹).

ج) بررسی سرعت رشد باکتری: به منظور رسم منحنی رشد در حضور یون روی، سویه مورد نظر با غلظت‌های متفاوتی از یون‌های روی (۱، ۲، ۳ و ۴ میلی مولار) و نانوآکسید روی (۱۰۰ تا 600 mg میکروگرم در میلی لیتر) تیمار گردید. این کشت‌ها در دمای 30°C درجه سیلیسیوس و دور 180 g گرمخانه‌گذاری شدند. نمونه کنترل شامل سوسپانسیون کشت باکتری بدون تیمار بود. سرعت رشد باکتری هر ۴ ساعت یک بار با اندازه‌گیری جذب نوری در طول موج 600 nm با استفاده از اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد (۱۰).

د) تعیین بیشترین غلظت قابل تحمل (MTC): برای این منظور محلول استوک یک مولار از ZnSO_4 و نیز غلظت‌های مختلف (۱۰-۱ میلی مولار) از آن تهیه شد. در مورد نانوآکسید روی نیز از غلظت‌های متفاوت (۱۰۰ تا 900 mg میکروگرم در میلی لیتر) استفاده شد. سویه باکتریایی از فاز لگاریتمی رشد، بر روی محیط مولر هینتون آگار (MHA) حاوی غلظت‌های مختلف یون روی و نانوآکسید روی کشت داده شد. این محیط‌ها در دمای 30°C درجه سیلیسیوس گرمخانه‌گذاری شدند و رشد آنها پس از گذشت ۴۸ تا ۷۲ ساعت مورد بررسی قرار گرفت (۱۱).

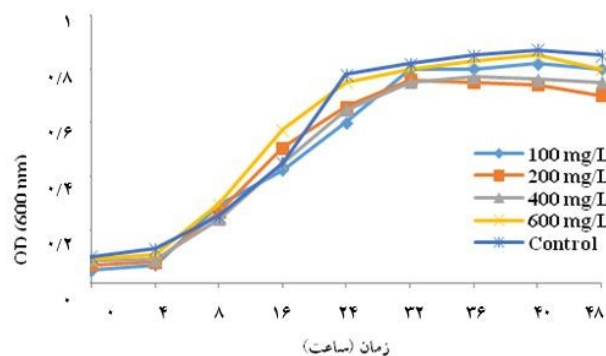
MTC عبارتست از بالاترین غلظتی از فلز و نانوذرات که اجازه رشد بعد از ۴۸ ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای 30°C درجه سیلیسیوس را می‌دهد.

یافته‌ها

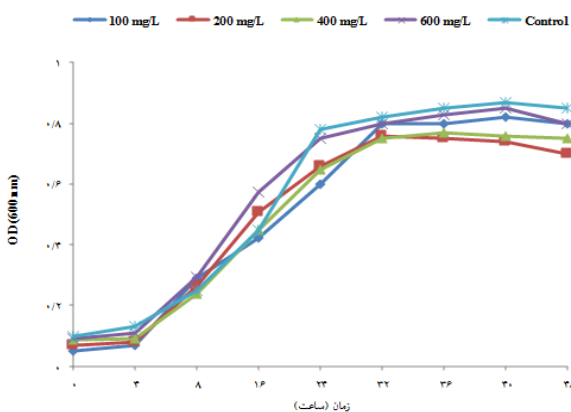
الف) تعیین ویژگی مورفولوژیکی نانوذرات اکسید روی: نمودار ۱ الگوی XRD نانوذرات اکسید روی را نشان می‌دهد که حالت کریستال بودن آن را تایید می‌نماید.

ب) رسم منحنی رشد برای تعیین فاز لگاریتمی رشد: به منظور تعیین زمان لازم برای رسیدن به فاز لگاریتمی رشد، منحنی رشد سویه مورد نظر رسم گردید (نمودار ۲). سویه‌های باکتریایی مختلف در زمان‌های متفاوت به فاز لگاریتمی رشد می‌رسند. این فاز زمان ایده‌آل جهت انجام بررسی مقاومت به فلزات سنگین می‌باشد. زیرا رشد متعادل در فاز لگاریتمی اتفاق می‌افتد.

ج) بررسی منحنی رشد باکتری در حضور غلظت‌های مختلف

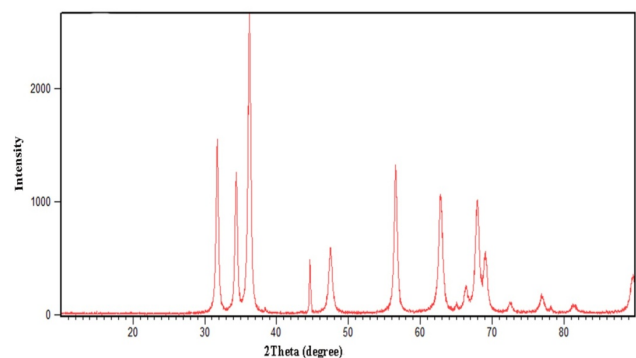


نمودار ۳: منحنی رشد سودوموناس استوتزری SEE-1 در حضور غلظت‌های مختلف یون روی.

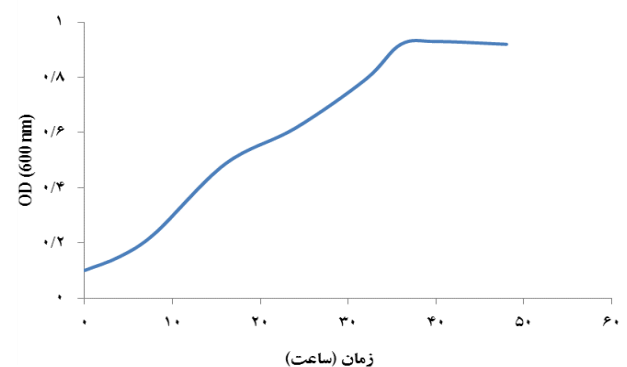


نمودار ۴: منحنی رشد سودوموناس استوتزری SEE-1 در حضور غلظت‌های مختلف نانو اکسید روی.

ولتاژ ۸۰ ولت با استفاده از بافر TBE بررسی شد. توالی ژن توسط شرکت BioNeer کره جنوبی تعیین گردید. این توالی توسط نرم افزارهای مختلف از جمله BioEdit، Gene Runner، Finch TV مورد بررسی و آنالیز قرار گرفت (۱۲). توالی نوکلئوتیدی با کمک سرور ExPASy به توالی پروتئینی ترجمه شد. توالی پروتئینی به منظور شناسایی نزدیک‌ترین محصولات ژنی از بانک ژن BLAST نتایج حاصل از BLAST توالی مورد نظر در پایگاه‌های NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) و EBI (<http://www.ebi.ac.uk>) بررسی و توسط نرم افزارهای CLC و MEGA5 آنالیز گردید (۱۵-۱۲). درخت فیلوژنتیکی به روش Neighbor joining ترسیم شد.



نمودار ۱: الگوی XRD نانوذرات اکسید روی.



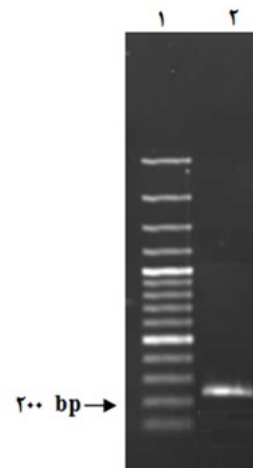
نمودار ۲: منحنی رشد سویه سودوموناس استوتزری SEE-1 (کشت باکتری در محیط LB و انکوباسیون در ۳۰ °C و ۲۰۰ g).

د) تعیین بیشترین غلظت قابل تحمل آنتی بیوتیک‌های مختلف: نتایج مربوط به MTC نشان داد که سویه مورد بررسی مقاومت چندگانه در برابر آنتی بیوتیک‌های مختلف دارد. بالاترین مقاومت در برابر آمپی سیلین و آموکسی سیلین (300 mg l^{-1}) گزارش شد. پس از آن بیشترین مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک های سفتریاکسون، سفازولین، استرپتومایسین، تتراسایکلین و جتتامایسین به ترتیب با غلظت های ۲۰۰، ۱۵۰، ۲۵، ۵ و ۰ میلی گرم در لیتر بود.

ه) بررسی حضور ژن *czcC*: شواهد احتمالی برای حضور لوکوس *czcC* در ژنوم سودوموناس استوتزری SEE-1 با استفاده از پرایمر اختصاصی این ژن به دست آمد. نتایج الکتروفورز نشان دهنده تکثیر قطعه ۲۵۰ جفت بازی بود (شکل ۱). محصول PCR تعیین توالی گردید. این توالی نوکلئوتیدی به توالی پروتئینی ترجمه شد و با توالی‌های جزئی پروتئین *CzcC* در دیگر باکتری‌های مقاوم به روی همتراز گشت. درخت فیلوژنی بر اساس توالی جزئی پروتئین *CzcC* با استفاده از روش Neighborjoining رسم گردید (شکل ۲). مقایسه توالی‌ها با قطعه مقاوم به روی در باکتری سودوموناس استوتزری SEE-1 شباهت ۱۰۰ درصدی به ژن مقاوم به روی در سویه سودوموناس استوتزری A1501 نشان داد. در نهایت توالی ژن توسط نرم افزار *sequin* در بانک ژن با شماره دست‌یابی KF378712 ثبت گردید.

بحث

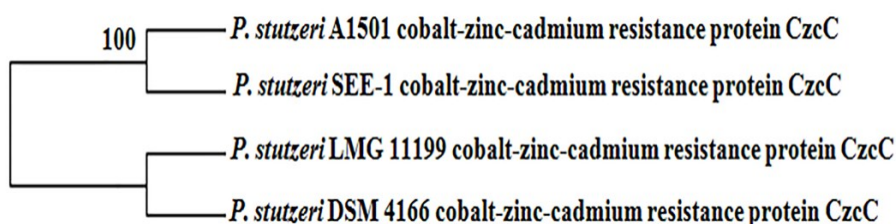
در اثر استفاده از ترکیبات شیمیایی، انسان محیط انتخابی تمام ارگانیسم‌ها را به گونه‌ای تغییر می‌دهد که اثرات شدیدی به ویژه



شکل ۱: الکتروفورز ژل آگارز محصول P حاصل از تکثیر ژن *czcC*. ستون (۱) مارکر ۱۰۰ جفت بازی، ستون (۲) ژن *czcC* سویه سودوموناس استوتزری SEE-1.

یون روی و نانو اکسید روی: نمودارهای ۳ و ۴ منحنی رشد سویه سودوموناس استوتزری SEE-1 در حضور غلظت‌های مختلف یون روی و نانوذرات اکسید روی را نشان می‌دهند. الگوی رشد این باکتری در غلظت‌های مختلف روی و نانو اکسید روی مشابه نمونه کنترل (بدون یون و نانوذرات) می‌باشد که نشان می‌دهد نانوذرات رشد این باکتری را تحت تأثیر قرار نداده است.

ج) تعیین بیشترین غلظت قابل تحمل یون روی و نانوذرات اکسید روی: بالاترین غلظت قابل تحمل سویه مورد بررسی بر علیه یون‌های روی و نانوذرات اکسید روی نشان داد که این سویه قادر است در غلظت‌های بالای فلزات و نانوذرات رشد نماید. نتایج نشان داد که این سویه توانایی رشد در غلظت‌های تا ۴ میلی مولار یون روی و $600 \mu\text{g/ml}$ نانوذرات اکسید روی را دارد.



شکل ۲: درخت فیلوژنی رسم شده بر اساس پروتئین *CzcC*.

همکاران در سال ۲۰۱۱ با مطالعه برهم‌کنش و اثر سمی نانوذرات ZnO و نقره را بر روی باکتری‌های مزوفیل و هالوفیل، نشان دادند که این ذرات بیشتر بر روی باکتری‌های گرم منفی مؤثر می‌باشند (۱۹).

مقاومت میکروبی به آنتی‌بیوتیک‌ها و عوامل ضد میکروبی دیگر، مشکل رو به رشد جوامع امروزی می‌باشد. مقاومت به این عوامل از چند راه به دست می‌آید. باکتری‌ها ممکن است ژن‌های کدکننده آنزیم‌هایی را به دست آورند که عوامل ضد میکروبی را تخریب می‌نمایند و یا پمپ‌های انتشار به خارج را کسب کنند که عوامل ضد میکروبی را از سلول بیرون می‌نمایند (۲۰). رایت (Wright) و همکاران در سال ۲۰۰۶ گزارش نمودند که مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها به وسیله تغییر در ساختار ژنتیکی یک باکتری ایجاد می‌شود. این امر می‌تواند به وسیله جهش ژنتیکی یا انتقال ژن‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک بین باکتری‌ها در محیط اتفاق افتد (۲۱). در اغلب بررسی‌ها مقاومت به فلزات سنگین در ارتباط با مقاومت آنتی‌بیوتیکی گزارش شده است (۲۲). که با نتایج این پژوهش هم خوانی دارد.

در شرایط استرس فلزی، مقاومت به فلز و آنتی‌بیوتیک در میکروارگانیسم‌ها به سازگاری سریع آن‌ها از طریق انتشار عوامل مقاومت، نسبت به موتاسیون یا انتخاب طبیعی کمک می‌کند (۲۳). مقاومت چندگانه تنها در مورد ترکیبات سمی اتفاق می‌افتد که مکانیسم‌های سمیت مشابه دارند. از آنجایی که فلزات سنگین مکانیسم‌های سمیت مشابهی دارند، مقاومت چندگانه پدیده رایجی در میان باکتری‌های مقاوم به این فلزات می‌باشد. قرار گرفتن در معرض فلزات سنگین یا بیوسایدها موجب انتخاب سویه‌های باکتریایی می‌شود که توانایی مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها را نیز دارند. این حالت به این دلیل اتفاق می‌افتد که ژن‌های کدکننده مقاومت به فلزات سنگین و بیوسایدها همراه با ژن‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها در کنار هم و یا به صورت متناوب قرار گرفته‌اند. زیرا باکتری‌ها می‌توانند مکانیسم‌های غیر اختصاصی مرسوم به منظور مقاومت در برابر مواد مختلف مانند فلزات سنگین، بیوسایدها و آنتی‌بیوتیک‌ها را

بر روی ارگانیسم‌های با دوره تقسیم کوتاه مثل باکتری‌ها دارد. افزایش سطح فلزات سنگین در محیط و استفاده زیاد از آنتی‌بیوتیک‌ها و ترکیبات آلی، محیط باکتریایی را تغییر داده و منجر به انتخاب ژنوتیپ‌های خاص مانند مقاومت به فلزات سنگین و آنتی‌بیوتیک‌ها می‌شود. در فرآیند تکامل، میکروارگانیسم‌ها مکانیسم‌های مقاومت به فلزات خود را به منظور سازگاری با محیط‌های مختلف بهبود می‌بخشند. باکتری‌ها مکانیسم‌های مختلفی برای مقاومت در برابر عوامل ضد میکروبی دارند. محصولات کد شده به وسیله ژن‌های مقاوم نیز می‌توانند سمیت فلزات سنگین را کاهش داده و یا حذف نمایند (۱۶).

در دهه‌های اخیر برهم‌کنش فلزات و باکتری‌ها از لحاظ زیست محیطی، تجاری، اقتصادی، سم‌شناسی و بیوشیمیایی مورد توجه زیادی قرار گرفته است. به عنوان نمونه، بررسی مکانیسم‌های مقاومت باکتری‌ها بر علیه فلزات سنگین مانند آهن، کبالت، نیکل، مس، روی، سرب، آرسنیک و اورانیوم کمک زیادی برای یافتن راه‌های بیوتکنولوژی و زیست سازگار برای استخراج معادن و بازیافت فلزات سنگین نموده است. سیلان (Ceylan) و آیسِل (Ayse) در سال ۲۰۱۲ با بررسی الگوی مقاومت به فلزات سنگین را در باکترهای سودوموناس و جنس‌های مربوط به آن، ارتباط بین مقاومت به فلزات سنگین و حضور پلاسמידها را نشان دادند. اغلب سویه‌ها به غلظت‌های مختلف فلزات سنگین مقاومت نشان دادند. به طوری که حداقل غلظت ممانعت کننده آن‌ها از $20 - 0/005$ m mol⁻¹ متغیر بود. همچنین ۱۰۰ درصد سویه‌ها در مقابل سرب و روی مقاوم بودند (۱۷).

سلطانی نژاد (Soltani Nezhad) و همکاران در سال ۲۰۱۴ سویه‌های سودوموناس مقاوم به نانوذرات اکسید مس و روی را از خاک معدن مس سرچشمه جداسازی نموده و گزارش نمودند که این سویه‌ها توانایی رشد در غلظت‌های بالای نانوذرات را داشته و مقاومت چندگانه در برابر آنتی‌بیوتیک‌های مختلف از خود نشان می‌دهند (۱۸). این یافته با نتایج به دست آمده در این پژوهش مطابقت دارد. سینها (Sinha) و

نتیجه گیری

با توجه به نتایج این پژوهش می توان بیان نمود که محیط های آلوده به فلزات سنگین منابع بالقوه ای برای جداسازی سویه های مقاوم به فلزات سنگین و نانو اکسید های فلزی می باشند. به همین دلیل، درک اساس ژنتیکی مقاومت به فلزات سنگین در باکتری ها می تواند منجر به استفاده بهتر از مکانیسم های طبیعی به منظور بهبود کیفیت محیط زیست تمام موجودات زنده شود.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از مسئولین محترم پژوهشگاه بیوتکنولوژی، پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی کرمان به دلیل همکاری صمیمانه در اجرای این پژوهش کمال امتنان را دارند.

داشته باشند (۲۴). در این پژوهش حضور ژن *czcC* در سویه مورد بررسی نشان داده شد. میرهندي (Mirhendi) و همکاران در سال ۲۰۱۳ نیز حضور این ژن را در سویه سودوموناس استوتزری CS-2 نشان دادند (۲۵). اگر چه سیستم های مربوط به فلزات در سراسر ژنوم پراکنده اند، اما بخش مهمی از ژن های موثر در مقاومت به نظر می رسد که در اطراف ناحیه شروع همانند سازی مستقر شده باشند. اما سیستم های جذب فلزات به دور از نواحی شروع همانند سازی قرار گرفته اند. در سودوموناس پوتیدا (*P. putida*) موقعیت دو مجموعه بزرگ ژنی موثر در مقاومت فلزی در ناحیه ORI، ممکن است به افزایش مقاومت منجر شود. این ژن ها کدکننده مقاومت به کاتیون های تک ظرفیتی و دوظرفیتی هستند که در این صورت می توانند موجب مقاومت نسبت به طیف وسیعی از فلزات شوند (۲۶).

References

1. Choudhury R, Srivastava S. Mechanism of zinc resistance in *Pseudomonas putida* strain S4. World J Microbiol Biotechnol. 2001; 17: 149-153.
2. Choudhury R, Srivastava S. Zinc resistance mechanisms in bacteria. Curr Sci. 2001; 81:768-775.
3. Diels L, Dong Q, van der Lelie D, Baeyens W, Mergeay M. The *czc* operon of *Alcaligenes eutrophus* CH34: from resistance mechanism to the removal of heavy metal. J Ind Microbiol. 1995; 114: 142-153.
4. Ramgir N, Datta N, Kaur M, Kailasaganapathi S, Debnath AK, Aswal DK. Metal oxide nanowires for chemiresistive gas sensors: issues, challenges and prospects. Colloids Surf. 2013; 439: 101-116.
5. Becheri A, Dürr M, Lo Nostro P, Baglioni P. Synthesis and characterization of zinc oxide nanoparticles: Application to textiles as UV-absorbers. J Nanopart Res. 2008; 10: 679-689.
6. Cash KJ, Clark HA. Nanosensors and nanomaterials for monitoring glucose in diabetes. Trends Mol Med. 2010; 16: 584-593.
7. Chang Y, Zhang M, Xia L, Zhang J, Xing G. The toxic effects and mechanisms of CuO and ZnO nanoparticles. Materials. 2012; 5: 2850-2871.
8. Tayel AA, El-Tras WF, Moussa S, El-Baz AF, Mahrous H, Salem MF. Antibacterial action of zinc oxide nanoparticles against foodborne pathogens. J Food Safety. 2011; 31: 211-218.
9. Christian RR, Hanson RB, Newell SY. Comparison of methods for measurement of bacterial growth rates in mixed batch cultures. Appl Environ Microbiol. 1982; 43(5): 1160-1165.

10. Khan S, Mukherjee A, Chandrasekaran N. Silver nanoparticles tolerant bacteria from sewage environment. *J Environ Sci*. 2011; 23(2): 346-352.
11. Margeay M, Nies D, Schlegel HG. *Alcaligenes eutrophus* CH34 is a facultative chemolithotroph with plasmid bound resistance to heavy metals. *J Bacteriol*. 1985; 162: 328-334.
12. Hall T. Bio Edit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser*. 1999; 41: 95-98.
13. Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*. 1985; 39(4): 783-791.
14. Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol*. 1980; 16(2): 111-120.
15. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol*. 2011; 28(10): 2731-2739.
16. Wei G, Fan L, Zhu W, Fu Y, Yu J, Tang M. Isolation and characterization of the heavy metal resistant bacteria CCNWR33-2 isolated from root nodule of *Lespedeza cuneata* in gold mine tailing in China. *J Hazard Mat*. 2009; 162(1): 50-56.
17. Ceylan O, Aysel U. Bio-monitoring of heavy metal resistance in *Pseudomonas* and *Pseudomonas* related genus. *J Biol Environ Sci*. 2012; 6: 233-242.
18. Soltani Nezhad S, Rabbani Khorasgani M, Emtiazi G, Yaghoobi MM, Shakeri S. Isolation of copper oxide (CuO) nanoparticles resistant *Pseudomonas* strains from soil and investigation on possible mechanism for resistance. *World J Microbiol Biotechnol*. 2014; 30: 809-817.
19. Sinha R, Karan R, Sinha A, Khare S. Interaction and nanotoxic effect of ZnO and Ag nanoparticles on mesophilic and halophilic bacterial cells. *Bioresour Technol*. 2011; 102: 1516-1520.
20. Tenover FC. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *Am J Med*. 2006; 119(6): 3-10.
21. Wright MS, Peltier GL, Stepanauskas R, McArthur JV. Bacterial tolerances to metals and antibiotics in metal-contaminated and reference streams. *FEMS Microbiol Ecol*. 2006; 58(2): 293-302.
22. Verma T, Srinath T, Gadpayle RU, Ramteke PW, Hans RK, Garg SK. Chromate tolerant bacteria isolated from tannery effluent. *Bioresour Technol*. 2001; 78(1): 31-35.
23. Silver S, Misra TK. Plasmid-mediated heavy metal resistances. *Annu Rev Microbiol*. 1988; 42: 717-743.
24. Singh V, Chauhan PK, Kanta K, Dhewa T, Kumar V. Isolation and characterization of *Pseudomonas* resistant to heavy metals contaminants. *Inter J Pharm Sci Rev Res*. 2010; 3(2): 164-167.
25. Mirhendi M, Emtiazi G, Roghanian R. Antibacterial Activities of Nano Magnetite ZnO Produced in Aerobic and Anaerobic Condition by *Pseudomonas stutzeri*. *Jundishapur J Microbiol*. 2013; 6(10): DOI: 10.5812/jjm.10254.
26. Cánovas D, Cases I, De Lorenzo V. Heavy metal tolerance and metal homeostasis in *Pseudomonas putida* as revealed by complete genome analysis. *Environ Microbiol*. 2003; 5(12): 1242-1256.



Analysis of zinc resistance gene in zinc and zinc oxide nanoparticles resistant *Pseudomonas stutzeri* SEE-1 isolated from soil

Shahla Soltani Nezhad¹, Mohammad Rabbani Khorasgani², Giti Emtiazi³

¹Assistant Professor, Department of Biology, Islamic Azad University, Jiroft branch, Jiroft, Iran.

²Associate Professor, Department of Microbiology, Faculty of Sciences, University of Isfahan, Isfahan, Iran.

³Professor, Department of Microbiology, Faculty of Sciences, University of Isfahan, Isfahan, Iran.

Abstract

Background & Objectives: Environmental pollution to toxic heavy metals is one of global environmental problems. Microorganisms perform several mechanisms to reduce the intracellular concentration of toxic pollutants. The objective of this study was to identify zinc resistance determinant (*czc* gene) in zinc resistant *Pseudomonas stutzeri* SEE-1 isolated from soil.

Materials & Methods: The strain was performed on a *P. stutzeri* strain isolated previously from soil by culture on MTBE (Methyl Tertiary Butyl Ether). The maximum tolerable concentrations of zinc ions and zinc oxide nanoparticles were determined. PCR amplification was used to investigate the *czc* gene. The nucleotide sequence was translated into protein sequence and its sequence was compared with other similar sequences in other zinc resistant bacteria.

Results: The highest tolerable concentrations of zinc ion and zinc nanooxide was measured at 4mM and 600 $\mu\text{g ml}^{-1}$, respectively. The primers used for the amplification of the Zn-resistance gene (*czc*) yielded a approximately 250 bp band. The comparison of *czc* with other sequences in the gene bank database demonstrated 100% similarities with *czc* gene in *P. stutzeri* 1501.

Conclusion: The results of this study showed that soils contaminated with heavy metals are potential sources for the isolation of resistant strains to heavy metals and metal oxide nanoparticles. Understanding the genetic basis of bacterial resistance to heavy metals can improve application of these natural mechanisms to provide a safer environment for all living things.

Keywords: *Pseudomonas stutzeri*, *czc* gene, Zinc ion, Zinc oxide nanoparticles.

Correspondence to: Shahla Soltani Nezhad

Tel: +989133471859

E-mail: Soltanibiotech@gmail.com

Journal of Microbial World 2015, 8(2): 139-147.