

Assessing the Genetic Diversity of Isolated Cd and Cu Resistant Non-fermenting Gram-negative Bacilli from Waste Water by Using Molecular Markers

Mohammad Hossein Habibollahi

Ph.D. Student, Department of Microbiology, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran, mohamadhossein.habib@gmail.com

Amin Baghizadeh *

Associate Professor, Department of Biotechnology, Graduate University of Advanced Technology, Kerman, Iran, amin_4156@yahoo.com

Azar Sabokbar

Associate Professor, Department of Microbiology, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran, sabokbar@kia.ac.ir

Abstract

Introduction: One of the best methods to remove pollutions resulted from heavy metals in industrial wastewater is biological removing. The first step in this way is identifying and clustering microorganisms especially, resistant bacteria to these metals.

Materials and methods: In this research, 17 non-fermenting gram-negative bacilli were isolated and identified from industrial wastewater. Their MIC was determined by different concentrations of Cu and Cd. With CTAB and Dellaporta, methods were extracted bacterial DNA. Then evaluated genetic diversity by 7 RAPD, 3 ISSR markers. The similarity matrix was calculated by using NTSYS-pc software based on Jaccard's coefficient for genotypes and dendrogram was drawn in UPGMA method.

Results: 133 bands were identified by using 10 markers that they included 122 polymorphic bands and 11 monomorphic bands. This markers show high level of polymorphism among the bacteria studied

Discussion and conclusion: In the study cluster analysis and dendrogram drawn based on RAPD and ISSR markers together, there was a significant match between genetic diversity of markers and genetic diversity based on the MIC values. The combined use of both markers for genetic clustering based on resistance to copper and cadmium was more accurate. Principal component analysis was performed to complete the results of cluster analysis and 2-D, 3-D plots were drawn. The results of comparing these two methods showed that these markers had been properly selected for studying genetic diversity, and it was recommended using cluster analysis.

Key words: Genetic diversity; RAPD; ISSR; Non-fermenting gram-negative Bacilli; Heavy Metals

* Corresponding author, Department of Biotechnology, Institute of Science and High Technology and Environmental Sciences, Graduate University of Advanced Technology, Kerman, Iran

Received: November 22, 2017 / **Accepted:** May 06, 2018

فصلنامه علمی- پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها
سال هفتم، شماره ۲۷، پاییز ۱۳۹۷، صفحه ۵۱-۳۷
تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۸/۰۳ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۰/۲۰

بررسی تنوع ژنتیکی باکتری‌های میله‌ای غیر تخمیرکننده مقاوم به فلزهای کادمیوم و مس جداشده از پساب‌های صنعتی با استفاده از نشانگرهای مولکولی

محمدحسین حبیب‌الهی: دانشجوی دکتری گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاداسلامی واحد کرج، ایران، mohamadhossein.habib@gmail.com
امین باقی‌زاده*: دانشیار گروه بیوتکنولوژی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته کرمان، ایران، amin_4156@yahoo.com
آذ سبکبار: دانشیار گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاداسلامی واحد کرج، ایران، sabokbar@kiau.ac.ir

چکیده

مقدمه: حذف زیستی بهترین روش برای رفع آلودگی‌های ناشی از فلزهای سنگین در پساب‌های صنعتی است و نخستین قدم در این مسیر، شناسایی و طبقه‌بندی ریزموجودات مناسب به‌ویژه باکتری‌های مقاوم به این فلزهاست.

مواد و روش‌ها: در پژوهش حاضر، ۱۷ باکتری گرم منفی غیر تخمیرکننده از پساب‌های صنعتی جداسازی و شناسایی شدند و کمترین غلظت بازدارنده (MIC) آنها نسبت به غلظت‌های مس و کادمیوم ارزیابی شد؛ DNA باکتری‌های یادشده با دو روش CTAB و دلاپورتا استخراج و تنوع ژنتیکی آنها با ۷ نشانگر RAPD و ۳ نشانگر ISSR بررسی شد. ماتریس تشابه بر اساس ضریب تشابه جاکارد با نرم‌افزار NTSYS-pc (Ver 2.02) برای ژنوتیپ‌ها محاسبه و دندروگرام به روش UPGMA رسم شد.

نتایج: ۱۳۳ بانده با استفاده از ۱۰ نشانگر DNA شناسایی شدند که از این تعداد، ۱۲۲ بانده چندشکل و ۱۱ بانده یک‌شکل بودند. این نشانگرها سطح بالایی از چندشکلی را در میان باکتری‌های مطالعه‌شده نشان دادند.

بحث و نتیجه‌گیری: تنوع ژنتیکی حاصل از بررسی توأم نشانگرهای ISSR و RAPD در تجزیه خوشه‌ای و دندروگرام رسم‌شده با تنوع ژنتیکی مشاهده‌شده بر اساس مقادیر MIC تطابق زیادی داشت و استفاده توأم از هر دو نوع نشانگر برای دسته‌بندی‌های ژنتیکی بر اساس مقاومت به فلزهای مس و کادمیوم دقیق‌تر بود. برای تکمیل نتایج روش خوشه‌ای، تجزیه به مؤلفه‌های اصلی نیز انجام شد و پلات‌های دوبعدی و سه‌بعدی رسم شدند. نتایج مقایسه این دو روش نشان دهنده انتخاب مناسب نشانگرها برای بررسی تنوع ژنتیکی می‌باشد و از بین دو روش، انجام تجزیه خوشه‌ای توصیه می‌شود.

واژه‌های کلیدی: تنوع ژنتیکی، نشانگر RAPD، نشانگر ISSR، باکتری‌های غیر تخمیرکننده، فلزهای سنگین

* نویسنده مسئول مکاتبات، گروه بیوتکنولوژی، پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته کرمان، ایران

مقدمه

در دنیای صنعتی امروز، کارخانه‌ها و صنایع بزرگ و کوچک فراوانی در شهرها و حاشیه آنها ساخته شده‌اند؛ تولید محصول تنها خروجی این صنایع نیست و پساب‌ها که بسیاری از آنها با محیط‌زیست ناسازگار هستند جزو فراورده‌های آنها به شمار می‌آیند (۱). فعالیت‌های صنعتی از یک سو و رعایت‌نشدن نکته‌ها و عوامل زیست‌محیطی از سوی دیگر سبب شده‌اند مقادیر زیادی از آلاینده‌ها به محیط‌زیست وارد شوند. فلزهای سنگین یکی از مهم‌ترین آلاینده‌های پایدار و تجزیه‌ناپذیر و از سمی‌ترین آلاینده‌ها در محیط‌زیست به شمار می‌آیند (۲). فناوری‌ها و پیشرفت‌های صنعتی مهم‌ترین عوامل ورود مقادیر زیاد فلزهای سمی و سنگین به محیط‌زیست هستند (۳ و ۴). حدود ۸۰ عنصر از عناصر جدول تناوبی به علت ویژگی‌هایی نظیر چگالی زیاد در گروه فلزهای سنگین و سمی قرار دارند (۵). فلزهای سنگین دسته‌ای از فلزها از جمله سرب، روی، کادمیوم، آرسنیک، جیوه، روی، مس، نیکل و غیره با چگالی سطحی بیش از ۵ گرم بر سانتی‌متر مکعب هستند (۵ و ۶). آلودگی فلزهای سنگین به طور مستقیم بر ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک و آب‌وهوا و از راه ورود به چرخه غذایی بر سلامت انسان و سایر جانداران و امنیت زیست‌محیطی تأثیر می‌گذارد (۷).

مطالعه راه‌های حذف آلاینده‌ها به‌ویژه فلزهای سنگین بسیار ضروری است. بررسی‌ها نشان داده‌اند روش‌های فیزیکی و شیمیایی دارای محدودیت هستند، از نظر اقتصادی مقرون‌به‌صرفه نیستند و برای پساب‌های حاوی مواد آلی کمپلکس‌شده با این فلزها نامناسب هستند (۸). اگرچه تاکنون روش‌های فیزیکی و شیمیایی فراوانی برای حذف فلزها از پساب‌های صنعتی استفاده

شده‌اند، به علت نداشتن کارایی مناسب به‌ویژه در غلظت‌های کم فلزهای سنگین و مشکلات خاص چندان به آنها توجه نشده است (۹ و ۱۰).

جذب زیستی^۱ روش مناسبی است که برای حذف آلودگی‌ها در غلظت‌های کم با استفاده از ریزموجودات مختلف انجام می‌شود. باکتری‌ها، قارچ‌ها، مخمرها، جلبک‌ها و حتی گیاهان و آبزیان متفاوتی برای جذب زیستی فلزهای سنگین بررسی شده‌اند (۳، ۱۱-۱۶).

با توجه به اهمیت باکتری‌های مقاوم به فلزهای سنگین در جذب و حذف زیستی آلاینده‌ها از محیط، جداسازی، شناسایی و طبقه‌بندی مولکولی این باکتری‌ها ضروری به نظر می‌رسد. پژوهش‌های مولکولی از جمله هیبریداسیون DNA و شناسایی بر اساس ژن‌های rRNA مفید اما بسیار وقت‌گیر و گران هستند (۱۷). سایر روش‌ها نظیر پروفایل پلاسمید^۲ (۱۸) و پروفایل پروتئین^۳ (۱۹) نیز برای طبقه‌بندی استفاده شده‌اند که تفسیر نتایج آنها به دلایل خاصی نظیر وجود نداشتن پلاسمید در برخی جنس‌ها و مشاهده باندهای مبهم و بسیار زیاد مشکل است. پژوهش‌های ژنتیکی در راستای طبقه‌بندی و تعیین قرابت ژنتیکی با استفاده از نشانگرهای مولکولی RAPD^۴ و ISSR^۵ انجام شده‌اند و به طور موفقیت آمیزی برای طبقه‌بندی و تعیین ارتباط ژنتیکی ریزموجودات بسیاری نظیر قارچ‌ها، ویروس‌ها، باکتری‌ها و ... استفاده می‌شوند (۲۰ و ۲۱).

تفویضی و همکاران با استفاده از ۲۰ نشانگر RAPD به بررسی تنوع ژنتیکی ۲۰ لاکتوباسیلوس جدا شده از محصول‌های سنتی ایران با RAPD-PCR پرداختند. در مطالعه آنها، ۱۹ نشانگر از ۲۰ نشانگر استفاده شده دارای باندهای واضح و قابل کدگذاری بودند. پس از

هدف پژوهش حاضر، جداسازی و شناسایی باکتری‌های گرم منفی غیرتخمیرکننده مقاوم به فلزهای مس و کادمیوم از پساب‌های صنعتی، تعیین کمترین غلظت بازدارنده رشد^{۱۴} (MIC) آنها نسبت به فلزهای یادشده و تعیین قرابت ژنتیکی ژنوتیپ‌ها با استفاده از نشانگرهای مولکولی RAPD و ISSR برای تعیین نقش ژن‌های مقاومت در طبقه‌بندی این باکتری‌هاست.

مواد و روش‌ها

جداسازی و شناسایی باکتری‌های مقاوم به مس و کادمیوم: پساب‌های صنعتی حاصل از فعالیت کارخانه‌های صنعتی از نظر آلاینده‌گی محیط زیست به ویژه حضور فلزهای سنگین در آنها مهم و فرایندهای زیست‌پالایی برای رفع این آلاینده‌ها با ارزش هستند. در پژوهش حاضر، نمونه پساب‌های صنعتی به روش نمونه برداری با چنگک^{۱۵} (۲۴) از مخازن پساب صنعتی پنج کارخانه بزرگ صنعتی در سطح استان کرمان شامل کارخانه مس سرچشمه رفسنجان، دو کارخانه کک‌سازی زرنند، کارخانه مس شهید باهنر کرمان و کارخانه زغال‌شویی زرنند جمع‌آوری شدند که همگی حاوی فلزهای سنگین از جمله مس و کادمیوم بودند. سپس باکتری‌های مقاوم به مس و کادمیوم با استفاده از محیط کشت‌های حاوی نمک‌های فلزی سولفات مس^{۱۶} (۲۵-۲۸) و سولفات کادمیوم^{۱۷} (۲۹) جداسازی شدند (۲۵ و ۲۶). بررسی ویژگی‌های ریخت‌شناختی و رنگ‌آمیزی گرم باکتری‌های جداشده انجام شد. جنس باکتری‌ها با آزمون‌های متداول بیوشیمیایی (آزمون‌های اکسیداز، کاتالاز، ایندول، بررسی حرکت، گلوکز، لاکتوز، DNase، احیای نیترات، آرژنین دهیدروژناز، لیزین دکربوکسیلاز، سیترات، اوره‌آز و ...) مطابق

کدگذاری در برنامه Excel (آفیس، شرکت مایکروسافت^{۱۸}) به شکل صفر و یک و تشکیل ماتریس داده‌های اولیه با نرم‌افزار NTSYS-pc (Ver 2.02e)^{۱۹}، ماتریس تشابه بر اساس ضریب تشابه جاکارد تشکیل و دسته‌بندی سویه‌ها با روش‌های UPGMA^{۲۰} و NJ^{۲۱} انجام شد؛ نتایج مقایسه دسته‌بندی با دو روش یادشده یکسان و مشابه بودند (۱۷). رایار^{۲۲} و همکاران تنوع ژنتیکی و چندشکلی گونه‌های سودوموناس را با استفاده از نشانگرهای RAPD و ISSR بررسی کردند. آنها ۱۷ گونه سودوموناس فلورسنت از خاک اطراف ریشه گیاهان مختلف مانند برنج و سیب‌زمینی جداسازی کردند و پس از استخراج DNA، تنوع ژنتیکی آنها را با استفاده از ۱۵ نشانگر RAPD و ۱۰ نشانگر ISSR و ضریب تشابه را با نرم‌افزار NTSYS-pc (Ver 2.02) و ضریب تشابه جاکارد بررسی و گونه‌ها را با روش UPGMA دسته‌بندی کردند (۲۲). حامید^{۲۳} و همکاران به بررسی مولکولی تنوع ژنتیکی سویه‌های سودوموناس جداشده از شیر با استفاده از روش RAPD-PCR پرداختند. آنها با استفاده از محیط کشت ستریماید آگار^{۲۴}، ۱۳ سودوموناس از نمونه‌های شیر جداسازی کردند و با آزمون‌های بیوشیمیایی به بررسی باکتری‌های جداشده پرداختند. سپس DNA نمونه‌ها را با روش تغییر یافته CTAB^{۲۵} استخراج کردند و عمل PCR را با دو نشانگر RAPD شامل OPZ-8 و OPD-20 انجام دادند و محصول‌ها را روی ژل آگارز ۱/۵ درصد الکتروفورز کردند. سپس، نتایج حضورداشتن یا نداشتن باندهای تشکیل شده را در برنامه Excel به شکل صفر و یک وارد کردند، دسته‌بندی را با نرم‌افزار NTSYS-pc (Ver 2.02) انجام دادند و دندروگرام را با روش UPGMA برای نمونه‌ها رسم کردند (۲۳).

واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمراز^{۲۰} و ارزیابی محصول‌های PCR: برای انجام PCR از ۱۰ نشانگر DNA استفاده شد. از آنجا که طول نشانگرها و ترتیب بازی آنها بر تکرارپذیری واکنش مؤثر هستند، از ۷ نشانگر RAPD و ۳ نشانگر ISSR در پژوهش حاضر استفاده شد. نشانگرها از شرکت ماکروژن^{۲۱} کره جنوبی تهیه شدند. لیست نشانگرهای استفاده شده در جدول ۱ آمده است.

ترکیب واکنش PCR برای حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۳ میکرولیتر DNA الگو (۵۰ نانوگرم بر میکرولیتر)، ۱/۵ میکرولیتر $MgCl_2$ (۵۰ میلی‌مولار)، ۱ میکرولیتر dNTPs (۲/۵ میلی‌مولار)، ۰/۴ میکرولیتر Taq DNA polymerase (۵ واحد بر میکرولیتر)، ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR (شامل Tris-HCl و KCl)، ۱ میکرولیتر نشانگر (۲ میکرومولار) و ۱۵/۶ میکرولیتر آب دیونیزه بود و تکثیر در دستگاه ترموسایکلر گرادیان^{۲۲} انجام شد.

عمل PCR برای هر نمونه باکتریایی با استفاده از هر نشانگر به طور مجزا انجام شد؛ به این شکل که ابتدا واسرشته‌سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه انجام و به دنبال آن، تکرار ۳۵ چرخه شامل ۴۵ ثانیه واسرشته‌سازی در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۱ دقیقه اتصال نشانگر به رشته‌های الگو در دمای خاص آن نشانگر و ۲ دقیقه طویل‌سازی و گسترش در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام شد. در پایان، ۳۵ چرخه گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه انجام شد. عمل PCR در برخی نشانگرها به‌طور تصادفی برای بررسی تکرارپذیری باندهای RAPD و ISSR تکرار شد تا وضوح باندها و درستی کار تأیید شود.

کتاب باکتری‌شناسی سیستماتیک برگگی^{۱۸} (۳۰) مشخص شد و باکتری‌های مقاوم از جنس‌های باسیلوس و کوکوباسیلوس‌های گرم منفی غیر تخمیرکننده قندهای گلوکز و لاکتوز مشخص شدند.

تعیین MIC باکتری‌ها نسبت به غلظت‌های متفاوت سولفات‌مس و سولفات کادمیوم: برای تعیین MIC باکتری‌ها از محیط کشت مایع آبگوشت مغذی استفاده شد (۲۵)؛ به این ترتیب که هر باکتری به‌طور مجزا به محیط کشت مایع حاوی غلظت اولیه نمک فلزی که از آن جدا شده بود تلقیح و رشد آن پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد بررسی شد. در صورت مشاهده کدورت در لوله، غلظت به شکل پله‌ای (۰/۵ میلی‌مولار بر لیتر) افزایش یافت و آزمایش دوباره تکرار شد؛ این عمل به‌طور مداوم تا زمانی تکرار شد که رشد و کدورتی در محیط مایع مشاهده نشد و غلظت حاصل، غلظت بازدارنده رشد (MIC) در نظر گرفته شد. این عمل با ۳ تکرار برای هر نمونه برای نمک‌های فلزی سولفات مس و سولفات کادمیوم انجام و میانگین غلظت بازدارنده رشد (MIC) باکتری‌ها مشخص شد (۲۷، ۳۱ و ۳۲).

استخراج DNA باکتری‌ها: با استفاده از روش‌های CTAB (۳۳ و ۳۴) و دلاپورتا^{۱۹} (۳۵ و ۳۶) با اندکی تغییر (افزایش حجم بافر استخراج نسبت به نمونه، افزایش غلظت EDTA، تغییر در مراحل شستشو DNA برای حذف بیشتر ناخالصی‌ها) DNA باکتری‌ها استخراج شد. کمیّت و کیفیت DNA‌های استخراج‌شده با روش‌های اسپکتروفتومتری و الکتروفورز DNA بررسی شد (۳۷).

عدد یک و حضور نداشتن باندها با عدد صفر مشخص شد و ماتریسی از اعداد صفر و یک برای نشانگرها در نرم افزار Excel تهیه شد. سپس داده‌ها به NTedit بخش ورودی نرم افزار NTSYS منتقل شدند. ماتریس تشابه با استفاده از ضریب تشابه جاکارد (۳۸) با نرم افزار NTSYS-pc (Ver 2.02) محاسبه و دندروگرام به روش UPGMA رسم شد. ضریب همبستگی کوفتیک برای بررسی همبستگی بین دندروگرام و ماتریس تشابه محاسبه شد. تجزیه به مؤلفه‌های اصلی (سه مؤلفه اول مؤلفه‌های اصلی در نظر گرفته شدند) انجام شد و پلات‌های دوبعدی و سه بعدی حاصل از سه مؤلفه اول رسم شدند.

نتایج

در پژوهش حاضر، ۳۱ باکتری از پساب‌های صنعتی جداسازی شدند و پس از بررسی مقاومت آنها نسبت به غلظت‌های مختلف مس و کادمیوم و انجام آزمون‌های بیوشیمیایی، ۱۷ باکتری مقاوم از جنس‌های *باسیلوس* و *کوکوباسیلوس گرم منفی غیر تخمیر کننده* بر اساس آزمون‌های متداول بیوشیمیایی (مطابق جدول ۲) شناسایی شدند. باکتری‌ها از جنس‌های *سودوموناس*، *آلکالیژنز*، *آسیتوباکتر*، *آکرموباکتر* و *استنوتروفوموناس* بودند. آزمون‌های بیشتری برای بررسی جنس‌ها و حتی شناسایی گونه‌ها در برخی نمونه‌ها انجام شدند؛ برای نمونه، آزمون‌های اسکولین و مالتوز در جنس *استنوتروفوموناس* انجام شدند و *استنوتروفوموناس مالتوفیلا* قادر به اکسید کردن مالتوز و اسکولین مثبت شناسایی شد. آزمون گزیلوز برای جنس *آکرموباکتر* انجام و *آکرموباکتر گزیلوزا* اکسیدانس مشخص شد. آزمون‌های اختصاصی در سایر جنس‌ها نیز برای تأیید جنس و در صورت امکان شناسایی گونه‌ها انجام شدند.

فراورده‌های تکثیر شده در PCR با استفاده از الکتروفورز روی ژل آگارز ۱/۵ درصد جداسازی و به روش رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید آشکار سازی شدند. از نشانگر 1kb DNA Ladder (شرکت سیناکلون) برای بررسی درستی الکتروفورز و مشخص شدن اندازه قطعه‌ها استفاده شد. ژل‌ها پس از رنگ آمیزی و شستشو با آب درون دستگاه Gel Documentation مدل SynGene قرار گرفتند و باندها با اشعه UV مشاهده شدند و عکس آنها با دوربین متصل به نرم افزار GeneSnap V6.08.04 تهیه شد.

جدول ۱- ویژگی‌های نشانگرهای استفاده شده RAPD و ISSR

نشانگرها	توالی نشانگرها RAPD	دمای ذوب (درجه سانتی گراد)
P1	5'-CAGTGCTCTT-3'	۳۰
P2	5'-TCACGCAGTT-3'	۳۰
P3	5'-GACAACAGGA-3'	۳۰
P4	5'-GGGTGGGTAA-3'	۳۲
P5	5'-CCTGGCAATC-3'	۳۲
P6	5'-TGGCCCTCAC-3'	۳۴
P7	5'-ACCCGGTCAC-3'	۳۴
ISSR		
P8	5'-GAGAGAGAGAGT-3'	۳۶
P9	5'-GAAGAAGAAGAAGAA-3'	۳۷/۹
P10	5'-GAGAGAGAGAGC-3'	۳۸

طبقه بندی نمونه‌ها: تمام باندهای تشکیل شده به وسیله ۱۰ نشانگر RAPD و ISSR با نرم افزار GeneTools تجزیه و تحلیل شدند. عملکرد این نرم افزار، تشخیص باندهای واضح برای هر نمونه و مشخص کردن باندهای مشترک است؛ از این رو، باندهای چند شکل ایجاد شده متغیر مستقل در نظر گرفته شدند و حضور داشتن باندها با

آنها برای هر نمونه باکتریایی با دستگاه اسپکتروفتومتری اندازه‌گیری و سلامت و کیفیت آنها روی ژل آگارز ۱ درصد بررسی شد. $OD_{260/280}$ های حاصل از دستگاه اسپکتروفتومتری برای DNAهای استخراج شده با روش CTAB بین ۰/۶ تا ۲ (میانگین = ۱/۱) و با روش دلاپورتا بین ۱/۵ تا ۲ (میانگین = ۱/۸) بود. باندهای تشکیل شده حاصل از الکتروفورز برای هر نمونه DNA استخراج شده در بالای ژل آگارز حاصل از روش دلاپورتا به شکل لکه پرننگ تری نسبت به CTAB ظاهر شدند؛ بنابراین در پژوهش حاضر، روش دلاپورتا از نظر کمیت و کیفیت DNA نسبت به روش CTAB مناسب‌تر بود و در نهایت، DNAهایی برای انجام آزمون‌های PCR انتخاب شدند که از نظر اسپکتروفتومتری ($OD_{260/280}$ بین ۱/۸ تا ۲) مناسب بودند و باند پرننگی در بالای ژل آگارز تشکیل دادند.

باکتری‌های منتخب از مکان‌های صنعتی کارخانه مس سرچشمه رفسنجان (A)، کارخانه‌های کک‌سازی زرنند (C)، کارخانه مس شهید باهنر کرمان (D)، کارخانه زغال‌شویی زرنند (E) جداسازی و شناسایی شدند. این باکتری‌ها شامل $A_2(1)$ ، $A_4(2)$ ، $A_6(3)$ ، $A_8(4)$ ، $A_9(5)$ ، $C_1(6)$ ، $C_2(7)$ ، $C_3(8)$ ، $C_4(9)$ ، $C_5(10)$ ، $C_6(11)$ ، $D_1(12)$ ، $D_2(13)$ ، $E_1(14)$ ، $E_2(15)$ ، $E_4(16)$ و $E_5(17)$ بودند و MIC آنها با ۳ تکرار برای هر باکتری اندازه‌گیری شد. مکان، جنس و میانگین MIC باکتری‌های جدا شده نسبت به فلزهای مس و کادمیوم در جدول ۳ آمده است.

مقایسه دو روش CTAB و دلاپورتا در استخراج DNA باکتری‌ها: خالص و سالم بودن DNAهای استخراج شده برای انجام PCR با نشانگرهای RAPD و ISSR مهم است؛ از این رو، پس از رقیق‌سازی DNAهای استخراج شده به روش‌های CTAB و دلاپورتا، غلظت

جدول ۲- ویژگی‌های بیوشیمیایی متداول برای شناسایی باکتری‌های گرم منفی غیر تخمیرکننده

Stenotrophomonas spp.	Achromobacter spp.	Acinetobacter spp.	Alcaligenes spp.	Pseudomonas spp.	ویژگی‌ها
-	-	-	-	-	Gram staining
+	+	+	+	+	KOH
ALK/ALK	ALK/ALK	ALK/ALK	ALK/ALK	ALK/ALK	TSI
-	-	-	-	-	Indole
-	Oxidative	Oxidative	-	Oxidative	OF Glucose
-	-	-	-	-	Glucose
-	-	-	-	-	Lactose
-	+	-	+	+	Oxidase
+	+	+	+	+	Catalase
-	+/-	-	-	-	NaCl 6.5%
+	+	-	+	+	Motility
+	+/-	-	-	-	DNase
+/-	+	-	-	+	Nitrate reduction
+/-	+	+	+	+	Citrate
-	-	-	-	+	Arginine dehydrogenase
+	-	-	-	-	Lysine decarboxylase
+	-	-	+/-	+	Gelatinase
+/-	+/-	-	-	+	Urease

- نتیجه منفی، + نتیجه مثبت، +/- در برخی گونه‌ها مثبت و در برخی گونه‌ها منفی، ALK قلیایی، Oxidative. اکسیدکننده قند

جدول ۳- مکان، جنس و میانگین MIC باکتری‌های جدا شده نسبت به فلزهای مس و کادمیوم

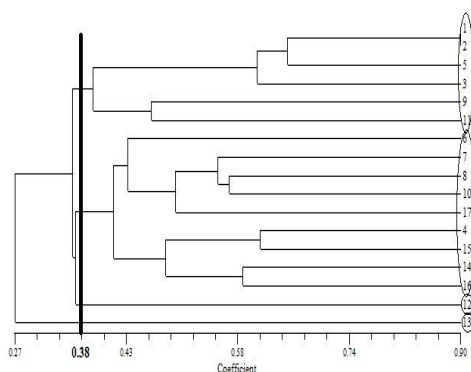
جنس‌ها	MIC میلی مولار بر لیتر CdSO ₄ .8H ₂ O	MIC میلی مولار بر لیتر CuSO ₄ .5H ₂ O	باکتری (شماره باکتری)	مکان نمونه‌گیری
<i>Pseudomonas</i> sp.	۶/۶۶۷	۶/۳۳۳	(۱)A ₂	کارخانه مس سرچشمه رفسنجان (A) کارخانه‌های کک‌سازی زرنند (C) کارخانه مس شهید باهنر کرمان (D) کارخانه زغال‌شویی زرنند (E)
<i>Pseudomonas</i> sp.	۶/۶۶۷	۸/۳۳۳	(۲)A ₄	
<i>Pseudomonas</i> sp.	۶/۵	۸/۱۶۷	(۳)A ₆	
<i>Pseudomonas</i> sp.	۴/۳۳۳	۵/۸۳۳	(۵)A ₉	
<i>Alcaligenes denitrificans</i>	۶/۸۳۳	۸/۳۳۳	(۴)A ₈	
<i>Alcaligenes faecalis</i>	۶/۶۶۷	۷/۶۶۷	(۶)C ₁	
<i>Alcaligenes</i> sp.	۶	۶/۳۳۳	(۱۱)C ₆	
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	۵/۳۳۳	۶/۸۳۳	(۷)C ₂	
<i>Acinetobacter lwoffii</i>	۶/۵	۸	(۹)C ₄	
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	۶/۳۳۳	۶/۸۳۳	(۱۰)C ₅	
<i>Acinetobacter lwoffii</i>	۴/۳۳۳	۴/۳۳۳	(۱۴)E ₁	
<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	۶/۶۶۷	۸/۱۶۷	(۸)C ₃	
<i>Achromobacter</i> sp.	۶	۶/۶۶۷	(۱۲)D ₁	
<i>Achromobacter</i> sp.	۴/۳۳۳	۵/۳۳۳	(۱۳)D ₂	
<i>Stenotrophomonas</i> sp.	۵	۴/۱۶۷	(۱۵)E ₂	
<i>Stenotrophomonas</i> sp.	۶	۴/۶۶۷	(۱۶)E ₄	
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	۵/۶۶۷	۴/۳۳۳	(۱۷)E ₅	

ازای هر نشانگر) و ۱۱ باندهای یک‌شکل (با میانگین ۱/۱ باندهای هر نشانگر) بودند که سطح بالای چندشکلی در میان نمونه‌های مطالعه شده را نشان می‌دهد. کمترین باندهای چندشکل به نشانگر P4 و بیشترین باندهای چندشکل به نشانگرهای P2 و P5 مربوط بودند. نمونه‌ای از باندهای تشکیل شده روی ژل الکتروفورز افقی با آگارز ۱ درصد با استفاده از نشانگر P4 برای ۱۷ ژنوتیپ باکتریایی در شکل ۱ نمایش داده شده است.

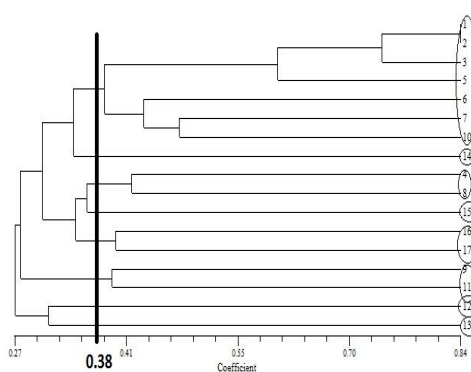
دندروگرام‌ها بر اساس ضریب تشابه جاکارد و طبق الگوریتم UPGMA به‌طور جداگانه برای نشانگرهای مولکولی RAPD (شکل ۲) و ISSR (شکل ۳) و به شکل توأم برای این نشانگرها (شکل ۴) رسم و نتایج تجزیه خوشه‌ای ژنوتیپ باکتری‌ها بررسی شدند.

تجزیه و تحلیل باندهای حاصل از نشانگرهای RAPD

و ISSR: باندهای واضح و روشنی با انجام عمل PCR با استفاده از نشانگرهای RAPD و ISSR (یاد شده در جدول ۱) روی ۱۷ ژنوتیپ باکتریایی حاصل شدند. در کل، ۹۵ باندهای ۷ نشانگر RAPD تشکیل شدند که ۸۶ باندهای ۹۰/۵ درصد چندشکل و ۹ باندهای ۹/۵ درصد یک‌شکل بودند. ۳ نشانگر ISSR استفاده شده و وضوح باندهای چندشکلی مناسبی داشتند و در کل، ۳۸ باندهای تشکیل دادند که ۳۶ باندهای ۹۴/۷ درصد چندشکلی و ۲ باندهای ۵/۳ درصد یک‌شکل بودند (جدول ۴). در مجموع، ۱۰ نشانگر DNA بررسی شده، ۱۳۳ باندهای میانگین ۱۳/۳ باندهای هر نشانگر ایجاد کردند که از این تعداد، ۱۲۲ باندهای چندشکل (با میانگین ۱۲/۲ باندهای



شکل ۳- دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای ۱۷ ژنوتیپ باکتریایی با ۳ نشانگر ISSR با روش UPGMA



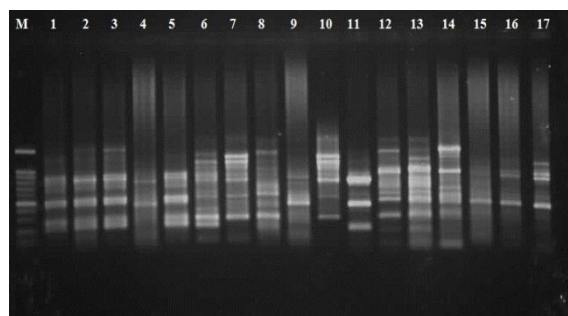
شکل ۴- دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای ۱۷ ژنوتیپ باکتریایی با نشانگرهای RAPD و ISSR با روش UPGMA

نتایج تجزیه خوشه‌ای در سطح تشابه ۰/۳۸ باعث گروه‌بندی‌های مختلفی شدند که در شکل‌های ۲ تا ۴ مشاهده می‌شوند. همان‌طور که مشخص است سه باکتری ۱، ۲ و ۳ (A_2 ، A_4 و A_6) با MIC یکسان (۶/۶ میلی‌مولار بر لیتر) برای سولفات کادمیوم و MIC به ترتیب ۶/۳، ۸/۳ و ۸/۱ میلی‌مولار بر لیتر برای سولفات مس بیشترین تشابه ژنتیکی را در سه دندروگرام رسم شده داشتند. این باکتری‌ها گونه‌های مختلف جنس *Sordomonas* جدا شده از پساب صنعتی کارخانه مس سرچشمه رفسنجان بودند که در یک گروه دسته‌بندی شده‌اند. گفتنی است باکتری ۵ (A_9) از جنس *Sordomonas* با MIC برابر ۴/۳ و ۵/۸ میلی‌مولار بر لیتر

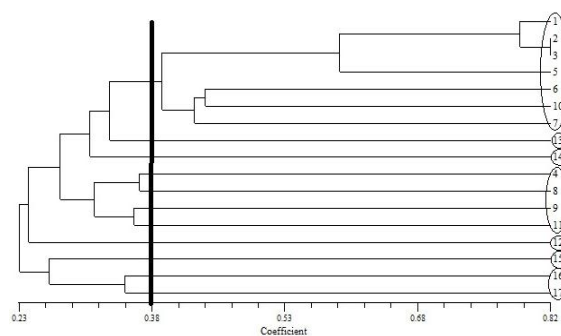
دامنه تشابه ژنتیکی دندروگرام‌های رسم شده برای نشانگر RAPD بین ۰/۲۳ تا ۰/۸۲، برای ISSR بین ۰/۲۷ تا ۰/۹، برای دو نشانگر به شکل توأم بین ۰/۲۷ تا ۰/۸۴ و ضریب همبستگی کوفنتیک به ترتیب $r=0/79$ ، $r=0/901$ و $r=0/88$ بود (شکل‌های ۲ تا ۴).

جدول ۴- مقایسه نشانگرهای RAPD و ISSR در ۱۷ ژنوتیپ باکتریایی

شاخص‌ها	ISSR	RAPD
تعداد نشانگرها	۳	۷
تعداد کل باندها	۳۸	۹۵
تعداد قطعه‌های چندشکل	۳۶	۸۶
درصد باندهای چندشکل	۹۴/۷	۹۰/۵



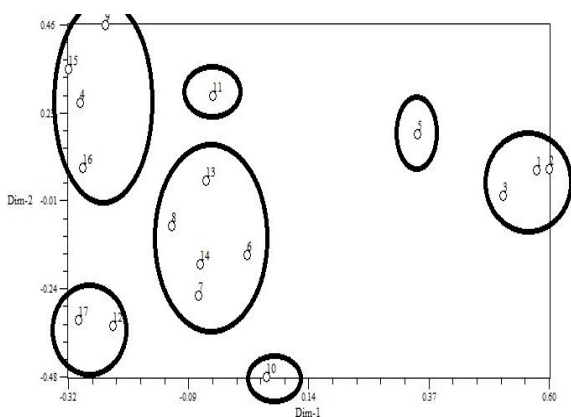
شکل ۱- باندهای تشکیل شده روی ژل الکتروفورز افقی با آگارز ۱ درصد با استفاده از نشانگر P4 مربوط به ۱۷ ژنوتیپ باکتریایی (شماره چاهک نشان‌دهنده شماره باکتری مطابق جدول ۳ است، M نشان‌دهنده نشانگر وزنی 1kb DNA Ladder است)



شکل ۲- دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای ۱۷ ژنوتیپ باکتریایی با ۷ نشانگر RAPD با روش UPGMA

ISSR با هم نسبت به دسته‌بندی دو دندروگرام RAPD و ISSR به‌طور جداگانه بهتر و واضح‌تر مشاهده می‌شود و کارایی زیاد این نشانگرها در دسته‌بندی ژنوتیپ‌ها بر اساس مقاومت آنها در برابر غلظت‌های مختلف فلزهای سنگین از جمله مس و کادمیوم را نشان می‌دهد.

برای یافتن دیدگاه بهتری درباره فاصله‌های ژنتیکی بین نمونه‌ها و مشاهده فاصله‌های ژنتیکی بین آنها به شکل چندبعدی و تکمیل نتایج روش تجزیه کلاستر، تجزیه به مؤلفه‌های اصلی برای دو نشانگر RAPD و ISSR به شکل توأم انجام شد. مؤلفه اصلی اول ۱۴/۹۳ درصد، مؤلفه اصلی دوم ۱۰/۲۴ درصد و مؤلفه اصلی سوم ۹/۱۳ درصد تغییرات ژنتیکی را توجیه کردند. پلات دویبعدی و سه‌بعدی حاصل از تغییرات ژنتیکی شناسایی شده با نشانگرها نیز رسم شد (شکل‌های ۵ و ۶). با توجه به اینکه سه مؤلفه اول در مجموع ۳۴/۳ درصد کل تغییرات را توجیه کردند و نتایج تجزیه به مؤلفه‌های اصلی در پلات‌های دویبعدی و سه‌بعدی با نتایج تجزیه خوشه‌ای یکسان نشدند، انتخاب نشانگرها برای بررسی تنوع ژنتیکی مناسب است و در مقایسه این روش‌ها، روش تجزیه خوشه‌ای توصیه می‌شود.



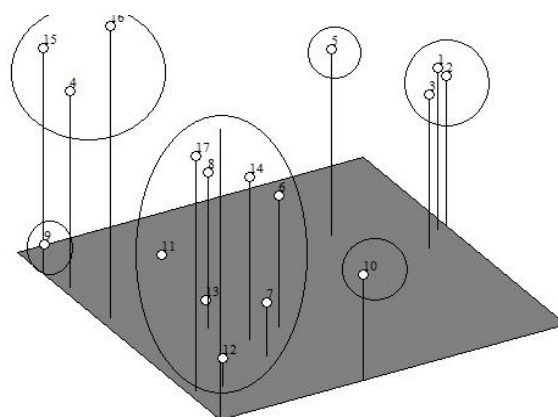
شکل ۵- پلات دویبعدی حاصل از تجزیه به مؤلفه‌های اصلی ۱۷ ژنوتیپ باکتریایی با نشانگرهای RAPD و ISSR

به ترتیب برای سولفات کادمیوم و سولفات مس در فاصله ژنتیکی نزدیکی با سه باکتری A_2 ، A_4 و A_6 قرار گرفت که کارایی زیاد نشانگرها را در دسته‌بندی ژنوتیپ‌ها بر اساس مقادیر MIC نشان می‌دهد. جنس‌های سودوموناس، آکالیژنز و آسیتوباکتر در گروه اول هر سه دندروگرام رسم شده قرار گرفتند که باکتری‌های جدا شده از دو مکان متفاوت کارخانه مس سرچشمه رفسنجان (A) و کارخانه‌های کک‌سازی زرنند (C) بودند؛ MIC آنها برای سولفات کادمیوم بین ۴/۵ تا ۶/۵ میلی مولار بر لیتر و برای سولفات مس بین ۶ تا ۸ میلی مولار بر لیتر بود که دسته‌بندی جنس‌های مختلف در یک گروه بر اساس تشابه مقادیر MIC آنها را نشان می‌دهد.

باکتری‌های ۴ و ۸ (A_8 و C_3) از جنس‌های آکالیژنز و آکروموباکتر با MIC بیش از ۶ میلی مولار بر لیتر برای سولفات کادمیوم و بیش از ۸ میلی مولار بر لیتر برای سولفات مس مقاوم‌ترین ژنوتیپ‌ها نسبت به سولفات مس و سولفات کادمیوم بودند و در یک گروه دسته‌بندی شدند. باکتری‌های ۱۶ و ۱۷ (E_4 و E_5) از جنس استنوتروفوموناس با کمترین مقادیر MIC برای سولفات کادمیوم و سولفات مس در یک گروه قرار گرفتند. باکتری ۱۴ (E_1) از جنس آسیتوباکتر با MIC برابر ۴/۳ میلی مولار بر لیتر برای سولفات مس و سولفات کادمیوم در فاصله ژنتیکی دورتری نسبت به سایر آسیتوباکترهای C_2 ، C_4 و C_5 با MIC بیش از ۶ میلی مولار بر لیتر برای سولفات کادمیوم و سولفات مس قرار گرفته است؛ این گروه‌بندی‌ها نشان می‌دهند تنوع ژنتیکی حاصل از نشانگرهای مولکولی با تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌ها بر اساس مقادیر MIC مطابقت به نسبت زیادی دارد. این گروه‌بندی‌ها در دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای ۱۷ ژنوتیپ باکتریایی با هر دو نشانگر RAPD و

حاضر، گروهی از باکتری‌ها شامل باکتری‌های گرم منفی غیر تخمیر کننده مقاوم به فلزهای مس و کادمیوم برای بررسی ژنتیکی و دسته‌بندی فیلوژنیک با نشانگرهای RAPD و ISSR از پساب پنج کارخانه صنعتی استان کرمان جداسازی شدند تا نقش ژن‌های مقاومت در طبقه‌بندی آنها بررسی شود. باکتری‌ها به پنج جنس *سودوموناس*، *آکالیژنز*، *آسینتوباکتر*، *آکرموباکتر* و *استنوتروفوموناس* تعلق داشتند.

حامید و همکاران از بافر SDS، NaCl، Tris HCl و EDTA و محلول فنل کلروفرم (روشی مشابه با روش CTAB) برای استخراج DNA باکتری‌های *سودوموناس* جداسازی شده از شیر استفاده کردند (۲۳). فاطیما و همکاران از روش مشابهی با روش هریک^{۳۳} و همکاران استفاده کردند؛ ترکیبات استفاده شده در این روش مشابه روش‌های CTAB و دلاپورتا بودند (۴۳). استفاده از نشانگرهای RAPD و ISSR، راه ساده‌ای برای بررسی سریع چندشکلی DNA است که با مقدار کم DNA نمونه انجام پذیر است و به اطلاعات درباره توالی DNA نیازی نیست (۲۳). رایار و همکاران به مقایسه کارایی نسبی دو نشانگر RAPD و ISSR در ارزیابی پلی مورفیسم DNA و تنوع ژنتیکی در گونه‌های *سودوموناس فلورسنت* پرداختند؛ به این شکل که پس از جداسازی ۱۷ باکتری از خاک‌های ریزوسفری اطراف ریشه گیاهان آلوده، DNA باکتری‌ها را استخراج و آنها را با ۲۵ نشانگر (۱۵ نشانگر RAPD و ۱۰ نشانگر ISSR) با روش PCR ارزیابی کردند. پس از تجزیه و تحلیل داده‌ها با نرم‌افزار NTSYS-pc (Ver 2.11) مشاهده کردند در نشانگرهای RAPD، ۱۴۷ باندها از ۲۲۲ باندها تشکیل شده چندشکلی (۶۳/۸۵ درصد) داشتند و ضریب تشابه ۰/۱۱ تا ۰/۷۳ بود و در نشانگرهای ISSR، ۱۰۵



شکل ۶- پلات سه‌بعدی حاصل از تجزیه به مؤلفه‌های اصلی ۱۷ ژنوتیپ باکتریایی با نشانگرهای RAPD و ISSR

بحث و نتیجه‌گیری.

امروزه، آلودگی ناشی از مناطق صنعتی مشکل جدی زیست‌محیطی محسوب می‌شود؛ زیرا سرعت ورود فاضلاب‌های صنعتی به محیط افزایش یافته است و بیشتر این پساب‌ها حاوی مواد سمی به‌ویژه فلزهای سنگین هستند (۳۹). کنترل آلودگی فلزهای سمی و سنگین مانند مس و کادمیوم از نگرانی‌های عمده کارشناسان محیط‌زیست و جوامع علمی است. ریزموجودات از جمله باکتری‌ها برای جذب زیستی فلزهای سنگین مطالعه شده‌اند (۴۰). گونه‌های متفاوتی از ریزموجودات مقاوم به فلزهای سنگین در پژوهش‌های انجام شده درباره خاک و پساب‌های آلوده در مناطق مختلف شناسایی شده‌اند که این عناصر را جذب و از محیط حذف می‌کنند. باکتری‌هایی از جنس‌های *سودوموناس*، *باسیلوس*، *آکالیژنز*، *کورینه‌باکتریوم*، *آکرموباکتر*، *آسینتوباکتر* و غیره نسبت به غلظت زیاد فلزهای سنگین از جمله مس و کادمیوم مقاومت زیادی دارند (۴۰-۴۲). با توجه به اهمیت ریزموجودات به‌ویژه باکتری‌ها برای حذف فلزهای سنگین از محیط‌زیست، جداسازی، شناسایی و طبقه‌بندی آنها ضروری است. در پژوهش

منحصر به فرد هر یک از نشانگرها به طور جداگانه و اینکه هر یک قسمت خاصی از ژنوم را هدف قرار می‌دهند (۲۲) و مطابقت زیاد تنوع ژنتیکی حاصل از نشانگرها در بررسی تجزیه کلاستر و دندروگرام رسم شده بر اساس هر دو نشانگر RAPD و ISSR با تنوع ژنتیکی بر اساس مقادیر MIC، استفاده توأم هر دو نوع نشانگر برای بررسی‌های ژنتیکی بهتر است و نتایج معتبرتری را در اختیار می‌گذارد.

راوی کومار^{۲۴} و همکاران به بررسی ویژگی‌ها و تعیین رابطه فیلوژنیک ۴۵ باکتری ویبریوکلرا بیماری‌زا و غیربیماری‌زای تهیه شده از مرکز بین‌المللی پژوهش‌های بیماری اسهال بنگلادش با استفاده از روش‌های ERIC-PCR^{۲۵} و ISSR-PCR پرداختند. بررسی آنها نشان داد دندروگرام رسم شده با استفاده از داده‌های ERIC-PCR شبیه داده‌های ISSR-PCR است و دسته‌بندی گونه‌های بیماری‌زا و غیربیماری‌زا در روش ISSR-PCR با دقت بیشتری انجام می‌شود؛ بنابراین، آنها روش ISSR-PCR را ابزار کارآمدی برای طبقه‌بندی فیلوژنیک ژنوم‌های پروکاریوت‌ها در تشخیص میکروب‌های بیماری‌زا معرفی کردند (۴۴). فاطیما و همکاران در بررسی تنوع ژنتیکی ۷ باکتری زانتوموناس از چهار گونه مختلف با استفاده از نشانگرهای RAPD و ISSR به طور جداگانه، درجه بالایی از چندشکلی را در هر نمونه گزارش کردند. آنها دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای ۷ ژنوتیپ را به روش UPGMA برای دو نشانگر RAPD و ISSR با هم رسم و سطح تنوع ژنتیکی را در محدوده ۰/۲۹/۲۹ تا ۰/۱۰۰ محاسبه کردند که بیشترین شباهت به دو گونه جدا شده از مکان‌های مختلف مربوط بود و ممکن است این شباهت به دلیل بیماری‌زایی آنها باشد. آنها در پژوهش خود نشان دادند دسته‌بندی ژنوتیپ‌های

باند از ۱۳۴ باند چندشکلی (۷۷/۹ درصد) داشتند و ضریب تشابه ۰/۳۸ تا ۰/۸۱ بود. تجزیه و تحلیل خوشه‌ای نشان داد هر دو نشانگر RAPD و ISSR به طور کارایی سطح بالای چندشکلی را بین ۱۷ نمونه سودوموناس مشخص می‌کنند و نشانگرهای ISSR کمی بهتر از RAPD هستند و ترکیبی از دو روش بهتر است و اطلاعات جامع‌تری از تجزیه و تحلیل ژنتیکی در اختیار قرار می‌دهد (۲۲). تفویضی و همکاران به بررسی تنوع ژنتیکی لاکتوباسیلوس‌های جدا شده از محصول‌های لبنی سنتی ایران با استفاده از نشانگرهای RAPD پرداختند. ۱۹ نشانگر از ۲۰ نشانگر استفاده شده در پژوهش آنها باندهای مناسب و قابل کدگذاری داشتند و تعداد کل باندها به وسیله کل نشانگرها ۲۲۵ عدد بود که ۲۱۹ باند چندشکل، ۶ باند مشترک و ۶۳ باند اختصاصی بودند. نتایج تجزیه و تحلیل داده‌ها با نرم‌افزار NTSYS-pc و ماتریس تشابه بر اساس ضریب جاکارد برای ژنوتیپ‌ها محاسبه شدند. دسته‌بندی سویه‌ها با روش‌های UPGMA و NJ انجام شد و نتایج یکسان و مشابهی از مقایسه دو روش حاصل شدند (۱۷). در پژوهش حاضر، برای ارزیابی نزدیکی ژنتیکی و تنوع زیستی باکتری‌های گرم منفی غیر تخمیر کننده مقاوم به فلزهای مس و کادمیوم جدا شده از پساب‌های صنعتی، از دو نشانگر RAPD و ISSR به طور جداگانه و توأم استفاده و ماتریس تشابه با استفاده از ضریب تشابه جاکارد به کمک نرم‌افزار NTSYS-pc محاسبه و دندروگرام با استفاده از روش UPGMA رسم شد. سطح بالای (۹۴/۷ درصد) چندشکلی مشاهده شده در نشانگرهای ISSR در مقایسه با نشانگرهای RAPD (۹۰/۵ درصد) کارایی بیشتر نشانگرهای ISSR را در بیان چندشکلی نشان می‌دهد؛ هر چند با توجه به کارایی نزدیک به هم و ویژگی‌های

- (2) Balkhair K.S., Ashraf MA. Field accumulation risks of heavy metals in soil and vegetable crop irrigated with sewage water in western region of Saudi Arabia. *Saudi Journal of Biological Sciences* 2016; 23(1): 32-44.
- (3) Meizhen T., Junfeng C., Yannan S., Yanru T., Yuling L. The absorption and scavenging ability of a bacillus in heavy metal contaminated soils (Pb, Zn and Cr). *African Journal of Environmental Science and Technology* 2014; 8(8): 476-481.
- (4) Dixit R., Wasiullah, Malaviya D., Pandiyan K., Singh UB., Sahu A., et al. Bioremediation of heavy metals from soil and aquatic environment: An overview of principles and criteria of fundamental processes. *Sustainability* 2015; 7(2): 2189-2212.
- (5) Simiary F., Nazemi A., Nasrolahi A. Isolation and molecular identification of nickel and cadmium resistant bacteria from Guilan industrial wastewater. *Biotechnological Journal of Environmental Microbiology* 2012; 6(2): 43-49.
- (6) Sharma B., Singh S., Siddiqi NJ. Biomedical implications of heavy metals induced imbalances in redox systems. *BioMed Research International* 2014; 2014: 640754.
- (7) Boisson J., Ruttens A., Mench M., Vangronsveld J. Evaluation of hydroxyapatite as a metal immobilizing soil additive for the remediation of polluted soils. Part 1. Influence of hydroxyapatite on metal exchangeability in soil, plant growth and plant metal accumulation. *Environmental Pollution* 1999; 104(2): 225-233.
- (8) Malik A. Metal bioremediation through growing cells. *Environment International*. 2004; 30(4): 261-278.
- (9) Ahmady-Asbchin S., Andres Y., Gerente C., Cloirec PL. Biosorption of Cu(II) from aqueous solution by *Fucus serratus*: surface characterization and sorption mechanisms. *Bioresource Technology* 2008; 99(14): 6150-6155.

زانتوموناس با استفاده از نشانگرهای RAPD و ISSR به طور عمده بر اساس معیارهای بیماری‌زایی و نه توزیع جغرافیایی آنها انجام می‌شود (۴۳). در پژوهش حاضر نیز دسته‌بندی ژنوتیپ‌ها با استفاده از نشانگرهای RAPD و ISSR به طور عمده بر اساس مقاومت آنها نسبت به فلزهای مس و کادمیوم انجام شد و ژنوتیپ‌هایی در یک گروه قرار گرفتند که مقاومت یکسان داشتند (حتی از جنس‌های مختلف و جدا شده از مکان‌های مختلف)؛ علاوه بر این، زیاد بودن چندشکلی بین باکتری‌های گرم منفی غیر تخمیرکننده مقاوم به فلزهای مس و کادمیوم، تنوع ژنتیکی زیاد این باکتری‌ها را نشان می‌دهد. قرارگیری باکتری‌های مقاوم و دارای MIC مشابه در کنار هم نیز قابلیت این نشانگرها در بررسی نزدیکی ژنتیکی نمونه‌ها با توجه به ژن‌های مقاومت و کارایی استفاده از این روش برای دسته‌بندی سایر باکتری‌های جدا شده و مقاوم به فلزهای سنگین را نشان می‌دهد تا با دسته‌بندی آنها، زمینه مناسبی برای بررسی‌های ژنتیکی و انجام فرایندهای شناسایی و انتقال ژن‌های مقاومت فراهم شود.

سپاسگزاری

نویسندگان مقاله از کارشناسان بخش آزمایشگاه زیست‌فناوری دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته کرمان، سرکار خانم فرهنگدوست و سرکار خانم کیانی و همکاری صمیمانه سرکار خانم افروشته در انجام مراحل پژوهش حاضر تشکر می‌کنند.

References

- (1) Wu B., Wang G., Wu J., Fu Q., Liu C. Sources of heavy metals in surface sediments and an ecological risk assessment from two adjacent plateau reservoirs. *PLoS ONE* 2014; 9(7): e102101.

- (10) Vijayaraghavan K., Yun YS. Bacterial biosorbents and biosorption. *Biotechnology Advances* 2008; 26(3): 266-291.
- (11) Sud D., Mahajan G., Kaur MP. Agricultural waste material as potential adsorbent for sequestering heavy metal ions from aqueous solutions- a review. *Bioresource Technology* 2008; 99(14): 6017-6027.
- (12) Abou-Shanab RA., van Berkum P., Angle JS. Heavy metal resistance and genotypic analysis of metal resistance genes in gram-positive and gram-negative bacteria present in Ni-rich serpentine soil and in the rhizosphere of *Alyssum murale*. *Chemosphere* 2007; 68(2): 360-367.
- (13) Rengaraj S., Moon SH., Sivabalan R., Arabindoo B., Murugesan V. Removal of phenol from aqueous solution and resin manufacturing industry wastewater using an agricultural waste: rubber seed coat. *Journal of Hazardous Materials* 2002; 89(2-3): 185-196.
- (14) Sari A., Tuzen M. Biosorption of cadmium (II) from aqueous solution by red algae (*Ceramium virgatum*): Equilibrium, kinetic and thermodynamic studies. *Journal of Hazardous Materials* 2008; 157: 448-454.
- (15) Zhang Y., Liu W., Xu M., Zheng F., Zhao M. Study of the mechanisms of Cu^{2+} biosorption by ethanol/caustic-pretreated baker's yeast biomass. *Journal of Hazardous Materials* 2010; 178(1-3): 1085-1093.
- (16) Zhang X., Su H., Tan T., Xiao G. Study of thermodynamics and dynamics of removing $Cu(II)$ by biosorption membrane of *Penicillium* biomass. *Journal of Hazardous Materials* 2011; 193:1-9.
- (17) Tafvizi F., Tajabadi ebrahimi M., Heydari Nasrabadi M., Bahrami H. Detection of genetic diversity of lactobacillus species isolated from different traditional dairy products by RAPD markers. *New Cellular and Molecular Biotechnology Journal* 2011; 1(3): 33-42.
- (18) Tannock GW. Studies of the intestinal microflora: A prerequisite for the development of probiotics. *International Dairy Journal* 1998; 8(5-6): 527-533.
- (19) Sauer S., Freiwald A., Maier T., Kube M., Reinhardt R., Kostrzewa M., et al. Classification and identification of bacteria by mass spectrometry and computational analysis. *PLoS ONE* 2008; 3(7): e2843.
- (20) Tymon AM., Pell JK. ISSR, ERIC and RAPD techniques to detect genetic diversity in the aphid pathogen *Pandora neoaphidis*. *Mycological Research* 2005; 109(3): 285-293.
- (21) Williams JG., Hanafey MK., Rafalski JA., Tingey SV. Genetic analysis using random amplified polymorphic DNA markers. *Methods in Enzymology* 1993; 218: 704-740.
- (22) Rayar JK., Arif M., Singh US. Relative efficiency of RAPD and ISSR markers in assessment of DNA polymorphism and genetic diversity among *Pseudomonas* strains. *African Journal of Biotechnology* 2015; 14(13): 1097-1106.
- (23) Hameed AM., Malla S., Kumar RS. Molecular characterization of *Pseudomonas* sp. isolated from milk samples by using RAPD-PCR. *European Journal of Experimental Biology* 2014; 4(4): 78-84.
- (24) Berardesco G., Dyhrman S., Gallagher E., Shiaris MP. Spatial and temporal variation of phenanthrene-degrading bacteria in intertidal sediments. *Applied and Environmental Microbiology* 1998; 64(7): 2560-2565.
- (25) Ansari MI., Malik A. Biosorption of nickel and cadmium by metal resistant bacterial isolates from agricultural soil irrigated with industrial wastewater. *Bioresource Technology* 2007; 98(16): 3149-3153.
- (26) Andrezza R., Pieniz S., Okeke BC., Camargo FAO. Evaluation of copper resistant bacteria from vineyard soils and mining waste for copper biosorption. *Brazilian Journal of Microbiology* 2011; 42: 66-74.

- (27) Shakoori AR., Muneer B. Copper-resistant bacteria from industrial effluents and their role in remediation of heavy metals in wastewater. *Folia Microbiologica* 2002; 47(1): 43-50.
- (28) Orell Á., Remonsellez F., Arancibia R., Jerez Guevara C. Molecular characterization of copper and cadmium resistance determinants in the biomining thermoacidophilic archaeon *Sulfolobus metallicus*. *Archaea* 2013; 2013: 1-16.
- (29) Chauhan M., Solanki M. Isolation of cadmium resistant bacteria for environmental clean-up. *International Journal of Pharmaceutical Research (IJPR)* 2015; 7(4): 29-33.
- (30) Goodfellow M., Kämpfer P., Busse HJ., Trujillo ME., Suzuki KI., Ludwig W., et al. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2nd ed. USA: Springer; 2012.
- (31) Kafilzadeh F., Moghtaderi Y., Rezaeian Jahromi A. Isolation and identification of cadmium-resistant bacteria in Soltan Abad river sediments and determination of tolerance of bacteria through MIC and MBC. *European Journal of Experimental Biology* 2013; 3(5): 268-273.
- (32) Khan Z., Nisar MA., Hussain SZ., Arshad MN. Cadmium resistance mechanism in *Escherichia coli* P4 and its potential use to bioremediate environmental cadmium. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2015; 99(24): 10745-10757.
- (33) Wilson K. Preparation of genomic DNA from bacteria. *Current Protocols in Molecular Biology* Chapter 2: Unit 2.4. 2001.
- (34) Doyle J. DNA protocols for plants In: Hewitt GM., Johnston AWB., Young JPW., editors. *Molecular Techniques in Taxonomy*. Berlin, Heidelberg: Springer; 1991: 283-293.
- (35) Weigel D., Glazebrook J. Dellaporta miniprep for plant DNA isolation. *Cold Spring Harbor Protocols* 2009; 2009(3): pdb.prot5178.
- (36) Dellaporta SL., Wood J., Hicks JB. A plant DNA miniprep: Version II. *Plant Molecular Biology Reporter* 1983; 1(4): 19-21.
- (37) Arjmand Qahestani R., Tavassolian I., Mohammadi Nezhad Q. Evaluation of genetic diversity in 25 Iranian pistachio genotypes using ISSR markers. *Journal of Agricultural Biotechnology*. 2015; 7(3): 1-18.
- (38) Jaccard P. New research on the floral distribution. *Bulletin de la Société vaudoise des sciences naturelles* 1908; 44: 223-270.
- (39) Vieira RH., Volesky B. Biosorption: a solution to pollution? *International microbiology: the official journal of the Spanish Society for Microbiology* 2000; 3(1): 17-24.
- (40) Hassan SH., Abskharon RN., El-Rab SM., Shoreit AA. Isolation, characterization of heavy metal resistant strain of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from polluted sites in Assiut city, Egypt. *Journal of Basic Microbiology* 2008; 48(3): 168-176.
- (41) Naz N., Young HK., Ahmed N., Gadd GM. Cadmium accumulation and DNA homology with metal resistance genes in sulfate-reducing bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 2005; 71(8): 4610-4618.
- (42) Shakeri S., Yaghoobi MM., Rabbani Khorasgani M., Soltani Nezhad S. Isolation of Zinc Oxide (ZnO) nanoparticles resistant *Pseudomonas* strains from soil and investigation of Zinc resistance genes. *Biological Journal of Microorganism* 2014; 3(11): 99-108.
- (43) Fatima S., Bajwa R., Anjum T., Saleem Z. Assessment of genetic diversity among different indigenous *Xanthomonas* isolates via RAPD and ISSR. *Archives of Biological Sciences* 2012; 64(1): 307-319.
- (44) Ravi Kumar A., Sathish V., Balakrish Nair G., Nagaraju J. Genetic characterization of *Vibrio cholerae* strains by inter simple sequence repeat-PCR. *FEMS Microbiology Letters* 2007; 272(2): 251-258.

- 1- Bio-sorption
- 2- Plasmid profiling
- 3- Protein profiling
- 4- Random Amplified Polymorphic DNA
- 5- Inter Simple Sequence Repeats
- 6- Microsoft Office Excel
- 7- Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System
- 8- Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean
- 9- Neighbor Joining
- 10- Rayar
- 11- Hameed
- 12- Cetrimide agar
- 13- Cetyl trimethylammonium bromide
- 14- Minimum Inhibitory Concentration
- 15- Grab sampling
- 16- $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
- 17- $\text{CdSO}_4 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$
- 18- Bergey's Manual of Systematic Bacteriology
- 19- Dellaporta
- 20- Polymerase Chain Reaction
- 21- Macrogen
- 22- Eppendorf Mastercycler gradient
- 23- Herrick
- 24- Ravi Kumar
- 25- Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus PCR