

فصلنامه علمی - پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها
سال سوم، شماره ۱۱، پاییز ۱۳۹۳، صفحه ۹۹-۱۰۸
تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۰۵/۰۷ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۰۹/۱۹

جداسازی سودوموناس‌های مقاوم به نانو اکسید روی از خاک و بررسی ژن‌های دخیل در مقاومت

شهلا سلطانی نژاد: دکتری میکروبیولوژی، دانشگاه اصمغان، اهر، ایران، shahlasoltani56@gmail.com
محمد ربانی خوراسگانی*: دانشیار میکروبیولوژی، دانشگاه اصمغان، اهر، ایران، m.rabbani@biol.ui.ac.ir
محمد مهدی یعقوبی**: استادیار ژنتیک مولکولی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته کرمان، ایران، yaghoobim@icst.ac.ir
شهریار شاکری**: استادیار میکروبیولوژی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته کرمان، ایران، shahryar.shkeri@yahoo.com

چکیده

مقدمه: نانو ذرات اکسید روی به طور وسیع در صنعت، لوازم آرایشی، بهداشتی و پزشکی استفاده می‌شوند. بررسی‌های زیادی بر روی فعالیت ضد میکروبی نانو ذرات متمرکز انجام شده است، اما اطلاعات اندکی در مورد مقاومت باکتری‌ها در برابر آن‌ها در دسترس است.

مواد و روش‌ها: جدایه‌های سودوموناس مقاوم به نانو اکسید روی از نمونه‌های خاک جمع‌آوری شده از مناطق مختلف از جمله معدن مس سرچشمه کرمان جداسازی شد. جدایه انتخاب شده به وسیله تحلیل توالی ژن *16S rRNA* شناسایی شد. اثر نانو ذرات اکسید روی بر روی سرعت رشد باکتری بررسی شد. یون‌های محلول روی آزاد شده از نانو ذرات اکسید روی به وسیله اسپکتروفتومتری جذب اتمی اندازه‌گیری شد. بخشی از توالی ژن مقاوم به روی (*czcC*) تکثیر شده و به وسیله تحلیل فیلوژنتیکی توالی پروتئین آن شناسایی شد.

نتایج: تحلیل فیلوژنتیکی بر اساس توالی ژن *16S rRNA* نشان داد که جدایه انتخاب شده *Pseudomonas sp. ZnO-2* است. الگوی رشد جدایه انتخاب شده در حضور تمام غلظت‌های نانو اکسید روی مورد بررسی، مشابه نمونه کنترل (کشت فاقد نانو ذرات) بود که نشان می‌دهد نانو ذرات اکسید روی رشد جدایه جداسازی شده را تحت تاثیر قرار نداده است. PCR ژن *czcC* و الکتروفورز نشان داد که *Pseudomonas sp. ZnO-2* دارای این ژن است.

بحث و نتیجه‌گیری: در طی فرآیند تکامل، میکروارگانیسم‌ها مکانیسم‌های مقاومت به فلزات خود را برای سازگاری با محیط‌های مختلف بهبود می‌بخشند. وجود ژن *czcC* به وسیله PCR تایید شد که شباهت زیادی با ژن‌های مقاوم به روی در باکتری‌های دیگر نشان می‌دهد.

واژه‌های کلیدی: نانو ذرات اکسید روی، فلزات سنگین، مقاومت، سودوموناس

* نویسنده مسؤول مکاتبات

** پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی

مقدمه

نانو ذرات اکسید فلزی در مقیاس وسیع برای کاربردهای صنعتی و مصارف خانگی تولید می‌شوند. تولید و استفاده زیاد از این نانو ذرات، خطر آلودگی‌های محیطی را افزایش داده و آلودگی خاک، باکتری‌های محیطی را تحت تاثیر قرار خواهد داد (۱). نانو ذرات اکسید روی (ZnO) در صنایع الکترونیک، نساجی، لوازم آرایشی، اسپری‌ها، پلاستیک، رنگ‌ها، فیلم‌های محافظ اشعه ماورا بنفش، حسگرهای شیمیایی و بسته بندی مواد غذایی استفاده می‌شوند (۱، ۲ و ۳). این نانو ذرات فعالیت ضد میکروبی قوی بر علیه باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی به‌ویژه عوامل بیماری‌زای غذایی مهم مثل اشریشیا کولای^۱ (O157:H7)، لیستریا منوسیتوزنز^۲، سالمونلا^۳ و استافیلوکوکوس اورئوس^۴ دارد (۴ و ۵). بررسی‌ها نشان داده که ذرات نانو نسبت به یون‌های فلزی سمیت سلولی بالاتری دارند، زیرا امکان نفوذ آن‌ها به درون غشای سلولی و رهاسازی یون‌های فلزی در درون سلول بیشتر است (۶). سودوموناس جنسی از گاما پروتئوباکترهاست. باکتری گرم منفی، میله‌ای، هوازی، بدون اسپور، متحرک با تاژک قطبی، اکسیداز و کاتالاز مثبت است (۷ و ۸). این جنس شامل گونه‌هایی با عملکردهای اکولوژیکی، اقتصادی و پزشکی است که برخی اعضای آن قادرند مواد شیمیایی آلوده کننده را در محیط متابولیزه کنند. در نتیجه می‌توانند در تجزیه زیستی^۵ استفاده شوند (۹). در حالی که فعالیت ضد میکروبی نانو ذرات به فراوانی بررسی شده اما اطلاعات اندکی در مورد مکانیسم مقاومت باکتری‌ها در برابر این ذرات وجود دارد. بر این اساس هدف از این پژوهش، جداسازی و غربال‌گری جدایه‌های سودوموناس مقاوم به نانو اکسید روی از خاک و شناسایی ژن‌های دخیل در مقاومت است.

مواد و روش‌ها

جمع آوری نمونه

نمونه‌های خاک (حدود ۱۰۰ گرم از هر نمونه) از مناطق مختلف از جمله معدن مس سرچشمه، مجتمع مس شهید باهنر و محوطه تصفیه خانه آب و پساب کرمان، از عمق ۲۰ سانتی‌متری در فلاسک‌های استریل جمع آوری و برای مطالعات بیشتر در ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند (۱۰).

تهیه محلول ذخیره^۶ نانو اکسید روی (ZnO)

نانو ذرات پودری اکسید روی (سیگما، آمریکا) با درجه خلوص بیشتر از ۹۹ درصد، اندازه ۳۵ تا ۴۵ نانومتر، رنگ سفید شیری و تقریباً کروی شکل استفاده شد. این نانو ذرات به وسیله XRD^۸ تحلیل شدند. محلول ذخیره به وسیله سوسپانسیون نمودن نانو ذرات در آب دو بار تقطیر استریل برای تهیه غلظت نهایی ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر فراهم شد. این سوسپانسیون به مدت ۳۰ دقیقه با 30 w اولتراسونیک شده تا این که سوسپانسیون کلوییدی یکنواختی فراهم شد (۱۱ و ۱۲). این محلول در ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

غنی‌سازی و جداسازی سوبه‌های سودوموناس از خاک

یک گرم از هر نمونه خاک در ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل سوسپانسیون شده، یک دقیقه ورتکس شد. این سوسپانسیون در ۲۰۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شده، ۰/۱ میلی‌لیتر از سوپرناتانت رقیق شده به پتری دیش‌های استریل حاوی محیط PIA^۹ دارای غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از ZnO اضافه شد. محیط‌ها به مدت ۷۲ ساعت در ۳۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. کلونی‌های مجزا بر روی محیط انتخابی PIA کشت مجدد داده شده تا کشت خالص و یک دستی از هر کلونی فراهم شود (۱۳).

غربال گری سودوموناس‌های مقاوم به ZnO

برای جداسازی جدایه‌های مقاوم، نمونه‌ها بر روی محیط PIA دارای غلظت‌های مختلف ZnO (۱۰۰ تا ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) غربال شدند. کشت‌ها ۳ تا ۵ روز در ۳۰ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند. تمام آزمایش‌ها با سه تکرار انجام شد.

سنجش سرعت رشد باکتری در حضور غلظت‌های مختلف ZnO

به منظور بررسی اثر نانو ذرات اکسید روی بر سرعت رشد باکتری، غلظت‌های مختلف آن (۱۰۰ تا ۴۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) استفاده شد. فلاسک‌های استریل دارای ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت آبگوشت LB به مدت ۳۰ دقیقه پس از اضافه نمودن ZnO اولتراسونیک (Tecna 6، ایتالیا) شد. فلاسک‌ها با حدود 10^5 CFU بر میلی‌لیتر از کشت تازه باکتری تلقیح شده و در ۳۰ درجه سانتی‌گراد با دور ۲۰۰ rpm گرمخانه‌گذاری شدند. میزان رشد باکتری با اندازه‌گیری جذب نوری در نانومتر ۶۰۰ اندازه‌گیری شد. نمونه کنترل مثبت شامل (فلاسک دارای محیط کشت و نانو ذرات، بدون تلقیح باکتری) و نمونه کنترل منفی شامل (فلاسک دارای محیط کشت و باکتری، بدون نانو ذرات) است (۱۴).

تعیین بیشترین غلظت قابل تحمل^{۱۰} MTC نانو اکسید روی

برای تعیین MTC نانو اکسید روی، جدایه مورد نظر بر روی محیط MHA^{۱۱} دارای غلظت‌های مختلف نانو اکسید (۱۰۰ تا ۹۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) کشت داده شده و رشد آن پس از گذشت ۴۸ ساعت در ۳۰ درجه سانتی‌گراد بررسی شد. MTC بالاترین غلظتی از نانو اکسید است که اجازه رشد پس از ۴۸ ساعت گرمخانه‌گذاری در ۳۰ درجه سانتی‌گراد را می‌دهد (۱۵).

اندازه‌گیری رهاسازی یون‌های روی از ZnO

سوسپانسیون تازه ای از ZnO با غلظت‌های ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر فراهم شده، اسیدیته آن ۶ و ۷ تنظیم شد. این سوسپانسیون به مدت یک ساعت به ملایمت تکان داده شده، سپس ۳۰ دقیقه در ۱۵۰۰۰g سانتریفیوژ شد. مایع رویی جمع‌آوری شده، دوباره به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. غلظت یون روی محلول در مایع رویی ثانویه به وسیله اسپکتروفتومتری جذب اتمی (Varian SpectraAA 220، استرالیا) اندازه‌گیری شد (۱۵). آزمایش با سه تکرار انجام شد.

شناسایی جدایه‌های باکتریایی**تکثیر ژن 16S rRNA و تحلیل الکتروفورزی**

DNA ژنومی باکتری مورد نظر با استفاده از کیت استخراج DNA (سینازن با شماره کاتالوگ DN8115 C) استخراج شد. دو پرایمر مورد استفاده برای تکثیر ژن 16S rRNA عبارتند از: 8F با توالی 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' و 1541 R با توالی:

3'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-5' (۱۶)

برنامه PCR با ۳۰ سیکل تکثیر در دستگاه ترموسایکلر به این شکل انجام شد: جداسازی اولیه دو رشته در دمای ۹۴ درجه به مدت ۵ دقیقه، باز شدن دو رشته در دمای ۹۴ درجه به مدت ۱ دقیقه، اتصال پرایمرها در دمای ۵۶ درجه به مدت ۱ دقیقه، طولیل شدن رشته هدف در ۷۲ درجه به مدت ۲ دقیقه و مرحله طولیل شدن نهایی در دمای ۷۲ درجه به مدت ۱۰ دقیقه. محصول PCR به وسیله الکتروفورز روی ژل آگاروز یک درصد (مرک، آلمان) جداسازی شده و به وسیله اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی شد. توالی ژن توسط شرکت بیونیر^{۱۲} کره جنوبی تعیین شد. این توالی توسط نرم افزارهای مختلف از جمله Finch TV، BioEdit،

طویل شدن رشته هدف در ۷۲ درجه به مدت ۴۵ ثانیه و مرحله طویل شدن نهایی در دمای ۷۲ درجه به مدت ۵ دقیقه. محصول PCR با استفاده از ژل آگاروز ۱/۵ درصد و ولتاژ ۸۰ ولت با استفاده از بافر TBE بررسی شد. محصول PCR تعیین توالی شده و توالی نوکلئوتیدی آن با کمک سرور ExPASy به توالی پروتئین ترجمه شد. این توالی پروتئین به منظور شناسایی نزدیک‌ترین محصولات ژنی *czcC* بلاست شده و در نهایت، درخت فیلوژنی به روش Neighbor joining با استفاده از مدل دو شاخصی کیمورا^{۱۶} رسم شد (۲۱)

نتایج

تعیین ویژگی‌های ریخت‌شناسی نانو ذرات اکسید روی
 شکل ۱ الگوی XRD نانو ذرات اکسید روی را نشان می‌دهد که با داده‌های استاندارد که قبل گزارش شده (۲۲) همخوانی دارد و حالت کریستال بودن آن را تایید می‌کند.

Gene Runner و سایر... بررسی و تحلیل شد (۱۷). نتایج حاصل از BLAST توالی مورد نظر در سایت‌های NCBI^{۱۳} و EBI^{۱۴} بررسی شده و توسط نرم افزارهای CLC و MEGA5 تحلیل شد (۱۸-۲۰). درخت فیلوژنتیکی به روش Neighbor joining ترسیم شده، در نهایت، توالی ژن توسط نرم افزار sequin در بانک ژن با شماره دست یابی^{۱۵} JX441330 ثبت شد.

تکثیر بخشی از ژن مسئول مقاومت به روی (*czcC*)

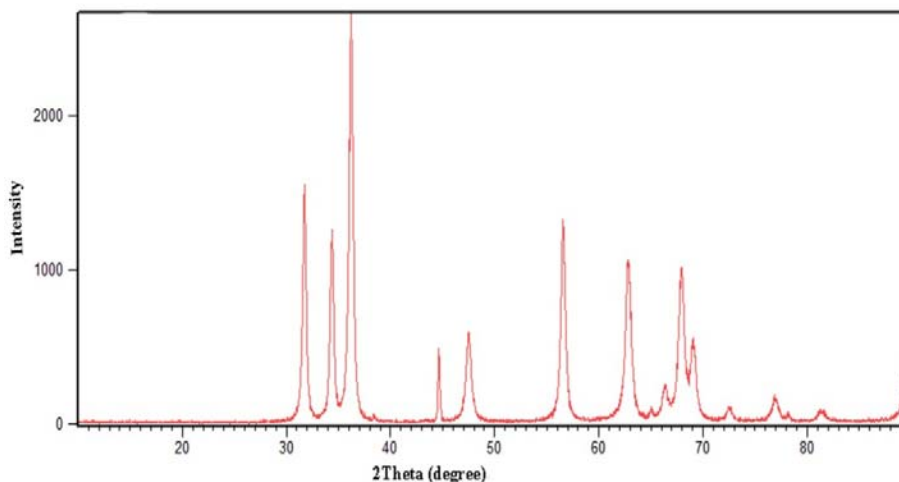
پس از استخراج DNA ژنومی، بخشی از ژن *czcC* به وسیله PCR تکثیر شد. پرایمرهای مورد استفاده عبارتند از: پرایمر رفت با توالی

5'-GATGACGTTGTTTCGATGG-3'

و پرایمر برگشت با توالی

5'-CGTCGAGGTAGGCAATCA-3'

برنامه PCR با ۳۵ سیکل تکثیر در دستگاه ترموسایکلر به این شکل انجام شد: جداسازی اولیه دو رشته در دمای ۹۴ درجه به مدت ۵ دقیقه، باز شدن دو رشته در دمای ۹۴ درجه به مدت ۴۵ ثانیه، اتصال پرایمرها در دمای ۵۶ درجه به مدت ۴۰ ثانیه،



شکل ۱- الگوی XRD نانو ذرات ZnO

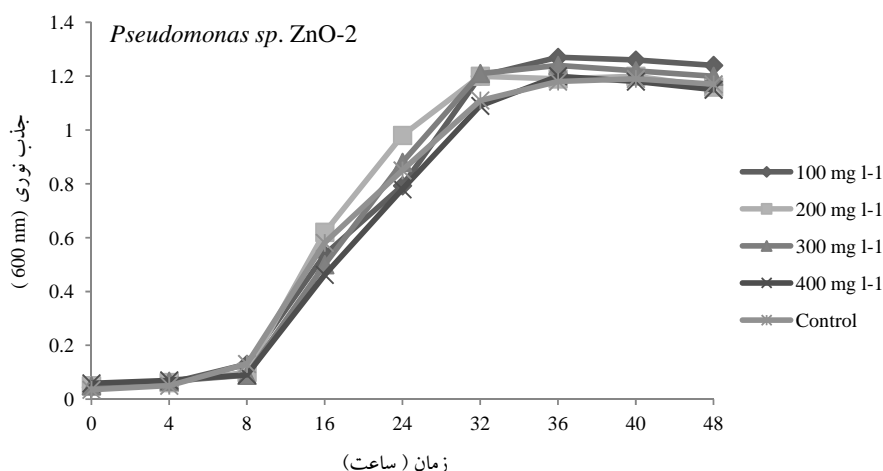
جداسازی و غربال‌گری سویه‌های مقاوم

در این پژوهش، ۵ جدایه مقاوم به نانو اکسید روی از خاک جداسازی شد. از میان آن‌ها، ۴ جدایه در محیط PIA دارای ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نانو اکسید روی و ۲ جدایه در محیط دارای ۳۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نانو اکسید روی رشد کردند. در نهایت، جدایه ZnO-2 (جداسازی شده از خاک معدن مس سرچشمه) بالاترین مقاومت را نسبت به نانو ذرات ZnO نشان داد که برای بررسی‌های بیشتر انتخاب شد.

بررسی منحنی رشد باکتری در حضور غلظت‌های

مختلف ZnO

شکل ۲ منحنی رشد جدایه *Pseudomonas sp.* ZnO-2 در حضور غلظت‌های مختلف نانو ذرات ZnO را نشان می‌دهد. الگوی رشد این باکتری در غلظت‌های مختلف ZnO مشابه نمونه کنترل (بدون نانو ذرات ZnO) است که نشان می‌دهد نانو ذرات رشد این باکتری را تحت تاثیر قرار نداده است.



شکل ۲- منحنی رشد *Pseudomonas sp.* ZnO-2 در حضور غلظت‌های مختلف نانو اکسید روی

تعیین MTC نانو ذرات روی

بررسی بالاترین غلظت قابل تحمل نانو ذرات اکسید روی در جدایه *Pseudomonas sp.* ZnO-2 نشان داد که این جدایه قادر به رشد در غلظت‌های بالا تا ۶۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نانو اکسید است.

رها سازی یون‌های محلول روی از نانو ذرات ZnO

میزان رها شدن یون روی از نانو ذرات ZnO در جدول ۱ نشان داده شده است. نتایج نشان می‌دهد که مقادیر در خور توجهی از یون‌های روی سریع در محیط رها می‌شوند. برای رها سازی یون‌های روی، بر هم کنش معنی‌داری بین غلظت و اسیدیته وجود دارد.

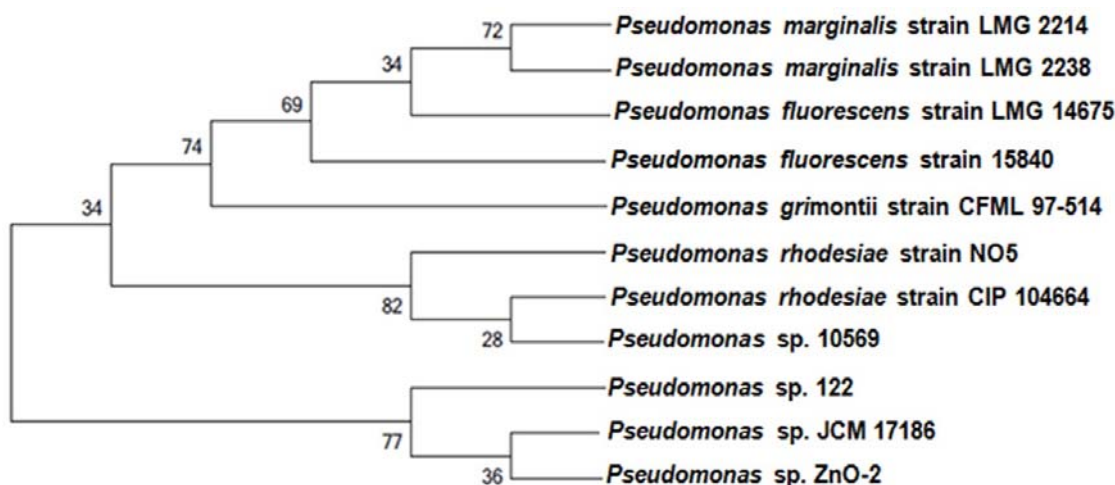
جدول ۱- رها سازی یون‌های محلول روی از سوسپانسیون ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر نانو ذرات ZnO

ماده	اسیدیته ۶		اسیدیته ۷	
	۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر	۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر	۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر	۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر
	یون محلول روی (میلی‌گرم بر لیتر)		یون محلول روی (میلی‌گرم بر لیتر)	
ZnO	۲۸/۲۵ ± ۰/۰۰۳	۱۸/۱۸ ± ۰/۰۰۳	۳۲/۰۰۲ ± ۰/۰۰۱	۲۰/۰۰۲ ± ۰/۰۰۳

تحلیل فیلوژنتیکی

وابستگی فیلوژنتیکی جدایه *Pseudomonas* sp. ZnO-2 به وسیله تحلیل توالی ژن *16S rRNA* مشخص شد. تحلیل فیلوژنی ژن *16S rRNA* روشی دقیق و سریع برای شناسایی موقعیت فیلوژنی باکتری هاست.

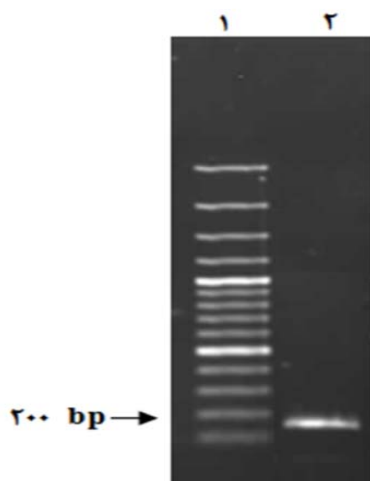
طول کامل این ژن (حدود ۱۵۰۰ جفت باز) تعیین توالی شده و درخت فیلوژنی رسم شد. شکل ۳ ارتباط فیلوژنتیکی این باکتری را با باکتری‌های دیگر نشان می‌دهد.



شکل ۳- درخت فیلوژنی رسم شده بر اساس توالی ژن *16S rRNA* که وابستگی جدایه *Pseudomonas* sp. ZnO-2 را با جدایه‌های دیگر نشان می‌دهد.

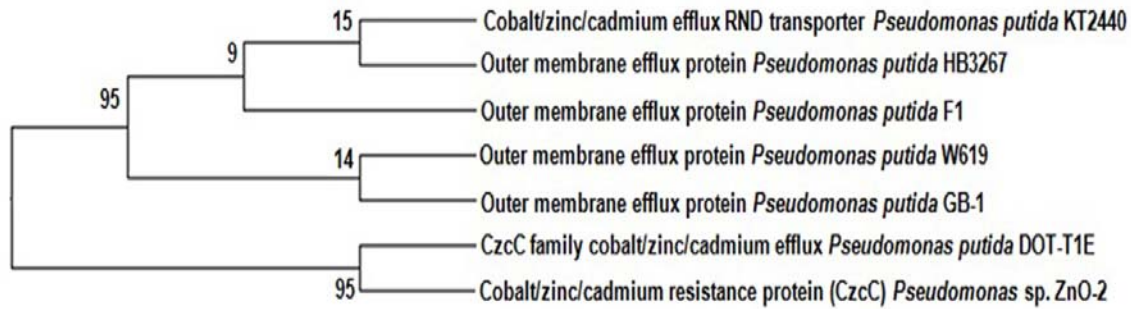
تحلیل فیلوژنتیکی ژن *czcC*

پرایمرهای استفاده شده برای تکثیر ژن *czcC* تقریباً یک باند ۱۵۰ جفت بازی را ایجاد کردند (شکل ۴). توالی نوکلئوتیدی به توالی پروتئین ترجمه شده و با توالی‌های پروتئین *CzcC* باکتری‌های دیگر مقاوم به روی هم تراز^{۱۷} شد. درخت فیلوژنی بر اساس توالی پروتئین *CzcC* رسم شد (شکل ۵). مقایسه توالی‌ها، تشابه زیادی با ژن مقاومت به روی در باکتری *Sordomonas putida* نشان داد.



شکل ۴- الکتروفورز ژل آگاروز محصول PCR ژن *czcC*

۱- نشانگر DNA ۲- ژن *czcC* جدایه *Pseudomonas* sp. ZnO-2



شکل ۵- درخت فیلوژنی رسم شده بر اساس پروتئین CzcC

بحث و نتیجه‌گیری

پژوهش هم‌خوانی دارد (۱). پژوهشگران زیادی نشان داده‌اند که رها شدن یونها از نانو ذرات به سمیت آنها کمک می‌کند (۱، ۲۴ و ۲۵). برای مثال چکل و همکاران^{۱۹} گزارش کردند که آزاد شدن یون روی از نانو ذرات ZnO به فعالیت ضد باکتریایی نانو اکسید روی کمک می‌کند (۲۶). همچنین، دیمکیا و همکاران نقش بیولوژیکی رها شدن یونها از ذرات نانو را نشان دادند به گونه‌ای که سمیت این ذرات هنگام استفاده از کلاته‌کننده‌های اختصاصی یونها از بین رفت (۱). بنابراین، با توجه به این نتایج ممکن است مکانیسم مقاومت به نانو ذرات روی نیز همان مکانیسم‌های مقاومت به فلز روی باشد.

تکثیر ژن دخیل در مقاومت

در طی فرآیند تکامل، میکروارگانیسم‌ها مکانیسم‌های مقاومت به فلزات خود را برای 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 کنند (۲۳). برای مثال، آنزیم‌های کد شده به وسیله ژن‌های مسوول مقاومت، عوامل ضد میکروبی را قبل از این که اثر گذار باشند، تخریب می‌کنند. همچنین، باکتری‌ها امکان دارد پمپ‌های انتشار به

آلودگی خاک با فلزات سنگین و ذرات نانو در حال گسترش است که به طور گسترده در نتیجه فعالیت‌های بشر مانند معدن کاوی، کشاورزی و صنعت اتفاق می‌افتد. معدن مس سرچشمه در جنوب غربی استان کرمان طی فعالیت خود در سال‌های متمادی باعث آلودگی خاک‌های سطحی با فلزات سنگین شده است. این آلودگی می‌تواند اثرات مهمی بر روی جمعیت میکروبی بومی داشته باشد. برای مثال فلزات سنگین و نانو ذرات می‌توانند ترکیب گونه‌ای و تولید مثل میکروبی را محدود کنند. همچنین، ممکن است فعالیت‌های میکروبی مثل تثبیت ازت را تحت تأثیر قرار دهند (۲۳). پژوهش حاضر، با هدف شناسایی جدایه‌های سودوموناس بومی که توانایی مقاومت در برابر نانو ذرات اکسید روی را داشته باشند، شروع شد. محیط‌های آلوده به فلزات سنگین منابع بالقوه‌ای برای جداسازی این باکتری‌های مقاوم هستند.

آزاد شدن یون روی از نانو ذرات ZnO

دیمکیا و همکاران^{۱۸} نشان دادند که رهاسازی یون‌های محلول از ZnO وابسته به اسیدیته و جرم است. به گونه‌ای که همچنان که غلظت افزایش پیدا می‌کند، میزان یون بیشتری آزاد می‌شود و یون‌های کمتری در اسیدیته ۷ نسبت به اسیدیته ۶ رها می‌شود که با نتایج این

References

- (1) Dimkpa CO, Alyssa C, Britt DW, McLean JE, Anderson AJ. Responses of a soil bacterium, *Pseudomonas chlororaphis* O6 to commercial metal oxide nanoparticles compared with responses to metal ions. *Environmental pollution*. 2011; 159: 1749-56 .
- (2) Mueller NC, Nowack B. Exposure modeling of engineered nanoparticles in the environment. *Environmental Science and Technology*. 2008; 42(12): 4447-53 .
- (3) Aruoja V, Dubourguier HC, Kasemets K, Kahru A. Toxicity of nanoparticles of CuO, ZnO and TiO₂ to microalgae *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Science of the Total environment*. 2009; 407 (4): 1461-68 .
- (4) Jones N, Ray B, Ranjit KT, Manna AC. Antibacterial activity of ZnO nanoparticle suspensions on a broad spectrum of microorganisms. *FEMS Microbiology Letters*. 2008; 279 (1): 71-76 .
- (5) Jin T, Sun D, Su JY, Zhang H, Sue HJ. Antimicrobial efficacy of zinc oxide quantum dots against *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enteritidis* and *Escherichia coli* O157:H7. *Journal of Food Science*. 2009; 74(1): M46-M52 .
- (6) Wu B, Huang R, Sahu M, Feng X, Biswas P, Tang YJ. Bacterial responses to Cu-doped TiO₂ nanoparticles. *Science of the Total Environment*. 2010; 408 (7): 1755-58 .
- (7) Krieg NR. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. 2nd ed. Baltimore: Williams & Wilkins; 1984.
- (8) Barnali S, Celin A, Joshi SR. *Pseudomonas*: A versatile bacterial group exhibiting dual resistance to metals and antibiotics. *African Journal of Microbiology Research*. 2010; 4 (25): 2828-35.

خارج^{۲۰} را کسب نمایند که عوامل ضد میکروبی را قبل از این که به محل هدف برسند، دفع کنند (۲۷). در این پژوهش، مقایسه توالی بخشی از پروتئین CzcC تشابه زیادی با باکتری‌های دیگر نشان داد. تحلیل درخت فیلوژنی CzcC نشان داد که *Pseudomonas sp. ZnO-2* شاخه فیلوژنتیکی با *Pseudomonas putida* DOT- T₁E تشکیل می‌دهد. بهترین مکانیسم مقاومت به روی سیستم czc است که مقاومت به کادمیوم، روی و کبالت را باعث می‌شود. این سیستم به عنوان آنتی‌پورتر کاتیون/پروتون پمپ کننده کاتیون‌ها به خارج سلول عمل می‌کند. CzcC یک پروتئین غشای خارجی است. CzcA و CzcB در فضای پری پلاسمی گسترده هستند و از رها شدن کاتیون‌های آزاد جلوگیری می‌کنند. CzcD در غشای سیتوپلاسمی قرار دارد (۲۸). با توجه به نتایج این پژوهش می‌توان نتیجه گرفت که خاک‌های آلوده به فلزات سنگین منابع بالقوه‌ای برای جداسازی جدایه‌های مقاوم به ذرات نانو هستند. از طرفی چون نانو ذرات اکسید فلزی مقدار در خور توجهی یون‌های فلزی محلول را در محیط آزاد می‌نمایند که به سمیت آن‌ها کمک می‌کند، می‌توان بیان کرد که ممکن است یکی از مکانیسم‌های مقاومت میکروارگانیسم‌ها در برابر ذرات نانو نیز همان مکانیسم‌های مقاومت در برابر فلزات باشد.

تشکر و قدردانی

از تمام افرادی که ما را در انجام این پژوهش یاری کردند، به‌ویژه مسوولین محترم آزمایشگاه بیوتکنولوژی پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته کرمان تشکر و قدردانی می‌شود.

- (9) Tanase AM, Trasca C, V assu T, Olteanu A, Pelinescu D, Csutka O, *et al.* Phylogenetic Analysis on 16S Ribosomal DNA of *Pseudomonas* Strains from Oil Polluted Soil. *Romanian Biotechnology Letters*. 2009; 14 (6): 4779-85 .
- (10) Sevgoli E, Corali G, Gizir AM, Sangun MK. Investigation of heavy metal resistance in some bacterial strains isolated from industrial soils. *Turkish Journal of Biology*. 2010; 34: 423-31 .
- (11) Ashutosh K, Alok KP, Shashi SS, Rishi S, Alok D. Cellular uptake and mutagenic potential of metal oxide nanoparticles in bacterial cells. *Chemosphere*. 2011; 83 (8): 1124-32 .
- (12) Yanping X, Yiping H, Peter LI, Tony J, Xianming S. Antibacterial activity and mechanism of action of Zinc Oxide nanoparticles against *Campylobacter jejuni*. *Applied and Environmental Microbiology*. 2011; 77 (7): 2325-31 .
- (13) Anyanwu CU, Nwachukwu ON. Heavy Metal Resistance in Bacteria Isolated from Contaminated and Uncontaminated Soils. *International Journal of Research in Chemistry and Environment*. 2011; 1(1): 173-8 .
- (14) Khan S, Mukherjee A, Chandrasekaran N. Silver nanoparticles tolerant bacteria from sewage. *Journal of Environmental Sciences*. 2011; 23 (2): 346-52 .
- (15) Margeay M, Nies D, Schlegel HG. *Alcaligenes eutrophus* CH34 is a facultative chemolithotroph with plasmid bound resistance to heavy metals. *Journal of Bacteriology*. 1985; 162: 328-34 .
- (16) Löffler FE, Sun Q, Li J, Tiedje JM. 16S rRNA Gene-Based Detection of Tetrachloroethene-Dechlorinating *Desulfuromonas* and *Dehalococcoides* Species. *Applied and Environmental Microbiology*. 2000; 66(4): 1369-74 .
- (17) Hall T. Bio Edit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*. 1999; 41: 95-98 .
- (18) 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. *Molecular Biology and Evolution*. 2011; 28 (10): 2731-2739 .
- (19) Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*. 1990; 215 (3): 403-10 .
- (20) Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*. 1985; 39 (4): 783-91 .
- (21) Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*. 1980; 16 (2): 111-20 .
- (22) Peng X, Palma Sh, Fisher NS, Wong SS. Effect of morphology of ZnO nanostructures on their toxicity to marine algae. *Aquatic Toxicology*. 2011; 102:186-96 .
- (23) 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. *Journal of Hazardous materials*. 2009; 162 (1): 50-6 .
- (24) Wu B, Wang Y, Lee YH, Horst A, Wang ZP, Chen DR, *et al.* Comparative ecotoxicities of nano-ZnO particles under aquatic and aerosol exposure modes. *Environmental Science and Technology*. 2010; 44: 1484- 9 .
- (25) Wang H, Wick RL, Xing B. Toxicity of nanoparticulate and bulk ZnO AL₂O₃ and TiO₂ to the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Environmental Pollution*. 2009; 157 (4): 1171- 7 .

- (26) Scheckel KG, Luxton TP, El-Badawy AM, Impellitteri CA, Tolaymat TM. Synchrotron speciation of silver and zinc oxide nanoparticles aged in a kaolin suspension. *Environmental Science and Technology*. 2010; 44 (4): 1307- 12 .
- (27) Fred CT. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *American Journal of Medicine*. 2006; 119 (6A): S3- S10 .
- (28) Choudhury R, Srivastava S. Zinc resistance mechanisms in bacteria. *Current Science*. 2001; 81(7): 7- 10 .

¹- *Escherichia coli* O157:H7

²- *Listeria monocytogenes*

³- *Salmonella*

⁴- *Staphylococcus aureus*

⁵- Bioremediation

⁶- Stock solution

⁷- Zinc Oxide Nanoparticles

⁸- X-ray diffraction analysis

(PANalytical XPert Pro Eindhoven, Netherlands)

⁹- *Pseudomonas* Isolation Agar

¹⁰- Maximum Tolerable Concentration

¹¹- Muller Hinton Agar

¹²- Bioneer

¹³- <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

¹⁴- <http://www.ebi.ac.uk>

¹⁵- Accession number

¹⁶- Kimura's two-parameter model

¹⁷- align

¹⁸- Dimkpa et al

¹⁹- Scheckel et al

²⁰- Efflux pumps

Isolation of Zinc Oxide (ZnO) nanoparticles resistant *Pseudomonas* strains from soil and investigation of Zinc resistance genes

Shahla Soltani Nezhad

Ph.D. of Microbiology, University of Isfahan, Iran, shahlasoltani56@gmail.com

Mohammad Rabbani Khorasgani*

Associate Professor of Microbiology, University of Isfahan, Iran, m.rabbani@biol.ui.ac.ir

Mohammad Mehdi Yaghoobi

Assistant Professor of Molecular Genetics, Institute of Science, High Technology and Environmental Sciences, Graduate University of Advanced Technology, Kerman, Iran, Yaghoobim@icst.ac.ir

Shahryar Shakeri

Assistant Professor of microbiology, Institute of Science, High Technology and Environmental Sciences, Graduate University of Advanced Technology, Kerman, Iran, Shahryar.shakeri@yahoo.com

Abstract

Introduction: The metal oxide nanoparticles of ZnO are widely used in industrial, cosmetic and medical applications. Many studies have focused on the antimicrobial activity of nanoparticles, but limited information on the resistance of bacteria to them is available.

Materials and methods: The ZnO nanoparticles resistant *Pseudomonas* strains were isolated from the collected soils from different areas such as Sarcheshmeh Copper mine in Kerman province of Iran. The selected strain was identified by *16 s rRNA* gene sequencing analysis. The effect of ZnO NPs on the bacterial growth kinetic was studied. Release of soluble Zinc ions from ZnO NPs were measured by an atomic absorption spectroscopy. The partial sequence of Zinc resistance gene *czcC* was amplified and identified by phylogenetic analysis of its protein sequences.

Results: Phylogenetic analysis based on the *16 s rRNA* gene sequence showed that the selected strain was *Pseudomonas* sp. ZnO-2. The growth pattern of selected strain with all studied ZnO NPs concentration was similar to that of control, indicating that ZnO NPs would not affect the growth of isolated strain. During dispersion a substantial amount of zinc ions was quickly released from ZnO NPs. PCR amplification of *czcC* gene and electrophoresis showed that *Pseudomonas* sp. ZnO-2 carried this gene.

Discussion and conclusion: Through the evolutionary process, microorganisms have improved their heavy metal resistance mechanisms to adapt to adverse environment. The existence of the *czcC* gene was confirmed by PCR and it showed high homology with Zinc resistance genes from other bacteria.

Key words: Zinc oxide nanoparticles, Heavy metal, Resistance, *Pseudomonas*

* Corresponding author

Received: July 29, 2013 / **Accepted:** December 10, 2013