Isolation and Identification of Resistant Bacteria to Heavy Metals in Sediments of Zayandehrood River

Kasra Kermanshahi, R-K. Assist. Prof., University of Isfahan, Faculty of Sciences
Ghazifard, A., Assist. Prof., University of Isfahan, Faculyt of Sciences
Tavakkoli, A., MSc., Azad University of Ghom

Abstract

Pollution of heavey metals from industrial, agricultural and municipal sources is a major environmental concern, since they are biologically toxic and are stable in the environment. As a results, heavy metals adsorb to soils and sediments and microorganisms gradually get exposed to them and become resistant. In this research seven soil and sediment samples from the margin of Zayandehrood river and four metals of lead, copper, cadmium and aresnic were studied. Twenty seven species of bacteria resistant to metals were also isolated. These genuses include: Bacillus, Staphylococcus, Kurthia, Corynebacterium, Lactobacillus and Arcanobacterium. During this research, bacteria's resistance to metal and their absorption affinity were evaluated. The results indicated that the location of sampling point along the river due to the contact with polluted water has some effect on percent of resistant microorganisms, and on microbial tolerance to heavy metals.

Water & Wastewater

جداسازی و شناسایی باکتری‌های مقاوم به فلزات سنگین در رسوبات حاشیهٔ زاینده رود

روحا - کسری کرمانشاهی * اکبر قاضی‌فرد ** آرزو توکلی ***

چکیده

آلودگی فلزات سنگین که ناشی از منابع شهری، صنعتی و کشاورزی است به عنوان یک مسئله عمده زیست‌محیطی محسوب می‌گردد، زیرا این فلزات از نظر بیولوژیکی سمی بوده و به صورت پایدار در محیط باقی می‌مانند. در نتیجه، فلزات سنگین جذب خاک و رسوبات شده و به تدریج میکروارگانیسم‌هایی که در معرض فلزات قرار دارند نسبت به آنها مقاوم می‌شوند.

در این تحقیق ۷ نمونه خاک و رسوب از حاشیه زاینده‌رود برای چهار فلز سرب، مس، کادمیم و ارسنیک مطالعه شده است. بیست و هفت گونه از باکتری‌های مقاوم به فلزات جدا گردیده که جنس آنها شامل: باسیلوس، استافیلوکوکوس، کورتیا، کورینه باکتریوم، لاکتوباسیلوس و وارکانوباکتریوم می‌باشد.

در خلال این مطالعه، میزان حداقل غلظت باز دارنده از رشد باکتری‌های مقاوم به فلزات و توانایی جذب آنها مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج دلالت بر این مسئله دارد که محل‌های نمونه‌برداری در طول رودخانه، که در تماس با آب آلوده می‌باشند تا حدودی بر درصد میکروارگانیسم‌های مقاوم و تحمل میکروبی آنها نسبت به فلزات سنگین مؤثر هستند.

مقدمه

با توجه به گسترش و پیشرفت روزافزون فن‌آوری، فعالیت‌های صنعتی متنوع و پساب‌های صنعتی و انسانی، سلامت محیط‌زیست به طور جدی تحت تأثیر قرارگرفته است. فلزات سنگین نیز از مواردی است که با توسعه صنایع، محیط زیست را با خطرات فراوانی مواجه ساخته است. ترکیبات حاوی فلز در اثر فرایندهای مختلف صنعتی وارد محیط می‌شوند و به اشکال مختلف برای مدت طولانی در طبیعت باقی می‌مانند [۲، ۳، ۹، ۱۰، ۱۳]. اگر چه فلزات سنگین در غلظت کم برای رشد سلولی و فعالیت‌های متابولیکی ضروری هستند اما در غلظت‌های بالا و خارج از حد مجاز سبب ممانعت بسیاری از واکنش‌های بیولوژیکی می‌شوند [۸]. اگرچه بسیاری از باکتری‌ها می‌توانند غلظت‌های سمی فلزات را تحمل کنند اما این مقاومت ممکن است ناشی از فاکتورهای ژنتیکی یا اتصال فلزات به ترکیبات آلی (عوامل چلات کننده) و یا به دلیل اتصال به سطوح سلولی و یا اکسید شدن و سم‌زدایی باشد [۱۰، ۱۲، ۱۵، ۱۶].

شهر اصفهان به دلیل وجود منابع صنعتی متعدد به میزان قابل توجهی تحت تأثیر عوامل آلوده کننده از جمله فلزات بوده

* دانشکده علوم دانشگاه اصفهان، گروه زیست شناسی (بخش میکروبیولوژی)
** دانشکده علوم دانشگاه اصفهان، گروه زمین شناسی
*** دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم (بخش میکروبیولوژی)

و با توجه به مسیر طولانی رودخانه زاینده‌رود پساب بسیاری از کارخانه‌ها و مراکز صنعتی و برخی از تصفیه‌خانه‌ها وارد رودخانه می‌شود که در تحقیقات متعدد تأثیر این عوامل آلوده کننده ارزیابی شده است. در تحقیقات انجام شده توسط شاهمنصوری [۴] بر روی رودخانه زاینده‌رود مشخص گردید که غلظت فلز سرب در جلبک‌ها و خاک‌های پایین‌دست رودخانه به مراتب بیشتر از ابتدای مسیر رودخانه است که احتمالاً ناشی از تأثیر صنایعی است که در مسیر رودخانه پساب خود را وارد آب می‌کنند. هم‌چنین خاک‌هایی که نزدیک به رودخانه هستند نسبت به خاک‌های مناطق دورتر دارای غلظت بالاتری از فلز در رسوبات می‌باشند. در مطالعات انجام شده توسط جوادی و همکاران [۲] میزان کادمیم در آب و رسوبات رودخانه، ماهی، لجن‌های فاضلاب و برخی گیاهان مشروب از آب زاینده‌رود مشخص گردیده است. البته تأثیر این عوامل نه تنها در آب رودخانه بلکه بر آب‌های زیرزمینی نیز مشاهده می‌شود [۵]. فعالیت صنایع بزرگ و وجود کارگاه‌های متعدد صنعتی و تردد وسایل نقلیه موتوری و تغییر دبی رودخانه و تخلیه زهکش‌ها به داخل زاینده‌رود نیز سبب آلودگی رودخانه و تغییر وضعیت بیولوژیکی آن شده است [۴،۱]. بر اساس تحقیقات انجام شده [۲] می‌توان از خاک و رسوباتی که به نحوی با آب رودخانه در تماس هستند به عنوان شاخصی برای میزان آلودگی رودخانه استفاده کرد. بنابراین هدف از انجام تحقیق بررسی وضعیت میکروبی رسوبات و خاک‌های حاشیه زاینده‌رود و هم‌چنین تأثیر فلزات سنگین بر میکروارگانیسم‌های موجود در خاک و رسوبات رودخانه می‌باشد.

مواد و روشها

فلزات: در این تحقیق از سه نمک نیترات شامل نیترات سرب، مس و کادمیم استفاده شده است. اسید ارسنیک هم به عنوان منبع ارسنیک به‌کار رفته است.

تهیه محیط MHGII: از این محیط برای جداسازی باکتری‌های مقاوم به فلز استفاده می‌شود و ترکیبات آن شامل ۴ گرم پپتون، ۱ گرم عصاره مخمر، ۲ گرم گلوکز و ۱۵ گرم آگار بود که در ۱۰۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل شده و در ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه اتوکلاو می‌شود و در pH برابر ۷ تنظیم می‌شود. پس از سرد شدن محیط کشت هنگامی که حرارت محیط کشت به ۵۰ درجه سانتی‌گراد رسید از محلول اصلی استریل فلز با غلظت‌های مختلف از فلز به محیط کشت اضافه شد [۱۱، ۱۳].

تهیه محلول اولیه برای فلزات: محلول‌های اولیه فلز با غلظت ۱۰۰mM تهیه شده‌اند و به هنگام مصرف با توجه به غلظت مورد نظر با آب مقطر استریل رقیق می‌شوند. قبل از تهیه محلول اولیه برای جلوگیری از اتصال فلز به بدنه ظروف، وسایل و ظروف نگهداری محلول در اسید نیتریک ۱٪ شستشو داده شده و سپس با آب مقطر استریل آبکشی و شسته شده‌اند [۸، ۱۱].

روش نمونه‌برداری: نمونه‌های رسوبی از چند نقطه در حاشیهٔ کنار زاینده‌رود از سطح تا عمق ۱۰ سانتی‌متری برداشت شده است. نمونه‌های خاک نیز از جمع‌آوری سه نمونه خاک به میزان یک کیلوگرم در آن منطقه و مخلوط کردن آنها با هم تهیه شده است [۲]. کلیه نمونه‌ها از مناطق انتهایی مسیر زاینده‌رود برداشت شده است. در مجموع سه نمونه خاک و چهار نمونه رسوب مورد بررسی قرار گرفت.

روش آنالیز خاک و رسوبات: بررسی فیزیکی نمونه‌ها با تعیین pH خاک انجام شد. برای تعیین اسیدیته خاک سوسپانسیون ۱:۱ از آب مقطر و خاک تهیه کرده و سپس نمونه به مدت ۱۰ دقیقه در حالت سکون نگهداری می‌شود و سپس pH نمونه‌ها با pH متر (مدل ES-۱۴) اندازه گیری گردید [۱۲].

تعیین تعداد باکتری‌ها: تعداد کل باکتری‌های خاک با تکنیک شمارش استاندارد بشقابی (SPC)[1] در محیط حاوی مواد مغذی آگار مشخص گردیده است. ابتدا رقت‌های متوالی از خاک تهیه و سپس یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون آخرین رقت در محیط مغذی آگار و یک میلی‌لیتر در محیط MHGII حاوی یک نوع فلز ریخته و کاملاً در سطح پلیت پخش می‌گردد. از یک پلیت MHGII بدون فلز به عنوان کنترل استفاده شده است.

1- Standard Plate Count

پلیت‌ها به مدت ۴۸-۲۴ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد در گرمخانه گذاشته می‌شوند. در این تحقیق در غلظت‌های ۲mM سرب، ۵mM مس، ۰/۵mM کادمیم و ۵mM ارسنیک برای جداسازی میکروب‌های مقاوم در نظرگرفته شده است [۱۱، ۱۲]. بعد از طی مدت زمان فوق تعداد باکتری‌های مقاوم در محیط MHGII شمارش گردید و درصد مقاومت نسبت به کل باکتری‌های خاک محاسبه می‌شود [۷، ۱۰، ۱۲، ۱۳].

شناسایی میکروارگانیسم‌های مقاوم: برای شناسایی میکروارگانیسم‌ها از رنگ‌آمیزی‌های مختلف نظیر گرم و اسید فاست و تست‌های کلیدی بیوشیمیایی استفاده شده است [۱۴].

تعیین حداقل غلظت بازدارنده از رشد (MIC[1]): برای تعیین حداقل غلظت بازدارنده از رشد هر فلز از روش رقیق شدگی آگار[2] استفاده شد. در این روش محیط MHGII با غلظت‌های مختلف از هر فلز تهیه می‌شود و باکتری‌های مقاوم در سطح محیط به صورت شعاعی کشت داده می‌شوند. حداقل غلظتی که از رشد باکتری‌ها جلوگیری می‌کند به عنوان MIC باکتری در نظر گرفته می‌شود [۱۲، ۱۳].

شناسایی مقاومت چندگانه در فلزات (MMR[3]): پس از شناسایی میکروارگانیسم‌های مقاوم، مقاومت آنها نسبت به سایر فلزات ارزیابی می‌گردد. برای بررسی مقاومت، محیط‌های MHGII که حاوی فلزات دیگر می‌باشند، تهیه شده و سپس باکتری مقاوم به فلز در محیطی که فلزات دیگر وجود دارد کشت داده می‌شود. عدم رشد، نشانگر حساسیت باکتری به آن فلز می‌باشد و اگر در محیط MHGII رشد باکتری مشاهده شد دلیل مقاومت باکتری نسبت به آن فلز است [۱۲، ۱۳].

تعیین وزن خشک سلولی و میزان جذب فلز: برای تعیین میزان جذب فلز در باکتری‌های مقاوم ابتدا باید وزن خشک سلولی مشخص شود. ابتدا محیط برات MHGII تهیه شده و بعد از تلقیح باکتری به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۰ درجهٔ سانتی‌گراد، در شیکر با دور ۲۰۰rpm قرار داده می‌شود. پس از رشد و کدر شدن محیط برات، سوسپانسیون میکروبی سانتریفوژ می‌شود. اجسام سلولی در ظرفی به مدت ۳ ساعت در آون ۱۲۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شده و پس از آن در دسیکاتور حاوی پنتا اکسید فسفر (P_2O_5) گذاشته شده است. استفاده از P_2O_5 به دلیل توانایی جذب رطوبت از محیط می‌باشد. سپس نمونه‌ها سریعاً وزن می‌شوند. تفاوت وزن اولیه (وزن ظرف) و وزن ثانویه (وزن ظرف + بیومس سلولی) به عنوان وزن خشک سلولی تلقی می‌شود. بعد از تعیین وزن خشک سلولی نمونه‌هایی که بیومس مناسبی دارند برای بررسی جذب اتمی انتخاب می‌شوند. برای تعیین میزان جذب فلز ابتدا به مدت ۲۴ ساعت باکتری مقاوم در محیط برات MHGII فاقد فلز رشد می‌کند. رشد میکروارگانیسم در شیکر با دور ۲۰۰rpm و درجه حرارت ۳۰درجه سانتی‌گراد انجام می‌شود و سپس سوسپانسیون میکروبی با دور ۷۰۰۰rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ می‌شود. نمونه با ۰/۶ میلی‌لیتر اسید نیتریک غلیظ و ۰/۲۵ میلی‌لیتر اسید سولفوریک ۷۵٪ آب‌کشی و شست و شو می‌شود. در طی مرحله بعدی به جسم سلولی ۵ میلی‌لیتر فلز با غلظت مورد نظر اضافه شده و به مدت ۲۰دقیقه نمونه در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد در تاریکی نگهداری شد. بعد از طی زمان ۲۰ دقیقه، نمونه مورد نظر به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۰۰۰۰ سانتریفوژ شد و قسمت شناور[4] به ظروف پلاستیکی که حاوی اسید نیتریک ۱٪ است اضافه گردید. برای دقت بیشتر از ظروف پلاستیکی که درب محکمی دارند استفاده می‌شود که قبل از استفاده با محلول اسیدی شست و شو و آب‌کشی می‌شوند [۶، ۹، ۱۱، ۱۳، ۱۵].

تعیین میزان جذب فلزات با دستگاه جذب‌اتمی (مدل فیلیپ PU ۹۱۰۰) انجام شده است. میزان جذب فلز بر اساس کاهش غلظت ثانویه نسبت به غلظت اولیه تعیین گردیده است [۱۱].

1- Minimum Inhibitory Concentration
2- Agar Dilution
3- Multi Metal Resistance
4- Supernatant

جدول ۱- ایستگاه‌های نمونه گیری از حاشیه زاینده‌رود

نمونه خاک و رسوب*	محل نمونه گیری
۱	رسوبات اطراف پل چوم
۲	رسوبات حاشیه زاینده‌رود اطراف اداره راه (شرق)
۳	رسوبات حاشیه زاینده‌رود اطراف اداره راه (غرب)
۴	رسوبات اطراف پل زرین‌شهر
۵	خاک منطقه اصفهانک
۶	خاک اطراف پل شهرستان
۷	خاک منطقه روشن‌دشت

* نمونه رسوبی (۴-۳-۲-۱) و نمونه خاک (۷-۶-۵)

جدول ۲- تعیین pH در نمونه‌های خاک و رسوب در حاشیه رودخانه

نمونه خاک و رسوب*	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷
pH	۷/۷۶	۷/۹۸	۷/۴۷	۷/۹۷	۷/۷۵	۷/۶۰	۷/۷۶

* نمونه رسوبی (۴-۳-۲-۱) و نمونه خاک (۷-۶-۵)

نتایج و بحث

در جدول ۱ محل نمونه گیری خاک‌ها و رسوبات در حاشیه رودخانه ذکر شده است. جدول ۲ نشان دهنده pH نمونه‌های خاک مورد مطالعه می‌باشد. نتایج مشخص می‌کند که محدوده pH بین ۷/۴۷ تا ۷/۹۸ می‌باشد که با توجه به تحقیقات روان و کلوگ [۱۲] این دامنه pH تأثیر چندانی بر مقاومت میکروب‌ها ندارد. در حالی که در خاک‌های اسیدی به شکل چشمگیری حلالیت فلز افزایش یافته و این مسئله با افزایش مقاومت میکروبی همراه است.

جدول ۳ درصد باکتری‌های مقاوم نسبت به فلزات مختلف را نشان می‌دهد. با مقایسه نتایج مربوط به درصد باکتری‌های مقاوم به فلزات در جدول ۳، در فلز سرب بالاترین درصد مربوط به نمونه رسوبی ۱ است که ۸۳/۳٪ از جمعیت آن به غلظت ۲mM سرب مقاوم بوده‌اند.

میانگین مقاومت‌ها به سرب در این میکروب‌ها ۳۱٪ بوده، در حالی که در تحقیقات صبری [۱۳] که در سال ۱۹۹۷ بر روی نمونه‌های آب در نواحی اسکندریه مصر انجام داده است ۶۱٪ از باکتری‌ها در غلظت ۲mM از خود مقاومت نشان داده‌اند. هم‌چنین در مطالعات اولوکویا و همکاران [۱۰] در سال ۱۹۹۷ بر روی نمونه‌های آب در نیجریه ۱۵/۴٪ از میکروب‌ها به سرب مقاومت داشته‌اند. علت درصد مقاومت بالا نسبت به سرب در تحقیقات صبری احتمالاً به دلیل وجود سرب، فسفات‌ها و کربنات‌ها در آب دریا بوده که باکتری‌ها را در مقابل اثر سمی فلز حفاظت می‌کند.

در مقاومت به مس نیز این نمونه بالاترین درصد باکتری‌های مقاوم را نسبت به سایر نمونه‌ها نشان داد و ۳۳/۳٪ از کل جمعیت میکروبی آن به غلظت ۵mM فلز مقاوم بودند.

در این بررسی میانگین مقاومت به مس ۹٪ در نظر گرفته شده است. در حالی که در تحقیقات صبری ۱۰۰٪ باکتری‌ها به غلظت ۵mM فلز مس حساس بودند. در مطالعات انجام شده در نیجریه نیز ۱۳/۶٪ از کل باکتری‌ها نسبت به مس مقاومت نشان دادند.

هم‌چنین در مقاومت به کادمیم نیز بالاترین درصد مقاومت‌ها مربوط به نمونه رسوبی ۱ بوده است و ۹۱/۶٪ از کل

باکتری‌های نمونه به غلظت ۰/۵mM کادمیم مقاومت نشان داده‌اند.

از نظر میانگین مقاومت‌ها به کادمیم ۵۳/۱٪ از سویه‌های جدا شده از خاک و رسوبات حاشیه زاینده‌رود به غلظت ۰/۵mM کادمیم مقاومت داشتند در صورتی که در آزمایش‌های صبری فقط ۱۰٪ از باکتری‌ها در این غلظت مقاوم بودند. بالا بودن درصد مقاومت‌ها به کادمیم در زاینده‌رود و نواحی اطراف به دلیل وجود مراکز مختلف صنعتی از جمله صنایع نساجی در اطراف رودخانه است. پساب‌های تصفیه نشده این کارخانه‌ها مقادیر قابل توجهی کادمیم را وارد محیط زیست می‌کنند که این آلودگی بر مقاومت میکروارگانیسم‌ها تأثیر مستقیمی دارد [۱،۳، ۱۰، ۱۲، ۱۳]. از نظر مقاومت به ارسنیک نیز بالاترین درصد مقاومت‌ها مربوط به خاک شماره ۴ است که ۹۲٪ از کل باکتری‌ها به غلظت ۵mM ارسنیک مقاومت داشته‌اند. هم‌چنین خاک شماره ۱ نیز ۸۳/۳٪ از جمعیت آن به ارسنیک مقاوم بوده است.

مکانیسم مقاومت به ارسنیک در باکتری‌ها بر اساس پمپ‌های ریزشی است که با خروج فلز از سلول باکتری، میکروارگانیسم را در برابر غلظت‌های مختلف فلز حفاظت می‌کند.

در مقاومت به ارسنیک نیز به طور متوسط ۵۵٪ از باکتری‌ها به غلظت ۵mM ارسنیک مقاومت داشتند. در حالی که در تحقیقات صبری ۶۲٪ از میکروارگانیسم‌ها مقاوم بودند.

با توجه به اینکه نمونه شماره ۱ از رسوبات اطراف پل چوم در انتهای مسیر زاینده‌رود تهیه شده است، از این رو میکروارگانیسم‌ها در این نمونه به شدت تحت تأثیر کلیه موارد آلوده کننده زاینده‌رود از جمله پساب‌های تصفیه‌خانه جنوب قرار دارند که این مسئله مقاومت قابل توجه میکروارگانیسم‌ها را در این نمونه توجیه می‌کند. بر اساس نتایج جدول ۳ مشاهده می‌شود که میانگین درصد مقاومت‌ها در میکروب‌های مقاوم به سرب، کادمیم و ارسنیک در بین نمونه‌های رسوبی و نمونه خاک‌های حاشیه زاینده‌رود یکسان است، در حالی که درصد میانگین مقاومت‌ها به مس در نمونه‌های رسوبی از خاک‌های حاشیه‌زاینده‌رود بیشتر است که این مسئله ممکن است ناشی از تأثیر محل نمونه‌برداری باشد. هم‌چنین بر اساس نتایج حاصله میانگین درصد مقاومت‌ها به کادمیم و ارسنیک بسیار بیشتر از میانگین درصد میکروب‌های مقاوم نسبت به سرب و مس است.

جدول ۴ مشخص کننده باکتری‌های مقاوم به فلزات جدا شده از نمونه‌های خاک و رسوبات می‌باشد. بر اساس نتایج به دست آمده در باکتری‌های مقاوم به سرب، مس و ارسنیک فراوانی باسیلوس‌ها نسبت به سایر جنس‌ها بیشتر است که احتمالاً به دلیل وجود اسپور و ساختار دیواره این باکتری‌ها است که در برابر فلزات مختلف مقاومت نشان می‌دهند، در حالی که در میان جنس‌های مقاوم به کادمیم فراوانی لاکتوباسیلوس‌ها از بقیه جنس‌ها بیشتر است.

جدول ۳- تعیین درصد باکتری‌های مقاوم نسبت به فلزات مختلف

نمونه خاک و رسوب	درصد مقاوم‌ها به ارسنیک	درصد مقاوم‌ها به کادمیم	درصد مقاوم‌ها به مس	درصد مقاوم‌ها به سرب	تعداد کل باکتری‌ها در مواد مغذی آگار
۱	۷۳/	۹۱/۶	۳۳/۳	۸۲/۳	۶×۱۰^{۱۱}
۲	۱۰	۲۰	۵/۴	۰	۵×۱۰^{۱۲}
۳	۱۰	۲۲/۵	۲/۵	۰/۵	۴×۱۰^{۱۲}
۴	۹۲	۸۸	۰	۴۰	۵×۱۰^{۱۱}
۵	۷۰	۹۰	۱۳	۴۰	۱×۱۰^{۱۲}
۶	۴۰	۵۰	۰	۱۶/۶	۳×۱۰^{۱۲}
۷	۸۰	۱۰	۱۰	۴۰	۵×۱۰^{۱۱}

جدول ۴- جنس‌های تعیین شده در باکتری‌های مقاوم به فلزات جدا شده از نمونه‌های خاک و رسوب

نمونه‌خاک و رسوب	ارسنیک	کادمیم	مس	سرب
۱	گونه باسیلوس	لاکتوباسیلوس[1]	گونه باسیلوس	گونه باسیلوس[2]
۲	اسپورولاکتوباسیلوس[3]	گونه باسیلوس	گونه باسیلوس	-
۳	کورینه باکترویوم	ارکانوباکتریوم[4]	کورینه‌باکتریوم[5]	گونه باسیلوس
۴	گونه‌باسیلوس	گونه باسیلوس	-	گونه باسیلوس
۵	گونه باسیلوس (5A) استافیلوکوکوس[7] (5A)	کورتیا[6]	گونه باسیلوس	گونه باسیلوس
۶	گونه‌باسیلوس	لاکتوباسیلوس	-	گونه باسیلوس
۷	استافیلوکوکوس (7A) کورینه باکتریوم (7A)	لاکتوباسیلوس	گونه باسیلوس	گونه باسیلوس

* حروف A و B نشان دهنده جداسازی ۲ جنس باکتری از نمونه خاک می‌باشد.
(-) باکتری مقاوم جداسازی نشده است.

میزان MIC در جدول ۵ نشان داده شده است. نتایج مشخص می‌کند که میزان MIC در باکتری‌ها نسبت به فلزات دیگر بیشتر می‌باشد در حالی که MIC مربوط به فلز کادمیم از همه کمتر است. توجیه این مسئله بر اساس سمیت بسیار بالای این فلز سنگین برای باکتری‌ها می‌باشد.

مقایسه میزان MIC در باکتری‌های مقاوم به سرب نشان می‌دهد که حداکثر MIC در باکتری جدا شده از رسوبات و خاک‌های زاینده‌رود ۸mM است در حالی که در تحقیقات صبری ۱۰mM است. در تحقیقات رُوان و کلوگ [۱۲] میزان MIC سرب ۲/۵mM ذکر شده است. حداکثر میزان MIC مس در تحقیق انجام شده ۹mM می‌باشد در حالی که MIC در مطالعات صبری ۲/۵mM است.

بالا بودن MIC در باکتری‌های جدا شده از زاینده‌رود و خاک‌های حاشیه‌ای آن احتمالاً به دلیل حضور برخی کارگاه‌های صنعتی در اطراف زاینده‌رود است [۱، ۲، ۴].

هم‌چنین بالاترین غلظت MIC نسبت به کادمیم در تحقیق انجام شده ۷/۵mM است. در حالی که میزان MIC در تحقیق صبری ۲/۵mM است و در تحقیقات روان و کلوگ نیز ۱/۲۲mM بیان شده است. این تفاوت قابل توجه به دلیل ورود پساب‌های آلوده به کادمیم به زاینده‌رود است. حداکثر میزان MIC برای ارسنیک در این تحقیق ۹۰mM است در حالی که در مطالعات صبری غلظت ۲۰mM به عنوان MIC ارسنیک در نظرگرفته شده است [۱۲،۲].

با مقایسه نتایج تحقیق انجام شده با تحقیقات دیگر نتیجه گیری می‌شود که میکروب‌های جدا شده از رسوبات و خاک‌های حاشیه‌زاینده‌رود قدرت تحمل بالاتری را نسبت به میکروب‌های جداشده در تحقیقات فوق‌الذکر دارند. با توجه به سمیت فلزات سنگین، قدرت تحمل غلظت‌های بالا توسط میکروارگانیسم‌ها تا حد زیادی به دلیل آلودگی زاینده‌رود با یون‌های مختلف فلزات است که در اثر ورود پساب‌های خانگی و صنعتی ایجاد شده و سبب افزایش تدریجی مقاومت در میکروارگانیسم‌ها شده است.

1- Lactobacillus
2- Bacillus sp
3- Sporolactobacillus
4- Arcanobacterium
5- Corynebacterium
6- Kurthia
7- Staphylococcus

جدول ۵- مقادیر MIC در باکتری‌های مقاوم جدا شده از نمونه‌های خاک و رسوب

نمونه خاک و رسوب	حداقل غلظت بازدارنده از رشد $mmol\ l^{-1}$			
	ارسنیک	کادمیم	مس	سرب
۱	۶۰	۵/۵	۶	۴
۲	۹۰	۷/۵	۸	–
۳	۸۰	۴/۵	۸	۴
۴	۵۰	۲/۵	–	۴
۵	(۵A)*۸۰	۲/۵	۹	۸
	(۵B)*۴۰			
۶	۶	۴/۵	–	۴
۷	(۷A)۶۰	۲/۵	۸	۴
	(۷B)۶۰			

* حروف A و B نشان دهنده MIC باکتری اول و دوم جدا شده می‌باشد

(-) باکتری مقاوم جداسازی نشده است.

جدول ۶- بررسی و تعیین موارد مقاومت همزمان به فلزات در بین باکتری‌های مقاوم جدا شده

الگوی مقاومت				موارد جدا شده با چند الگوی مقاومت		موارد جدا شده		فتوتیپ مقاومت چندگانه
As	Cd	Cu	Pb	%R[5]	%[4]	تعداد[3]	%[2]	تعداد[1]	
+	+	+	+	-	-	-	۱۴/۸	۴	مقاومت ۴ تایی[1]
+	-	+	+	۱۴/۸	۳۶/۳۶	۴	۴۰/۷۴	۱۱	مقاومت ۳تایی[2]
+	+	-	+	۱۸/۵۱	۴۵/۴۵	۵			
+	+	+	-	۷/۴۰	۱۸/۱۸	۳			
-	-	+	+	۳/۷۰	۱۴/۲۸	۱	۲۵/۹۲	۷	مقاومت ۲تایی[3]
-	+	+	-	۷/۴	۲۸/۵۷	۲			
+	-	-	+	۳/۷۰	۱۴/۲۸	۱			
+	-	+	-	۳/۷۰	۱۴/۲۸	۱			
+	+	-	-	۷/۴۰	۲۸/۷۵	۲			
+	-	-	-	۷/۴۰	۴۰	۲	۱۸/۵۱	۵	مقاومت تکی[4]
-	+	-	-	۷/۴۰	۴۰	۲			
-	-	-	+	۳/۷۰	۲۰	۱			

۱- تعداد باکتری جدا شده که واجد فنوتیپ مقاوم مورد نظر هستند.

۲- درصد باکتری‌هایی که فنوتیپ را دارند (n=۲۷).

۳- تعداد باکتری‌های جدا شده که الگوی مقاومت را دارند.

۴- درصد باکتری‌های جدا شده با الگوی مقاومت نسبت به فنوتیپ مورد نظر.

۵- درصد باکتری‌های جدا شده با الگوی مقاومت نسبت به کل باکتری‌های مقاوم جدا شده.

1- Tetra-R

2- Tri-R

3- Double-R

4- Mono-R

جدول ۷- درصد جذب فلزات توسط میکروب‌های مقاوم

نمونه خاک و رسوب	درصد جذب ارسنیک	درصد جذب کادمیم	درصد جذب سرب
۱	۱۹/۵۹	۵۹/۹۳	*
۲	*	۹۵/۶۳	–
۳	۳۱/۹۶	*	۹۹
۴	۵۹/۰۳	*	۹۸/۷
۵	*	*	۹۹/۱
۶	*	۹۵/۶۸	*
۷	۳۵/۶۸	*	*

* جذب اتمی انجام نشده است

در بررسی فنوتیپ‌های مقاوم که در جدول ۶ ارائه شده است در مجموع در ۲۷ باکتری جداسازی شده چهار فنوتیپ و ۱۲ الگوی مقاوم مشخص گردیده است. در فنوتیپ مقاومت چهارتایی ۴ باکتری جدا شده‌اند که ۱۴/۸۱٪ از کل باکتری‌های مقاوم را تشکیل می‌دهد. در فنوتیپ مقاومت سه تایی ۱۱ باکتری جداسازی شده که ۴۰/۷۴٪ از کل باکتری‌های مقاوم می‌باشد. در این فنوتیپ بالاترین الگوی مقاومت به مقاومت همزمان در سرب، کادمیم و ارسنیک اختصاص دارد که ۱۸/۵۱٪ از مجموع باکتری‌های مقاوم است. در فنوتیپ مقاومت دوتایی نیز ۷ باکتری جدا شده که ۲۵/۹۲٪ از کل جمعیت مقاوم به فلز را به خود اختصاص داده و در این فنوتیپ الگوهای مقاومت همزمان به مس و کادمیم و یا کادمیم و ارسنیک دارای ۷/۴۰٪ از کل جمعیت مقاوم می‌باشند که بالاترین فراوانی را نشان می‌دهد. در مقاومت اختصاصی به یک فلز نیز ۵ باکتری مقاوم مشخص شده که ۱۸/۵۱٪ از کل موارد می‌باشد و الگوی مقاومت اختصاصی به کادمیم یا ارسنیک با ۷/۴۰٪ از کل جمعیت مقاوم، بالاترین درصد مقاومت را نشان می‌دهند. در جدول ۶ بالاترین درصد فنوتیپ مقاوم به مقاومت سه‌گانه و الگوی مقاومت همزمان به سرب، کادمیم و ارسنیک اختصاص دارد.

جدول ۷ نشان دهنده درصد جذب فلزات توسط میکروب‌های مقاوم می‌باشد. بر اساس این نتایج مشاهده می‌شود که بالاترین میزان جذب در میان باکتری‌های مقاوم به سرب مربوط به خاک شماره ۵ است که ۹۹/۱٪ از سرب موجود در محیط را جذب می‌کند. در باکتری‌های مقاوم به کادمیم بالاترین میزان جذب در خاک شماره ۱ که ۹۵/۹۳٪ از فلز محیط را جذب می‌کند می‌باشد. در باکتری‌های مقاوم به ارسنیک نیز بالاترین میزان جذب ارسنیک مربوط به خاک شماره ۴ می‌باشد که ۵۹/۰۳٪ از ارسنیک محیط را جذب می‌کند.

با مقایسه نتایج جذب فلزی، بالاترین میزان جذب به فلز سرب اختصاص دارد. در میان جنس‌های شناسایی شده باسیلوس‌ها نسبت به سایر جنس‌ها بالاترین میزان جذب فلز را نشان می‌دهند.

نتایج حاصله از میزان جذب فلزات با مطالعات تراسلر و وُد [۱۵] مطابقت دارد. در هر دو تحقیق بالاترین میزان جذب به فلز سرب اختصاص دارد و پس از آن بالاترین میزان جذب در کادمیم مشاهده می‌شود. البته در جذب فلز توسط میکروارگانیسم‌ها فاکتورهای متعددی نظیر ساختار ژنتیکی، بیومس سلولی و جنس باکتری، دما، زمان و شرایط محیطی نیز دخالت دارند [۹، ۱۵].

نتیجه گیری

با توجه به نتایج حاصله، آلودگی آب زاینده‌رود ناشی از منابع مختلف، نه تنها بر جمعیت میکروبی آب مؤثر است بلکه جمعیت میکروبی خاک را نیز تحت تأثیر قرار داده است و سبب افزایش چشمگیر مقاومت در میکروارگانیسم‌های این مناطق

شده است. با توجه به محل‌های نمونه گیری مشخص می‌شود که در قسمت‌های پایین‌دست مسیر رودخانه جمعیت میکروب‌های مقاوم به مراتب بیشتر از قسمت‌های بالادست مسیر رودخانه است. هم‌چنین این میکروارگانیسم‌ها در برابر غلظت‌های متعددی از فلزات مختلف مقاومت نشان داده و در برخی موارد حتی درصد قابل توجه‌ای از فلز موجود در محیط اطراف را جمع آوری و در درون سلول خود انباشته می‌کنند.

منابع و مراجع

۱- بابامیر، ش. ۱۳۷۲، تأثیر فاضلاب کارخانجات نساجی بر روی راندمان آب و فاضلاب تصفیه خانه جنوب اصفهان، مجله آب و فاضلاب، شماره ۱۱، ص ۱۴-۹.

۲- جوادی، ا. وکارگران، ح. ۱۳۷۵، تعیین میزان غلظت کادمیم در ارتباط با ماهی، رسوبات لجن های فاضلابی و گیاهان مشروب از آب زاینده رود، مجله پژوهشی دانشگاه اصفهان، شماره ۷، ص ۸۸-۷۵.

۳- خوش منش، ا. ۱۳۷۱، ترکیب فلزات سنگین در پساب تعدادی از واحدهای آبکاری شهر اصفهان و خطرات زیست محیطی آنها، مجله آب و فاضلاب شماره ۸، ص ۱۶-۱۰.

۴- شاهمنصوری، م. ر. ۱۳۷۴، بررسی اکولوژیک آلوگی ناشی از سرب در رودخانه، مجله آب و فاضلاب، شماره ۱۶، ص ۱۱-۳.

۵- موسوی، ف. ۱۳۷۶، مطالعه آلودگی آب های زیرزمینی حاشیه رودخانه زاینده رود، مجله آب و فاضلاب، شماره ۲۴، ص ۲۲-۹

6- Beveridge, T.A., and Murray, R.G.E. (1976). " *Uptake and Retention of Metals by Cell Walls of Bacillus Subtilis* ", J. Bacteriology, 121: 1502 - 1518.

7- Chaudhury, P., and Kumar, R. (1996). " *Association of Metal Tolerance with Multiple Antibiotic Resistance of Enteropathogenic Organisms Isolated from Coastal Region of Deltatic Sunderbans* ", Indian Journal of Medical Research, 140: 148-151.

8- Hughes, M.N., and Poole, R. K. (1989). " *Metals and Microorganisms* ", Chapman and Hall, London.

9- Mullen, M.D., Wolf, D. C., Ferris, F.C., Beveridge, T.J., Flemming, C.A. and Bailey, G.W. (1989). " *Bacterial Sorption of Heavy Metals* ", Applied and Environmental Microbiology, 55: 3143-3149.

10- Olukoya, D.K., Smith, S.I., and Ilori, M.O. (1997). " *Isolation and Characterization of Heavy Metals Resistant Bacteria from Lagos Laggon* ", Folia Microbiology, 42: 441-444.

11- Pumpel, T., Pernfub, B., Pigher, P., Diels, L., and Schinner, F. (1995). " *A Rapid Screening Method for the Isolation of Metal Accumulating Microorganisms* ", J. Industrial Microbiology, 14: 213 - 217.

12- Roane, T.M., and Kellogg, S.T. (1995). " *Characterization of Bacterial Communities in Heavy Metal Contaminated Soils* ", Canadian J. Microbiology, 42: 593 - 603.

13- Sabry, S.A., Ghozlan, H.A., and Abou-zeid, D.M. (1997). " *Metal Tolerance and Antibiotic Resistance Patterns of a Bacterial Population Isolated from Sea Water* ", J. Applied Microbiolgy, 82: 245-252.

14- Sneath, H.A.P., et al. (1986). " *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* ", Vol 2, Williams and Wilkins Baltimore, Md.

15- Traxler, R. W., and Wood, E.N. (1990). " *Bioaccumulation of Metals by Coryneform SL-1* ", J. Industrial Microbiology, 6: 249 - 252.

16- Veglio, F., Beolchini, F., and Gasbarro, A. (1997). " *Biosorption of Toxic Metals and Equilibrium Study Using Free Cells of Arthrobacter sp* ", Process Biochemistry, 32: 99-105.