مجله سلامت و بهداشت

دوره پنجم، شماره دوم، تابستان ۱۳۹۳، صفحات ۱۰۳ تا ۱۱٤

بررسی میزان رشد، مقاومت و توانایی حذف فلز روی در باکتری‌های مقاوم جداشده از آب و رسوبات رودخانه کارون

فرشید کفیل زاده[1]*، مژده چیت تایی[2]

[1] دانشیار، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد جهرم، گروه زیست شناسی، جهرم، ایران [2] کارشناس ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد جهرم، گروه زیست شناسی، جهرم، ایران.

* نویسنده مسئول. تلفن: ۰۹۱۷۱۱٤۰۷۹۹ فکس: ۰۷۱۱۶۲۶۲۱۰۲ ایمیل: Kafilzadeh@jia.ac.ir

چکیده

زمینه و هدف: اگرچه روی یک یون فلزی ضروری است، اما غلظت‌های بالای آن سمی بوده و بر بسیاری از وظایف مهم سلولی اثر مهاری دارد. هدف از پژوهش حاضر بررسی میزان رشد، مقاومت و توانایی حذف فلز روی در باکتری‌های جداشده از رودخانه کارون می‌باشد.

روش کار: در این تحقیق نمونه‌برداری از آب و رسوبات ٤ ایستگاه در سه فصل انجام گرفت. جداسازی باکتری‌های مقاوم از طریق غنی‌سازی و کشت مستقیم در محیط جامد صورت گرفت. سپس باکتری‌های جداسازی شده با استفاده از تست‌های بیوشیمیایی شناسایی و تعیین هویت شدند و میزان مقاومت آنها در محیط LB broth حاوی غلظت‌های ۲۰۰ تا ۱٤۰۰ میلی گرم بر لیتر کلرید روی تعیین گردید. سپس رشد باکتری‌های مقاوم در غلظت $\frac{mg}{L}$ ۲۶۰ کلرید روی و توانایی حذف روی درآنها بررسی شد.

یافته ها: باکتری‌هایی نظیر سودوموناس، اشریشیا کولی، سالمونلا و سیتروباکتر به‌عنوان باکتری‌های مقاوم به روی شناسایی شدند. برخی از این باکتری‌ها قادر به تحمل غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر کلرید روی بودند. توانایی حذف روی، توسط باکتری‌های جدا شده در هر فصل، بین ۳۹ تا ۶۸ درصد متغیر بود. باکتری سودوموناس جداشده در فصل تابستان بیشترین میزان رشد را در حضور فلز روی نشان داد.

نتیجه گیری: باکتری‌های جدا شده از محیط‌های آلوده به روی دارای پتانسیل حذف این فلز می‌باشند. منحنی‌های رشد باکتری‌های مقاوم، در حضور ۲۶۰mg/l کلرید روی از منحنی استاندارد رشد پیروی کردند. باکتری *Pseudomonas* sp جدا شده در فصل تابستان، با کارایی ۶۸ درصد، بیشترین میزان حذف روی را داشت.

واژه های کلیدی: باکتری‌های مقاوم به روی، روی، سودوموناس، رودخانه کارون

دریافت: ۹۲/۵/۱۷ **پذیرش: ۹۲/۸/۱۱**

مقدمه

حذف فلزات سمی از محیط در سرتاسر جهان موردتوجه می‌باشد. برعکس آلودگی‌های آلی، فلزات سنگین قابل تجزیه نیستند و یک سیکل اکوبیولوژیک را در آب‌های طبیعی دارند (۱). این فلزات دارای خاصیت تجمع‌پذیری هستند و به‌راحتی در زنجیره غذایی مصرف‌کنندگان انتقال یافته و در بافت‌های مختلف تجمع می‌یابند (۲). وجود و تجمع این فلزات در هر نقطه از جهان به‌صورت بحرا نی و خطرناک، باعث افزایش خطر برای محیط و سلامتی انسان است (۳). اغلب فلزات از جمله فلز روی فقط در غلظت‌های بالا سمی می‌باشند (۲) و در غلظت‌های

www.SID.ir

بالا بر بسیاری از وظایف مهم در سلول‌های زنده، اثر مهاری دارند (٤). این فلز به دلیل عبور سریع در زنجیره غذایی دارای اهمیت می‌باشد (۵). یون آزاد روی در محلول برای گیاهان و بی‌مهرگان و ماهی‌ها بسیار سمی است (۶). حداکثر غلظت مجاز روی جهت آشامیدن، آبهای سطحی و آبیاری $\frac{mg}{L}$ ۵ و جهت حیات آبزیان $\frac{mg}{L}$ ۰/۰۳ است (۷). این فلز دارای نیروی ممانعت‌کننده از سیستم انتقال الکترون تنفسی می‌باشد. افزایش غلظت Zn^{2+} اثر خطرناکی بر متابولیسم کربن و فعالیت‌های تنفسی در سویه‌های باکتریایی دارد (۸). برخی از باکتری‌های ساکن مناطق آلوده قادر به حذف روی از محیط اطراف خود هستند، بنابراین استفاده از این باکتری‌ها جهت حذف زیستی روی از پساب حاوی این فلز از نظراقتصادی و زیست محیطی بسیار مقرون به صرفه می‌باشد (۹). روش‌های بیولوژیکی، مکانیکی و شیمیایی برای تصفیه آب و بازیافت فلزات از پساب‌ها، گسترش یافته است. این تکنیک‌ها ممکن است چندان مؤثر نباشند، مخصوصاً وقتی که غلظت فلزات پایین‌تر از $۱۰۰mgl^{-1}$ است. از سوی دیگر، استفاده از میکروارگانیسم‌ها در حذف فلزات از پساب‌های آلوده معمولاً امیدوارکننده مطرح شده‌اند (۱۰). طی مطالعات بادرا[1] و همکاران مشخص شد اگر باکتری‌ها در معرض سطوح ppb از فلز روی، نظیر غلظت‌های طبیعی روی در رودخانه قرار بگیرند، این امکان وجود دارد که مقاومت به روی در آن‌ها القا شود (۱۱). نگرآ[2] و همکاران با استفاده از روش غنی‌سازی اولیه، باکتری‌های مقاوم به روی را شناسایی کردند که قادر به رشد در غلظت ۱٤۰۰ mg/l فلزروی بودند (۱۲). تاثیرات سمی فلز روی بر رشد، بیولومینسانس، فعالیت دهیدروژناز، نیتریفیکاسیون و غیره در باکتری‌ها به‌طور گسترده‌ای توسط محققین مطالعه شده است (۱۳). نوویک[3] و همکاران میت فلز روی را نسبت به باکتری‌های هتروتروف رسوبات رودخانه‌ای در نیجریه مورد بررسی قرار دادند و نتیجه گرفتند که روی به‌طور جدی می‌تواند باعث مهار فعالیت آنزیم دهیدروژناز در باکتری‌هایی مانند باسیلوس و آرتروباکتر گردد (۱٤). بونگ[4] و همکاران نشان دادند که غلظت پایین فلز روی، فراوانی، میزان رشد و تولید باکتریایی را در نمونه‌های آب دریا کاهش داد (۱۵).

رودخانه کارون به‌عنوان مهمترین رودخانه ایران در گذر از مناطق وسیعی از استان خوزستان ارتباط تنگاتنگی با گروهی از مهمترین صنایع از جمله متالورژی، پتروشیمی و نفت داشته و همچنین در تماس با بخش مهمی از فاضلاب‌های شهری و کشاورزی قرار دارد. با توجه به این که این رودخانه ضمن تامین آب مصرفی بسیاری از صنایع غذایی، به عنوان منبع آب شرب شهرهایی از قبیل اهواز، آبادان و خرمشهر نیز محسوب گردیده و از طرف دیگر به‌دلیل برخورداری از ذخایر مناسب آبزیان یکی از منابع تأمین پروتئین در سطح منطقه می‌باشد، بنابراین وجود هرگونه عنصر فلزی به‌ویژه فلزات سنگین در فاضلاب‌های ورودی به این رودخانه می‌تواند به‌عنوان یک عامل بالقوه آلودگی و خطر مورد توجه باشد (۲).

هدف از این تحقیق جداسازی و شناسایی باکتری‌های مقاوم به روی از آب و رسوبات رودخانه کارون در استان خوزستان و بررسی میزان رشد، مقاومت و توانایی حذف این فلز در باکتری‌های مذکور می‌باشد.

روش کار

انتخاب ایستگاه و نمونه‌برداری

[1] Bhadra
[2] Negrea
[3] Nweke
[4] Bong

Archive of SID
www.SID.ir

در این مطالعه تجربی- آزمایشگاهی، ابتدا اطلاعات لازم درمورد مرفولوژی و آب‌شناسی رودخانه به‌دست آمد و منابع آلاینده شناسایی گردیدند. بر اساس شیب ساحل رودخانه، استقرار صنایع و خروجی‌های پساب آنها و در دسترس‌بودن برای نمونه‌برداری (۱۶)، ٤ ایستگاه نمونه‌برداری از محدوده بند قیر تا آبادان- خرمشهر به‌نام دز، گرگر، ام‌الطمیر و پل ثامن در طول رودخانه انتخاب شدند. در هنگام نمونه‌برداری موقعیت جغرافیایی ایستگاه‌ها به‌وسیله دستگاه موقعیت‌یاب ماهواره‌ای (GPS) تعیین گردید.

نمونه‌برداری از آب و رسوبات سطحی چهار ایستگاه مورد نظر، در سه فصل سال، انجام گرفت. در هر فصل سه نوبت نمونه‌برداری در سه ماه مختلف انجام شد و هر مرتبه نمونه‌برداری با ۳ تکرار صورت گرفت (در مجموع برای هر ایستگاه ۲۷ نمونه آب و ۲۷ نمونه رسوب). نمونه‌ها بر طبق روش‌های استاندارد به آزمایشگاه انتقال داده شدند (۱۷).

شمارش باکتری‌ها

شمارش باکتری‌ها به‌روش Viable Plate Count انجام شد و تعداد باکتری‌ها در محیط‌های کشت حاوی فلز روی و بدون فلز روی شمارش گردید (۱۸).

جداسازی و شناسایی باکتری‌های مقاوم به روی

جداسازی باکتری‌های مقاوم به روی از طریق غنی‌سازی اولیه و کشت مستقیم در محیط جامد انجام شد. سپس شناسایی باکتری‌های خالص‌سازی‌شده، با استفاده از رنگ‌آمیزی گرم و تست‌های بیوشیمیایی صورت گرفت (۱۹).

بررسی میزان مقاومت باکتری‌ها

در این مرحله، میزان مقاومت باکتری‌های جداسازی شده، به فلز روی در محیط‌های کشت LB broth حاوی غلظت‌های $\frac{mg}{L}$ ۱٤۰۰، ۱۲۰۰، ۱۰۰۰، ۸۰۰، ٦۰۰، ٤۰۰، ۲۰۰ کلرید روی مورد ارزیابی قرار گرفت (۲۰).

بررسی توانایی حذف روی

در این مرحله برای مقاوم‌ترین باکتری‌های هر فصل سوسپانسیون باکتریایی تهیه گردید. از این سوسپانسیون باکتریایی به محیط‌های کشت LB broth حاوی $\frac{mg}{L}$ ۵۰۰ کلرید روی اضافه شد و به مدت ٤۸ ساعت در دمای ۳۰° سانتی‌گراد قرار گرفت. پس از اتمام مدت زمان گرمخانه‌گذاری، محیط‌های حاوی باکتری در ۶۰۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردیدند تا توده سلولی کاملاً از مایع رویی جدا شود. سپس مایع رویی از فیلتر واتمن ۰/٤۲ میکرومتری عبور داده شد و میزان فلز روی در این مایع با استفاده از دستگاه جذب اتمی اندازه‌گیری گردید (۲۰).

برای اندازه‌گیری میزان روی موجود در توده سلولی، ابتدا توده سلولی یک بار با آب مقطرشست و شو داده شدو به مدت یک شب در دمای ۱۰۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت تا به‌صورت توده خشک درآید. آنگاه ٤ میلی‌لیتر از توده خشک با ۰/۵ میلی‌لیتر اسیدنیتریک غلیظ مخلوط گردید و به‌مدت یک ساعت در ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس حجم آن با آب مقطر دو بار تقطیرشده به ۵ میلی‌لیتر رسانیده شد. بدین ترتیب محلول جهت اندازه‌گیری روی با دستگاه جذب اتمی آماده گردید (۲۰).

مطالعه میزان رشد باکتری‌ها

دو باکتری مقاوم از هر فصل انتخاب گردید و از هر باکتری مقاوم کشت شبانه تهیه گردید. سپس به ازای هر باکتری مقاوم و منتخب تعداد سه ارلن مایر حاوی محیط کشت LB broth تهیه شد. در هر سری سه تایی، یکی از محیط‌ها فاقد فلز و به عنوان کنترل در نظر گرفته شد، به محیط دوم از ابتدا میزان $\frac{mg}{L}$ ۲۶۰ کلرید روی اضافه شد و به محیط سوم در نیمه فاز رشد لگاریتمی، $\frac{mg}{L}$ ۲۶۰ کلرید روی اضافه شد. سپس از سوسپانسیون میکروبی به هر یک از ارلن‌های سری سه تایی تلقیح گردید. یک ارلن حاوی

Archive of SID

www.SID.ir

محیط کشت LB broth بدون تلقیح باکتری و فاقد فلز در نظر گرفته شد تا از آن برای کالیبره‌نمودن دستگاه اسپکتروفتومتر استفاده شود. بلافاصله پس از تلقیح سوسپانسیون باکتریایی جذب نوری هر یک از محیط‌ها در طول موج ۵٤۰nm قرائت و سپس محیط‌ها در دمای ۳۰℃ به مدت ۱۲ ساعت در انکوباتور شیکردار در ۱۵۰rpm شیک گردیدند و جذب نوری آنها به فواصل یک ساعت قرائت گردید (۲۰).

تحلیل‌های آماری

تحلیل‌های آماری نتایج به‌دست آمده از طریق تحلیل واریانس (ANOVA) و آزمون دانکن (Duncan) به‌وسیله نرم افزار SPSS.15 صورت گرفت و برای رسم نمودارها نیز از نرم افزار ایکسل (Excel) استفاده شد.

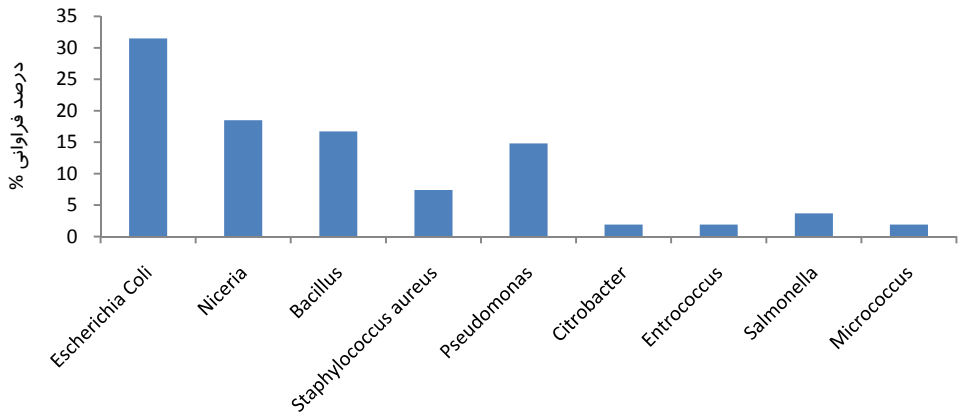
یافته‌ها

شمارش باکتری‌ها

میانگین تعداد باکتری‌ها در محیط کشت حاوی فلز روی و محیط بدون فلز روی (کنترل) بر حسب CFU/ml یا CFU/g به‌ترتیب ٤/۲۷۸ و ۵/۳۳۳ به‌دست آمد و اختلاف معنی‌دار بود ($p<۰/۰۱$). بیشترین میانگین تعداد باکتری مقاوم به روی در ایستگاه‌های پل ثامن و ام الطمیر بر حسب CFU/ml یا CFU/g به‌ترتیب ٤/۹۹۸ و ٤/۶۳۵ و کمترین میانگین تعداد باکتری مقاوم به فلز روی در ایستگاه گرگر بر حسب CFU/ml یا CFU/g ۳/٤٤ به‌دست آمد. تفاوت بین ایستگاه گرگر با بقیه ایستگاه‌ها از نظر تعداد باکتری مقاوم به فلز روی معنی‌دار بود ($p<۰/۰۱$).

شناسایی باکتری‌ها

میانگین درصد فراوانی باکترهای گرم منفی شناسایی‌شده بیشتر از باکتری‌های گرم مثبت بود و تفاوت معنی‌داری را در سطح یک درصد نشان داد. بر این اساس ۷۲ درصد باکتری‌های مقاوم جداشده گرم منفی و ۲۸ درصد باکتری‌ها گرم مثبت بودند. بیشترین درصد فراوانی باکتری‌های شناسایی‌شده مربوط به اشریشیا کولی وکمترین آن مربوط به باکتری‌های انتروباکتر، سیتروباکتر و میکروکوکوس بود (نمودار ۱). باکتری اشرشیا کلی در تمامی فصل‌ها و تمامی ایستگاه‌ها جداسازی شد.



نمودار۱. درصد فراوانی جنس های باکتریایی جدا شده

تعیین میزان مقاومت باکتری‌ها

میزان مقاومت باکتری‌های جداسازی شده، بین mgl^{-1} ۲۰۰ تا mgl^{-1} ۱۰۰۰ کلرید روی متفاوت بود. بیشترین میزان مقاومت مربوط به باکتری‌های جداشده در فصل تابستان (۷٤۱/۶۶۷ mg/l) و کمترین میزان مقاومت مربوط به باکتری‌های جداشده در فصل زمستان (۳۷۹/۱۶۷ mg/l) به‌دست آمد. در این میان باکتری‌های سودوموناس و

www.SID.ir

اشریشیاکولی جداشده در فصل تابستان بیشترین میزان مقاومت در برابر روی (۱۰۰۰mg/l) را نشان دادند. بیشترین میزان مقاومت به فلزروی، مربوط به باکتری‌های جداشده از ایستگاه پل ثامن با میانگین ۶۸۸/۸۸۹ و کمترین میزان مقاومت مربوط به ایستگاه گرگر با میانگین ٤١۶/۶۶۷ بود. تفاوت این دو ایستگاه از نظر میانگین میزان مقاومت به فلز روی در سطح ۵ درصد معنادار می‌باشد.

توانایی حذف روی توسط باکتری‌های مقاوم

توانایی حذف روی در بین باکتری‌های مقاوم بین ۳۹/۲۳ و ۶۸/۲۵ درصد متغیر بود. باکتری سودوموناس جداشده در فصل تابستان، بیشترین میزان حذف (۶۸/۲۵ درصد) را نشان داد و کمترین توانایی حذف روی (۳۹/۲۳ درصد) نیز مربوط به باسیلوس جدا شده در فصل زمستان بود. میزان حذف روی در محیط کشت حاوی باکتری، درمقایسه با محیط کشت کنترل بیشتر به دست آمد (جدول ۱).

جدول ۱. حذف زیستی باکتری‌های مقاوم

فصل	نام باکتری	مقدار اولیه Zn mg/L	مقدار Zn مایع رویی mg/L	مقدار Zn توده سلولی mg/L	مقدار حذف شده mg/L	درصد حذف ٪
تابستان	سودوموناس	۵۰۰	۱۳۱/۳٤	۲۷/٤۳	۳٤۱/۲۳	۶۸/۲۵
پاییز	سالمونلا	۵۰۰	۱۵۲/۵۳	۷۷/۲۸	۲۷۰/۱۹	۵٤/۰٤
زمستان	سودوموناس	۵۰۰	۲۳۹/۲	۶٤/۵۶	۱۹۶/۲٤	۳۹/۲۳
کنترل	کنترل	۵۰۰	٤۵٤/۷٤	-	٤۵/۲۶	۹/۰۵۳

رشد باکتری‌ها در حضور روی

منحنی‌های رشد باکتری‌های مقاوم در حضور ۲۶۰ mg /l کلرید روی از منحنی استاندارد رشد پیروی کردند. وجود روی در محیط کشت، به مدت‌زمان فاز تاخیری رشد در باکتری‌های جداشده در فصول مختلف تاثیر گذاشت. باکتری‌های جداشده در فصل زمستان بیشترین مدت زمان فاز تاخیری را نشان دادند، که در این میان بیشترین مدت زمان فاز تاخیری مربوط به باکتری باسیلوس جداشده از ایستگاه ام الطمیر و در فصل زمستان بود. افزودن روی از نیمه فاز رشد لگاریتمی در OD= ۰/۵ (منحنی سبزرنگ) موجب توقف موقتی در یک ساعت اول پس از اضافه‌کردن فلز شد. اما پس از آن باکتری مجدداً به رشد خود ادامه داد. نمودار قرمزرنگ این باکتری (حضور فلز از ابتدا)، نسبت به دو نمودار سبزرنگ و آبی رنگ (بدون فلز) هم در فاز لگاریتمی و هم در فاز ایستایی، رشد بسیار کمتری را نشان داد (نمودار۲).

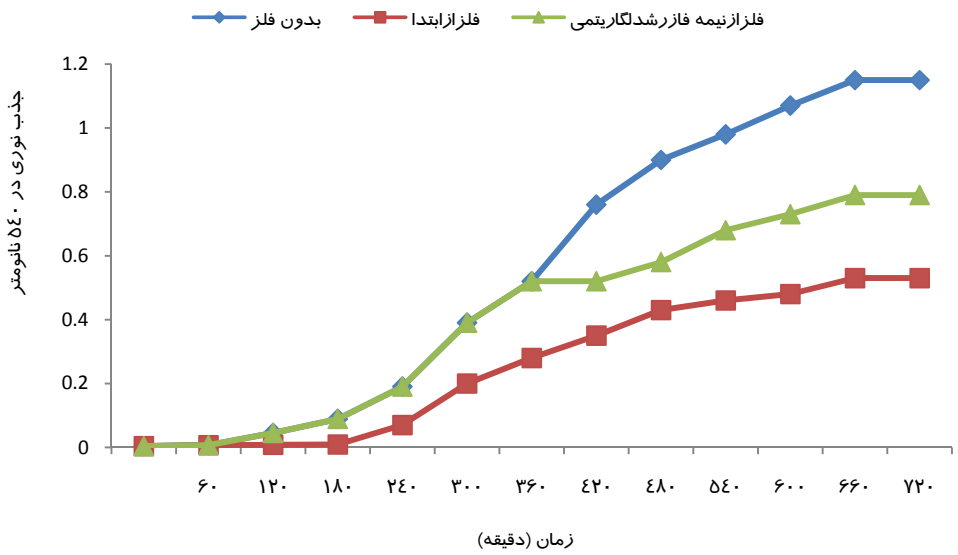
در مورد سالمونلا جداشده از ایستگاه پل ثامن و سیتروباکتر جداشده از ایستگاه دز در فصل پاییز، اضافه‌کردن روی در میانه کار (OD=۰/۵) موجب کاهش رشد باکتری‌ها شد (نمودار سبزرنگ). چنانچه در مورد سالمونلا جداشده از ایستگاه پل ثامن در فصل پاییز، منحنی سبز رنگ کاملاً از منحنی قرمز رنگ و آبی رنگ جدا شده و رشد کمتری را نسبت به آن‌ها نشان داده است. در مورد سودوموناس جداشده از ایستگاه پل ثامن در فصل زمستان، منحنی قرمز رنگ نسبت به منحنی سبز رنگ رشد کمتری دارد (نمودارهای ۳ و٤ و ۵).

در مورد اشریشیا کولی جداشده از ایستگاه پل ثامن در فصل تابستان تفاوت زیادی در سه نمودار این باکتری مشاهده شد. نمودار قرمز این باکتری در فاز رشد لگاریتمی نسبت به دو نمودار دیگر رشد بیشتری را نشان داد. یعنی باکتری در ابتدا توانسته فلز روی را به‌خوبی حذف کند، ولی بعد از مدتی حذف فلز روی توسط این باکتری کم شده است (نمودار ۶).

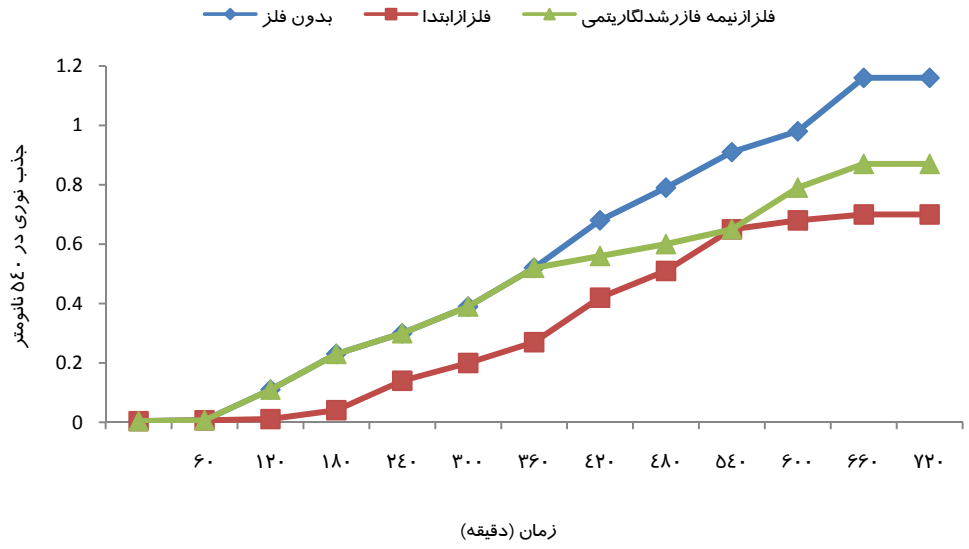
Archive of SID

www.SID.ir

باکتری سودوموناس جدا شده از ایستگاه پل ثامن در فصل تابستان، بالا ترین سرعت رشد در حضور روی را داشت. اضافه شدن فلز روی در نیمه فاز رشد لگاریتمی نه تنها رشد این باکتری را کاهش نداد بلکه منجر به افزایش رشد آن شد (منحنی سبزرنگ). همچنین حضور فلز روی در محیط کشت (نمودار قرمزرنگ) رشد باکتری را تشدید کرده است. هر چند پس از مدتی دوباره رشد آن نسبت به منحنی آبی رنگ کاهش پیدا کرده است. هر سه نمودار رشد این باکتری بسیار به هم نزدیک هستند (نمودار ۷).

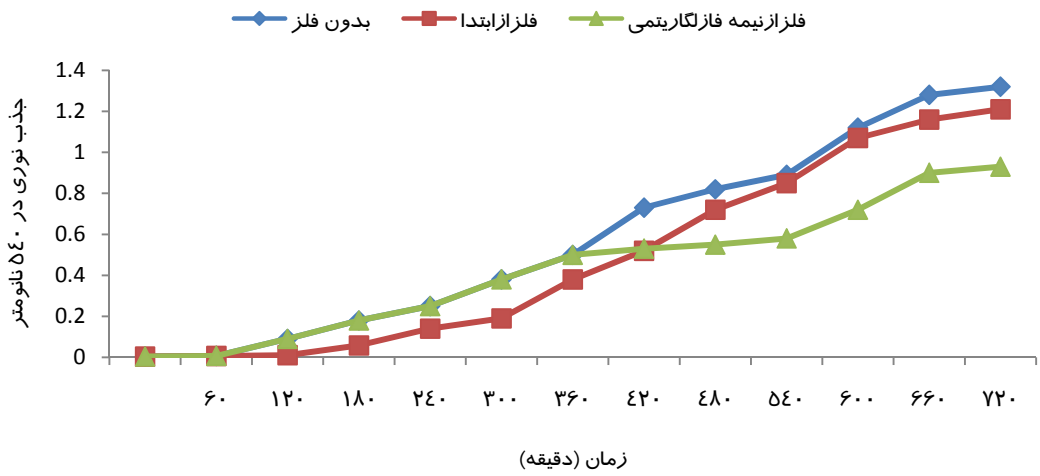


نمودار۲. رشد باکتری مقاوم *Bacillus* sp جدا شده در فصل زمستا ن

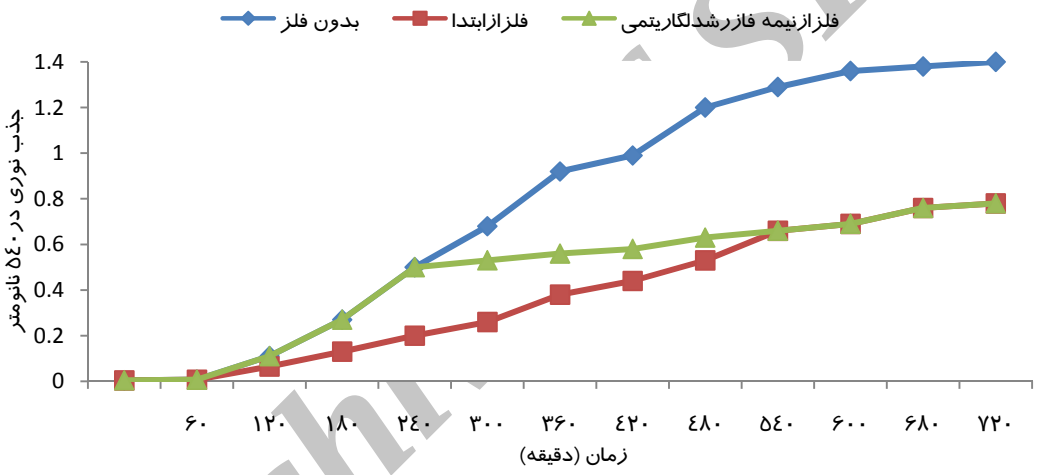


نمودار۳. رشد باکتری مقاوم جدا شده *Pseudomonas* sp در فصل زمستان

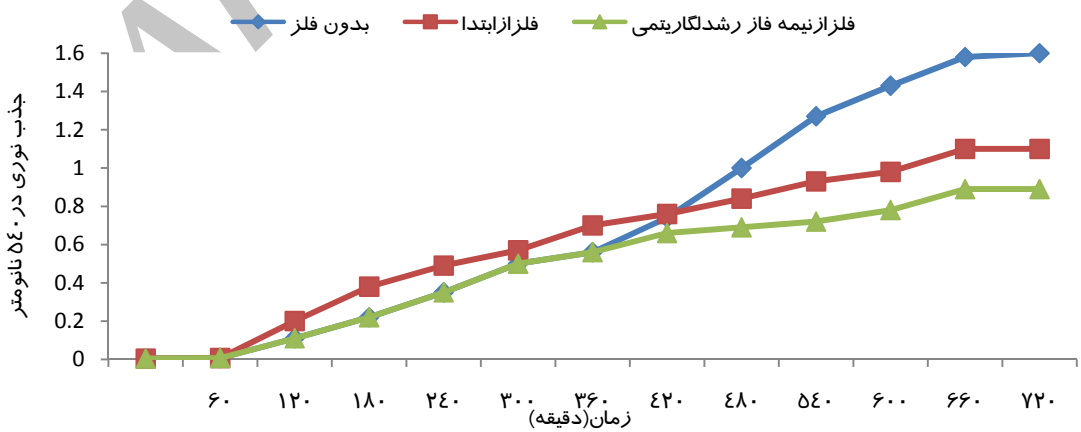
www.SID.ir



نمودار۴. رشد باکتری مقاوم جدا شده *Salmonella* sp در فصل پاییز

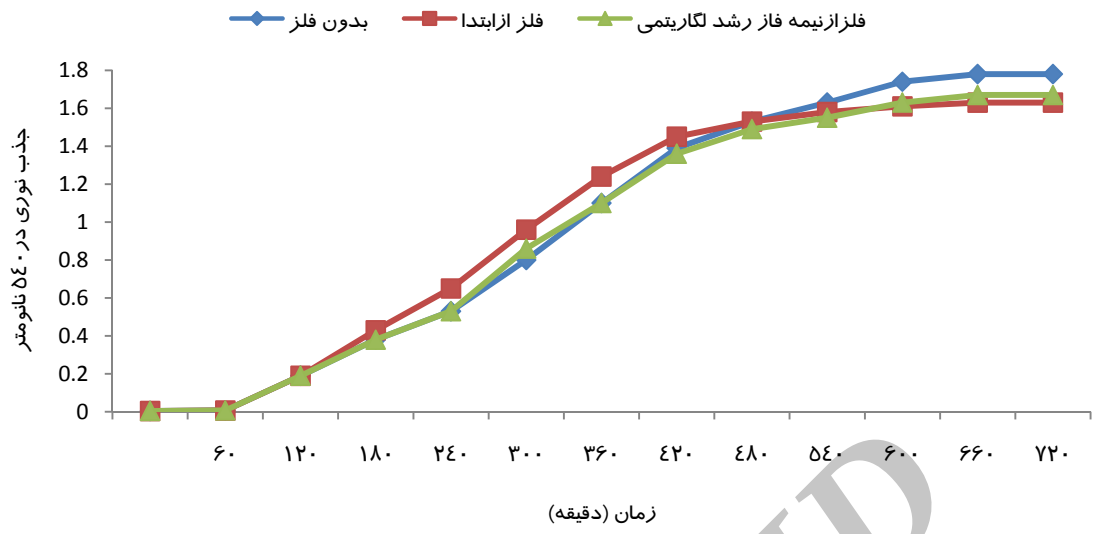


نمودار۵. رشد باکتری مقاوم جدا شده *Citrobacter* sp در فصل پاییز



نمودار۶. رشد باکتری مقاوم جدا شده *Escherichaia coli* در فصل تابستان

www.SID.ir



نمودار۷. رشد باکتری مقاوم جدا شده *Pseudomonas* sp در فصل تابستان

بحث

در تحقیق حاضر تعداد باکتری‌ها در محیط کنترل (بدون فلز) بیشتر از محیط فلزدار به‌دست آمد. وجود فلز موجب توقف رشد و مرگ و کاهش تعداد باکتری‌ها در محیط حاوی فلز روی گردیده است. در تحقیقات شوگرمن[1] و همکاران نیز تعداد باکتری‌ها در محیط کشت حاوی فلز بسیار کمتر از تعداد باکتری‌ها درمحیط کشت کنترل به‌دست آمد (۲۱).

در بررسی جاری باکتری‌های مقاوم به فلز روی، با روش کشت مستقیم و غنی‌سازی اولیه در حضور ۲۶۰mg/l کلرید روی جداسازی گردیدند. باکتری‌های جداشده با روش غنی‌سازی، در مراحل بعد در حضور روی رشد بهتری را نشان دادند. غنی‌سازی اولیه موجب بیان ژن‌های مقاومت به فلز در باکتری‌ها، سازگاری آنها با شرایط استرس‌زای ناشی از وجود فلز و در نتیجه رشد بهتر آنها می‌شود (۲۲).

تالات[2] در سال ۲۰۰۰ جهت جداسازی باکتری‌های مقاوم به روی از روش غنی‌سازی اولیه استفاده کرد (۲۳). همچنین شکیبایی و همکاران جهت جداسازی باکتری‌های مقاوم به روی از روش کشت مستقیم استفاده کردند (۲۴). نتایج به‌دست‌آمده نشان داد که باکتری‌های جداشده با روش کشت مستقیم بعضاً توانایی تحمل غلظت‌های بالاتر از میزان لازم برای جداسازی را نداشتند.

در تحقیق حاضر باکتری‌های گرم مثبت و منفی مختلفی به عنوان باکتری‌های مقاوم به روی شناسایی شدند. درصد فراوانی باکتری‌های گرم منفی در مقایسه با باکتری‌های گرم مثبت بیشتر بود. باکتری‌های گرم منفی در شرایط سخت به‌راحتی از طریق فرایند هم‌یوغی[3] به‌صورت درون‌گونه‌ای و برون‌گونه ای قادر به انتقال ژن‌های مقاومت به روی بین یکدیگر می‌باشند. علاوه بر این اولین مرحله در برهم‌کنش باکتری و یون روی در محیط، عبور این فلز از دیواره سلولی می‌باشد. باکتری‌های گرم منفی به دلیل داشتن غشای خارجی (که از عبور مواد سمی به داخل سیتوپلاسم جلوگیری می‌کند)، در مقایسه با باکتری‌های گرم مثبت کمتر تحت تاثیر روی قرار می‌گیرند؛ از این رو احتمال جداسازی آنها از محیط نیز افزایش می‌یابد. مقاومت به روی در طیف

[1] Sugarman
[2] Talat
[3] Conjugation

Archive of SID
www.SID.ir

وسیعی از باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی گزارش شده است. نوویک و همکاران جنس‌های باکتریایی مقاوم به روی شامل باسیلوس، سالمونلا و آرتروباکتر را شناسایی کردند (۱٤). طهمورث پور وهمکاران جنس‌های باکتریایی کلبسیلا، سیتروباکتر، نایسریا و استافیلوکوکوس مقاوم به روی را شناسایی کردند (۲۵).

مطالعه بادرا و همکاران نشان داد اگر باکتری‌ها در معرض سطوح ppb از فلز روی، نظیر غلظت‌های طبیعی روی در رودخانه قرار بگیرند، می‌تواند مقاومت به روی در آن‌ها القا شود (۱۱). آنها باکتری‌های محیطی مقاوم به روی را جدا کردند که قادر به رشد در محیط کشت با غلظت ۷ mM سولفات روی بودند. نوویک و همکاران جنس‌های باکتریایی مقاوم به روی را شناسایی کردند که میزان مقاومت به روی در آنها بین ۲- ۰/۲ mol/lit کلرید روی بود (۱٤). یکی از دلایل میزان مقاومت بیشتر در بین باکتری‌های جداشده در تحقیق حاضر می‌تواند مربوط به روش جداسازی یا کشت باکتری‌های مقاوم به روی باشد. در بیشتر تحقیقات گذشته جداسازی باکتری‌های مقاوم به روی از طریق کشت مستقیم صورت می‌گرفت و میزان مقاومت کمتری نیز به‌دست می‌آمد. در تحقیق جاری باکتری‌های مقاوم از طریق روش غنی‌سازی اولیه و همچنین روش کشت مستقیم جداسازی شدند. غنی‌سازی اولیه موجب سازگاری باکتری‌ها در برابر استرس ناشی از روی می‌شود و در نتیجه باکتری‌های جدا شده قادر به تحمل غلظت‌های بالاتر روی نیز خواهند بود. هر چند به دلایل گوناگون از جمله استفاده از محیط‌های کشت و سوش‌های مختلف، مقایسه مستقیم مقادیر مقاومت به روی به‌دست آمده در تحقیقات مختلف نمی‌تواند صورت بگیرد.

المومانی[1] و همکاران با روش غنی‌سازی اولیه باکتری‌های مقاوم به روی را جداسازی کردند که می‌توانستند در غلظت ۱۲۵۰ mg/l از فلز روی رشد کنند (۲۶). نگرآو همکاران با استفاده از روش غنی‌سازی اولیه باکتری‌های مقاوم به روی را شناسایی کردند که قادر به رشد در غلظت ۱٤۰۰mg/l فلزروی بودند (۱۲). تالات طی تحقیقی، مقاومت سویه‌های سودوموناس آئروجینوزا که با روش غنی‌سازی جداسازی شده بودند را بین ۲۰ -۲۵mM اعلام کرد (۲۳).

باکتری‌های مقاوم به روی توانایی حذف این فلز را از محیط اطراف خود دارند و برای این منظور اختصاصاتی پیدا کرده‌اند. المومانی و همکاران باکتری‌های مقاوم به روی را جداسازی کردند که توانایی حذف روی با کارایی ۱۹/۲ تا ۸۲/۸٤ درصد را داشتند (۲۶). شکوری و همکاران نیز توانایی حذف روی توسط ۶ سویه باکتریایی جداشده را بین ۱۰ تا ۲۸ درصد اعلام کردند (۲۷). همچنین خسروان و همکاران جذب بیولوژیک فلز روی توسط چهار نوع بیوماس میکروبی را بین ۳۳ تا ۸۲ درصد اعلام کردند (۲۸). در تحقیق حاضر توانایی حذف روی توسط باکتری‌های مقاوم بین ۳۹ تا ۶۸ درصد تعیین شد. این نتایج نشان می‌دهد که عوامل زنده (باکتریایی) توانایی حذف روی از محیط کشت را دارند.

در تحقیق جاری نمودار رشد مقاوم‌ترین باکتری‌های جداشده در حضور روی مطابق با نمودار رشد استاندارد باکتری‌ها به دست آمد. یک استرس ناگهانی (افزودن روی در نیمه فاز رشد لگاریتمی) نیز مانع رشد این باکتری‌ها نشد و فقط در یک مورد منجر به یک وقفه کوتاه در رشد باکتری باسیلوس از ایستگاه پل فولاد در فصل زمستان شد. این موضوع را می‌توان به شوک ناشی از حضور ناگهانی فلز در محیط کشت نسبت داد. در مورد باکتری‌های

[1] Al.Momani

Archive of SID
www.SID.ir

جداشده در فصل پاییز و زمستان، حضور فلز روی در محیط کشت موجب افزایش مدت‌زمان فاز تاخیری شد. باکتری‌ها پس از انتقال به محیط کشت جدید، به مدت زمان خاصی نیاز دارند تا با شرایط محیط جدید سازگار شوند. در طول مدت سازگاری، رشد باکتری‌ها بسیار کم است. بنابراین طبیعی است که با وجود روی در محیط کشت مدت زمان فاز تاخیری رشد افزایش یابد.

باکتری سودوموناس جدا شده از ایستگاه پل ثامن در فصل تابستان، بیشترین میزان مقاومت و سرعت رشد در حضور روی را در میان باکتری‌های مورد بررسی نشان داد. با توجه به نمودارهای رشد این باکتری می‌توان نتیجه گرفت که رشد این باکتری نه‌تنها در حضور فلز روی کمتر نشد، بلکه فلز روی موجب تشدید رشد باکتری شده است. این باکتری از ایستگاه پل ثامن که بیشترین میزان آلودگی به روی را دارد، جدا شد. به نظر می‌رسد تماس با روی در محیط زیست و به کارگیری روش غنی‌سازی، این باکتری را با شرایط وجود این فلز سازگار کرده است. باکتری سودوموناس یکی از مقاوم‌ترین باکتری‌ها در برابر مواد ضد میکروبی است. به همین دلیل این باکتری در محیط های مختلف قادر به ادامه رشد می‌باشد.

نتیجه گیری

باکتری‌های جداشده از محیط‌های آلوده به روی دارای پتانسیل حذف این فلز می‌باشند. با فراهم‌نمودن شرایط و بستر مناسب جهت رشد این باکتری‌ها می‌توان از آن‌ها جهت سمیت‌زدایی محیط‌های آلوده استفاده کرد. در این بررسی بیشترین حذف روی مربوط به باکتری *Pseudomonas* sp جدا شده از ایستگاه پل ثامن در فصل تابستان، با کارایی ۶۸ درصد بود. بنابراین می‌توان از این باکتری جهت تصفیه پساب کارخانجات آلوده‌کننده رودخانه کارون استفاده کرد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله مراتب سپاس و قدردانی خود را از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی، واحد جهرم به دلیل حمایت‌های مالی اعلام می‌دارند.

References

1- Nurenberg HW. The Volta metric approach in tract metal chemistry of natural wates and atmospheric precipitation. Anal Chim Acta. 1984; 164(7): 1-21.
2- Jafarzadeh-Haghighi N. Detection and determination of heavy metals Hg, Cd, Pb, Fe, Ni, Co, Cu, Cr and Zn in water and pollutant sources Karun and Dez Rivers in Khuzestan Province. Report of Environmental Research Center of Kuzestan Province; 1999; 1-30. (In Persian)
3- Remacle J, Houba C. The removal of heavy metals from industrial effluents in a biological fluidized bed. Environ Technol Lett. 1983; 4(2): 53-57.
4- Choudhury R, srivastava S. Zinc resistance mechanism in bacteria. Curr Sci. 2001; 81(7): 768-775.
5- Riyahi A, Esmaeeli A, Savari A. Determine of heavy metals (Cd, Co, Pb, Ni, Zn & Cu) in water, sediments and fish from thr Karun River. Iranian Journal of Natural Resources. 1999, 52(2): 37-46. (In Persian)
6- Muyssen BT, De-Schamphelaere KA, Janssen CR. Mechanisms of chronic waterborne Zn toxicity in Daphnia magna. Aquat Toxicol. 2006: 77(4): 393-401.
7- Kafilzadeh F, Kargar M, Kadivar A. Determine the concentrations of Cd, Zn,Cu,Fe and Ni in the Khoshk river shiraz and some adjacent crops. Environmental Science and Technology. 2006; 8(4): 67-75. (In Persian)
8- Nweke CO, Okolo JC, Nwanyanwu CE, Alisi CS. Response of planktonic bacteria of Newcalabar River to zinc stress. Afr J Biotechnol. 2006; 5(8): 653-658.
9- Essa AM, Macaskie LE, Brown NL. Mechanisms of mercury bioremediation. Biochem Soc Trans. 2002; 30(4): 672-674.

Archive of SID

www.SID.ir

10- Grren-Ruiz C, Rodriquez-Tirado V, Gomez-Gil B. Cadmium and zinc removal from aqueous solutions by Bacillus jeotgali: pH, Salinity and temperature effects. Bioresour Technol. 2008; 99(9): 3864-3870.
11- Bhadra B, Nanda AK, chakraborty R. Fluctuation in recoverable nickel and zinc resistant copiotrophic bacteria explained by the varying zinc lon content of Torsa River in different monts. Arch Microbiol. 2007; 188(3): 215-225.
12- Negrea A, Muntean G. Bio-remediation of the zinc Polluted soils from mining areas. Chem Bull Politehnica Univ. 2008; 53(67): 1-2.
13- Nweke CO. Kinetics of zinc toxicity to invironmental bacteria isolates. Ambi Agua. 2009; 4(3): 23-34.
14- Nweke CO, Alisi CS, Okolo JC, Nwanyanwu CE. Toxicity of zinc to heterotrophic bacteria from a tropical river sediment. Appl Ecol Environ Res. 2007; 5(1): 123-132.
15- Bong CW, Obayashi Y, Suzuki S. Efect of exposure of zinc at low concentration to bacterial production in seawater. Mem Fac Agr Ehime Univ. 2011; 56: 41-45.
16- Diagomanolin V, Farhang M, Ghazi-Khansari M, Jafarzadeh N. Heavy metal (Ni, Cr, Cu) in the karoon waterway river. Toxicol Lett. 2004; 151(1): 63-68.
17- APHA, AWWA, WEF. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 22 th edition. Washington DC, USA. 2012: 1148-1157.
18- Wagner-Dobler I, Lunsdorf H, Lubbenhausen T, Voncanstein H, Li Y. Structure and species composition of mercury reducing biofilms. Appl Environ Microbiol. 2000; 66(10): 4559-4563.
19- Kafilzadeh F, Mirzaei N, Kargar M. Isolation and identification of mercury resistant bacteria from water and sediments of Kor river. Journal of Microbial World. 2009; 1: 43-50. (In Persian)
20- Mirzaei N. Evaluation of detoxification and resistance to mercury in bacteria isolated from Kor river. M.Sc thesis Islamic Azad University, Jahrom Branch, Jahrom, Iran. 2007. (In Persian)
21- Sugarman B, Epps LR, Stenback WA. Zinc and bacterial adherence. Infect Immun. 1982; 37(3): 1191-1199.
22- Robinson JB, Tuovinen OH. Mechanisms of microbial resistance and detoxification of mercury and organomercury compound: physiological, biochemical and genetic analysis. Microbiol Rev. 1984; 48(2): 95-124.
23- Talat ME. Genetic mechanism of heavy metal resistance of pseudomonas aerogionsa CMG103. Ph.D thesis University of Karachi. Pakistan. 2000: 171-178.
24- Shakibaei MR, Khosvayan A, Farahmand A, Zareh S. Elimination of copper and zinc from industrial wastes by mutated bacteria. Journal of Kerman University of Medical Sciences; 2009; 16(1): 13-24. (In Persian)
25- Tahmourespour A, Kermanshahi RK. Adaptability of bacterial isolates to heavy metals in industrial wastewater. Water and Wastewater Journal. 2007; 61: 53-59. (In Persian)
26- Al-Momani FA, Massadeh AM, Hadad YA. Uptake of zinc and copper by halophilic bacteria isolated from the Dead Sea Shore. Biol Trace Elem Res. 2006; 115(3): 291-300.
27- Shakoori AR, Sattar S, Khalid N. Zinc resistant bacteria from industrial wastewater and their use bioremediator. Pakistan J Zool. 2003; 44: 245-257.
28- Khosravan A, Amini J, Sarsalary S, Rohanian E. Comparison of biosorption of heavy metal zince by four different microbial biomas (activated sludge) in industrial waste water in order to biological refinement. Journl of Microbial World. 2009; 1: 23-30. (In Persian)

Archive of SID

www.SID.ir

Investigation of Growth Rate, Resistance, and Zinc Elimination Ability of Resistant Bacteria Isolated from Water and Sediment of Karun River

Kafilzadeh F[1]*, Chittaei M[2]

1. Associate professor, Department of Biology, Jahrom Branch, Islamic Azad University, Jahrom, Iran.
2. MSc, Department of Biology, Jahrom Branch, Islamic Azad University, Jahrom, Iran.
Corresponding author. Tel: +989171140799 Fax: +987116262102 E-mail: Kafilzadeh@jia.ac.ir

Received: 7 Aug 2013 Accepted: 1 Nov 2013

ABSTRACT

Background & Objectives*:* Although zinc is an essential metal ion, however, its high concentration is toxic and has inhibitory effect on important functions of the cells. Purpose of present study is investigation of growth rate, resistance, and zinc elimination ability of isolated bacteria from Karun River.

Methods*:* In this research water and sediment samples were taken from 4 stations in 3 seasons. Isolation of resistant bacteria was performed by enrichment and direct culturing on solid medium. Isolated bacteria were identified by using biochemical tests and their resistance was evaluated in LB broth medium containing 200 to 1400 mg/l of zinc chloride. Growth of resistant bacteria and their ability to remove zinc were investigated at zinc chloride concentration of 260 mg/l.

Results*:* Bacteria such as Pseudomonas, E. coli, Salmonella, and Citrobacter were identified as zinc resistant bacteria. Some of the bacteria were able to tolerate 1000 mg/l of zinc chloride concentration. Zinc removal ability of bacteria isolated in each season varied from 39 to 68 %.*Pseudomonas* isolated in summer showed the highest growth in presence of zinc.

Conclusion*:* Isolated bacteria from zinc contaminated sites have the potential for zinc elimination. Growth curves of resistant bacteria followed standard growth curves in presence of 260 mg/l of zinc chloride. *Pseudomonas* isolated in summer showed the highest zinc removal rate with an efficiency of 68%.

Keywords: Zinc Resistant Bacteria, Heavy Metals, *Pseudomonas*, Karun River

Archive of SID

www.SID.ir