مجله میکرب شناسی پزشکی ایران
سال۶ شماره ۸، بهار و تابستان ۱۳۹۱، صفحات - ۲۸

جدا سازی باکتریهای مقاوم به جیوه از دریاچه مهارلو درسال۸۹-۸۸

: **معصومه آرام*-دکتر اصغر شریفی** - دکتر فرشید کفیل زاده*** - محسن نغماچی****

* دانشگاه آزاد اسلامی جهرم و اداره آموزش و پرورش یاسوج
** دانشگاه علوم پزشکی یاسوج دانشکده پزشکی مرکز تحقیقات میکروب شناسی
*** دانشگاه آزاد اسلامی جهرم
نویسنده مسئول: دکتر اصغر شریفی **Email:asgharsharifi@yahoo.com**

چکیده:

مقدمه و اهداف: جیوه ازسمی ترین فلزات سنگین است.بعلت کاربرد زیاد آن درصنعت, کشاورزی, دندانپزشکی, استخراج طلاو...باعث آلودگی محیط زیست می شود ومقادیر اندک آن درخاک و آب تهدید کننده جانداران آن ناحیه است .غلظت کم این فلز باعث مسمومیت حاد و مزمن,اختلال دربینایی,شنوایی وسیستم عصبی می شود و با عبور از سدخونی-مغزی وجفت باعث صدمه مغزی,عدم رشد فکری ,کوری و ناتوانی در صحبت کردن جنین می شود .باکتری های مناطق آلوده به جیوه ازطریق فرایندا‌حیاء قادربه حذف این فلزدرمحیط اطراف خود هستند(۲و۳).دریاچه مهارلو(نمک)در۲۳کیلومتری جنوب شرق شیرازاست.کلیه فاضلابهای خانگی,تجاری، صنعتی، بیمارستانی و کشاورزی شیراز از طریق رودخانه های خشک,پل فسا,سلامیه وارد دریاچه شده و آن را آلوده می کند. از جمله آلاینده های این دریاچه فلزات سنگین به خصوص جیوه می باشد.هدف از پژوهش حاضر جداسازی و شناسایی هالوتولرانت های مقاوم به جیوه از آب و رسوبات دریاچه و بررسی توانایی حذف جیوه توسط آنهاست(۶).

موادوروش ها :پس از نمونه گیری از آب ورسوبات ۴ ایستگاه دریاچه در ۴ فصل سال باکتری های هالوفیل مقاوم به جیوه از طریق غنی سازی درمحیط کشتL.B.Broth و کشت در محیط L.B.Agar حاوی نمک وجیوه جداسازی شدند. با اندازه گیری میزان جیوه باقی مانده در محیط با دستگاه جذب اتمی ,توانایی حذف جیوه توسط مقاوم ترین باکتری های جداشده محاسبه شد.و سینتیک رشدآنها بررسی شد(۵).

نتیجه گیری : باکتریهای مقاوم به جیوه نقش تعیین کننده ای در جذب و حذف این عنصر از محیط زیست دارند، ازجمله سوشهای باکتریایی هالوتولرانت، مقاوم به جیوه می توان *اشرشیا کلی ، ویبریو ها ،کلبسیلا ، سیتروباکتر* و...را نام برد.

کلمات کلیدی: جیوه، مهارلو، هالوتولرانت های مقاوم به جیوه.

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه:

آب، مایعی حیاتی است که نقش بسیار مهمی در حفظ و بقای موجودات زنده دارد و انجام بیشتر واکنش‌های شیمیایی نیز مستلزم وجود محیط آبی است. این در حالی است که بخش قابل توجهی از آب مصرفی در محیط‌های خانگی، صنعتی و مزارع کشاورزی تبدیل به پساب می‌شود که می‌تواند منجر به آلودگی آب‌های سطحی و منابع زیرزمینی و همچنین آلودگی محیط زیست شود(۲). از طرفی رشد ناگهانی صنایع, انفجار جمعیت و انقلاب کشاورزی اثر بزرگی بر محیط فیزیکی انسان گذاشت. بعلاوه داروها, انتی بیوتیکها و مواد رادیواکتیو, زباله های صنعتی دارای فلزات سنگین ا ند که موتاژن, کارسینوژن و تراتوژن اند. بسیاری از فلزات سنگین اثرات زیان آوری روی زندگی و حیات دارند (۷). یکی از مهم‌ترین پیامدهای نامطلوب ناشی از تخلیه فاضلاب‌های صنعتی در آب‌های سطحی، مرگ‌ومیر حیوانات آبزی بخصوص ماهی‌هاست که متلاشی شدن اجساد و بقایای این موجودات نیز سبب افزایش آلودگی‌های زیست‌محیطی در آن منطقه خواهد شد(۳).

امروزه بسیاری از کشورها برای تصفیه پساب‌ها با مشکلات بسیار زیادی مواجه هستند که می‌تواند عواقب جبران‌ناپذیری در محیط زیست و سلامت انسان‌ها و دیگر موجودات زنده به همراه داشته باشد. با توجه به اهمیت این موضوع، از بین بردن آلودگی ناشی از پساب‌ها با استفاده از فناوری‌های نوین از موضوعات مهمی است که در سال‌های اخیر مورد توجه قرار گرفته و تاکنون موفقیت‌های بسیاری در زمینه کاربرد روش‌های جدید به دست آمده که می‌تواند نقش بسیار مهمی در تضمین سلامت موجودات زنده داشته باشد(۳).

فاضلاب‌های صنعتی، فاضلاب‌هایی هستند که ترکیب شیمیایی آنها به نوع فعالیت صنعتی ایجادکننده این نوع فاضلاب‌ها بستگی دارد. ورود فاضلاب‌های صنعتی به دریاها ودریاچه ها سبب آلودگی آب و در نتیجه مرگ آبزیان خواهد شد. کارخانه‌ها و فرآورده‌های تولیدی آنها سبب آلودگی شیمیایی پساب‌های صنعتی می‌شود. آرسنیک، جیوه و سرب از مهم‌ترین ترکیبات شیمیایی موجود در پساب کارخانه‌های تولید کاغذ، پلاستیک و مواد شیمیایی دفع آفات گیاهی هستند که سبب آلودگی محیط زیست و آب‌های جاری و سطحی می‌شوند(۲). جیوه یکی از الوده کننده های اصلی محیط است که بسیار سمی است. جیوه موتاژن, ممانعت کننده رشد ودارای اثرات سمی و علت بسیاری از بیماریها وسندرمهای مهم انسانی است. اثر جیوه بر عملکرد اکوسیستم از اهمیت اقتصادی و بهداشتی برخوردار است . جیوه ایجاد مسمومیتهای مزمن و حاد می کند(۷).

ترکیبات آلی جیوه بالا خص مشتقات آلکیل مانند هالوژنهای اتیل مرکوری بسیار سمی هستند و ایجاد اختلالات شدید بینایی می کنند و معمولاً باعث از بین رفتن بعضی از اعصاب سطحی و خلفی طناب عصبی ستون فقرات می‌شوند همچنین روی نرونهای مغز نیز اثر می گذارند . هالوژنهای آلکیل مرکوری ر وی پوست اثر تحریکی دارد و می تواند ایجاد بیماریهای پوستی شدید نماید .دی متیل مرکوری فوق العاده سمی است و ایجاد عوارض شدید می نماید(۳) . مقادیر جزئی از این ترکیب جیوه می تواند عوارضی را برای چند ماه ایجاد نماید علاوه برانسان موجودات زنده, گیاهان و جانوران ,جیوه همچنین بر رشد باکتریها اثر دارد. گرچه بسیاری از باکتریها در محیط غنی از جیوه می تواند رشد کند(۷).بسیاری از گیاهان و جانوران آبزی قادر به جذب جیوه هستند و اعضای پایین تر زنجیره غذایی (مانند فیتوپلانکتون ها) جیوه را در خود محبوس می سازند. زمانیکه پلانکتون ها توسط گیاهخواران یا گوشتخواران عالی تر زنجیره غذایی خورده می‌شوند. فلز جیوه به بدن آن ها منتقل و در نهایت این زنجیره به ماهیان ختم می‌شود که به وسیله انسان مصرف می گردند(۵).

محاسبات اخیر جهانی میزان ورود جیوه را به طبیعت ۸۳۰۰- ۴۸۰۰ تن در سال برآورد می‌کنند. هزینه حذف هر پوند جیوه از محیط با استفاده از تکنولوژی معمول، دهها و هزارها دلار است. بنابراین کشف تکنیک‌های حذف متناوب و قابل دسترسی جیوه نیاز ضروری است(۱۲). روش های شیمیایی

Archive of SID

www.SID.ir

جهت حذف فلزات سنگین و جیوه از آب و پساب، علاوه بر هزینه بالا که سبب خودداری صاحبان صنایع از کاربرد چنین روش‌هایی می‌شود. مشکل تولید لجن حاصله از رسوبات شیمیایی را نیز به دنبال دارند که خود مشکلی است در قسمت مواد زاید که سازگار با محیط زیست نیست (۴). بنابراین روش حذف بیولوژیکی هم اقتصادی بوده و هم سازگار با محیط زیست است، مورد توجه قرار می‌گیرد. در این روش حذف بیولوژیک از میکروارگانیسم ها برای کاهش و حذف آلاینده‌های فلزی (جیوه) استفاده می‌شود. که اصلاح زیستی[۱] گویند(۱). باکتری ها به علت داشتن آنزیم‌های مختلف تجزیه کننده نسبت به سایر میکروارگانیسم ها از اهمیت بیشتری برخوردارند(۱). از مهم ترین باکتری‌ها می‌توان به باسیلوس ها، سودوموناسها ویبریوها و خانواده انتروباکتریاسه اشاره کرد(۱).

ورود فاضلاب‌های صنعتی به آب‌های سطحی، زمینه مناسبی را برای فعالیت باکتری‌های موجود در آب در محیط بی‌هوازی و بدون نیاز به مصرف اکسیژن فراهم می‌کند که علاوه بر ایجاد بوی نامطبوع در آب‌ها، مواد سمی و قابل اشتعالی را نیز در آب به وجود خواهد آورد و بنابراین محیط نامناسبی را برای زندگی موجودات آبزی ایجاد خواهد کرد(۲). سیستم های مقاومت به فلزات دربسیاری از گروههای باکتریایی شناخته شده است. باکتریها دارای توانایی گسترده در سطح سلولی و مولکولی خود برای غلبه بر استرسهای محیط های خارجی هستند(۷).از روش های بیولوژیک جهت حذف فلزات سنگین از پساب ها و آب های آلوده استفاده می شود. روش های بیولوژیک هم اقتصادی بوده و هم سازگار با محیط زیست است. در این روش ها از موجودات زنده (باکتری،مخمر،جلبک،قارچ،گیاهان و ...) استفاده میشود. باکتری ها به علت دارا بودن سیستم های مقاومت به فلزات سنگین و همچنین آنزیم های تجزیه کننده نسبت به سایر میکروارگانیسم ها از اهمیت بیشتری برخوردارند(۷).

۱-Bioremediation

دریاچه مهارلو در ۲۳ کیلومتری جنوب شرقی شیراز قرار گرفته و دارای آبی شور با میزان نمک متوسط۲۲۰گرم در لیتر می باشد. توسط رودخانه های فصلی خشک،پل فسا، نظرآباد، سروستان و سلامیه مورد هجوم انواع آلودگی ها قرار می گیرد(۶).در اطراف رودخانه های ورودی به دریاچه مهارلو به خصوص رودخانه خشک،فعالیت های صنعتی ، شهری ،کشاورزی زیادی مانند،کارخانه نرگس شیراز،کارخانه نوشابه سازی زمزم،کارخانه الکل سازی شیراز،پارس شیمی، بیمارستانها و تعمیرگاه ها، رستوران ها و ... وجود دارد که هر کدام در پساب خود دارای فلزات سنگین مختلف هستند. که در نهایت به دریاچه مهارلو تخلیه می گردند(۶). هدف از این پژوهش اندازه گیری میزان جیوه درآب ورسوبات دریاچه مهارلو، جداسازی ، شناسایی و بررسی سینتیک رشد باکتری های مقاوم به جیوه (سمی ترین فلز سنگین) این دریاچه ، جهت به کارگیری در تصفیه پساب کارخانجات ومنابع آلوده کننده وبررسی فرضیه ارتباط بین افزایش آلودگی محیط به جیوه و افزایش احتمال جداسازی باکتری های مقاوم به جیوه است. از آنجایی که دریاچه دارای نمک است باکتری های فوق هالوتولرانت مقاوم به جیوه هستند.

مواد وروشها:

محدوده مطالعاتی ورودی‌های رودخانه خشک ،پل فسا، سلامیه و وسط دریاچه، یعنی ۴ ایستگاه تعیین گردید. (شکل) که سه ایستگاه ورودی رودخانه‌ها به دریاچه آلوده ترین ایستگاه‌ها جهت جداسازی باکتری‌های هالوتولرانت مقاوم به جیوه وایستگاه وسط دریاچه باآلودگی کمتربه عنوان ایستگاه کنترل، انتخاب گردیدند. درهنگام نمونه گیری موقعیت جغرافیایی ایستگاه‌هابه وسیله دستگاه موقعیت یاب جهانی (GPS) تعیین گردید.

آماده سازی نمونه ها جهت اندازه گیری میزان جیوه:

۱-نمونه‌های آب : نمونه‌ها با فیلتر واتمن ۴۲میلیمتری صاف گردیدند. تا ناخالصی‌های موجود در آنها حذف گردید. تمام

Archive of SID

www.SID.ir

نمونه‌های فیلتر شده با مخلوطی از نیتریک اسید و کلریدریک اسید (به نسبت ۳ به۱) هضم شدند.

۲-نمونه های رسوب:برای این منظور ابتدا نمونه ها کاملاً یکنواخت گردیده و سپس در ظرف پتری دیش قرار داده و با ترازو وزن گردیدند بعد آنها را در آون(Oven) قرار داده (دمای ۱۰۳ درجه سانتیگراد) تا خشک شوند و وزن آنها تعیین گردید تا درصد رطوبت به دست آید. سپس از نمونه های خشک یک گرم برداشته و ۱۰ میلی لیتر مخلوط کلریدریک اسید و نیتریک اسید به نسبت ۳به۱ به تمام نمونه ها اضافه شد. نمونه هارا حرارت داده شده و با فیلترواتمن۴۲میلیمتری صاف گردیدند تا ناخالصی های موجود در آنها از بین برود.سپس حجم آنها با آب مقطر به ۱۰۰ میلی لیتر رسانده شد(۵).ومیزان فلزسنگین جیوه درنمونه های آب ورسوب با روش بخار سرد توسط دستگاه جذب اتمی اندازه گیری شد (۵).

شمارش باکتری‌ها:

شمارش باکتری‌ها به روش Viable Plate Count انجام شد. ابتدا از هر یک از نمونه های آب و رسوب رقت‌های 10^{-1} تا 10^{-9} تهیه گردید. با پیپت از هر یک از رقت ها حجم ۰/۱ میلی لیتر برداشته و در دو محیط LBagar که یکی حاوی فلزجیوه و دیگری فاقد فلزجیوه است به روش (Surface plate method)کشت داده شد. پلیت ها به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۰درجه سانتی گراد گرمخانه گذاری شد. پس از ظاهر شدن کلنی‌ها پلیت‌های حاوی کلنی‌های مشخص و قابل شمارش انتخاب وتعداد کلنی‌های شمارش و در حجم (۰/۱ میلی لیتربرداشته شده) و در عدد رقت (باتوان مثبت) ضرب گردید تا تعداد باکتری ها در محیط کنترل و محیط فلزدار بر حسب CFU/ml,CFU/gr به دست آید(۵).

در این تحقیق از محیط کشت Luria Bertani Bbroth (ساخت شرکت مرک آلمان) جهت غنی سازی باکتری‌های مقاوم به جیوه استفاده گردیداز آنجا که محیط کشت.Agar. L.B یک محیط کشت عمومی است و اکثر باکتری‌ها می‌توانند درآن رشد نمایند جهت انتخابی کردن محیط، هنگام تهیه محیط ۲درصد نمک طعام NaCl اضافه کرده و پس از اتو کلاو ۱۰میلی گرم درلیترمحلول کلرید جیوه ۲ظرفیتی $HgCl_2$ بافیلتر۴۵/ میکرومتری استریل کرده وبه محیط افزوده گردید.سپس از کلنی های تشکیل شده کشت خالص تهیه گردید.pH محیط در تمامی محیط‌های مورد استفاده در محدوده ۸-۷ تنظیم گردید. در نهایت باکتری‌های خالص شده مطابق با روشهای تشخیصی کتاب Bergy (برگی) و با رنگ آمیزی گرم و تست‌های بیوشیمیایی تعیین هویت گردیدند(۵).

سینتیک رشد باکتری‌ها:

جهت تعیین سرعت رشد باکتری های مقاوم جداشده در حضور جیوه در هر فصل باکتری مقاوم وحساس را جدا کرده و سینتیک رشد آنها را در حضور جیوه مطالعه کرده و به این ترتیب مقاوم ترین باکتری در هر فصل جداسازی شد. ابتدا از کلیه باکتری های مقاوم جدا شده در هر فصل کشت ۲۴ ساعته در محیط L.B.broth تهیه گردید. پس از رشد باکتری‌ها، در غلظتی معادل نیم مک فارلند، به ازاء هر باکتری ۳ ارلن محیط کشت L.B.broth در حجمی معادل ۱۰۰ میلی لیتر تهیه شد. به محیط اول از ابتدا میزان (۵mg/l) کلریدجیوه اضافه شد و به محیط دوم در نیمه فاز رشد لگاریتمی یعنی در فاصله زمانی ۲۴۰ تا ۳۲۰ دقیقه همان میزان(۵ mg/l) کلرید جیوه اضافه شد.محیط سوم که فاقد فلز بود به عنوان کنترل انتخاب شد. در مرحله بعد ۱ میلی لیتر از سوسپانسیون باکتریایی به هر یک از ارلن‌های سری سه تایی تلقیح گردیدند یک ارلن حاوی محیط L.B.broth نیز به عنوان شاهد در نظر گرفته شد تا در تنظیم (صفرکردن) دستگاه اسپکتروفتومتراز آن استفاده گردد.بلافاصله پس از تلقیح سوسپانسیون باکتریایی، جذب نوری هر یک از محیط ها در طول موج ۵۴۰ nm قرائت و سپس محیط‌هارا در دمای ۳۰درجه سانتی گراد به مدت ۱۲ ساعت درانکوباتور شیکردار در ۱۵۰rpm شیک گردیدند و سپس جذب نوری آنها در مرحله دوم به مدت نیم ساعت و از آن به بعد به

Archive of SID

www.SID.ir

مدت یک ساعت خوانده شد. این کار در ۱۲ ساعت متوالی تکرار شد. تا در نهایت نمودار رشد باکتری‌ها درحضور جیوه به دست آمد(۵).

تجزیه تحلیل آماری:

آنالیزهای آماری مربوط به تعداد باکتری ها با استفاده از آنالیز واریانس (ANOVA) و آزمون دانکن انجام با نرم افزار SPSS انجام گرفت.

یافته ها:

میزان جیوه در نمونه ها: بیشترین میزان جیوه در نمونه های آب (۲۹/۹۵۱µg/l) و رسوب (۳۱/۲۵۱µg/l) ایستگاه پل فسا و کمترین میزان جیوه نیز در نمونه های آب (۱۵/۲۴۳µg/l) و رسوب (۱۸/۰۶۷µg/l) ایستگاه وسط دریاچه مشاهده شد.

شمارش باکتری ها:

بیشترین تعداد باکتری مقاوم به جیوه در ایستگاه های خشک و پل فسا (به ترتیب $۸/۳۷\times۱۰^{۴}$, $۲/۸\times۱۰^{۳}$)و کمترین تعداد باکتری مقاوم به جیوه در ایستگاه وسط دریاچه(۴×۱۰^{۲}) به دست آمد.در این رابطه تفاوت بین ایستگاه خشک و پل فسا معنی دار نبود. تفاوت سایر ایستگاه ها از نظر تعداد باکتری‌های مقاوم به جیوه در سطح ۵ درصد معنی دار بود

میانگین‌های تعداد باکتری ها در محیط کشت حاوی جیوه (باکتری‌های مقاوم به جیوه) در مقایسه با میانگین تعداد باکتری ها در محیط کشت کنترل (تعداد کل باکتری های هوازی قابل کشت) بسیار کمتر بود و در سطح ۵ درصد اختلاف معنی‌دار داشتند(نمودار۳).جداسازی وشناسایی باکتری های مقاوم به جیوه درصد فراوانی باکتری های گرم منفی شناسایی شده بیشتر از باکتری های گرم مثبت بود و تفاوت معنی داری درسطح ۵ درصد داشتند. بر این اساس ۶۵ درصد باکتری های مقاوم جدا شده گرم منفی و۳۵ درصد باکتری ها گرم مثبت بودند. بیشترین درصد فراوانی باکتری شناسایی شده در ایستگاه ها و فصول مختلف مربوط به Sp *Vibrio* با فراوانی ۷۵ درصد و کمترین آن مربوط به *V.parahemolyticus*با فراوانی۶/۲۵ درصد و *Citrobacter*با ۱۲/۵ درصد بود

سینتیک رشد:

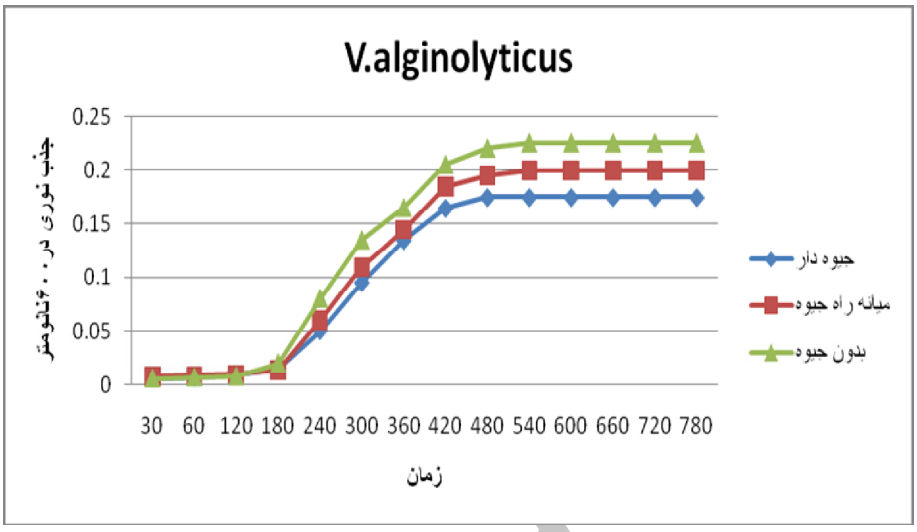
منحنی سینتیک رشد باکتری های با مقاومت بیشتر به جیوه در حضور 5mg/Lکلرید جیوه تقریباً از منحنی استاندارد رشد پیروی می کند. وجود جیوه در محیط کشت *Pseudomonas*به مدت زمان فاز تأخیری و لگاریتمی رشد باکتری اثر گذاشته وباعث افزایش زمان فاز تاخیری ولگاریتمی باکتری شده است. بالاترین سرعت رشد در حضور جیوه را باکتری *V.alginolyticus*جدا شده در فصل تابستان داشت(نمودار ۶و۷).

نمودار رشد باکتری های مقاوم جدا شده در بهار و زمستان بیشترین مدت فاز تاخیری(۴-۳ساعت) را نشان می‌دهد که در این میان بیشترین زمان فاز تاخیری مربوط به باکتری *Staph*جدا شده در فصل زمستان است (۴ساعت). با اضافه کردن جیوه به محیط کشت این باکتری در دو نمودار A,Cآن تغییر زیادی مشاهده نشد اما نمودار B این باکتری در فازلگاریتمی و سپس در فاز ایستایی کاهش رشد شدیدی نسبت به نمودارA,Cدارد و ODآن نسبت به نمودار Aبیش از نصف کاهش می‌یابد(نمودار ۱۰و۱۱). چنین وضعیتی در*Citrobacter*جداشده درفصل بهارنیزمشاهده می شود. یعنی اضافه شدن جیوه در میانه کار باعث کاهش شدیدی در رشد باکتری می‌شود. چنانکه منحنی رشد Bکاملاً از دو منحنی A,C جدا می شود(نمودار۱۲). منحنی رشد *Vibrio* در پاییز تقریباً نرمال است(نمودار۹). منحنی رشد *E.coli* جدا شده در فصل بهار با اضافه کردن جیوه در میانه کار باعث کاهش رشد شدید منحنی Bنسبت به دومنحنی A,Cمی شود. این کاهش رشد در مرحله فازلگاریتمی است چنانکه OD منحنی Bنسبت به Aکاهش چشمگیری دارد(نمودار۱۳) . می‌توان گفت نرمال‌ترین و مناسب ترین منحنی رشد در همه حالات در حضور جیوه مربوط به باکتری *Proteus* به به

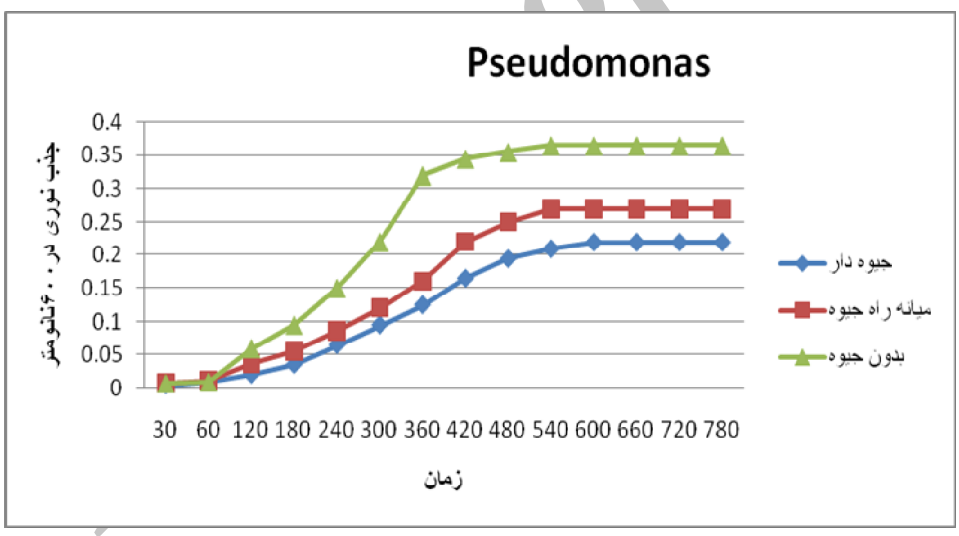
Archive of SID

www.SID.ir

خصوص *Proteus* جدا شده در فصل پاییز می توان دید(نمودار۸و۱۱) .

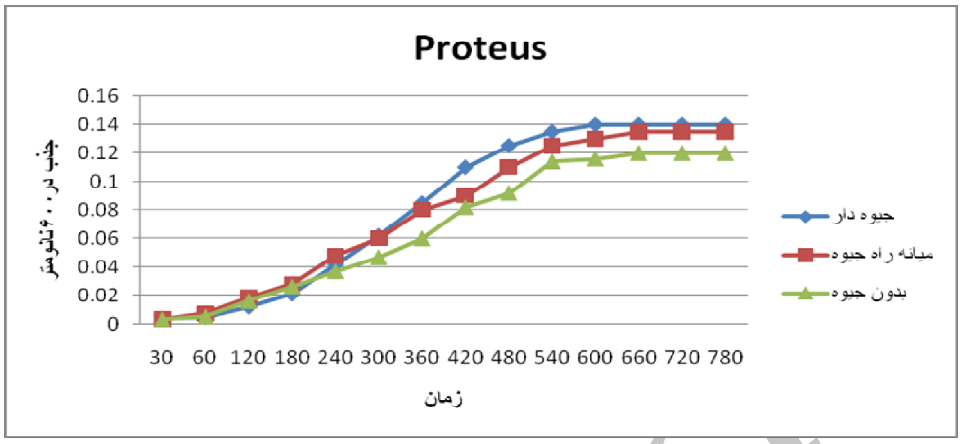


نمودار ۶: سینتیک رشد باکتری ***V.alginolyticus*** درتابستان ۱۳۸۸

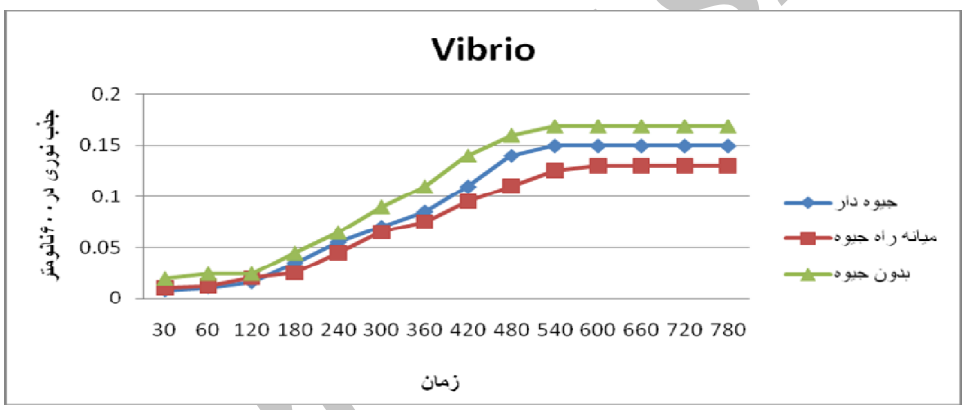


نمودار۷: سینتیک رشد باکتری ***Pseudomonas sp*** درتابستان ۱۳۸۸

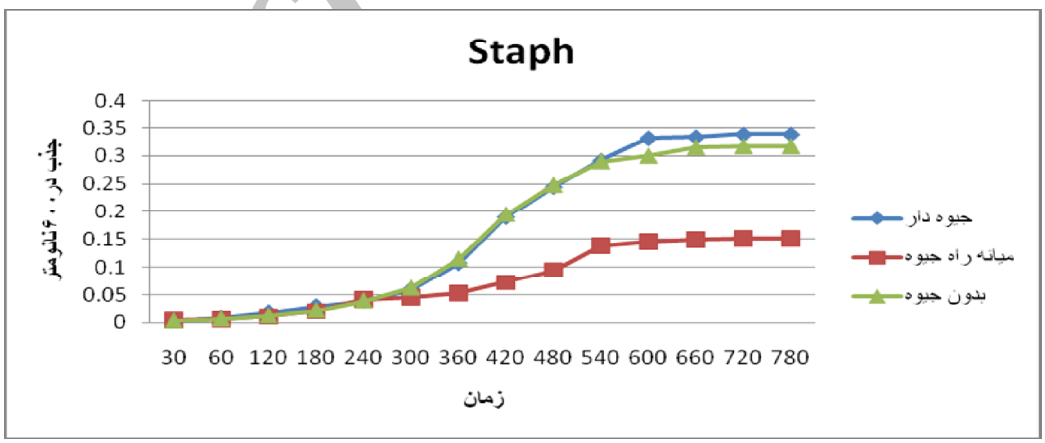
www.SID.ir



نمودار۸: سینتیک رشد باکتری ***Proteus sp*** درپاییز ۱۳۸۸

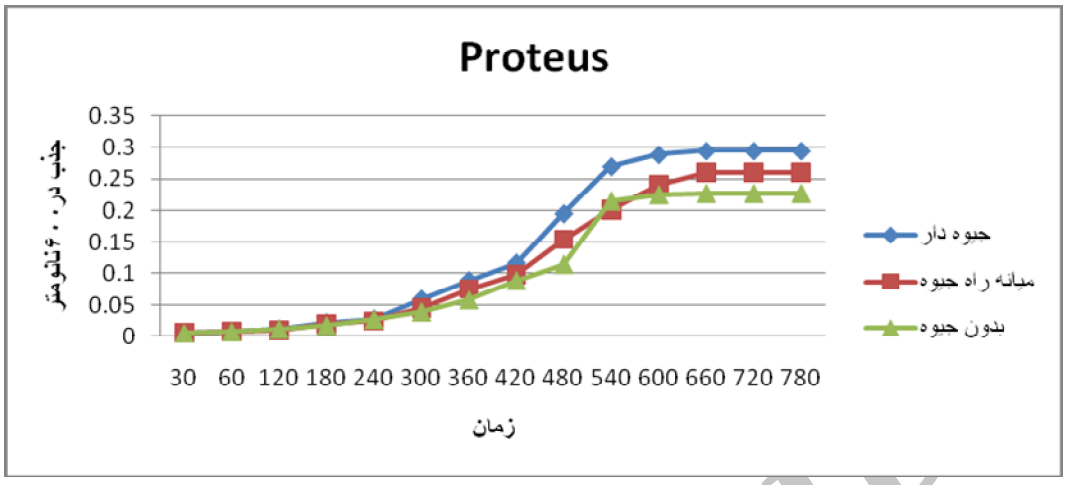


نمودار۹: سینتیک رشد باکتری ***Vibrio sp*** درپاییز۱۳۸۸

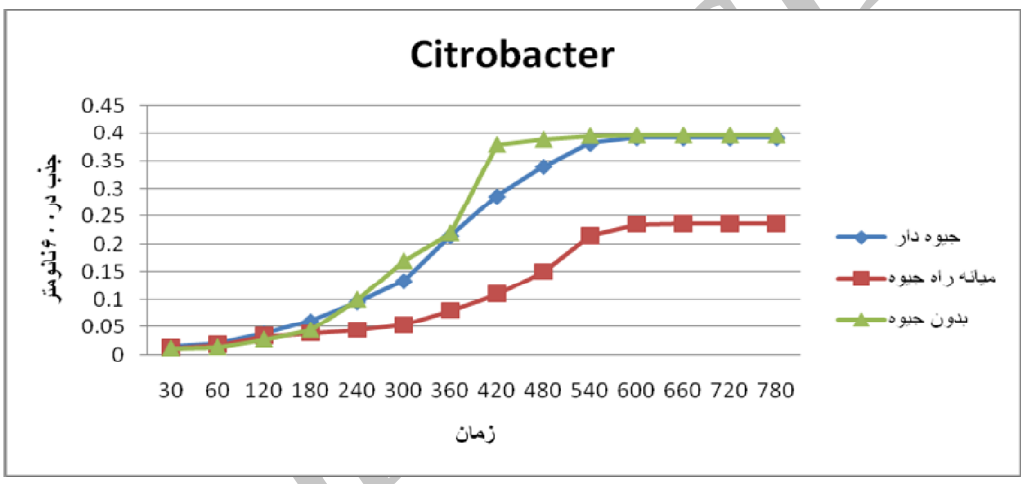


نمودار۱۰: سینتیک رشد باکتری ***Staph sp*** در زمستان۱۳۸۸

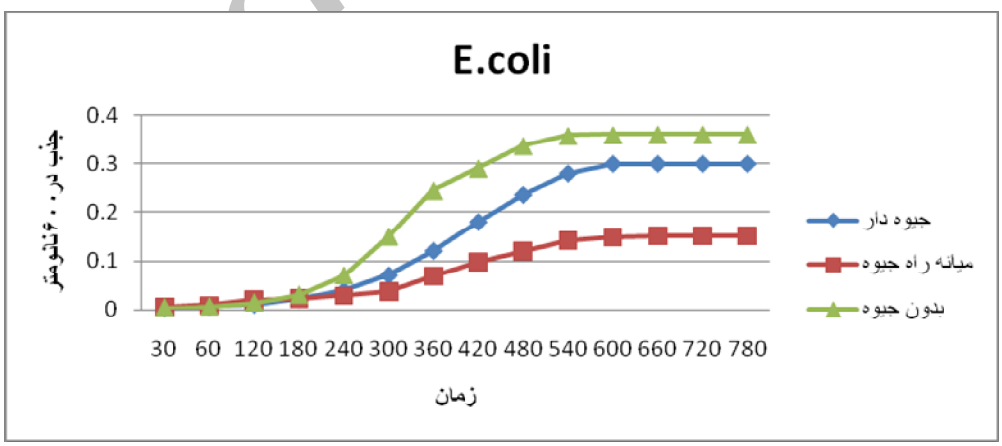
www.SID.ir



نمودار۱۱: سینتیک رشد باکتری ***Proteus sp*** در زمستان۱۳۸۸



نمودار۱۲: سینتیک رشد باکتری ***Citrobacter sp*** در بهار۱۳۸۹



نمودار۱۳: سینتیک رشد باکتری ***E.coli*** در بهار ۱۳۸۹

www.SID.ir

بحث:

در این مطالعه بیشترین میزان جیوه در نمونه های ایستگاه های پل فسا و رودخانه خشک و کم ترین آلودگی در ایستگاه وسط دریاچه بدست آمد. نتایج حاصل از شمارش باکتری ها در محیط کشت کنترل و فلزدار گویای این مطلب است که تعداد باکتری در محیط کشت کنترل بیشتر از محیط کشت حاوی جیوه می باشد. زیرا وجود جیوه در محیط کشت موجب توقف رشد و مرگ بسیاری از باکتری ها می شود. در این تحقیق بیشترین تعداد باکتری مقاوم به جیوه در فصل بهار و کمترین آن در فصل تابستان و پاییز مشاهده شد. دمای آب دریاچه مهارلو در فصل بهار بین ۱۶ تا ۱۸ درجه سانتیگراد متغیر بود. از طرفی غلظت نمک آب دریاچه در بهار نسبت به تابستان کمتر است. بنابراین شرایط بهینه برای رشد باکتری‌های ساکن دریاچه مهارلو، در فصل بهار مهیا می‌باشد. در تحقیقات Mahlerو همکارانش درسال ۱۹۸۶ و Barkayدرسال ۱۹۸۷ تعداد باکتری‌ها در محیط کشت حاوی جیوه بسیار کمتر از تعداد باکتری ها در محیط کشت کنترل (بدون جیوه) به دست آمد(۹و۱۳).

در این تحقیق همانطور که انتظار می رفت، بیشترین تعداد باکتری مقاوم به جیوه در ایستگاه های خشک و پل فسا که بیشترین آلودگی به جیوه را نیز داشتند به دست آمد. درحالیکه کمترین تعداد باکتری مقاوم به جیوه در ایستگاه وسط دریاچه (با کمترین میزان جیوه) مشاهده شد.

Osbornو همکارانش در سال۱۹۹۳ محدوده‌ی CFU/g $۹/۱\times۱۰^{۳}$تا ۶×۱۰^{۶} در تعداد باکتری های مقاوم به جیوه در رسوبات ۴ ایستگاه مورد بررسی گزارش کردند. آنها نشان دادند که تعداد باکتری های مقاوم به جیوه در ایستگاه های باآلودگی کمترپایین می باشد(۱۴).در این بررسی باکتری های مقاوم به جیوه با روش غنی سازی اولیه در حضور 5mg/l کلرید جیوه و ۲ درصد نمک سپس باروش کشت مستقیم در محیط جامد جداسازی گردیدند. باکتری‌های جداشده با روش غنی سازی، درمراحل بعد درحضور جیوه رشد بهتر، مقاومت بیشتر و توانایی بالاتری در حذف جیوه و تحمل نمک نشان دادند.Wanger Dobler و همکارانش جهت جداسازی باکتری های مقاوم به جیوه از پساب کارخانجات کلرآلکالی از روش کشت مستقیم استفاده کردند. و باکتری هایی جدا کردند که میزان مقاومت به جیوه درآنها نسبتاً پایین بود(۱۶). در این پژوهش جنس‌های باکتریایی *Klebsiella,E.coli, Bacillus,Pseudomonas Vibrio* را به عنوان باکتری هالوتولورانت مقاوم به جیوه شناسایی شد. کفیل زاده و همکاران در سال ۱۳۸۶ باکتری های Staph,Klebsiella, *Bacillus,E.coli,Pseudomonas,Serratia* را به عنوان باکتری های مقاوم به جیوه در رودخانه کر گزارش کردند(۵).

Pahanو همکارانش در سال ۱۹۹۰ مقاومت به جیوه را در جنس‌های*Bacillus,Pseudomonas Klebsiella,E.coli,* گزارش کردند(۱۰) .در این تحقیق باکتری های گرم مثبت وگرم منفی مقاوم به جیوه مختلفی شناسایی شدند. درصد فراوانی باکتری های گرم منفی در مقایسه با باکتری های گرم مثبت بیشتر بود. باکتری های گرم منفی در شرایط سخت از طریق فرایند هم یوغی (Conjugation) به صورت درون گونه ای وبرون گونه ای قادر به انتقال ژن های مقاومت به جیوه بین یکدیگر هستند. علاوه بر این اولین مرحله از بر هم کنش باکتری و جیوه در محیط، عبور این فلز از دیواره سلولی است. باکتری های گرم منفی به دلیل داشتن غشای خارجی (که از عبور مواد سمی به داخل سیتوپلاسم جلوگیری می کند) در مقایسه با باکتری های گرم مثبت کمتر تحت تاثیر جیوه قرار می گیرند.از این رو احتمال جداسازی آنها از محیط نیز افزایش می یابد.در تحقیق حاضر باکتری‌هایی مثل *Staph,Vibrio,Ecoli*جدا شده در فصل بهار و زمستان در حضور جیوه به مدت زمان بیشتری نیاز دارند تا با شرایط محیط جدید سازگار شوند. در طول مدت سازگاری، رشد باکتری ها بسیار کم است. بنابراین طبیعی است که با وجود مواد سمی (مثل جیوه) در محیط کشت مدت زمان فاز تاخیری رشد افزایش یابد. در تحقیقی که Hansen و

Archive of SID

www.SID.ir

همکارانش در سال ۱۹۸۴ بر روی تعدادی از باکتری‌های مقاوم به جیوه انجام دادند و رشد آنها درحضور جیوه بررسی کردند، متوجه شدند که وجود جیوه در محیط کشت موجب افزایش مدت زمان فاز تاخیری رشد می شود(۱۱).

Proteusبه دلیل داشتن تاژک سرتاسری و همچنین ژن های اپرون merرشد خوبی در برابر جیوه دارد. از آنجا که این باکتری از ایستگاه‌های پل فسا، سلامیه و خشک که بیشترین میزان آلودگی به جیوه را دارند جدا شد. به نظر می رسد تماس مداوم با جیوه در محیط زندگی و بکارگیری روش غنی سازی، این باکتری را با شرایط استرس‌زای ناشی از وجود این ماده سمی سازگار و آن را به یک باکتری مقاوم تبدیل کرده است.

نتیجه گیری :

۱-دریاچه مهارلو توسط رودخانه‌های ورودی به آن(پل فسا، سلامیه وخشک) به فلزات سنگین از جمله جیوه آلوده شده است. این امر تهدیدی برای اکوسیستم دریاچه است که گونه‌های مختلف وکمیاب گیاهی وجانوری را در خود جای داده است، محسوب می شود.

۲-نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که رابطه مستقیمی میان افزایش میزان جیوه در محیط و افزایش تعداد باکتری های مقاوم به جیوه دراین مناطق ، وجوددارد بیشترین میزان مقاومت به جیوه در باکتری های جداشده از ایستگاه های پل فسا و رودخانه خشک مشاهده شد. بنابراین انتخاب مناطق آلوده جهت نمونه گیری منجر به جداسازی باکتری‌های مقاوم تر می‌گردد.

۳-باکتری های جداشده از محیط های آلوده از پتانسیل خوبی در حذف جیوه برخوردار هستند. بافراهم نمودن شرایط و بستر مناسب جهت رشد این باکتری ها برای پالایش زیستی پساب (فیلترها و راکتورهای زیستی) می‌توان از این باکتری ها جهت سمیت زدایی و حذف از پساب کارخانجات آلوده کننده محیط زیست دریاچه مهارلو یا سایر مناطق آلوده کشور استفاده کرد

۴- *Vibrio* تقریبًا در تمامی فصول و ایستگاه های مورد بررسی جدا شد. بنابراین می توان گفت که این باکتری، بومی دریاچه مهارلو می‌باشد (آب دریاچه شور و این باکتری نیز نمک دوست می‌باشد) و ژن های مقاومت به جیوه را از باکتری های مقاوم از طریق انتقال پلاسمید یا ترانسپوزون‌های حاوی اپرون merکسب کرده است.ژن هایی که بیان آنها موجب مقاومت باکتری‌ها در برابر جیوه می‌شوند، عمدتاً برروی پلاسمید یا ترانسپوزون قرارگرفته‌اند(۹,۸).

پیشنهادات :

۱-با توجه به آلوده بودن مناطق مختلف دریاچه وعدم کفایت روش های فیزیکوشیمیایی مرسوم حذف جیوه از پساب کارخانجات، برای حفظ اکوسیستم منطقه به مسئولان محیط زیست توصیه می شود از فناوری نوین (استفاده از باکتری های مقاوم به جیوه جدا شده از دریاچه مهارلو مثل *Proteus,Vibrio,Pseudomonas* جهت تصفیه پساب صنعتی، کشاورزی و شهری حاوی جیوه آلوده کننده دریاچه مهارلو استفاده کنند.

۲-به منظور کاهش مدت زمان وهزینه ها، شناسایی باکتری ها از طریق روش های مولکولی نظیر واکنش زنجیره ای پلیمراز 16s rRNA,RFLP,PCR,صورت گیرد.

۳-جداسازی و شناسایی ژن های مقاومت به جیوه در باکتری های مقاوم به جیوه جدا شده از محیط های آلوده و تکثیر این ژن‌ها به وسیله واکنش زنجیره ای پلیمراز PCR وکلون کردن آنها دروکتور مناسب جهت ایجاد سویه های نوترکیب (که توانایی بالایی درحذف جیوه دارند) و سپس استفاده از این سویه های نوترکیب جهت پالایش پساب ها، توصیه می شود.

تقدیر و تشکر:

بدین وسیله از زحمات دکتر فرشید کفیل زاده، دکتر اصغر شریفی، دکتر عبدالعلی مشفع ، دکتر میرزایی، مهدی کارگر، محسن نغماچی، رضا محمدی، خانم جابری وکارکنان

Archive of SID

www.SID.ir

دانشکده علوم پزشکی یاسوج که در این پژوهش ما را یاری کردند تشکر و قدردانی می شود .

فهرست منابع:

۱-بنایی ، ۱۳۷۳، بررسی آلودگی رودخانه کر به فلزات سنگین ، اداره کل محیط زیست استان فارس .

۲-.جام جم، ۱۳۸۷، حذف فلزات سنگین ازپساب صنعتی بااستفاده ازنانو مواد.

۳-رضایی، ع.، ۱۳۸۸، حذف جیوه پساب پتروشیمی شیراز با استفاده ازتکنیک های بیوتکنولوژیکی، طرح پژوهشی، دانشگاه تربییت مدرس.شرکت ملی صنایع پتروشیمی.

۴-فولادی فرد، ر.، کمانی، ح.، خائفی، م.، ۱۳۸۳، حذف فلزات سنگین به روش جذب بیولوژیکی از محلول های آبی، نهمین کنگره ملی مهندسی شیمی ایران، دانشگاه علم وصنعت ایران.

۵-میرزایی، ن.، ۱۳۸۶، جداسازی میکروارگانیسم های حذف کننده جیوه از رودخانه کر، پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی واحد جهرم.

۶- رضائیان ، س .، ۱۳۸۳، بررسی آلودگی میکروبی و شیمیایی دریاچه مهارلو، پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی واحد جهرم.

7-.Afrasayab, SH.,Yasmin, A., Hasnain, SH.,2007, Characterization of some Indigenous mercury Resistant Bacteria from polluted Environment, J, Bio, Sci, 5(7),792-797

8- Barkay,T.,C.Liebert, and M.Gillman. 1989. Environmental significance of potential for mer(Tn 21) mediated reduction of Hg(II) to Hg(0) in natural waters. Appl.Environ.Microbiol. 55:1196-1202.

9- Barkay,T.1987. Adaptation of aquatic microbial communities to Hg(II) stress. Appl.Environ.Microbiol. 53:2725-2732.

10- Essa, A.M.M.,L.E. Macaskie, and N.L. Brown.2002.Mechanisms of mercury Biochem.Socie.Transc.30: 672-674.

11- Hansen,C.L.mG.zwolinski,D.Martila, and J.w.williams. 1984.Bacterial removal of mercury from sewage.Bioteclnol-Bioeng.26: 1330-1333.

12- Kiefer,N.2000 .Mechanisms of microbial metal resistance. Appl.Environ.Microbiol.

13- MaH1er,I.,.H.S.Levinsol4,Y.Wang and H.O.Halvorson. 1986. Cadmium and mercury resistance Bacillus strains from a salt marsh and from Boston harbor. Appl. Environ.Microbiol.52: 1293-1298.

14- OsbonA,A.M.,K.D.Bruce,P.Strike, and D.A.Ritchie. 1993.Polymerase chain reaction fragment length polymorphism analysis shows divergence among mer determinants from gram negative soil bacteria in distinguishable by DND-DNA hybridization.Appl.Environ.Microbiol. 59: 4024-4030.

15- Pahan,K.,S.Ray,R.Gachui,J.Chaudhuri, A.Mandal.1990. Ecological and biochemical studies on mercury resistance bacteria. Indian.J. Environ. Health. 32: 250-261.

16- Wagner Dobler,I.,H.Lunsdorf,T.Lubbenhausen,H.Von Canstein, and Y.Li. 2000.structure and species composition of mercury reducing biofilms.Appl.Environ.Microbiol.66: 4559-4563.

Archive of SID

www.SID.ir