Archive of SID

مجله دنیای میکروب ها
سال اول، شماره اول، زمستان ۱۳۸۷
صفحات ۵۰ ـ ۴۳

جداسازی وشناسایی باکتری های مقاوم به جیوه از آب و رسوبات رودخانه کر

دکتر فرشید کفیل زاده*[1]، نیما میرزائی[1]، مهدی کارگر[1]

[1]گروه میکروبیووژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد جهرم

چکیده

سابقه و هدف: جیوه یکی از سمی ترین فلزات سنگین می باشد. مقادیر اندک جیوه برای همه موجودات زنده سمی است. با این وجود برخی از باکتری ها با مکانیسم های خاص در برابر جیوه مقاوم هستند. هدف از این پژوهش جداسازی و شناسایی باکتری های مقاوم به جیوه و بررسی ارتباط بین میان میزان آلودگی محیط به جیوه و احتمال جداسازی باکتری های مقاوم است.

مواد و روش ها: نمونه برداری از آب و رسوبات چهار ایستگاه در طول رودخانه کر و از تابستان ۱۳۸۵ تا بهار ۱۳۸۶ انجام گرفت. میزان جیوه در نمونه ها با روش بخار سرد و به وسیله دستگاه جذب اتمی اندازه گیری شد. تعداد باکتری ها در دو محیط کشت حاوی ۱۰ mg/l کلرید جیوه و بدون کلرید جیوه شمارش گردید. جداسازی باکتری‌های مقاوم از طریق غنی سازی اولیه و کشت مستقیم در محیط جامد حاوی ۱۰mg/l کلرید جیوه صورت گرفت. باکتری ها به وسیله تست های متداول بیوشیمیایی شناسایی گردیدند.

یافته ها: تعداد باکتری ها در محیط کشت بدون جیوه 1×10^{7} CFU/ml و بیشتر از محیط فلز دار بود. فراوانی باکتری های مقاوم به جیوه در ایستگاه پل خان ۵۴/۲ و در ایستگاه درودزن ۴/۳ درصد شناسایی شد. این ایستگاه ها از نظر میزان آلایندهٔ جیوه به ترتیب آلوده ترین و پاک ترین ایستگاه ها بودند. باکتری های *Entrobacter* sp.، *Klebsiella* sp.، *E.coli*، *Serratia marcescens*، *Pseudomonas* sp. به عنوان باکتری های مقاوم به جیوه جداسازی و شناسایی گردیدند.

نتیجه گیری: نتایج این پژوهش نشان داد که استفاده از روش غنی سازی اولیه در مقایسه با روش کشت مستقیم، موجب جداسازی بهتر باکتری های مقاوم می شود. علاوه بر این افزایش میزان جیوه در محیط، احتمال جداسازی باکتری های مقاوم به جیوه را افزایش می دهد.

واژگان کلیدی: باکتری های مقاوم به جیوه، *Serratia marcescens*، رودخانه کر

دریافت مقاله: اردیبهشت ۱۳۸۷ پذیرش برای چاپ: مهر ۱۳۸۷

مقدمه

امروزه مقامات بهداشتی در ارتباط با مواد شیمیایی سمی نظیر جیوه که در رودخانه‌ها یافت می‌شوند و از طریق مصرف آبزیان وارد بدن انسان می‌گردند، نگرانی‌های زیادی دارند (۱). جیوه به صورت طبیعی در محیط‌های مختلف به مقدار بسیار کم وجود دارد. با این حال در نتیجه فعالیت‌های انسانی میزان آن در محیط افزایش یافته است (۲). جیوه به دلیل خاصیت تجمع‌پذیری در بافت‌ها و واکنش با گروه‌های سولفیدریل پروتئین‌ها، مشکلات بهداشتی عدیده‌ای در انسان ایجاد می‌کند. روش‌های مرسوم پالایش جیوه از پساب کارخانجات علاوه بر کم بازده بودن بسیار پرهزینه می‌باشند. بنابراین برای داشتن طبیعتی سالم، استفاده از تکنولوژی‌های پاکسازی موثر و در عین حال کم هزینه، اجتناب ناپذیر است (۳). ورود سمی ترین شکل جیوه یعنی متیل مرکوری به بدن انسان باعث ایجاد بیماری مینی‌ماتا می‌گردد. این بیماری با بروز علائم متعدد عصبی مشخص می‌شود (۴). مقادیر اندک جیوه برای تمام موجودات زنده سمی و خطرناک می‌باشد. با این وجود برخی از باکتری‌های ساکن رودخانه های آلوده به دلیل اینکه به میزان زیاد در معرض جیوه قرار می گیرند، قادرند ژن‌های مقاومت به جیوه را بین یکدیگر رد وبدل کنند و بدین ترتیب در برابر غلظت‌های سمی جیوه مقاوم می‌شوند (۳). مقاومت در برابر

*) آدرس برای مکاتبه: جهرم، میدان چمران، دانشگاه آزاد اسلامی، گروه میکروبیولوژی
Dr.kafilzadeh@yahoo.com تلفن: ۰۹۱۷۱۱۴۰۷۹۹

www.SID.ir

Archive of SID

غلظت‌های سمی جیوه در باکتری‌ها به واسطه محصولات ژن‌های اپرون *mer* صورت می‌گیرد. در اکثر باکتری‌ها اپرون *mer* از ژن‌های *mer*RTPABD تشکیل شده است و MerR و MerD در تنظیم بیان ژن‌های اپرون، MerT و MerP در انتقال جیوه به درون سیتوپلاسم و MerB نیز در تجزیه جیوه آلی نقش دارند. آنزیم مرکوریک ردوکتاز Hg(II) که بسیار سمی است را به Hg(0) احیا می کند. Hg (0) بسیار فرار است و به سرعت از محیط اطراف باکتری خارج می شود (۵، ۶، ۷).

Moore و همکاران اولین بار در دهه ۱۹۶۰ مقاومت باکتری *Staphylococcus aureus* (جدا شده از نمونه های کلینیکی) به ترکیبات جیوه را گزارش کردند (۸). از آن پس تاکنون تحقیقات گسترده ای بر روی مقاومت به جیوه در باکتری های جدا شده از محیط های طبیعی صورت گرفت. Barkay و همکاران در سال ۱۹۸۷ با اندازه گیری میزان حذف Hg(II) از فلاسک های حاوی باکتری های مقاوم به جیوه، مکانیسم مقاومت در برابر جیوه را مورد بررسی قرار دادند(۹). همچنین Ray و همکاران در سال ۱۹۸۹ توانایی حذف جیوه توسط باکتری‌های آزادزی تثبیت کننده ازت (که عمدتاً *Azotobacter* و *Beijerinckia*) می‌باشند که در برابر غلظت‌های بالای جیوه مقاوم بودند را ارزیابی کردند. مطالعات آنها نشان داد که رابطه مستقیمی میان افزایش مصرف علف‌کش‌ها و گسترش مقاومت در برابر جیوه، در باکتری‌های موجود در خاک‌های کشاورزی وجود دارد (۱۰). از طرف دیگر Masaru و همکاران در سال ۱۹۹۹ برای اولین بار مقاومت به جیوه را در باکتری‌های بی هوازی به خصوص جنس کلاستریدیوم مورد بررسی قرار دادند (۱۱). Schelert و همکاران در سال ۲۰۰۴ آرکیای گرمادوست مقاوم به جیوه از دهانه چشمه های آب گرم جدا کردند (۱۲). اکنون پنج دهه از اولین تحقیقات در زمینه مقاومت به جیوه در باکتری ها می گذرد. این تحقیقات بیشتر به سمت شناسایی باکتری های مقاوم به جیوه جدا شده از محیط های طبیعی و مطالعه و دست ورزی ژن های مقاومت به جیوه در این باکتری ها سوق داده شده است (۸). Chen و همکاران در سال ۱۹۹۷ با دست ورزی ژنتیکی *E.coli* این باکتری را برای پاک سازی محیط‌های آلوده به جیوه آماده کردند. این سوش‌ها به نحوی دستکاری شدند که پروتئین‌های MerP، MerT را برای انتقال هر چه بیشتر Hg(II) به درون سیتوپلاسم، در سطح خود بروز دهند (۱۳). امروزه مکانیسم مقاومت به جیوه و ژن‌های مسئول آن در باکتری ها به طور کامل شناسایی شده است. مطالعات محققان نشان داده است که این ژن ها از پتانسیل خوبی برای به‌کارگیری جهت حذف جیوه از پساب کارخانجات برخوردار هستند(۲). Brunke و همکاران در سال ۱۹۹۳ برای اولین بار نشان دادند که باکتری های مقاوم به جیوه، قادر به حذف این فلز سمی از پساب کارخانجات می باشند (۱۴). Von canstein و همکاران در سال ۱۹۹۹ باکتری *Pseudomonas putida* مقاوم به جیوه را از رسوبات رودخانه ای آلوده در آلمان جدا کردند که این باکتری قادر به حذف جیوه از پساب کارخانه کلرآلکالی با بازده ۹۰ تا ۹۸ درصد بود (۱۵). بنابراین شناسایی دقیق باکتری های مقاوم به جیوه اولین گام در استفاده از روش حذف زیستی جیوه از پساب آلوده کارخانجات می‌باشد. رودخانه کر مهم ترین رودخانه استان فارس است و بخش اعظم آب شرب شیراز را تامین می‌کند. پساب کارخانجات مختلف از جمله پتروشیمی که حاوی مقادیر زیاد جیوه می‌باشند، وارد این رودخانه می‌شود. هدف از این پژوهش اندازه گیری میزان جیوه در آب و رسوبات رودخانه کر، جداسازی، شناسایی و معرفی باکتری‌های بومی مقاوم به جیوه در این رودخانه، جهت به‌کارگیری در تصفیه پساب کارخانجات آلوده کننده و بررسی فرضیه ارتباط بین افزایش آلودگی محیط به جیوه و افزایش احتمال جداسازی باکتری‌های مقاوم به این فلز سمی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

محدوده طرح: با توجه به نتایج حاصل از مطالعات و اندازه گیری های قبلی (۱۶، ۱۷) و همچنین شناخت کامل از کلیه فعالیت های صنعتی، کشاورزی و خدماتی موجود در حاشیهٔ رودخانهٔ کر، محدوده طرح از سد درودزن تا دریاچه بختگان در ۴ ایستگاه نمونه گیری تعیین شد. موقعیت ایستگاه ها هنگام نمونه برداری به وسیله دستگاه موقعیت یاب جهانی (GPS) مشخص گردید(جدول ۱ و شکل ۱).

نمونه برداری: نمونه برداری از آب و رسوبات سطحی ۴ ایستگاه و در چهار فصل از تابستان ۱۳۸۵ تا بهار ۱۳۸۶ انجام شد. در هر فصل سه مرتبه نمونه برداری به عمل آمد. نمونه ها برای کشت میکروبی در ظروف شیشه ای استریل و برای اندازه گیری میزان فلز سنگین جیوه، در ظروف پلی اتیلن شسته شده با اسید نیتریک، جمع آوری شدند. نمونه ها در مجاورت یخ قرار گرفتند و حداکثر ۴ ساعت پس از نمونه گیری به آزمایشگاه منتقل گردیدند(۱۸).

آماده سازی نمونه ها: پیش از اندازه گیری میزان جیوه،

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱) مشخصات ایستگاه های نمونه برداری

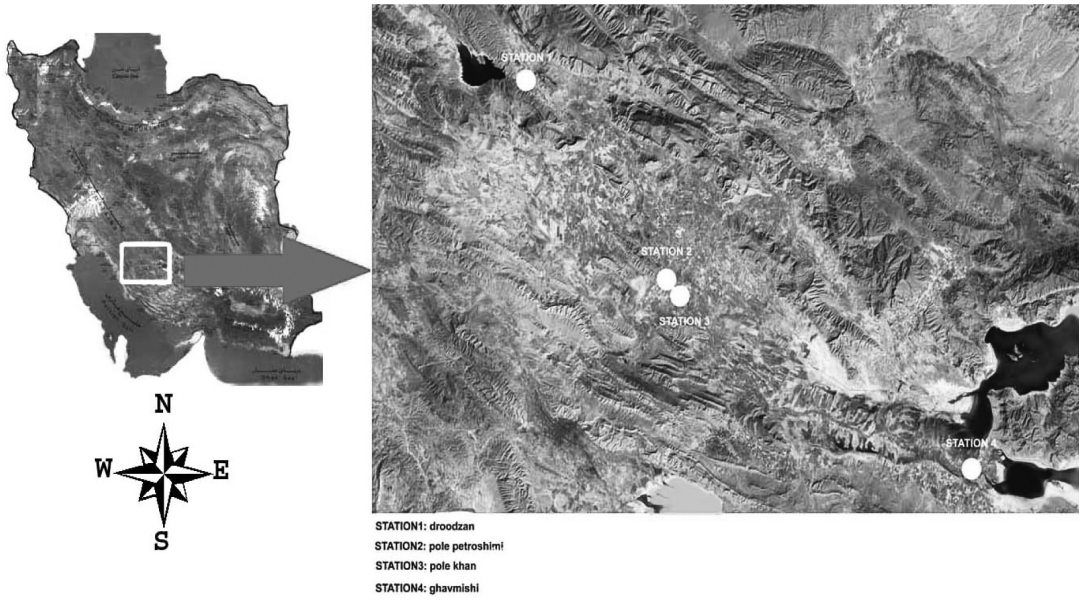
ایستگاه	نام منطقه	ارتفاع از سطح دریا (متر)	ویژگی منطقه	موقعیت جغرافیایی	
				طول شرقی	عرض شمالی
۱	درودزن	۱۶۳۴	بعد از سد درودزن، بدون هرگونه ورودی فاضلاب	″۵۲°۲۵۳۲/۲۶	″۳۰°۱۲۲۲/۰۰
۲	پل پتروشیمی	۱۵۹۳	بعد از خروجی فاضلاب پتروشیمی شیراز	″۵۲° ۴۵۳۹/۵۰	″۲۹°۵۱۴۲/۴۳
۳	پل خان	۱۵۸۸	بعد از ورودی رودخانه سیوند، حاوی فاضلاب خانگی شهر مرودشت	″۵۲°۴۶۱۵/۴۴	″۳۰° ۵۱۰۰/۷۷
۴	گاو میشی	۱۵۶۳	نزدیک به انتهای رودخانه کر ورودی به دریاچه بختگان	″۵۲°۲۵۰۰/۲۰	″۲۹° ۳۲ ۵۹/۷۱

نمونه‌ها آماده سازی گردیدند. تمام نمونه های آب به وسیله فیلتر واتمن ۴۲ میکرومتری صاف گردیدند. نمونه‌های فیلتر شده با مخلوطی از اسیدنیتریک و اسید کلریدریک (به نسبت ۳ به ۱) هضم شدند. نمونه های رسوب ابتدا در آون (oven) در دمای ۱۰۳ درجه سانتیگراد خشک گردیدند. نمونه های خشک شده در هاون کوبیده شدند تا اندازه تمامی ذرات یکنواخت گردد. سپس یک گرم از هر نمونه با مخلوطی از ۶ میلی لیتر نیتریک اسید و ۲ میلی لیتر کلریدریک اسید هضم و حرارت داده شدند. در مرحله آخر نمونه‌ها با فیلتر واتمن۴۲ میکرومتری صاف گردیدند(۱۸).

اندازه گیری میزان جیوه: پس از آماده سازی نمونه ها، میزان جیوه در نمونه ها به وسیله دستگاه طیف سنجی جذب اتمی (Atomic absorption spectroscopy) مدل Varian و با روش بخار سرد اندازه گیری شد(۱۸).

شمارش باکتری‌ها: پس از انتقال نمونه ها به آزمایشگاه شمارش باکتری ها با روش Total viable plate count صورت گرفت. از نمونه ها به وسیله سرم فیزیولوژی رقت های 10^{-1} تا 10^{-10} تهیه و در محیط Luria-Bertani agar(ساخت شرکت Merck آلمان) واجد ۵ mg/l کلرید جیوه و محیط Luria-Bertani agar بدون جیوه، کشت سطحی (Surface plate method) داده شد. پلیت های کشت داده شده به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد گرمخانه گذاری شدند. پس از مدت زمان گرمخانه گذاری تعداد باکتری ها در محیط های کشت حاوی جیوه و بدون جیوه شمارش گردید(۱۹).

جداسازی و شناسایی باکتری های مقاوم به جیوه: جداسازی باکتری‌های مقاوم به جیوه از طریق غنی سازی اولیه و کشت مستقیم در محیط جامد، با استفاده از روش تغییر یافته Wagner Dobler



شکل ۱) موقعیت جغرافیایی و مکان یابی ایستگاه های نمونه برداری

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۲) مقایسه ایستگاه ها از نظر میانگین تعداد باکتری مقاوم به جیوه

تعداد باکتری / ایستگاه	میانگین تعداد کل باکتری (CFU/g یا CFU/ml)	میانگین تعداد باکتری های مقاوم به جیوه (CFU/g یا CFU/ml)	درصد باکتری‌های مقاوم به جیوه
درودزن	$۳/۷\times۱۰^{۶}$	$۱/۶\times۱۰^{۵}$	۴/۳
پل پتروشیمی	$۵/۵\times۱۰^{۶}$	۲×۱۰^{۶}	۳۶/۳
پل خان	$۴/۸\times۱۰^{۶}$	$۲/۶\times۱۰^{۶}$	۵۴/۲
گاومیشی	$۳/۳\times۱۰^{۶}$	$۱/۹\times۱۰^{۵}$	۵/۷

و همکاران صورت گرفت(۳). در غنی سازی اولیه، ابتدا ۱ گرم یا ۱ میلی لیتر از هر نمونه به ۹ میلی لیتر محیط کشت broth Luria Bertani (ساخت شرکت Scharlau اسپانیا) واجد mg ۱۰ کلرید جیوه اضافه گردید و محیط‌های کشت به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد گرمخانه گذاری شدند. پس از ۴۸ ساعت گرمخانه گذاری، ۰/۱ میلی لیتر از محیط حاوی باکتری های رشد کرده، در محیط کشت LB agar به صورت سطحی کشت و گرمخانه گذاری شدند. سپس از کلنی‌های تشکیل شده کشت خالص تهیه گردید. در روش کشت مستقیم، نمونه های رقیق شده با سرم فیزیولوژی در محیط LB agar حاوی mg/l ۱۰ کلرید جیوه کشت داده و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد گرمخانه گذاری و سپس از کلنی‌های حاصل کشت خالص تهیه گردید. شناسایی باکتری های خالص سازی شده با استفاده از رنگ‌آمیزی گرم و تست‌های بیوشیمیایی مطابق با کتاب Bergey's Manual of Systematic Bacteriology صورت گرفت(۲۰).

تجزیه وتحلیل آماری: تجزیه و تحلیل آماری نتایج به دست آمده با استفاده از آزمون آنالیز واریانس *(ANOVA)* و آزمون دانکن به وسیله نسخه دوازدهم نرم افزار *SPSS* صورت گرفت و مرز معنی داری در سطح $p<۰/۰۵$ قرار داده شد.

یافته ها

میزان جیوه در نمونه ها: بیشترین میزان جیوه به مقدار ppm ۰/۰۸۶ و ppm۰/۷۵۸، به ترتیب در نمونه های آب و رسوب ایستگاه پل خان به دست آمد. کمترین میزان جیوه نیز به مقدار ppm ۰/۰۱۵ و ppm ۰/۲۶۶، به ترتیب در نمونه های آب و رسوب ایستگاه درودزن مشاهده شد. بین مقادیر میانگین جیوه در ایستگاه های مختلف، اختلاف معنی داری در سطح $p<۰/۰۵$ وجود داشت.

شمارش باکتری ها: میانگین تعداد باکتری ها در محیط کشت حاوی جیوه CFU/g یا $۹/۱\times۱۰^{۵}$ CFU/ml و در مقایسه با میانگین تعداد باکتری ها در محیط کشت کنترل CFU/g یا ۱×۱۰^{۷} CFU/ml بسیار کمتر بود. بین مقادیر میانگین تعداد باکتری در محیط بدون جیوه و محیط حاوی جیوه، در سطح ۵ در صد اختلاف معنی دار وجود داشت. در مقایسه ایستگاه ها از نظر میانگین تعداد باکتری مقاوم به جیوه بیشترین تعداد باکتری های مقاوم به جیوه، CFU/g یا $۲/۶\times۱۰^{۶}$ CFU/ml و ۲×۱۰^{۶} در ایستگاه های پل خان و پل پتروشیمی وکمترین تعداد باکتری مقاوم به جیوه نیز CFU/g یا $۱/۶\times۱۰^{۵}$ CFU/ml در ایستگاه درودزن به دست آمد. میانگین تعداد باکتری‌های مقاوم به جیوه در ایستگاه‌های مختلف در سطح ۰/۰۵ اختلاف معنی‌دار داشتند (جدول۲).

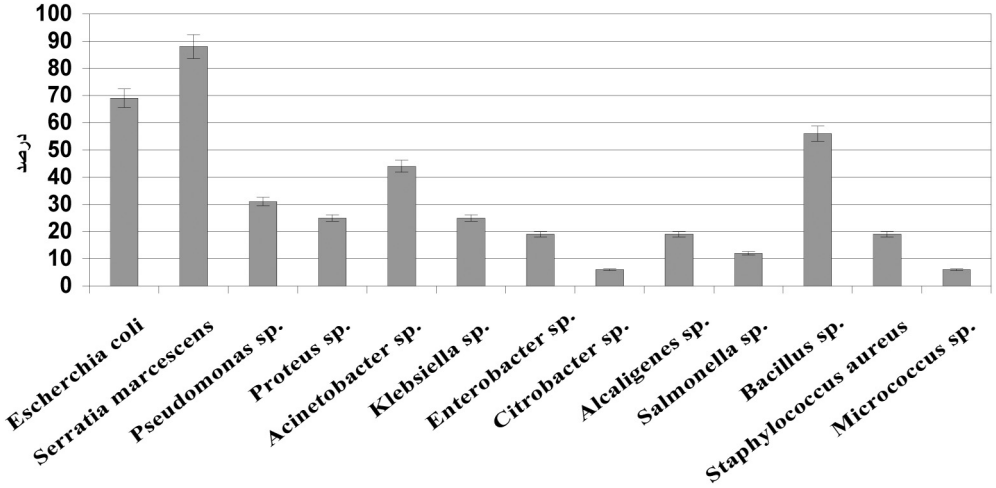
جداسازی و شناسایی باکتری های مقاوم به جیوه: درصد فراوانی باکتری های گرم منفی شناسایی شده بیشتر از باکتری های گرم مثبت بود و تفاوت معنی داری در سطح ۵ درصد داشتند. بر این اساس ۷۷ درصد باکتری های مقاوم جدا شده گرم منفی و ۲۳ درصد باکتری ها گرم مثبت بودند. بیشترین درصد فراوانی مربوط به *Serratia marcescens* (۸۸٪) و کمترین فراوانی مربوط به *Micrococcus* sp. (۶٪) و *Citrobacter* sp. (۶٪) بودند (نمودار ۱).

بحث

در این مطالعه بیشترین میزان جیوه در نمونه‌های ایستگاه‌های پل خان و پل پتروشیمی به دست آمد. در تحقیقات گذشته که توسط کفیل زاده و همکاران برروی رودخانه کر در سال ۱۳۸۴ انجام گرفت، بیشترین میزان آلودگی به جیوه در ناحیه پل

www.SID.ir

Archive of SID



نمودار ۱: درصد فراوانی باکتری های جدا شده مقاوم به جیوه

پتروشیمی تا پل خان گزارش گردید(۱۶). مقادیر به دست آمده در این تحقیق بیشتر از مقادیر گزارش شده توسط این گروه بود. ایستگاه پل پتروشیمی در ناحیه‌ای قرار گرفته است که پساب حاوی جیوه واحد کلرآلکالی پتروشیمی شیراز در این منطقه وارد رودخانه کر می گردد. ایستگاه پل خان نیز پس از ورودی پساب شهرک صنعتی آب باریک، پالایشگاه شیراز، کارخانه آزمایش و فاضلاب خانگی شهر مرودشت قرار گرفته است. در ایستگاه درودزن هیچ گونه پساب صنعتی وارد رودخانه کر نمی شود. به همین دلیل بیشترین و کمترین میزان آلودگی به جیوه به ترتیب در این ایستگاه ها مشاهده شد.

در تحقیق حاضر تعداد باکتری های مقاوم به جیوه (۹/۱ درصد) بسیار کمتر از تعداد باکتری در محیط کشت کنترل بود. در تحقیقات Mahler و همکارانش در سال ۱۹۸۶ و Barkay و همکاران در سال ۱۹۸۷ تعداد باکتری در محیط کشت حاوی جیوه بسیار کمتر از تعداد باکتری در محیط کشت کنترل به دست آمد(۲۱، ۲۲). وجود جیوه در محیط کشت سبب توقف رشد و مرگ بسیاری از باکتری ها می شود، به همین دلیل تعداد باکتری ها در محیط کشت حاوی جیوه بسیار کمتر از محیط کشت کنترل می‌باشد.

درصد باکتری‌های مقاوم به جیوه در ایستگاه های مختلف بین ۴/۳ تا ۵۴/۲ درصد متغیر بود. اختلاف تعداد باکتری‌ها در ایستگاه‌های مختلف در نتیجه تفاوت در میزان جیوه در این ایستگاه های می باشد. بیشترین تعداد باکتری مقاوم به جیوه مربوط به ایستگاه های پل خان و پل پتروشیمی به ترتیب با ۵۴/۲ درصد و ۳۶/۳ درصد بود. این دو ایستگاه بیشترین میزان آلودگی به جیوه را داشتند. Osborn و همکارانش در سال ۱۹۹۳ محدوده ۰/۰۵ تا ۲۵ درصد در تعداد باکتری های مقاوم به جیوه در ۴ ایستگاه آلوده در معدن استخراج مس به دست آوردند(۲۳). آقای Nakamura و همکارانش در سال ۱۹۹۰ و Petrova و همکارانش در سال ۲۰۰۲ فرضیه افزایش احتمال جداسازی باکتری های مقاوم به جیوه در مناطق آلوده به این فلز سمی را در مقایسه با مناطق غیر آلوده مطرح ساختند(۲۴، ۲۵). نتایج به دست آمده در این تحقیق نیز، فرضیه رابطه میان افزایش آلودگی محیط به جیوه و افزایش تعداد باکتری مقاوم به جیوه را تأیید می کند. باکتری‌ها برای بقا در مناطق آلوده به جیوه پلاسمیدها و ترانسپوزون های حاوی ژن های مقاومت به جیوه را بین یکدیگر رد و بدل می کنند. این امر موجب گسترش تعداد باکتری های مقاوم به جیوه در این مناطق می‌شود (۲۶).

در این بررسی باکتری های مقاوم به جیوه از نمونه های آب و رسوب با روش کشت مسقیم و غنی سازی اولیه در حضور ۱۰ mg/l کلرید جیوه جداسازی گردیدند. روش غنی سازی موجب جداسازی بهتر باکتری های مقاوم شد. علاوه بر این باکتری های جداسازی شده با روش غنی سازی در مراحل بعد رشد بهتری در حضور جیوه نشان دادند. بنابراین غنی سازی اولیه موجب بیان ژن‌های مقاومت به جیوه در باکتری ها، سازگاری آنها با شرایط استرس زای ناشی از وجود جیوه و در نتیجه رشد بهتر آنها می‌شود.

www.SID.ir

Archive of SID

چرا که ژن‌های مقاومت به جیوه القاء پذیر هستند و بیان آنها در حضور جیوه القا می‌گردد (۲۷). در تحقیقات گذشته در این زمینه، جدا سازی باکتری‌های مقاوم به فلزات سنگین نظیر جیوه، مستقیماً بر روی محیط جامد حاوی فلز صورت گرفته است. نتایج به دست آمده نشان می‌دهد که باکتری‌های جدا شده با این روش بعضاً توانایی تحمل غلظت‌های بالاتر از میزان لازم برای جداسازی را نداشتند (۹، ۱۵، ۱۶).

در این تحقیق باکتری های گرم مثبت و گرم منفی مختلفی به عنوان باکتری‌های مقاوم به جیوه شناسایی شدند. درصد فراوانی باکتری‌های گرم منفی در مقایسه با باکتری های گرم مثبت بیشتر بود. باکتری های گرم منفی در شرایط سخت به راحتی از طریق فرآیند هم یوغی (conjugation) به صورت درون گونه ای و برون گونه‌ای قادر به انتقال ژن های مقاومت به جیوه بین یکدیگر هستند. علاوه بر این اولین مرحله از برهم‌کنش باکتری و جیوه 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 می کند) در مقایسه با باکتری های گرم مثبت کمتر تحت تاثیر جیوه قرار می‌گیرند، از این رو احتمال جداسازی آنها از محیط نیز افزایش می‌یابد. مقاومت به جیوه در طیف وسیعی از باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی گزارش شده است. Pahan و همکارانش در سال ۱۹۹۰ جنس‌های باکتریایی مقاوم به جیوه اشریشیاکلی، کلبسیلا، میکروکوکوس، سودوموناس، آلکالیجنس و باسیلوس را شناسایی کردند (۲۸). همچنین Petrova و همکارانش در سال ۲۰۰۲ باکتری‌های گرم مثبت آرتروباکتر، اکسیگوباکتریوم، میکروکوکوس و باسیلوس و باکتری های گرم منفی پلیزیوموناس، آسینتوباکتر و سودوموناس مقاوم به جیوه را شناسایی نمودند (۲۵) و Felske و همکارانش نیز در سال ۲۰۰۳ *Pseudomonas aeruginosa* مقاوم به جیوه را جداسازی و شناسایی کردند (۲۹).

از آنجا که باکتری های بومی مناطق آلوده به طور مداوم در تماس با غلظت های سمی جیوه هستند، لذا این باکتری ها به نحوی باید قادر به حذف این فلز سمی از اطراف خود باشند. Ray و همکارانش در سال ۱۹۸۹ باکتری های مقاوم به جیوه از خاک های آلوده جداکردند که توانایی بالایی در حذف این فلز سمی از محیط کشت داشتند(۱۰) و Von canstein و همکارانش نیز در سال ۱۹۹۹ باکتری مقاوم به جیوه سودوموناس پوتیدا سوش Spi3 از رسوبات رودخانه ای آلوده در آلمان جداکردند که قادر به حذف جیوه بود. سپس با طراحی یک بیوراکتوردر مقیاس آزمایشگاهی از این باکتری مقاوم برای تصفیه فاضلاب کلر آلکالی استفاده کردند. آنها نشان دادند سوش های مقاوم سودوموناس پوتیدا قادر به حذف جیوه از پساب واحد کلر آلکالی با بازده ۹۸-۹۰ درصد می باشند. تحقیقات آنها موجب شد که چندین واحد کلر آلکالی در آلمان برای تصفیه فاضلاب خود از این سیستم زیستی بهره ببرند (۱۵). بنابراین استفاده از روش حذف زیستی جیوه از پساب آلوده کارخانجات مستلزم جداسازی و شناسایی دقیق باکتری‌های مقاوم و سپس کاربرد آنها بدین منظور می‌باشد.

نتیجه گیری

در این پژوهش باکتری سراشیا مارسه سنس تقریباً در تمامی فصول و ایستگاه های مورد بررسی شناسایی شد. این نتایج نشان می‌دهد که این باکتری، بومی رودخانه کر می باشد و ژن‌های مقاومت به جیوه را از طریق پلاسمید های حاوی اپران *mer* کسب کرده است. ژن هایی که بیان آنها موجب مقاومت باکتری در برابر جیوه می شوند عمدتاً بر روی پلاسمید قرار گرفته اند (۳۰).

References:

1. Kumar H.D, Aquatic ecology Chapter VII, General ecology, First edition, New Delhi India, Vinkas press, 1994, 497-555.
2. Nascimento A., and Chartone Souza E., Operon mer: bacterial resistance to mercury and potential for bioremediation of contaminated environments, Genet. Mol. Res., 2003, 2(1): 92-101.
3. Wagner Dobler I., Von Canstein H., Timmis K.N., Li Y., and Deckwer W.D., Removal of mercury from chemical waste-water by microorganisms in technical scale, Environ.Sci.Tecnhnol., 2000, 34(21): 4628-4634.
4. Wackett L., Dodge A. and Ellis L., Microbial genomics and the periodic Table, Appl. Environ. Mirobiol., 2004, 70(2): 647-655.
5. Kiyono M. and Pan Hau H., Genetic engeneering of bacteria for environmental remediation of mercury, J.Health.Sci., 2006, 52(3): 199-204.
6. Tothova T., Pritas P., and Javorsky P., Mercuric reductase gene transfer from soil bacteria to rumen bacteria,

www.SID.ir

Archive of SID

Folia.Microbiol., 2006, 51)4:(317-319.
7. Deckwer W.D., Becker F.U., Ledakowitcz S., and Wagner Dobler I., Microbial removal of ionic mercury in a three phase fluidzed bed reactor, Environ.Sci., 38(6): 1858-1865.
8. Barkay T., Miller S.M., and Summers A.O., Bacterial mercury resistance from atoms to ecosystems, FEMS Microbiol. Rev., 2003, 27: 355-384.
9. Barkay T., Adaptation of aquatic microbial communities to Hg(II) stress, Appl.Environ.Microbiol., 1987, 53(12): 2725-2732.
10. Ray S., Gachhui R., Pahan K., Chaudhury J., and Mundal A., Detoxification of mercury and organomercurials by nitrogen fixing soil bacteria, 1989, J.Bio.sci., 14(2):173-182.
11. Masura N., Huang C., Takeshi Y., and Ginro E., Study on ubiquity of mercury resistance genes and multi heavy metal resistance of Clostridia, Procee. Environ. Engin. Res., 1999, 36: 29-37.
12. Schelert J., Dixit V., Hoang V., Simbahan J., Drozda M., and Blum P., Occurrence and characterization of mercury resistance in the hyperthermophilic archaeon Sulfolobus sulfataricus by use of gene disruption, J.Bacteriol., 2004, 186)2:(427-437.
13. Chen Sh., and Wilson B., Construction and characterization of E.coli genetically engeneering for bioremediation of contaminated environments, Appl.Environ.Microbiol., 1997, 63(6): 2442-2445.
14. Brunke M., Deckwer W.D., Frischmuth A., Horn J.M, Lundsorf H., Rhode M., Rohrocht M., Timmis K.N., and Weppen P., Microbial retention of mercury from waste streams in a laboratory column containing merA gene bacteria, FEMS Microbiol. Rev., 1993, 11: 145-152
15. Von Canstein H., Li Y., Timmis K.N., Deckwer W.D., and Wagner Dobler I., Removal of mercury from chlor alkali electrolysis wastewater by a mercury resistance Pseudomonas putida strain, Appl.Environ.Microbiol., 1999, 65(12):5279-5284.

۱۶. کفیل زاده، ف.، بررسی آلودگی فلزات سنگین در رودخانه کر، طرح پژوهشی،۱۳۸۴، دانشگاه آزاد اسلامی ارسنجان.

۱۷. کریمی، ی.، مطالعه حوزه آبریز رودخانه کر و سیوند، ۱۳۷۴، اداره کل حفاظت از محیط زیست استان فارس.

18. Manual of Oceanographic and Observations Pollutant Analysis Methods, (MOOPAM), Chapter III Analysis method, 1999, ROMPE, Kuwait. 257-342.
19. Wagner Dobler I., Lunsdorf H., Lubbenhausen T., Von Canstein H., and Li Y., 2000, Structure and species composition of mercury reducing biofilms, Appl.Environ.Microbiol., 66(10):4559-4563.
20. Harley J.P and Prescott L.M., Biochemical activities of bacteria, Laboratory exercises in microbiology, Fifth edition, New York USA, McGraw Hill Pub., 2002, 125-219.
21. Mahler I., Levinson H.S., Wang Y.and Halvorson H.O., 1986, Cadmium and mercury resistance Bacillus strains from a salt marsh and from Boston harbor, Appl.Environ.Microbiol., 56(6):1293-1298.
22. Barkay T., Adaptation of aquatic microbial communities to Hg(II) stress, Appl.Environ.Microbiol., 1987, 53(12):2725-2732.
23. Osborn A.M., Bruce K.D., Strike P., and Ritchie D.A., 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., 1993, 59(12): 4024-4030.
24. Nakamura K., Sakamoto M., Uchiyama H., and Yagi O., Organomercury volatilizing bacteria in the mercury polluted sediment of Minamata bay, Japan, Appl.Environ.Microbiol., 1990, 56(1):304-305.
25. Petrova M.A., Mindlin S., Gorlenko Z., Kaliaeva E., Soina V., and Bogdanova E., Mercury resistance bacteria from permafrost sediments and prospects for their use in comparative studies of mercury resistance determinants, Genetika., 2002, 38)11:(1569-1574.
26. Schneiker S., Keller M., Droge M., Lanka E., Puhler A., and Selbistschka W., 2001, The genetic organization and evolution of the broad host range mercury resistance plasmid pSB102 isolated from a microbial pollution residing in the rizhospher of alfalfa, Nucleotide Acid res., 29)24(: 5169-5181.
27. Robinson, J.B., and Tuovinen O.H., Mechanisms of microbial resistance and detoxification of mercury and organomercury compounds: physiological, biochemical and genetic analysis, J.Microbiol.Rev., 1984, 48(2): 95-124.
28. Pahan K., Ray S., Gachui R., Chaudhuri J., and Mandal A., Ecological and biochemical studies on mercury resistance bacteria.Indian, J.Environ.Health, 1990, 32(3): 250-261.
29. Felske A.D., Fehr W., Pauling B.V., Von Canstein H., and Wagner Dobler I., Functional profiling of mercuric reductase genes in biofilm communities of a technical scale biocatalyzer, BMC Microbiology, 2003, 4(6): 1-11.
30. Barkay T., Fouts D.L., and Olsen B.H., Preparation of a DNA probe for detection of mercury resistance genes in gram negative bacterial communities, Appl. Environ. Microbiol., 1985, 49(3): 686-692.

www.SID.ir