مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی - مولکولی
دوره هفتم، شماره بیست و هفتم- تابستان ۱۳۹۶

Research Article
مقاله تحقیقی

بررسی میزان مقاومت به فلزهای سنگین سولفات روی و سولفات کادمیوم در سویه-های *اشرشیاکلی* جدا شده از آب‌های سطحی شهر تهران با استفاده از روش تهیه رقت سریال در لوله

میترا صالحی*، مهسا اختری، عباس اخوان سپهی

گروه میکروبیولوژی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

چکیده

سابقه و هدف: فلزهای سنگین از جمله مواد آلوده کننده طبیعت به شمار می‌آیند که طی عملکردهایی نظیر استخراج معادن و ورود پساب کارخانجات صنعتی، به محیط‌های طبیعی وارد می‌گردند. برخی از فلزهای سنگین به مقدار کم برای رشد سلولی نیاز بوده و تنها در غلظت‌های بالا سمی هستند. غلظت‌های بالای فلزهای سنگین مشکل‌های جدی را برای حیات گیاهان، حیوانات و آبزیان و در نهایت برای انسان‌ها که مصرف‌کنندگان اصلی این منابع غذایی هستند، ایجاد می‌کنند. شناسایی باکتری‌های مقاوم به فلزهای سنگین نقش مهمی در رابطه با آلودگی محیط و در نهایت پاکسازی آن ایفا می‌کند. از این رو به بررسی میزان مقاومت سویه‌های *اشرشیاکلی* جدا شده از آب های سطحی نسبت به فلزهای سنگین پرداخته شده است.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش ۱۲۰ نمونه از آب‌های سطحی شهر تهران در فصل‌های بهار و تابستان از رودخانه، آب‌های سطحی و جوی‌های آب جمع‌آوری و داخل فالکون‌های استریل به آزمایشگاه منتقل شد. نمونه‌ها ابتدا به منظور غنی-سازی در محیط کشت BHI براث و سپس به‌منظور رویت کلنی میکروارگانیسم‌ها روی پلیت حاوی محیط BHI آگار به‌صورت خطی کشت و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. جهت جداسازی باکتری *اشرشیاکلی* از سایر باکتری‌های رشد یافته از محیط کشت اختصاصی ائوزین متیلن بلو (EMB) بهره گرفته شد. با روش تهیه رقت‌های سریال در لوله، مقاومت این باکتری‌ها در برابر غلظت‌های مختلف از نمک فلزهای سنگین سولفات روی و سولفات کادمیوم مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: تنها ۴۰ سویه (۳۳/۳۳٪) *اشرشیاکلی* خالص و جداسازی شد. حداقل تراکم متوقف کننده رشد (MIC) برای نمک سولفات روی ۱۲/۵ mMو برای نمک سولفات کادمیوم میزان ۱۰ mM گزارش شد.

نتیجه‌گیری: با مقایسه مقاومت سویه‌های *اشرشیاکلی* به فلزهای روی و کادمیم به نظر می‌رسد که میزان فلز روی در آب‌های سطحی مورد بررسی از فلز کادمیم بیش‌تر است و به دنبال آن میزان مقاومت سویه‌های *اشرشیاکلی* در مقابل فلز روی نیز بیش‌تر است. در نهایت، افزایش فلزهای سنگین در آب‌های سطحی منجر به افزایش مقاومت سویه های *اشرشیاکلی* به فلزهای سنگین می‌شود.

واژه‌های کلیدی: فلزهای سنگین، *اشرشیاکلی*، آب‌های سطحی

مقدمه

فلزهای سنگین که به عنوان فلزهای کمیاب شناخته شده‌اند، از ترکیب‌های طبیعی محیط‌زیست هستند. امروزه به علت مصرف بی‌رویه و تخلیه مقادیر بالایی از فلزهای سنگین به آب‌ها، چرخه‌های ژئوشیمیایی و تعادل بیوشیمیایی تغییر کرده و منجر به اثرهای زیست محیطی و بهداشتی شده است (۷). حضور فلزهای سنگین در پساب آبی بسیاری از صنایع از قبیل آب‌کاری فلزهای،

نویسنده مسئول
گروه میکروبیولوژی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.
پست الکترونیکی:mitra_salehi_microbiology@yahoo.com
تاریخ دریافت: ۱۵/۹/۱۳۹۵
تاریخ پذیرش: ۳/۱۲/۱۳۹۵

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-21]
[DOR: 20.1001.1.22285458.1396.7.27.9.1]

استخراج معادن، دباغی، تولید رادیاتور، ذوب، صنایع آلیاژ و ذخیره‌سازی باتری صنعتی گزارش شده است (۱۱). شایع‌ترین فلزهای سنگین سمی در فاضلاب شامل آرسنیک، سرب، جیوه، کادمیوم، کروم، مس، نیکل، نقره و روی هستند (۷).

غلظت کم برخی از فلزهای واسطه مانند کبالت، مس، نیکل و روی ضروری است اما فلزهای سنگین مانند سرب، کادمیوم، جیوه، نقره و کروم، حتی در غلظت‌های پایین سمی هستند. به‌طور کلی، فلزهای سنگین تجزیه‌پذیر نیستند و به دلیل حلالیت بالا می‌توانند توسط ارگانیسم-های زنده جذب شوند. قرار گرفتن انسان‌ها در معرض فلزهای سنگین می‌تواند از طرق مختلفی نظیر استنشاق گرد و غبار و یا بخار و مصرف از طریق مواد غذایی و نوشیدنی رخ دهد (۷،۹،۱۳).

ورود فاضلاب شهری به آب‌های سطحی از این جهت نگران کننده است که از این منابع آبی برای آبیاری زمین-های کشاورزی جنوب تهران استفاده می‌شود. هنگامی که فلزهای سنگین وارد زنجیره غذایی شوند، امکان تجمع آن‌ها در بدن افزایش می‌یابد. اگر مصرف فلزهای فراتر از غلظت مجاز شوند، می‌توانند بیماری ها و اختلال‌های مختلفی از جمله کاهش رشد، سرطان، آسیب عضوی، آسیب به سیستم ایمنی و در موارد شدید مرگ را ایجاد کنند (۹).

پاک‌سازی یک تکنولوژی نوآورانه و امید بخش در دسترس برای حذف فلزهای سنگین و بازیابی فلزهای در آب‌های آلوده و زمین است. از آنجا که میکروارگانیسم‌ها استراتژی‌های مختلفی برای بقای خود در زیستگاه‌های آلوده به فلزهای سنگین را توسعه داده اند، این میکروارگانیسم‌ها به توسعه و اتخاذ مکانیسم‌های سم‌زدای مختلفی از جمله جذب، تجمع زیستی، انتقال زیستی، معدنی شدن، رسوب خارج سلولی و اکسیداسیون آنزیمی یا تبدیل به یک فرم کم‌تر سمی و جریان فلزهای سنگین از سلول که می‌تواند برای پاک‌سازی مورد بهره برداری قرار گیرد، شناخته شده اند. میکروب‌ها انواع مختلفی از مکانیسم های مقاومتی در پاسخ به شرایط سخت محیطی از جمله فلزهای سنگین دارد این مکانیسم‌ها ممکن است توسط ژن های کروموزومی کد شود(۱۰).

شناسایی باکتری‌های مقاوم به فلزهای سنگین اولین مرحله در مسیر فرایند حذف زیستی فلزهای سنگین از پساب می باشد. پاکسازی میکروبی به عنوان احیای محیط زیست و حفظ کیفیت آن با استفاده از میکروارگانیسم ها (باکتریایی، قارچ و مخمر) توصیف شده است. این روش با فعالیت‌های بیولوژیکی بر کاهش غلظت یا سمیت یک آلاینده کاربرد دارد(۷).

باکتری *اشرشیاکلی*، مهم‌ترین عضو از خانواده انتروباکتریاسه، شاخص آلودگی مدفوعی و ساکن دستگاه گوارش انسان و حیوانات خونگرم است (۸). در مطالعه‌های متعدد میزان مقاومت این باکتری نسبت به فلز روی و کادمیوم گزارش شده است(۱۴).

هدف این پژوهش بررسی میزان مقاومت سویه‌های *اشرشیاکلی* جدا شده از آب‌های سطحی شهر تهران نسبت به فلزهای سنگین سولفات روی و سولفات کادمیوم می-باشد.

مواد و روش‌ها

در این پژوهش در فصل‌های بهار و تابستان سال ۱۳۹۴، ۱۲۰ نمونه آب از رودخانه، آب‌های سطحی و جوی‌های آب و فاضلاب سطح شهر تهران جمع آوری گردید و بلافاصله با استفاده از فالکون‌های درب دار استریل به آزمایشگاه منتقل شد.

نمونه‌ها ابتدا به منظور غنی سازی در محیط کشت BHI براث و سپس به منظور رویت کلنی میکروارگانیسم‌ها روی پلیت حاوی محیط BHI آگار به صورت خطی کشت و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند.

جهت جداسازی باکتری *اشرشیاکلی* از سایر باکتری‌های رشد یافته از محیط کشت اختصاصی ائوزین متیلن بلو (EMB) بهره گرفته شد. جهت اثبات سویه های *اشرشیاکلی*، از تست‌های بیوشیمیایی نظیر اوره آز، سیمون سیترات، TSI، SIM، MR-VP استفاده و با رنگ آمیزی گرم، تست کاتالاز و اکسیداز تأئید شد.

جهت تعیین[1] MIC (حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد) و[2] MBC (حداقل غلظت کشندگی رشد) از روش تهیه رقت‌های سریال لوله ای استفاده شد.

ابتدا رقت‌های سریال (۱۰۰، ۵۰، ۲۵، ۱۲/۵، ۶/۲۵،... میلی‌مولار) از نمک سولفات روی و هم‌چنین رقت‌های

[1] Minimum Inhibitory Concentration
[2] Minimum Bactericidal Concentration

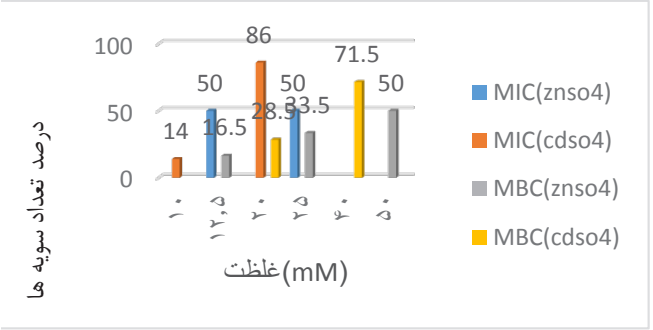
[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-21]
[DOR: 20.1001.1.22285458.1396.7.27.9.1]

(۸۰، ۴۰، ۲۰، ۱۰، ۵،... میلی‌مولار) از نمک سولفات کادمیوم تهیه و اتوکلاو شدند. سپس محیط کشت BHI براث استریل، به همراه محلول نمک مورد نظر و کدورت باکتری تهیه شده معادل نیم مک‌فارلند را درون لوله ریخته، و در انکوباتور گرم‌خانه گذاری شدند. اولین لوله شفاف به عنوان MIC (حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد) تعیین شد. سپس جهت تعیین MBC (حداقل غلظت کشندگی رشد) به طور جداگانه بر روی محیط کشت اختصاصی EMB کشت و در انکوباتور گرم‌خانه گذاری شد. در صورتیکه در پلیت مربوط به لوله شفاف باکتری رشد کرده باشد، رقت مورد نظر MIC محسوب می‌شود. هم‌چنین رقت قبل از لوله شفاف اگر فاقد رشد در پلیت باشد، رقت مورد نظر MBC محسوب می‌شود.

یافته‌ها

در این پژوهش، ۱۲۰ نمونه آب سطحی از جوی‌ها، رودخانه‌ها و فاضلاب سطح شهر تهران جمع آوری گردید. از این نمونه‌ها تنها 40 (33/33%) سویه *اشرشیاکلی* جداسازی شد.

حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد (MIC) سویه‌های *اشرشیاکلی* بین غلظت‌های ۱۲/۵ mM تا ۲۵ mM از نمک فلز روی متغیر بود. حداقل غلظت کشندگی رشد (MBC) سویه‌های *اشرشیاکلی* بین غلظت‌های ۱۲/۵ mM تا ۵۰mM از نمک فلز روی متغیر بود. حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد (MIC) سویه‌های *اشرشیاکلی* بین غلظت‌های ۱۰mM تا ۲۰ mM از نمک فلز کادمیوم متغیر بود. حداقل غلظت کشندگی رشد (MBC) سویه‌های *اشرشیاکلی* بین غلظت‌های ۲۰ mM تا ۴۰ mM از نمک فلز کادمیوم متغیر بود (نمودار ۱).



نمودار ۱- سنجش MIC و MBC برحسب درصد تعداد سویه‌های *اشرشیاکلی* نسبت به غلظت‌های نمک سولفات روی و سولفات کادمیوم

بحث

در مطالعه حاضر پس از نمونه‌گیری، از محیط کشت BHI broth و BHI agar، جهت غنی سازی باکتری‌ها استفاده شد و سپس با استفاده از محیط کشت اختصاصی EMB agar جداسازی انجام گردید. روش کار در این مطالعه با روش کار در مطالعه ذوالفقاری که ۲۶۳ سویه باکتری را با استفاده از روش غنی سازی و نیز کشت مستقیم در محیط جامد از پساب جداسازی گردید و هم‌چنین با روش کار در مطالعه میرزایی، مطابقت دارد (۴،۱۲). در صورتی‌که با روش کار در مطالعه اخوان سپهی که پس از نمونه گیری، مستقیم از محیط کشت اختصاصی EMB agar جهت جداسازی سویه‌های باکتری استفاده شد، تفاوت دارد (۲). استفاده از روش غنی سازی در مقایسه با روش کشت مستقیم، موجب جداسازی بهتر باکتری‌های مقاوم می گردد. هم‌چنین، باکتری‌های جداسازی شده با این روش در مراحل بعد، رشد بهتری در حضور فلز نشان می‌دهند. بنابراین، غنی سازی به احتمال موجب بیان ژن‌های مقاومت به فلز در باکتری‌ها و سازگاری آن‌ها با شرایط موجود می‌گردد. بنابراین روش غنی سازی به دلیل جداسازی بهتر باکتری‌ها، روش مناسب‌تری به نظر می‌رسد (۴).

با توجه به این که حضور فلزهای سنگین در محیط با ایجاد مقاومت در باکتری‌ها ارتباط دارد، با مقایسه مقاومت سویه‌های *اشرشیاکلی* جدا شده از آب‌های سطحی به فلزهای روی و کادمیوم، به نظر می‌رسد که میزان فلز روی در آب‌های سطحی مورد بررسی از فلز کادمیوم بیش‌تر است و به دنبال آن میزان مقاومت سویه‌های *اشرشیاکلی* در مقابل فلز روی نیز بیش‌تر است.

میزان MIC ۲۰-۱۰ میلی‌مولاری برای نمک سولفات کادمیوم و ۲۵-۱۲/۵ میلی‌مولاری برای نمک سولفات روی در مقایسه با MIC به دست آمده در مطالعه Abskharon برای سویه‌های جدا شده از فاضلاب شهر مصر که میزان ۹/۱۷ mM برای فلز روی و ۴/۴ mM برای فلز کادمیوم گزارش شده است و یا در مطالعه آلبوغبیش، که MIC فلز کادمیوم برای سویه‌های جدا شده از فاضلاب شهری شاهین شهر اصفهان میزان ۶ mM و برای سویه‌های جدا شده از پساب کارگاه مسگری میزان ۴ mM گزارش شد، مقادیر بیش‌تری است (۳،۶). هم-

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-21]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1396.7.27.9.1]

چنین در مقایسه با مطالعه Shrivastava که MIC فلز کادمیوم برای سویه‌های جدا شده از پساب صنعتی میزان ۲ mM به دست آمده است، میزان کمابیش ۵ تا ۹ برابر بیش‌تر است (۱۵). این مقایسه بیانگر این مطلب است که در حال حاضر آلودگی آب‌های سطحی شهر تهران به فلزهای روی و کادمیوم بیش‌تر از فاضلاب شهر مصر، فاضلاب شاهین شهر اصفهان و پساب کارگاه مسگری است.

میزان MIC ۲۰ میلی‌مولاری برای نمک سولفات کادمیوم در مقایسه با MIC به دست آمده برای فلز کادمیوم در پژوهش اخوان سپهی که میزان ۲۲ mM است و یا در مطالعه مصفحی که میزان این فاکتور برای سویه‌های *اشرشیاکلی* جدا شده از نمونه های بالینی ۳۵ mM است، مقدار کم‌تری است. علت تفاوت این است که، سویه‌های *اشرشیاکلی* مورد مطالعه در پژوهش حاضر، از آب‌های سطحی جداسازی شده‌اند که معمولا دارای مقادیر کم‌تری از فلز کادمیوم است و سویه‌های *اشرشیاکلی* نمی‌تواند از خود مقاومت چندانی نشان دهد. در حالی‌که ، وجود مقادیر بالای فلز کادمیوم در پساب صنعتی و نمونه‌های بالینی مطالعه شده، مقاومت به این فلز سنگین را در سویه‌های مطالعه شده افزایش داده است (۲،۵).

دو مقایسه فوق می‌تواند زنگ خطری برای محیط زیست باشد. نظریه‌هایی که تاکنون ارائه شده ، منشاء مقاومت میکروبی به فلزهای را ناشی از تماس‌های ابتدایی با فلزهای سمی و تداوم با آلاینده‌های محیطی می‌داند. چرا که ممکن است با گذشت زمان و با ورود پساب‌های آلوده به فلزهای سنگین روی و کادمیوم به آب‌های سطحی، سویه‌های باکتری موجود در این آب‌ها مقاومت بیش‌تری نسبت به این فلزهای سنگین کسب کنند. به‌طوری‌که با ورود این آب‌های سطحی به زمین‌های کشاورزی و رودخانه‌ها باعث آلوده شدن محصول‌های کشاورزی و جانوران آبزی و در نهایت خطری برای سلامتی انسان به عنوان مصرف کننده اصلی این مواد غذایی باشد. از یک سو احتمال انتقال مقاومت، از سویه‌های مقاوم به فلزهای سنگین به باکتری‌های مفید فلور طبیعی روده و دستگاه گوارش انسان وجود دارد. از سوی دیگر سویه‌های محیطی به عنوان مخزن ژن‌های مقاومت در طبیعت می‌توانند موجب ایجاد سویه‌های مقاوم بیماری زا شوند (۱).

نتیجه‌گیری

به‌طور کلی مقادیر MIC به‌دست آمده در این پژوهش مقادیر اندکی است ولی در مقایسه با مقادیر MIC به‌دست آمده در مطالعه‌های گذشته مقادیر چشم‌گیری است. این بررسی از طرفی نگرانی‌هایی برای محیط زیست ایجاد می‌کند. چرا که در مواردی میزان این فلزهای سنگین در سطح شهر تهران بالاتر از فاضلاب شهر مصر، فاضلاب شهری و پساب کارگاه مسگری شاهین شهر اصفهان گزارش شد. از طرفی می‌توان از این سویه‌های *اشرشیاکلی* جدا شده از آب‌های سطحی در جهت پاک‌سازی و حذف این فلزهای سنگین از محیط زیست بهره برد.

امید است این فن‌آوری ارزان قیمت و کارآمد رواج یابد و انسان را در جهت حفظ و نگهداری و بهبود کیفیت محیط زیست یاری رساند.

با توجه به نتایج به‌دست آمده در این مطالعه، پژوهش پیرامون ژن‌های کدکننده مقاومت به فلزهای سنگین در سویه‌های اشرشیاکلی جدا شده از آب‌های سطحی ضروری به نظر می‌رسد. لذا در نظر است، در ادامه پژوهش به این مهم پرداخته شود.

سپاسگزاری

بدین‌وسیله از مساعدت آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشکده علوم زیستی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال جهت در اختیار گذاشتن مواد و وسایل مورد نیاز جهت انجام این پژوهش قدردانی می‌گردد.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-21]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1396.7.27.9.1]

منابع

۱. ابراهیمی پور غ، مرادی ا، کارخانه م، مرزبان ع. مقایسه مقاومت به آنتی بیوتیک ها و فلزهای سنگین در سه سویه باکتری سودوموناس آئروژینوزا جداسازی شده از مناطق با زیستگاه متفاوت. مجله علوم آزمایشگاهی دانشکده پیراپزشکی گرگان. ۱۳۹۳؛ شماره چهارم:۶۰-۵۵.

۲. اخوان سپهی ع، شریفیان سحر، ذوالفقاری م، درمنی م. بررسی میزان مقاومت کلی فرم های روده ای جدا شده از پساب های صنعتی، خانگی و بخش هایی از تصفیه خانه شهر اراک به فلزهای سنگین. مجله پژوهش های سلولی و مولکولی. ۱۳۹۳؛ شماره دوم: ۱۷۸-۱۶۷.

۳. آلبوغبیش ه، طهمورث پور آ، دودی م. مقاومت باکتری های جدا شده از فاضلاب شهری و پساب کارگاه مسگری به آنتی بیوتیک ها و فلزهای سنگین سرب، مس، کادمیم و نیکل. مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی گرگان. ۱۳۹۲؛ شماره اول: ۹۵-۱۰۲.

۴. ذوالفقاری م، خلیلیان م. جداسازی و ارزیابی میکروارگانیسم های مقاوم به سلنیت از پساب های صنعتی. مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی ایلام. ۱۳۹۲؛ شماره هفتم: ۱۵۲-۱۴۲.

۵. مصفحی م، منصوری ش، نعمتی ر، فروتن ح. بررسی مقاومت هم زمان نسبت به فلزهای سنگین و داروهای ضد میکروبی گونه های اشرشیاکلی جدا شده از نمونه های بالینی. مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان. ۱۳۸۸؛ شماره سوم: ۱۹۳-۲۰۲.

6. Abskharon RNN, Hassan SHA, Gad El-Rab SMF, Shoreit AAM. Heavy metal resistant of *E. coli* isolated from wastewater sites in Assiut City, Egypt. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 2008; 81(3): 309-315.
7. Akpor OB, Ohiobor GO, Olaolu TD. Heavy metal pollutants in wastewater effluents: Sources, effects and remediation. Bioscience and Bioengineering, 2014; 2: 37-43.
8. Allocati N, Masulli M, Alexeyev MF, Ilion CD. *Escherichia coli* in Europe: An Overview. Environmental Research and Public Health, 2013; 10: 6235-6254.
9. Barakat MA. New trends in removing heavy metals from industrial wastewater. Arabian Journal of Chemistry, 2010; 4: 361-377.
10. Dixit R, Wasilla, Malaria D, Pandiyan K, B. Singh U, Sahu U, Shukla R, P. Singh B, P. Rai J, Sharma PK, Lade H and Paul D. Bioremediation of Heavy Metals from Soil and Aquatic Environment: An Overview of Principles and Criteria of Fundamental Processes. Sustainability, 2015; 7: 2189-2212.
11. Hegazi, H.A. 2013. Removal of heavy metals from wastewater using agricultural and industrial wastes as adsorbents. Housing and Building National Research Center. Vol. 9, Pp 276-282.
12. Mirzaei N, Kafilzadeh, F, Kargar M. Isolation and Identification of Mercury Resistant Bacteria from Kor River, Iran. Journal of Biological Sciences, 2008; 8: 935-939.
13. Nasrazadani A, Tahmourespour A, Hoodaji M. Determination of Bacteria Resistance Threshold to Lead, Zinc and Cadmium in three Industrial Wastewater Samples. Environmental Studies, 2011; 36: 56.
14. Rensing C, Mitra B, Rosen BP. The *ZntA* gene of *Escherichia coli* encodes a zn(II)-Translocating p-type ATPase. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997; 94: 14326.
15. Shrivastav A, Jain S, Gautam V, Shrivastav N, Sharma RK, Shrman K. MURRAY KOENIGII (CURRY LEAVES). PHARMA SCIENCE MONITOR, 2013; 4: 462-477.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-21]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1396.7.27.9.1]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1396.7.27.9.1]
[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-21]