

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 می آیند که طی عملکردهایی نظیر استخراج معادن و ورود پساب کارخانجات صنعتی، به محیطهای طبیعی وارد می گردند. برخی از فلزهای سنگین به مقدار کم برای رشد سلولی نیاز بوده و تنها در غلظت های بالا سمی هستند. غلظت های بالای فلزهای سنگین مشکل های جدی را برای حیات گیاهان، حیوانات و آبزیان و در نهایت برای انسان ها که مصرف کنندگان اصلی این منابع غذایی هستند، ایجاد می کنند. شناسایی باکتری های مقاوم به فلزهای سنگین نقش مهمی در رابطه با آلودگی محیط و در نهایت پاکسازی آن ایفا می کند. از این رو به بررسی میزان مقاومت سویه های *اشرشیاکلی* جدا شده از آب های سطحی نسبت به فلزهای سنگین پرداخته شده است.

مواد و روش ها: در این پژوهش ۱۲۰ نمونه از آب های سطحی شهر تهران در فصل های بهار و تابستان از رودخانه، آب های سطحی و جوی های آب جمع آوری و داخل فالكون های استریل به آزمایشگاه منتقل شد. نمونه ها ابتدا به منظور غنی سازی در محیط کشت BHI براث و سپس به منظور رویت کلنی میکروارگانیزم ها روی پلیت حاوی محیط BHI آگار به صورت خطی کشت و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. جهت جداسازی باکتری *اشرشیاکلی* از سایر باکتری های رشد یافته از محیط کشت اختصاصی ائوزین متیلن بلو (EMB) بهره گرفته شد. با روش تهیه رقت های سریال در لوله، مقاومت این باکتری ها در برابر غلظت های مختلف از نمک فلزهای سنگین سولفات روی و سولفات کادمیوم مورد بررسی قرار گرفت.

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

نتیجه گیری: با مقایسه مقاومت سویه های *اشرشیاکلی* به فلزهای روی و کادمیم به نظر می رسد که میزان فلز روی در آب های سطحی مورد بررسی از فلز کادمیم بیش تر است و به دنبال آن میزان مقاومت سویه های *اشرشیاکلی* در مقابل فلز روی نیز بیش تر است. در نهایت، افزایش فلزهای سنگین در آب های سطحی منجر به افزایش مقاومت سویه های *اشرشیاکلی* به فلزهای سنگین می شود.

واژه های کلیدی: فلزهای سنگین، *اشرشیاکلی*، آب های سطحی

مقدمه

فلزهای سنگین که به عنوان فلزهای کمیاب شناخته شده اند، از ترکیب های طبیعی محیط زیست هستند. امروزه به علت مصرف بی رویه و تخلیه مقادیر بالایی از فلزهای سنگین به آب ها، چرخه های 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 آب کاری 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

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 فعالیت های بیولوژیکی بر کاهش غلظت یا سمیت یک آلاینده کاربرد دارد (۷).

باکتری /شرشیاکلی، مهم ترین عضو از خانواده انتروباکتریاسه، شاخص آلودگی مدفوعی و ساکن دستگاه گوارش انسان و حیوانات خونگرم است (۸). در مطالعه های متعدد میزان مقاومت این باکتری نسبت به فلز روی و کادمیوم گزارش شده است (۱۴).

هدف این پژوهش بررسی میزان مقاومت سویه های /شرشیاکلی جدا شده از آب های سطحی شهر تهران نسبت به فلزهای سنگین سولفات روی و سولفات کادمیوم می باشد.

مواد و روش ها

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

نمونه ها ابتدا به منظور غنی سازی در محیط کشت BHI برات و سپس به منظور رویت کلنی میکروارگانیسم ها روی پلیت حاوی محیط کشت BHI آگار به صورت خطی کشت و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند.

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

جهت تعیین^۱ MIC (حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد) و^۲ MBC (حداقل غلظت کشندگی رشد) از روش تهیه رقت های سریال لوله ای استفاده شد.

ابتدا رقت های سریال (۱۰۰، ۵۰، ۲۵، ۱۲/۵، ۶/۲۵... میلی مولار) از نمک سولفات روی و هم چنین رقت های

استخراج معادن، دباغی، تولید رادپاتور، ذوب، صنایع آلیاژ و ذخیره سازی باتری صنعتی گزارش شده است (۱۱). شایع ترین 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 غلظت های پایین سمی هستند. به طور کلی، فلزهای سنگین تجزیه پذیر نیستند و به دلیل حلالیت بالا می توانند توسط ارگانیسم های زنده جذب شوند. قرار گرفتن انسان ها در معرض فلزهای سنگین می تواند 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 آب های سطحی از این جهت نگران کننده است که از این منابع آبی برای آبیاری زمین های کشاورزی جنوب تهران استفاده می شود. هنگامی که فلزهای سنگین وارد زنجیره غذایی شوند، امکان تجمع آن ها در بدن افزایش می یابد. اگر مصرف فلزهای فراتر از غلظت مجاز شوند، می توانند بیماری ها و اختلال های مختلفی از جمله کاهش رشد، سرطان، آسیب عضوی، آسیب به سیستم ایمنی و در موارد شدید مرگ را ایجاد کنند (۹).

پاک سازی یک تکنولوژی نوآورانه و امید بخش در دسترس برای حذف فلزهای سنگین و بازیابی فلزهای در آب های آلوده و زمین است. از آنجا که میکروارگانیسم ها استراتژی های مختلفی برای بقای خود در زیستگاه های آلوده به فلزهای سنگین را توسعه داده اند، این میکروارگانیسم ها به توسعه و اتخاذ مکانیسم های سم زدای مختلفی از جمله جذب، تجمع زیستی، انتقال زیستی، معدنی شدن، رسوب خارج سلولی و اکسیداسیون آنزیمی یا تبدیل به یک فرم کم تر سمی و جریان فلزهای سنگین از سلول که می تواند برای پاک سازی مورد بهره برداری قرار گیرد، شناخته شده اند. میکروپها انواع مختلفی از مکانیسم های مقاومتی در پاسخ به شرایط سخت محیطی از جمله فلزهای سنگین دارد این مکانیسم ها ممکن است توسط ژن های کروموزومی کد شود (۱۰).

شناسایی باکتری های مقاوم به فلزهای سنگین اولین مرحله در مسیر فرایند حذف زیستی فلزهای سنگین از

¹ Minimum Inhibitory Concentration

² Minimum Bactericidal Concentration

بحث

در مطالعه حاضر پس از نمونه گیری، 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 صورتی که 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 می‌گردد. 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).

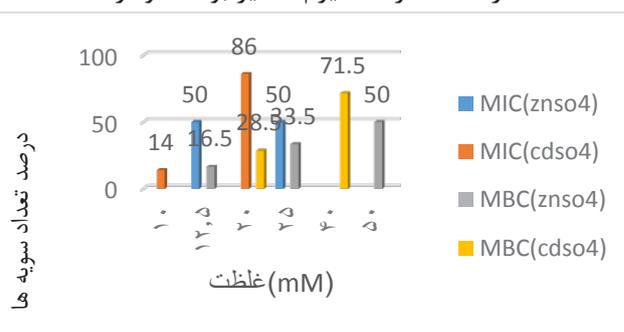
با توجه به این که حضور فلزهای سنگین در محیط با ایجاد مقاومت در باکتری‌ها ارتباط دارد، با مقایسه مقاومت سویه‌های /شرشیاکلی جدا شده از آب‌های سطحی به فلزهای روی و کادمیوم، به نظر می‌رسد که میزان فلز روی در آب‌های سطحی مورد بررسی از فلز کادمیوم بیشتر است و به دنبال آن میزان مقاومت سویه‌های /شرشیاکلی در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

(۸۰، ۴۰، ۲۰، ۱۰، ۵، ... میلی‌مولار) از نمک سولفات کادمیوم تهیه و اتوکلاو شدند. سپس محیط کشت BHI برات 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 جمع‌آوری گردید. از این نمونه‌ها تنها ۴۰ (33/33%) سویه /شرشیاکلی جداسازی شد.

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



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

به عنوان مخزن ژن های مقاومت در طبیعت می توانند موجب ایجاد سویه های مقاوم بیماری زا شوند (۱).

نتیجه گیری

به طور کلی مقادیر MIC به دست آمده در این پژوهش مقادیر اندکی است ولی در مقایسه با مقادیر MIC به دست آمده در مطالعه های گذشته مقادیر چشم گیری است. این بررسی از طرفی نگرانی هایی برای محیط زیست ایجاد می کند. 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 می توان از این سویه های /شرشیاکلی جدا شده از آب های سطحی در جهت پاک سازی و حذف این فلزهای سنگین از محیط زیست بهره برد.

امید است این فن آوری 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 به دست آمده در این مطالعه، پژوهش پیرامون ژن های کدکننده مقاومت به فلزهای سنگین در سویه های اشرشیاکلی جدا شده از آب های سطحی ضروری به نظر می رسد. لذا در نظر است، در ادامه پژوهش به این مهم پرداخته شود.

سپاسگزاری

بدین وسیله 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 می گردد.

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

میزان MIC ۲۰ میلی مولاری 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 سویه های /شرشیاکلی جدا شده از نمونه های بالینی ۳۵ mM است، مقدار کمتری است. علت تفاوت این است که، سویه های /شرشیاکلی مورد مطالعه در پژوهش حاضر، از آب های سطحی جداسازی شده اند که معمولا دارای مقادیر کمتری از فلز کادمیوم است و سویه های /شرشیاکلی نمی تواند از خود مقاومت چندانی نشان دهد. در حالی که ، وجود مقادیر بالای فلز کادمیوم در پساب صنعتی و نمونه های بالینی مطالعه شده، مقاومت به این فلز سنگین را در سویه های مطالعه شده افزایش داده است (۲،۵).

دو مقایسه فوق می تواند زنگ خطری برای محیط زیست باشد. نظریه هایی که تاکنون ارائه شده ، منشاء مقاومت میکروبی به فلزهای را ناشی از تماس های ابتدایی با فلزهای سمی و تداوم با آلاینده های محیطی می داند. چرا که ممکن است با گذشت زمان و با ورود پساب های آلوده به فلزهای سنگین روی و کادمیوم به آب های سطحی، سویه های باکتری موجود در این آب ها مقاومت بیش تری نسبت به این فلزهای سنگین کسب کنند. به طوری که با ورود این آب های سطحی به زمین های کشاورزی و رودخانه ها باعث آلوده شدن محصول های کشاورزی و جانوران آبی و در نهایت خطری برای سلامتی انسان به عنوان مصرف کننده اصلی این مواد غذایی باشد. از یک سو احتمال انتقال مقاومت، از سویه های مقاوم به فلزهای سنگین به باکتری های مفید فلور طبیعی روده و دستگاه گوارش انسان وجود دارد. از سوی دیگر سویه های محیطی

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: ۵۵-۶۰.
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: ۱۶۷-۱۷۸.
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: ۱۴۲-۱۵۲.
۵. مصفحی م، منصور 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.

