

## بررسی میزان مقاومت کلیفرمهای روده‌ای جدا شده از پسابهای صنعتی، خانگی و

### بخشهایی از تصفیه خانه شهر اراک به فلزات سنگین

عباس اخوان سپهی<sup>۱\*</sup>، سحر شریفیان<sup>۲</sup>، محمدرضا ذوالفقاری<sup>۳</sup> و محمد خلیلی درمنی<sup>۲</sup>

<sup>۱</sup> تهران، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، گروه زیست‌شناسی

<sup>۲</sup> خمین، دانشگاه آزاد اسلامی واحد خمین، گروه زیست‌شناسی

<sup>۳</sup> قم، دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم، گروه زیست‌شناسی

تاریخ دریافت: ۹۰/۳/۲۷ تاریخ پذیرش: ۹۲/۸/۲۷

#### چکیده

فلزات سنگین نظیر کادمیوم، جیوه، نیکل و اکسی‌آنیونهای تلوریت و کرومات از عناصر سمی هستند که به طرق مختلف وارد محیط زیست شده و برای سیستمهای بیولوژیکی، بالخصوص انسان، حیوانات و گیاهان زیان آور می‌باشند، لذا حذف آنها از محیط زیست ضروری است. میکروارگانیسم‌ها و به ویژه باکتریها نقش بسیار مهمی در حذف زیستی فلزات سنگین داشته و در بیوتکنولوژی کاربرد دارند. در این پژوهش شمارش کلیفرمهای روده‌ای و جداسازی سویه‌های مقاوم به فلزات سنگین از پسابهای صنعتی، خانگی و قسمت‌های مختلف سیستم تصفیه پساب شهر اراک انجام شده است. در این مطالعه چهار جنس از خانواده باکتریهای روده‌ای شامل *Escherichia coli*، *Klebsiella spp*، *Citrobacter spp* و *Enterobacter spp* از نمونه پسابهای فوق جداسازی شدند و حداقل تراکم متوقف کننده رشد (MIC) در مقابل غلظتهای مختلف فلزات سنگین نظیر کلرید کادمیوم، سولفات نیکل، کلرید جیوه، کرومات پتاسیم و تلوریت پتاسیم با استفاده از روش رقت در آگار، تعیین گردید و مقاومت آنها در برابر تعدادی از آنتی‌بیوتیکها با روش دیسک متد مشخص شد. در این تحقیق برای اولین بار MIC بسیار بالای 22mM (4032µg/ml) نسبت به کادمیوم، 20mM (3884µg/ml) نسبت به کروم، 20mM (6157 µg/ml) نسبت به تلوریت، 10mM (2628µg/ml) نسبت به نیکل و 1mM (271.5µg/ml) نسبت به جیوه برای باکتری *Klebsiella spp* به دست آمد.

واژه‌های کلیدی: کلیفرمهای روده‌ای، مقاومت به فلز سنگین، مقاومت آنتی‌بیوتیکی

\* نویسنده مسئول، تلفن: ۲۲۹۷۷۸۶۰، پست الکترونیکی: akhavansepahy@gmail.com

#### مقدمه

رزین، نساجی، دباغی، ذوب فلزات و آبرکاری به محیطهای طبیعی وارد می‌گردند این ترکیبات غالباً به صورت محلول یا ذراتی در اتمسفر در محیطهای آبی و خاکی رها می‌شوند و گاه غلظت آنها در طبیعت به حد خطرناکی می‌رسد و باعث آلودگی اکوسیستمهای طبیعی مانند خاک، آبهای سطحی و زیرزمینی می‌شوند و از سویی موجودات زنده را نیز تحت تأثیر قرار می‌دهند از طرف دیگر مواد

فلزات سنگین عناصری هستند که دارای چگالی<sup>۳</sup> ۵g/cm می‌باشند. فلزات سنگین شامل: جیوه، کادمیوم، نیکل، آرسنیک، مس، سرب، کبالت، نقره و کروم می‌باشند برخی از فلزات سنگین به مقدار کم برای رشد سلولی نیاز هستند، و تنها در غلظتهای بالا سمی هستند.

فلزات سنگین از جمله مواد آلوده کننده طبیعت به شمار می‌آیند که طی عملکردهایی نظیر استخراج معادن و ورود پسابهای کارخانجات صنعتی از جمله کارخانجات رنگ و

آلاینده به اعماق زمین نفوذ کرده و سفره‌های آب زیرزمینی را در معرض آلودگی قرار می‌دهند (۱۲).

شناسایی میکروارگانیسم‌های مقاوم به فلزات نقش مهمی را در رابطه با آلودگی محیط و نهایتاً تیمار این محیط‌ها ایفاء می‌کنند به این صورت که با توجه به سطوح بالای برخی از فلزات در پسابها و به طور کلی در محیط‌های آلوده به فلز، میکروارگانیسم‌ها، مکانیسم مقاومتی را ایجاد می‌کنند که منجر به انتخاب گونه‌های مقاوم با توانایی تحمل سمیت فلزی می‌شوند. معمولاً این نوع میکروارگانیسم‌ها در نتیجه تماس با محیط‌های آلوده به فلز ظاهر می‌شوند، محیط‌های آلوده به طور اتفاقی می‌توانند با تحول و دگرگونی در ساختار ژنتیکی باکتری یا تغییر در عملکرد باکتری، باعث انتخاب همزمان فاکتورهای مقاومت شوند، بر حسب میزان آلودگی ممکن است ظرفیت پلاسمیدی یا ساختار سلولی آنها تغییر یابد تا به آنجا که قدرت تحمل غلظت‌های بالاتر ترکیبات سمی را داشته باشند از طرف دیگر باکتری‌های مقاوم قادرند با انتقال عناصر ژنتیکی به سویه‌های دیگر تعداد سویه‌های مقاوم را افزایش دهند (۱۰).

مقاومت باکتری‌ها به آنتی‌بیوتیک‌ها و عوامل فیزیکی و شیمیایی ضد میکروبی دیگر عموماً ناشی از وجود ژنهای مقاومت بر روی DNA خارج کروموزومی (پلاسمید) است. پلاسمیدها معمولاً برای بقای سلول میزبان ضروری نیستند ولی در شرایط خاص (مثلاً قرار گرفتن در برابر عوامل ضد میکروبی) قادر به ایجاد مقاومت و تضمین بقای سلول هستند (۷).

امروزه به دلایل مختلفی نظیر افزایش جمعیت، بالا بودن مصرف سرانه آب در شهرها و به تبع آن ایجاد پساب قابل توجه، محدودیت منابع آب در دسترس، انسان مجبور به تأمین آب مورد نیاز خود از منابع آبی غیر متعارف بوده که مصرف پساب فاضلابهای شهری یکی از این روشها می‌تواند باشد. از طرفی افزایش یونهای فلزی سمی در فاضلابهای شهری و صنعتی، مسئله نگران‌کننده زیست

محیطی می‌باشد. در شهر اراک صنایع کوچک و بزرگ بسیاری وجود دارند که فاضلاب خود را وارد شبکه جمع-آوری فاضلاب شهری می‌کنند. این موضوع باعث بالا رفتن مقادیر این فلزات در فاضلاب شهری و در نهایت پساب خروجی از تصفیه‌خانه می‌شود. با توجه به اینکه این مواد خاصیت تجمع‌پذیری دارند، لذا تعیین مقادیر این مواد در پساب خروجی تصفیه‌خانه ضروری به نظر می‌رسد. در کنار مزایای متعدد استفاده از آبهای بازیافتی در کشاورزی، مخاطراتی نیز متصور است، یکی از این مخاطرات میکروب‌های بیماری‌زا می‌باشد که باکتری‌های بیماری‌زای روده‌ای بیشترین عامل بیماری‌زای میکروبی هستند که در پساب یافت می‌شوند (۱).

تحقیق حاضر بر اساس طرح تحقیقاتی در شرکت آب و فاضلاب استان مرکزی بر روی باکتری‌های کلیفرم مدفوعی نظیر *Citrobacter*، *Klebsiella spp*، *Escherichia coli* و *Enterobacter* انجام گردیده است.

انتروباکتریاسه‌ها گروه بزرگی از باسیلهای گرم منفی، بدون اسپور هوازی و بی‌هوازی اختیاری بوده که در حالت طبیعی در روده انسان و حیوان زندگی می‌کنند. در این خانواده، چندین جنس مانند اشرشیا، کلبسیلا، انتروباکتر، سیتروباکتر، سراسشیا، شیگلا، سالمونلا و پروتئوس وجود دارند برخی از این باکتری‌ها مانند *E. coli* ساکن روده بوده و بخشی از فلور طبیعی روده هستند و گاهی هم ایجاد بیماری می‌کنند (۳).

هدف این پژوهش بررسی میزان مقاومت و انتخاب چند سویه مقاوم از بین سویه‌های اشرشیاکلی، کلبسیلا، انتروباکتر و سیتروباکتر جداسازی شده از نمونه‌های پساب صنعتی، خانگی و قسمتهای مختلف تصفیه‌خانه فاضلاب شهر اراک می‌باشد.

تحقیقات نشان داده که یک ارتباطی بین تحمل فلز و مقاومت به آنتی‌بیوتیک در محیط وجود دارد. به دلیل این احتمال که ژنهای مقاومت به هر دو نزدیک به یکدیگر و بر

روی یک پلاسمید قرار گرفته‌اند بنابراین به احتمال زیاد در محیط با یکدیگر منتقل می‌گردند به دلیل افزایش حضور باکتریهای پاتوژن مقاوم به آنتی‌بیوتیک، درمان بیماریهای عفونی مشکل‌تر و گران‌تر از قبل شده بنابراین نه تنها باید در استفاده مؤثر از آنتی‌بیوتیکها در جامعه تأکید نمود بلکه باید نسبت به استفاده از دیگر مواد ضد میکروبی از جمله فلزات سنگین که وارد محیط می‌گردند آگاه بود (۱۲).

تاکنون ارتباط بین تحمل فلز و مقاومت به آنتی‌بیوتیک چندین بار گزارش شده است و با نتایج حاصل از این تحقیق مطابقت دارد که از همه این گزارشات چنین بر می‌آید که ژنهای کد کننده مقاومت به فلزات و آنتی‌بیوتیکها بر پلازمیدهای قابل انتقال قرار گرفته‌اند (۷).

ابتدا میزان مقاومت این باکتریها در مقابل غلظتهای مختلف فلزات سنگین (کلرید کادمیوم، سولفات نیکل، کلرید جیوه، کرومات پتاسیم و تلوریت پتاسیم) توسط MIC تعیین گردید، مقاومت آنها در برابر تعدادی از آنتی‌بیوتیکها مشخص شد و نیز مطالعه ارتباط بین مقاومت باکتریهای مقاوم به فلزات سنگین مورد آزمایش و مقدار فلزات سنگین و نوع پسابهای مورد آزمایش مورد بررسی قرار گرفت.

کادمیوم یکی از فلزات سنگین سمی است که از راههای مختلف نظیر پسابهای صنعتی، خانگی، کشاورزی و مکانهای دفن غیربهداشتی مواد زاید شهری و صنعتی وارد منابع آب می‌شود. استنشاق مزمن ترکیبات کادمیوم، به شکل بخارات یا گرد و خاک، ایجاد ورم ریوی می‌کند که در این حالت کیسه‌های کوچک هوایی بزرگ شده و عاقبت در اثر حجم کم ریه تخریب می‌شوند (۱۶).

عنصر کروم و ترکیبات حاوی آن به صورت  $Cr^{3+}$  معمولاً سلامتی را به خطر نمی‌اندازد ولیکن به صورت  $Cr^{6+}$  می‌تواند سمی باشد. کروم از طریق پوستی، گوارشی و تنفسی جذب می‌شود. استنشاق ترکیبات شش ظرفیتی کروم در دراز مدت باعث سرطان ریه می‌شود (۱۸).

همچنین تلوریت پتاسیم دارای اثرات حاد و مزمن بر روی انسان و حیوانات می‌باشد که از اثرات حاد آن تاثیر بر روی سیستم تنفسی، سیستم گوارشی، پوست و بیماریهای چشمی را می‌توان نام برد عنصر تلوریوم دارای دو اکسی‌آنیون سمی تلوریت و تلورات می‌باشد، به نحوی که سمیت تلوریت نسبت به تلورات به مراتب بالاتر می‌باشد که این امر به دلیل حلالیت بسیار بالای تلوریت است اکسی‌آنیونهای سمی کرومات و تلوریت با اکسیداسیون گروههای تیولی آنزیمهای مختلف سلولی، جانشینی با گروه های سولفورآمینواسیدها، القای موتاسیون و غیره اثرات زیان باری را به دنبال دارد (۱۱).

نیکل به طور گسترده در بیوسفر وجود دارد و از نظر فراوانی در پوسته زمین بیست و چهارمین عنصر نسبت به عناصر دیگر می‌باشد. به علاوه نیکل یکی از عمومی ترین فلزات در آبهای سطحی می‌باشد. استفاده های صنعتی و تجاری از نیکل شامل استنلس استیل، آبکاری، رنگها، سرامیکها می‌باشد. نیکل در کوتاه مدت مشکلاتی ایجاد نمی‌کند اما در طولانی مدت می‌تواند باعث کاهش وزن بدن، صدماتی به قلب، کبد، تحریک و حساسیت بالا شود (۱۳).

جیوه یکی از سمی ترین فلزات سنگین است به علت توانایی آن در ترکیب شدن با فلزات دیگر، مصرف صنعتی قابل توجهی دارد ترکیبات جیوه در صنایع باتری سازی، دستگاههای الکتریکی، در کشاورزی به عنوان قارچ کش، علف کش و باکتری کش استفاده می‌شود (۲).

با توجه به اینکه این فلزات سنگین اثرات زیست محیطی فراوانی دارند، لذا وجود باکتریهای مقاوم به این فلزات که قادر به حذف آنها از محیط باشند، می‌تواند کمک شایانی در سم زدایی محیط زیست از این ترکیبات سمی و جلوگیری از اثرات سمی شدید آنها بر موجودات زنده داشته باشد.

## مواد و روشها

**جداسازی و کشت:** در این پژوهش تعداد ۷ نمونه از پساب صنعتی، خانگی، ورودی تصفیه‌خانه، برکه بی‌هوایی، برکه اختیاری یک، برکه اختیاری دو و خروجی تصفیه‌خانه شهر اراک جمع‌آوری شد این عمل با استفاده از ظروف مخصوص نمونه برداری شیشه‌ای ۲۵۰ میلی‌لیتری استریل صورت گرفت و دقت شد که حدود ۳ سانتیمتر از بالای بطری خالی بماند تا در هنگام شروع آزمایش بتوان به راحتی نمونه را کاملاً به هم زد تا pH نمونه، یکنواخت شود. برای هر نمونه تاریخ برداشت، دمای محل نمونه برداری و نوع نمونه روی برچسبی که بر سطح شیشه نصب گردیده بود نوشته شد. نمونه‌های جمع‌آوری شده فوراً به آزمایشگاه منتقل گردید تا مراحل مختلف کار روی آنها انجام گیرد. از هر نمونه پساب صنعتی هموزن شده ۱ میلی‌لیتر در شرایط کاملاً استریل برداشته شد و رقت‌های متوالی  $10^{-1}$  تا  $10^{-10}$  در لوله‌های آزمایش حاوی ۹ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی (هیدروکسید سدیم و پتاسیم دی-هیدروژن فسفات) استریل با pH ۷/۲ جهت بازیافت جمعیت میکروبی استفاده شد. سپس از هر رقت ۰/۱ میلی‌لیتر در دو پلیت حاوی محیط EMB آگار به روش Spread plate کشت داده شد و سپس پلیتهای کشت داده شده در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. برای شمارش کلنیها از دستگاه کلنی‌کانت استفاده شد پلیتهایی که تعداد کلنی در آنها بین ۳۰ تا ۳۰۰ بود شمارش شد.

### شمارش احتمالی کلیفرمها-MPN: شمارش احتمالی

MPN با استفاده از روش چند لوله ای در کل گروه کلیفرمها انجام شد که شامل باکتریهای هوایی و بی‌هوایی اختیاری، گرم منفی، بدون اسپور و میله ای شکل بودند و قادر بودند لاکتوز را در فاصله ۲۴ ساعت در حرارت  $35 \pm 0.5$  درجه سانتی‌گراد تخمیر نموده و ایجاد گاز نمایند.

**روش جداسازی میکروب های مقاوم به فلزات:** در این تحقیق برای بررسی میکروبیهای مقاوم به فلزات از روش رقیق سازی در آگار استفاده شده است.

در روش Agar dilution پس از تهیه محیط کشت BHI آگار از این محیط با پیبت برداشته داخل ارلنهای کوچک تقسیم گردید، در اتوکلاو و در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه استریل شده، به طوری که بعد از اضافه کردن محلول فلز سنگین که با روش فیلتراسیون استریل شدند حجم نهایی به ۲۵ میلی‌لیتر رسید و pH محیط کشت برابر ۷ تنظیم شد.

برای سنجش مقاومت سوبه های باکتریایی جدا شده از پسابها الگوی مقاومت بر اساس MIC با غلظتهای ۲۴-۰/۵ میلی مولار با روش رقت در آگار در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد، در محیط نوترینت آگار با pH ۷/۲ صورت گرفت. (پایین ترین تراکم از محلول فلز سنگین که کاملاً مانع از رشد باکتری می گردد MIC نامیده می‌شود)(۱۴).

پس از بسته شدن محیط، پلیتها به مدت ۳۰ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد تا سطح پلیت عاری از هر گونه رطوبت شود. در این مرحله ۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون میکروبی که معادل با ۰/۵ مک فارلند تهیه شده بود را با پیبت استریل در سطح محیط کشت فلز دار ریخته و با میله شیشه ای استریل در سطح پلیت پخش گردید و پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در ۳۷-۳۵ درجه سانتی‌گراد نتیجه بررسی شد، از دو پلیت نیز به عنوان کنترل استریلی استفاده شد.

الف) کنترل استریلی محیط کشت

ب) کنترل استریلی محلول فلزی

پس از این مرحله به منظور نگهداری باکتریها محیط BHI آگار حاوی فلز به صورت شیب دار تهیه کرده و کلونیها در آن کشت داده پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون و رشد باکتریها در یخچال ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید.

تصفیه خانه شهر اراک جدا شده بود به دست آمد. MIC ۲۲ میلی‌مولاری (4032µg/ml) نسبت به کادمیوم، ۵/۵ برابر MIC گزارش شده توسط Filali و همکارانش (۸) (4Mm & 733µg/ml) در مورد *K. pneumonia* است. همچنین ۲۰ برابر MIC گزارش شده توسط Karbasizaed و همکارانش (۱۹) می باشد و (200µg/ml) در مورد *Kelebsiella pneumoniae* و ۱/۵ برابر MIC گزارش شده توسط Sharma و همکارانش (۱۸) و (15mM) در مورد *Klebsiella planticola* سویه Cd-1 می‌باشد. بنابراین می توان ادعا کرد که MIC ۲۲ میلی مولاری به کادمیوم بالاترین MIC است که تا به حال گزارش شده است. همچنین MIC ۲۰ میلی‌مولاری (3884µg/ml) نسبت به کروم، در باکتریهای *Klebsiella spp*، *Escherichia coli*، *Citrobacter spp* جداشده از پساب صنعتی به دست آمد، که به ترتیب ۲۶، ۱۹ و ۱۷/۵ برابر MIC گزارش شده توسط Rajbanshi و همکارانش (۱۵) است که (به ترتیب برای باکتریهای فوق ۱۵۰، ۲۰۰ و ۲۲۰ میکروگرم بر میلی-لیتر) می‌باشند. همچنین MIC ۲۰ میلی‌مولاری (6157µg/ml) نسبت به تلوریت، MIC ۱۰ میلی-مولاری (2628µg/ml) نسبت به نیکل و MIC ۱ میلی-مولاری (271.5µg/ml) نسبت به جیوه برای باکتری *Klebsiella spp* که از پساب صنعتی و ورودی تصفیه خانه شهر اراک جدا شده بود به دست آمد. کمترین MIC گزارش شده مربوط به سمی ترین فلز بررسی شده یعنی جیوه می باشد.

در مرحله بعد حساسیت باکتریها نسبت به برخی از آنتی-بیوتیکها، توسط دیسک های آنتی بیوگرام (Padtan teb) مورد ارزیابی قرار گرفت. جهت تعیین حساسیت نسبت به آنتی بیوتیکهای:

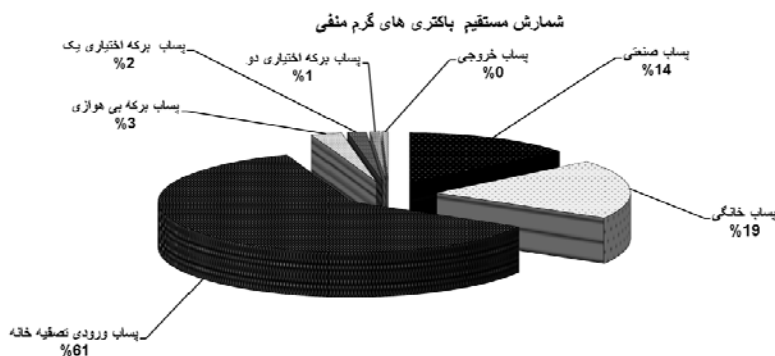
Amikacin (30µg/Disc), Ciprofloxacin (5µg/Disc), Gentamycin (10µg/Disc) Tobramycin (10µg/Disc), Sulfamethoxazol, Tetracycline (30µg/Disc), Ampicillin (10µg/Disc), Chloramphenicol (30µg/Disc), Cefixime (5µg/Disc)

از روش دیسک پلیت در محیط Mueller-Hinton Agar (Merck) استفاده شد و پس از کشت دادن پلیتها به مدت ۱۶-۲۰ ساعت در انکوباتور قرار گرفتند، سپس با توجه به ایجاد هاله عدم رشد باکتریهای مقاوم و حساس تعیین گردیدند (۶).

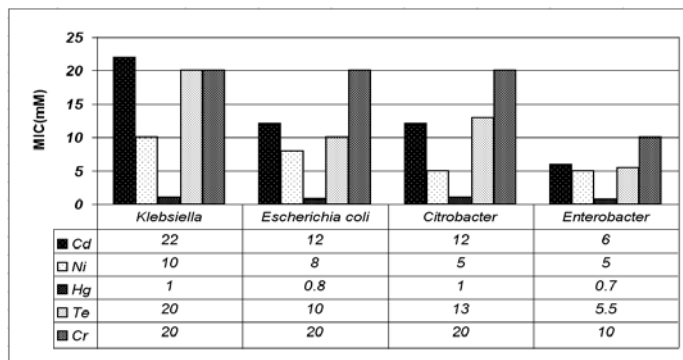
اندازه گیری فلزات سنگین در پساب: در این تحقیق مقدار فلزات سنگین موجود در پساب ورودی و خروجی تصفیه خانه به کمک دستگاه جذب اتمی مدل Scientific Buck مورد بررسی قرار گرفتند (۱۴). که نتایج حاصل در جدول ۵ آورده شده است.

## نتایج

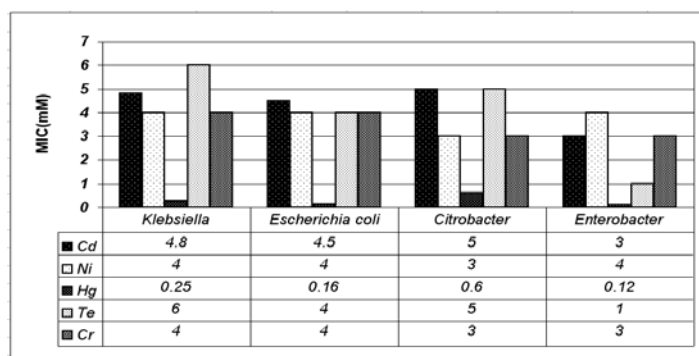
در این پژوهش برای اولین بار مقاومت بالای ۲۲ میلی-مولاری نسبت به کادمیوم، ۲۰ میلی‌مولاری نسبت به کرومات، ۲۰ میلی‌مولاری نسبت تلوریت، ۱۰ میلی‌مولاری نسبت به نیکل و ۱ میلی‌مولاری نسبت به جیوه برای باکتری *Klebsiella spp* که از پساب صنعتی و ورودی



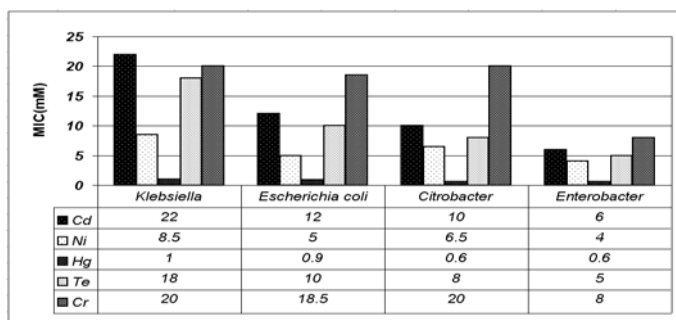
شکل ۱- درصد فراوانی باکتریهای گرم منفی موجود در پسابهای بررسی شده



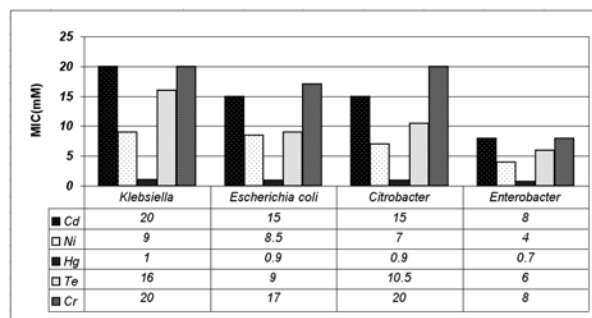
شکل ۲- حداقل میزان غلظت ممانعت کننده از رشد (MIC)، فلزات سنگین، برای کلیفرمهای مربوطه پساب صنعتی. Cd: کلرید کادمیوم / Ni: سولفات نیکل / Hg: کلرید جیوه / Te: تلوریت پتاسیم / Cr: کرومات پتاسیم



شکل ۳- حداقل میزان غلظت ممانعت کننده از رشد (MIC)، فلزات سنگین، برای کلیفرمهای مربوطه پساب خانگی



شکل ۴- حداقل میزان غلظت ممانعت کننده از رشد (MIC)، فلزات سنگین، برای کلیفرمهای مربوطه پساب ورودی تصفیه‌خانه

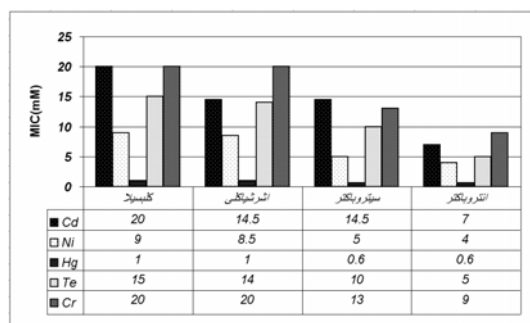


شکل ۵- حداقل میزان غلظت ممانعت کننده از رشد (MIC)، فلزات سنگین، برای کلیفرمهای مربوطه پساب برکه بی‌هوایی

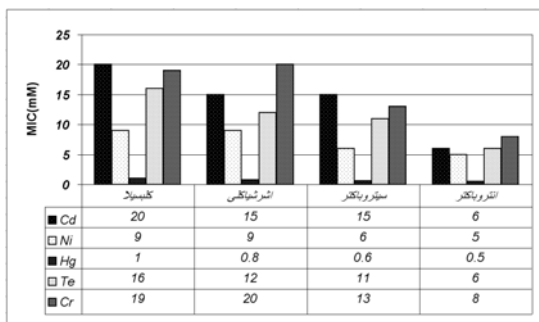
رنگ کاری، صاف کاری در سطح شهر باشد که پساب خود را وارد پساب شهری می‌کند.

با توجه به شکل ۴، کلیفرمهای جدا شده از پساب ورودی تصفیه‌خانه الگوی مقاومتی بالایی را به فلزات سنگین نشان می‌دهند که این به علت مخلوط شدن پسابهای خانگی و صنعتی در ورودی تصفیه‌خانه می‌باشد.

نتایج حاصل از حداقل میزان غلظت فلزات سنگین که مانع کننده از رشد برای باکتریهای جدا شده از برکه بی‌هوای و برکه‌های اختیاری ۱ و ۲ می‌باشند، در شکل‌های ۵، ۶ و ۷ آورده شده است. در پساب خروجی نیز باکتریهای الگوی مقاومتی قابل توجهی را نشان می‌دهند که بیشترین آن مربوط به باکتری *Klebsiella spp* می‌باشد که حداقل غلظت کروم و کادمیوم که از رشد این باکتری ممانعت می‌کند ۲۰ میلی‌مولار می‌باشد (شکل ۸).



شکل ۶- حداقل میزان غلظت ممانعت کننده از رشد (MIC)، فلزات سنگین، برای کلیفرمهای مربوطه پساب برکه تثبیت اختیاری ۱

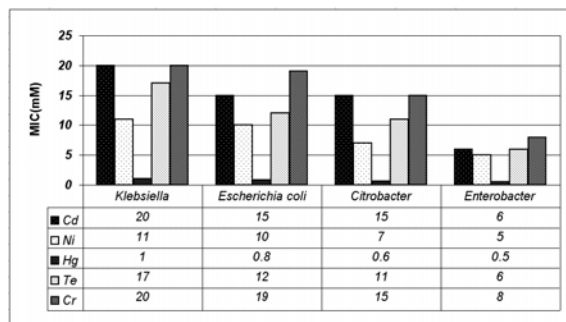


شکل ۷- حداقل میزان غلظت ممانعت کننده از رشد (MIC)، فلزات سنگین، برای کلیفرمهای مربوطه برکه تثبیت اختیاری شماره ۲

در شکل ۱ نتایج حاصل از شمارش مستقیم باکتریهای گرم منفی موجود در پسابها نشان داده شده است، که پساب ورودی بیشترین سهم را و پساب خروجی کمترین سهم را به خود اختصاص داده است.

در بین کلیفرمهای مدفوعی جدا شده از پسابهای مختلف که میزان مقاومت آنها در برابر فلزات سنگین بررسی شد بیشترین مقاومت مربوط به کلبسیلا و کمترین الگوی مقاومتی مربوط به انئوربکتر می‌باشد، (شکل ۲). همان طور که در شکل ۲ نشان داده شده است بیشترین الگوی مقاومتی مربوط به باکتریهای موجود در پساب صنعتی می‌باشد که علت آن را می‌توان به تماس دائمی باکتریها با فلزات سنگین ارتباط داد. با توجه به سطوح بالای برخی از فلزات در پسابهای صنعتی، میکروارگانیسیم‌ها، از جمله کلیفرمهای مدفوعی مکانیسم مقاومتی را ایجاد می‌کنند که منجر به انتخاب گونه‌های مقاوم با توانایی تحمل سمیت فلزی می‌شوند، تا به آنجا که قدرت تحمل غلظتهای بالاتر ترکیبات سمی را داشته باشند از طرف دیگر باکتریهای مقاوم قادرند با انتقال عناصر ژنتیکی به سویه های دیگر تعداد سویه های مقاوم را افزایش دهند(۱۷).

همان طور که در شکل ۳ نشان داده شده است در بین پسابهای مورد بررسی پساب خانگی علی‌رغم دارا بودن تعداد کلیفرمهای روده‌ای بیشتر نسبت به پساب صنعتی سهم کمتری را در وجود کلیفرمهای روده‌ای مقاوم به فلزات سنگین دارد که این موضوع را می‌توان چنین تفسیر کرد که در پسابهای خانگی باکتریها کمتر در معرض فلزات سنگین می‌باشند. لازم به ذکر است که در پسابهای خانگی نیز باکتریهای مقاوم به فلزات وجود دارند همین طور در سنجش میزان فلزات سنگین در پساب خانگی وجود فلزات سنگین تأیید شد که این امر می‌تواند به علت وجود برخی از این مواد به میزان ناچیز در مواد شوینده و کارگاههای کوچک صنعتی نظیر کارگاههای ریخته‌گری،



شکل ۸- میزان غلظت ممانعت‌کننده از رشد (MIC)، فلزات سنگین، برای کلیفرم‌های مربوطه خروجی تصفیه‌خانه

جدول ۱- نتایج حاصل از بررسی مقاومت و یا حساسیت کلیفرم‌های جدا شده از پساب صنعتی نسبت به آنتی‌بیوتیکها

CFM	C	AM	TE	SXT	TOB	GM	CI	AK	سویه باکتری
S	S	R	R	R	S	S	S	S	کلبسیلا
R	S	R	S	R	S	S	S	S	اشرشیاکلی
R	S	R	R	S	S	S	S	S	سیتروباکتر
R	R	R	R	S	S	S	S	S	انتروباکتر

جدول ۲- نتایج حاصل از بررسی مقاومت و یا حساسیت کلیفرم‌های جدا شده از پساب خانگی نسبت به آنتی‌بیوتیکها

CFM	C(30)	AM	TE(30)	SXT	TOB	GM	CI	AK	سویه باکتری
S	S	R	R	R	S	S	S	S	کلبسیلا
R	S	R	S	R	S	S	S	S	اشرشیاکلی
R	S	R	R	S	S	S	S	S	سیتروباکتر
R	R	R	S	S	S	S	S	S	انتروباکتر

جدول ۳- نتایج حاصل از بررسی مقاومت و یا حساسیت کلی فرم‌های جدا شده از پساب برکه‌های بی‌هوازی و اختیاری ۱ و ۲ نسبت به آنتی‌بیوتیکها

CFM	C(30)	AM	TE(30)	SXT	TOB	GM	CI	AK	سویه باکتری
S	S	R	S	S	S	S	S	S	کلبسیلا
S	S	S	S	S	S	S	S	S	اشرشیاکلی
S	S	S	R	S	S	S	S	S	سیتروباکتر
R	R	R	S	S	S	S	S	S	انتروباکتر

جدول ۴- نتایج حاصل از بررسی مقاومت و یا حساسیت کلی فرم‌های جدا شده از پساب خروجی تصفیه‌خانه نسبت به آنتی‌بیوتیکها

CFM	C(30)	AM	TE(30)	SXT	TOB	GM	CI	AK	سویه باکتری
S	S	R	R	R	S	S	S	S	کلبسیلا
R	S	R	S	R	S	S	S	S	اشرشیاکلی
R	S	R	S	S	S	S	S	S	سیتروباکتر
R	R	R	R	S	S	S	S	S	انتروباکتر



مقایسه نتایج حاصله با استاندارد محیط زیست ایران و استانداردهای مربوط به سازمان US-EPA که در جدول ۶ آورده شده‌اند، حاکی از آن است که در تمام موارد نمونه برداری، مقادیر فلزات مورد آزمایش پایین تر از حد استاندارد EPA می باشد، که با توجه به وفور تعداد کارگاهها و صنایع در سطح شهر که باعث ورود فلزات سنگین به فاضلاب شهری می‌گردند، انتظار می‌رود که مقدار فلزات سنگین بالاتر از حد استاندارد باشد در حالی که داده‌های به دست آمده نشان داد که این مقادیر پایین تر از حد استاندارد بودند. (جدول ۵) این عامل می‌تواند به دلیل دفع غیر مجاز فاضلاب کارخانه‌ها و یا تعطیلی فصلی کارگاههای موجود در سطح شهر باشد.

یکی از مهم ترین مسائل دنیای امروز، آلودگی محیط زیست به فلزات سنگین سمی و خطرناک می‌باشد. روشهای متداول حذف فلزات سنگین از محیط آبی، تعویض یون، رسوب‌دهی شیمیایی اسمز معکوس، فرآیند تبخیر، جذب سطحی، که اغلب پر هزینه می‌باشند. برای پاسخ گویی به این نیاز، مطالعه در زمینه جذب زیستی ضروری می‌باشد (۴). توانایی جذب فلزات سنگین و سمی توسط میکروارگانیسم ها منجر به توجه خاص پژوهشگران به مطالعه انواع قارچها، مخمرها، جلبکها و باکتریهای مختلف در جهت جذب آنها و به دنبال آن حذف این فلزات از محیط زیست به خصوص پساب کارخانجات صنعتی، رودخانه‌ها و فاضلابهای آلوده به این گونه فلزات گردیده است که به آن پاک سازی زیستی می‌گویند (۹).

اگرچه تعدادی از فلزات سنگین عناصر کمیاب ضروری هستند، اما بیشترشان می‌توانند در غلظتهای بالا برای تمام شاخه‌های حیات مانند میکروبیها، با تشکیل ترکیبات کمپلکس در داخل سلول سمی باشند، فلزات سنگین بطور زیادی در زیستگاههای میکروبی به دلیل فرآیندهای صنعتی و طبیعی یافت می‌شوند، از این رو بیشتر میکروبیهای موجود در این محیطها دارای چندین مکانیسم تکامل یافته

نتایج حاصل از تست آنتی بیوگرام در جدولهای ۱ تا ۴ آورده شده است، الگوی مقاومت به آنتی بیوتیکها در باکتریهای جدا شده از برکه بی‌هوازی، برکه اختیاری یک، برکه اختیاری دو، تصفیه خانه یکسان بود لذا تنها یک جدول (جدول ۳) جهت گزارش تست آنتی بیوگرام این سه منطقه آورده شده است.

نتایج حاصل از اندازه گیری مقدار فلزات سنگین موجود در پساب ورودی و خروجی تصفیه خانه اراک به کمک دستگاه جذب اتمی مورد بررسی قرار گرفتند. که نتایج حاصل در جدول ۵ آورده نشان می‌دهد که این فلزات سنگین در پسابهایی که در این بررسی آمده وجود دارند.

### بحث

بر اساس اطلاعات به دست آمده از آزمایشها غلظت فلزات کادمیوم، نیکل، کروم و جیوه در پساب خروجی به ترتیب برابر  $0/01 <$ ،  $0/1$ ،  $0/06$  و  $0/01 <$  میلی‌گرم بر لیتر به دست آمد. این در حالی است که غلظت این فلزات در پساب ورودی به تصفیه‌خانه اراک به ترتیب برابر  $0/25$ ،  $0/01$  و  $0/01 <$  میلی‌گرم بر لیتر می‌باشد.

جدول ۵- غلظت فلزات سنگین اندازه گیری شده در پساب ورودی

و پساب خروجی تصفیه خانه شهر اراک

آلاینده	واحد	ورودی تصفیه خانه	خروجی تصفیه خانه
کادمیوم	mg/l	۰,۰۲	<۰,۰۱
نیکل	mg/l	۰,۲۵	۰,۱
کروم	mg/l	۰,۱	۰,۰۶
جیوه	mg/l	<۰,۰۱	<۰,۰۱

جدول ۶- کیفیت استاندارد سازمان حفاظت محیط زیست ایران و

آمریکا در مورد فلزات سنگین موجود در پساب خروجی تخلیه شده به

آبهای سطحی

آلاینده	واحد	استاندارد ایران	استاندارد EPA
کادمیوم	mg/l	۰/۰۵	۰/۰۵
نیکل	mg/l	۲	۲/۳۸
کرم	mg/l	۲	۱/۷۱
جیوه	mg/l	<۰/۰۱	<۰/۰۱

انتخابی را می‌توان تقویت کرده و طوری عمل کرد که باکتری فلز خاصی را به تنهایی و در حضور سایر فلزات جذب کند. به عنوان مثال چنانچه باکتری در محیطی که فقط یک فلز خاص دارد پرورش یابد و به تدریج غلظت فلز در محیط پرورش افزایش پیدا کند پس از گذشت چندین نسل باکتری خود را به جذب فلز مورد نظر تطبیق داده و حضور آن را در محیط به مقدار بیشتر تحمل خواهد کرد (۱۳).

و در آخر با توجه به مقاومت بسیار بالای کلیفرمهای گرم منفی جدا شده از پساب می‌توان امیدوار بود که این سویه‌ها انتخاب بسیار مناسبی جهت پاک‌سازی زیستی پسابهای صنعتی از فلزات سنگین کادمیوم، نیکل، جیوه و اکسی‌آنیونهای سمی تلوریت و کرومات باشد. فرآیند جذب زیستی، روشی مناسب برای زدایش فلزات سنگین از محیط آبی می‌باشد و هزینه آن بسیار کمتر از روشهای شیمیایی می‌باشد. فناوری جذب زیستی هنوز در مراحل ابتدایی توسعه قرار دارد. پیش‌بینی می‌شود در آینده هزینه آن کاهش یافته و عملکرد آن بهبود یابد. اما برای استفاده گسترده از آن در مقیاس واقعی به تحقیقات بیشتر و برقراری ارتباط با صنایع تولیدکننده محصولات مشابه و صنایع مصرف‌کننده نیاز است. انتظار می‌رود با رواج این فناوری ارزان قیمت، گام مهمی در بهبود کیفیت محیط زیست برداشته شود.

### تشکر و قدردانی

بدین وسیله از مساعدت شرکت آب و فاضلاب استان مرکزی جهت تأمین هزینه و امکانات و هماهنگیهای لازمه در این مطالعه قدردانی می‌گردد.

برای تحمل حضور فلزات سنگین هستند و یا آنها را به عنوان پذیرنده نهایی الکترون در تنفس بی‌هوازی به کار می‌برند. اثر دیگر تحمل فلزات سنگین در محیط این است که این امر به وسیله افزایش دادن فشار انتخابی محیط باعث حذف ژنهای مقاومت آنتی‌بیوتیکی می‌شود. این احتمال وجود دارد که ژنهای مقاومت به آنتی‌بیوتیک و فلزات سنگین هردو روی یک نوع پلازمید در باکتریها واقع شده باشند بنابر این به احتمال زیاد با همدیگر در محیط منتقل می‌شوند (۵). اهمیت این موضوع زمانی مشخص می‌شود که انسان و یا دامها به طور مستقیم و غیر مستقیم در معرض پسابهای آلوده به فلزات سنگین قرار گیرد و یا، با استفاده از محصولات کشاورزی که در معرض این پسابها بوده‌اند خسارات جانی جبران‌ناپذیری برای انسان و دام به وجود می‌آید. حتی مسئله باکتریهای مقاوم به فلزات سنگین موجود در پساب خود می‌تواند مشکلاتی از قبیل مقاومت به درمان آنتی‌بیوتیکی را ایجاد کند. پس از طرفی باید پسابها را از وجود فلزات سنگین و میکروبیهای بیماری‌زا، به ویژه باکتریهای روده‌ای که در نتیجه تماس با این محیطها ممکن است مسئله مقاومت به این فلزات و در پی آن مقاومت آنتی‌بیوتیکی در آنها ایجاد شده است تیمار گردد و از طرفی دیگر نمی‌توان از نقش همین میکروارگانیسم‌های مقاوم به فلزات در حذف فلزات سنگین چشم‌پوشی کرد زیرا از نظر صنعتی کاربرد باکتری در تصفیه پساب و حذف فلزات آلوده‌کننده از محیط زیست بسیار مقرون به صرفه است. باید در نظر داشت که کاربرد میکروارگانیسم‌ها نیز خود مستلزم شرایط خاص و مناسبی برای آنها می‌باشد و چنانچه این شرایط فراهم نشود، فعالیت این موجودات نیز مقدر نخواهد بود. با پرورش باکتری و کاربرد مهندسی ژنتیک این خاصیت

### منابع

1-Asano, T., Levine, A.D. 1996. Wastewater reclamation: Recycle & reuse past, present and future. Water Science and Technology. Vol. 33, Pp 1-14.

2-Barkay, T. 2003. Bacterial mercury resistance from atoms to ecosystems. Federation of European Microbiological Societies. Vol. 27, Pp 355-384.

- 3-Bitton, G., Wiley, J. 2005. Wastewater Microbiology. Third Edition
- 4-Benyehuda, G., Coombs, J., Ward, P. L., Barkay, T. 2003. Metal resistance among aerobic chemoheterotrophic bacteria from the deep terrestrial subsurface. Canadian Journal of Microbiology. Vol. 49, Pp 151 – 156.
- 5-Craig, B.A., Meredith, S. W., Ramunas, S., McArthur, J.V. 2006. Co-selection of antibiotic and metal resistance. trends in microbiology. Vol. 14, No.4, Pp 176-182.
- 6-Dean, R.D., Mills, A.L. 1989. Bacterial community structure and function along a heavy metal gradient. Vol. 55, No.8, Pp 2002-2009.
- 7-Edward, C. R., Selvam, G. S. 2009. Plasmid profile and curing analysis of pseudomonas aeruginosa as metal resistant. International journal of Environmental Science and Technology. Vol. 6, Pp 259-266.
- 8-Filali, B.K., Taoufik, J., Zeroual, Y., Dzairi, F.Z., Talbi, M., Blaghen, M. 2000. Waste water bacterial isolates resistant to heavy metals and antibiotics. Current Microbiology, Vol. 41, Pp. 151–156.
- 9-Gavrilescu, M. 2004. Removal of heavy metals from the environment by biosorption. Eng. Life. Sci. Vol. 3, Pp 219 – 232.
- 10-Lengeler, W. L., Drews, G., Schlegel H. G. 1999. Biology of the prokaryotes. First Edition Blackwell science.
- 11-Lloyd, J. R. 2003. Microbial reduction of metals and radionuclides. Federation of European Microbiological Societies Microbiology Reviews. Vol. 27, Pp 411– 425.
- 12-Mara, D., Horan, N. 2003. Handbook of water and wastewater microbiology. Academic Press an Imprint of Elsevier. Pp 507-602.
- 13-Mulrooney, S. B., Hausinger, R. P. 2003. Nickel uptake and utilization by microorganisms. Federation of European Microbiological Societies Microbiology Reviews. Vol. 27, Pp. 239-261.
- 14-Parameswari, E., Lakshmanan, A., Thilagavathi, T. 2009. Biosorption of Chromium (VI) and Nickel (II) by bacterial isolates from an aqueous solution. Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry. Vol. 8, Pp 150- 156.
- 15-Rajbanshi, A. 2008. Study on heavy metal resistant bacteria in guheswori sewage treatment plant. Our Nature, Vol. 6, Pp 52-57.
- 16-Riazul, H., Sayyed, K. Z., Shakoor, A. R. 1999. Cadmium resistant enterobacter cloacae and klebsiella sp. isolated from industrial E.Uents and their possible role in cadmium detoxification. World Journal of Microbiology & Biotechnology Vol. 15, Pp 283-290.
- 17-Sabry, S.A., Ghozian, H.A., Abou-Zeid, D.M. 1997. Metal tolerance and antibiotic resistance patterns of a bacterial population isolated from sea water. Journal of applied Microbiology. Vol. 82, Pp 245-252.
- 18-Snow, E. 1994. Effects of Cr on DNA replication invitro. Environmental Health Perspectives. Vol. 102, Pp 41 – 44.
- 19-Karbasizadeh, V., Badami, N., Emtiazi, G. 2003. Antimicrobial, heavy metal resistance and plasmid profile of coliforms isolated from nosocomial infections in a hospital in isfahan, iran. African Journal of Biotechnology Vol. 2, Pp. 379-383.

## Evaluation of Resistance in Intestinal Coli Forms Isolated from Industrial Wastewater, Domestic Wastewater and Various Parts of the Wastewater Treatment System of Arak City

Akhavan S.A.<sup>1</sup>, Sharifian S.<sup>2</sup>, Zolfaghari M.R.<sup>3</sup> and Khalili D.M.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Biology Dept., Islamic Azad University, Tehran North Branch, Tehran, I.R. of Iran

<sup>2</sup>Biology Dept., Islamic Azad University, Khomein Branch, Khomein, I.R. of Iran

<sup>3</sup>Biology Dept., Islamic Azad University, Qom Branch, Qom, I.R. of Iran

### Abstract

Heavy metals such as cadmium, mercury, nickel and Oxyanions for example chromate and tellurite are toxic elements that entering into the environment in different ways and are harmful for biological systems, especially humans, animals and plants, so to remove it from the environment is essential. Microorganisms, especially bacteria have a very important role in the biological removal of heavy metals and are used in biotechnology. In this essay, the heavy metal resistance patterns of bacterial strains isolated from industrial wastewater, domestic wastewater and various parts of the wastewater treatment system of Arak city have been studied. 28 intestinal bacterial strains were screened and identified as *Klebsiella*, *Escherichia coli*, *Citrobacter* and *Enterobacter* species biochemical methods. The minimum inhibitory concentration (MIC) against the various heavy metals including cadmium chloride, nickel sulfate, mercuric chloride, potassium chromate and potassium tellurite were determined using the agar dilution method and some antibiotics by disk method. In this study, for first time, we have found high MIC for *Klebsiella* sp., 22 mM (4032 µg/ml) for cadmium, 20 mM (3884 µg/ml) for chromium, 20 mM (6157 µg/ml) for telluride, 10 mM (2628 µg/ml) for nickel and 1mM (271.5 µg/ml) for mercury.

**Key words:** intestinal coli forms, heavy metal resistant, antibiotic resistance