

## جداسازی و بررسی سینتیک رشد باکتری‌های مقاوم به جیوه در دریاچه مهارلو

فرشید کفیل زاده<sup>۱\*</sup>، معصومه آرام<sup>۱</sup>، اصغر شریفی<sup>۲</sup>، محسن نغماچی<sup>۲</sup>

(۱) گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد جهرم، جهرم، ایران  
(۲) مرکز تحقیقات میکروب شناسی، دانشگاه علوم پزشکی یاسوج، یاسوج، ایران

\*نویسنده رابط: فرشید کفیل زاده، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد جهرم، جهرم، ایران

تلفن ۰۹۱۷۱۱۴۰۷۹۹ پست الکترونیک [Kafilzadeh@jia.ac.ir](mailto:Kafilzadeh@jia.ac.ir)

### چکیده

**زمینه و اهداف:** جیوه از سمی ترین فلزات سنگین بوده به طوری که غلظت کم آن باعث مسمومیت حاد و مزمن، اختلال در بینایی، شنوایی و سیستم عصبی می‌شود. باکتری‌های مناطق آلوده به جیوه از طریق فرآیند احیاء قادر به حذف این فلز در محیط اطراف خود هستند. کلیه پساب‌های خانگی، تجاری، صنعتی، بیمارستانی و کشاورزی شهر شیراز از طریق رودخانه‌های خشک، پل فسا و سلامیه وارد دریاچه مهارلو شده و آن را آلوده می‌کنند. از جمله آلاینده‌های این دریاچه فلزات سنگین به خصوص جیوه می‌باشد. هدف از این مطالعه جداسازی و شناسایی باکتری‌های نمک دوست (هالوفیل) مقاوم به جیوه از آب و رسوبات دریاچه مهارلو و بررسی سینتیک رشد آن‌ها بود.

**روش بررسی:** نمونه برداری از آب و رسوبات سطحی ۴ ایستگاه دریاچه (ورودی رودخانه‌های خشک، پل فسا، سلامیه و وسط دریاچه) در ۴ فصل طی سال ۸۹-۱۳۸۸ انجام گردید. باکتری‌های نمک دوست مقاوم به جیوه از طریق غنی سازی در محیط‌های *Luria Bertani Broth* و *Luria Bertani Agar* حاوی نمک و جیوه جداسازی و با روش *Viable Plate Count* شمارش شدند. سپس سینتیک رشد باکتری‌های مقاوم جداسازی شده در سه حالت بدون جیوه (کنترل)، حضور ۵ میلی گرم بر لیتر جیوه از ابتدا و حضور ۵ میلی گرم بر لیتر جیوه از نیمه فاز رشد لگاریتمی بررسی گردید. برای تجزیه و تحلیل آماری از آنالیز واریانس (ANOVA) و آزمون دانکن (Duncan) استفاده شد.

**یافته‌ها:** بیشترین تعداد باکتری مقاوم به جیوه در ایستگاه‌های رودخانه خشک و پل فسا (بر حسب CFU/ml یا CFU/g) به ترتیب  $1.04 \times 10^4$  و  $8.375 \times 10^3$  و کمترین آن در ایستگاه وسط دریاچه ( $7 \times 10^2$ ) به دست آمد. باکتری‌های ویبریو، سیتروباکتر، استافیلوکوکوس، پروتئوس، اشریشیاکلی و سودوموناس به عنوان باکتری‌های مقاوم به جیوه شناسایی شدند. بیشترین درصد فراوانی باکتری‌های شناسایی شده در ایستگاه‌ها و فصول مختلف مربوط به ویبریو با میزان ۷۵ درصد و کمترین آن مربوط به سیتروباکتر با میزان ۱۲/۵ درصد بود. رشد باکتری‌های سیتروباکتر و استافیلوکوکوس در حضور جیوه از نیمه فاز رشد لگاریتمی، به شدت کاهش یافت.

**نتیجه گیری:** باکتری‌های مقاوم به جیوه نقش تعیین کننده‌ای در جذب و حذف این عنصر از دریاچه مهارلو دارند. با فراهم نمودن شرایط بستر مناسب جهت رشد این باکتری‌ها می‌توان از آنها جهت سمیت زدایی و حذف جیوه از پساب کارخانجات آلوده کننده محیط زیست دریاچه مهارلو استفاده کرد.

**کلمات کلیدی:** جیوه، دریاچه مهارلو، باکتری‌های نمک دوست (هالوفیل)، باکتری‌های مقاوم به جیوه.

## Isolation and survey growth kinetics of mercury resistant bacteria in Lake Maharloo

Kafilzadeh F<sup>1\*</sup>, Aram M<sup>1</sup>, Sharifi A<sup>2</sup>, Naghmachi M<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Microbiology, Jahrom Branch, Islamic Azad University, Jahrom, Iran

<sup>2</sup>Microbiology Research Center, Yasuj University of Medical Sciences, Yasuj, Iran

\*Corresponding author: Department of Microbiology, Jahrom Branch, Islamic Azad University, Jahrom, Iran. Tel: 09171140799 Email: Kafilzadeh@jia.ac.ir

### Abstract

**Background and Objectives:** Mercury is one of the most toxic heavy metals as it cause chronic and acute toxicity, visually, hearing and neurological systems Impaired in low concentrations. Mercury polluted sites bacteria can remove this metal from their surrounding by reduction process. Domestic, commercial, industrial, hospital and agricultural effluents of Shiraz city enter to the Lake Maharloo through Khoshk, Pole Fasa and Salamiye rivers and contaminate it. Heavy metals especially mercury are among this river pollutants. Purpose of this study was isolation and identification of mercury resistant halophilic bacteria from water and sediments of Lake Maharloo and survey their growth kinetics.

**Materials and Methods:** Sampling were done from surface water and sediments of 4 stations of the lake (entrance of Khoshk, Pole Fasa and Salamiye rivers and middle of lake) in 4 season during years 2009-2010. Mercury resistant halophilic bacteria were isolated by enriching in Luria Bertani Broth and Luria Bertani Agar media containing salt and mercury and counted by Viable Plate Count method. Afterwards their growths kinetics were surveyed in three states: without mercury (control), presence of 5 mg/l mercury from the first and presence of 5 mg/l mercury from the half of logarithmic growth phase. ANOVA and Duncan tests were used for statistical analysis.

**Results:** The most numbers of mercury resistant bacteria were obtained by  $2.8 \times 10^4$  and  $8.375 \times 10^3$  (based on CFU/ml or CFU/g) from Khoshk and Pole Fasa stations respectively and the lowest numbers was from the middle of lake ( $7 \times 10^2$ ). *Vibrio*, *Citrobacter*, *Staphylococcus*, *Proteus*, *E. Coli* and *Pseudomonas* were identified as mercury resistant bacteria. The most and least abundance percentage of identified bacteria from different stations and seasons were related to *Vibrio* with 75% and *Citrobacter* with 12.5% respectively. Growth of *Citrobacter* and *Staphylococcus* declined sharply in presence of mercury from their half of logarithmic growth phase.

**Conclusion:** Mercury resistant bacteria have determinant role in absorption and elimination of this metal from Lake Maharloo. With preparation of appropriate condition and bed for growth of these bacteria, they can be used for detoxification and mercury removal from effluents of Lake Maharloo environmental pollutant plants.

**Key words:** Mercury, Lake Maharloo, Halophilic Bacteria, Mercury Resistant Bacteria

## 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. از طرفی رشد ناگهانی صنایع، انفجار جمعیت و انقلاب کشاورزی اثر بزرگی بر محیط فیزیکی انسان گذاشت. به علاوه داروها، آنتی بیوتیک‌ها، مواد رادیواکتیو و زباله‌های صنعتی دارای فلزات سنگین اند که جهش‌زا و سرطان‌زا هستند (۱). یکی از مهم‌ترین پیامدهای نامطلوب ناشی از تخلیه پساب‌های صنعتی در آب‌های سطحی، مرگ‌ومیر حیوانات آبی به خصوص ماهی‌هاست که متلاشی شدن اجساد و بقایای این موجودات نیز سبب افزایش آلودگی‌های زیست‌محیطی در آن منطقه خواهد شد (۲).

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 (۲).

ترکیب شیمیایی پساب‌های صنعتی به نوع فعالیت صنعتی ایجادکننده آنها بستگی دارد. ورود پساب‌های صنعتی به دریاها و دریاچه‌ها 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 (۱).

جیوه یکی از آلوده کننده‌های اصلی محیط است که بسیار سمی است. جیوه جهش‌زا و ممانعت کننده رشد بوده و علت بسیاری از بیماری‌ها و سندرم‌های مهم انسانی است (۱). ترکیبات آلی جیوه خصوصاً مشتقات آلکیل مانند هالوژن‌های اتیل مرکوری بسیار سمی هستند و ایجاد اختلالات شدید بینایی می‌کنند و معمولاً

باعث از بین رفتن بعضی از اعصاب سطحی و خلفی طناب عصبی ستون فقرات می‌شوند. همچنین روی نرون‌های مغز نیز اثر می‌گذارند. هالوژن‌های آلکیل مرکوری روی پوست اثر تحریکی دارند و می‌توانند ایجاد بیماری‌های پوستی شدید نماید. دی متیل مرکوری فوق العاده سمی است و ایجاد عوارض شدید می‌نماید (۲). علاوه بر انسان، گیاهان و جانوران، جیوه همچنین بر رشد باکتری‌ها اثر دارد. البته بعضی از باکتری‌ها در محیط غنی از جیوه می‌توانند رشد کنند (۱). بسیاری از گیاهان و جانوران آبی قادر به جذب جیوه هستند و اعضای پایین‌تر زنجیره غذایی (مانند فیتوپلانکتون‌ها) جیوه را در خود محبوس می‌سازند. زمانی که پلانکتون‌ها توسط گیاهخواران یا گوشتخواران عالی تر زنجیره غذایی خورده می‌شوند فلز جیوه به بدن آنها منتقل می‌گردد و در نهایت این زنجیره به ماهیان ختم می‌شود که به وسیله انسان مصرف می‌گردند (۳).

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 فناوری‌های معمول، ده‌ها و هزارها دلار است. بنابراین، کشف فناوری‌های حذف متناوب و قابل دسترسی جیوه نیاز ضروری است (۴). روش‌های شیمیایی جهت حذف فلزات سنگین و جیوه از آب و پساب، علاوه بر هزینه زیاد که سبب خودداری صاحبان صنایع از کاربرد چنین روش‌هایی می‌شود، مشکل تولید لجن حاصله از رسوبات شیمیایی را نیز به دنبال دارند که مواد زاید ناسازگار با محیط زیست به شمار می‌آیند (۵). بنابراین، روش حذف زیستی که هم اقتصادی و هم سازگار با محیط زیست است، مورد توجه روزافزون قرار دارد. در روش حذف زیستی از میکروارگانیسم‌ها برای کاهش و حذف آلاینده‌های فلزی (جیوه) استفاده می‌شود. این روش اصلاح زیستی (Bioremediation) نامیده می‌شود (۶). در این روش از موجودات زنده (باکتری‌ها، مخمرها، جلبک‌ها، قارچ‌ها، گیاهان و ...) استفاده می‌شود. باکتری‌ها به علت دارا بودن سامانه‌های مقاومت به فلزات سنگین و همچنین آنزیم‌های تجزیه کننده نسبت به سایر میکروارگانیسم‌ها از اهمیت بیشتری برخوردارند. سامانه‌های مقاومت به فلزات در بسیاری از گروه‌های باکتریایی شناخته شده است. باکتری‌ها دارای توانایی گسترده‌ای در سطح سلولی و مولکولی خود برای غلبه بر تنش‌های محیطی خارجی هستند (۱). از مهم‌ترین باکتری‌ها می‌توان به *باسیلوس*‌ها، *سودوموناس*‌ها، *ویبریوها* و خانواده *نتروباکتریاسه* اشاره کرد (۶). دریاچه مهارلو در ۲۳ کیلومتری جنوب شرقی شیراز قرار گرفته و دارای آبی شور با میزان نمک متوسط ۲۲۰ گرم در لیتر می

## کفیل زاده و همکاران / جدا سازی باکتری های مقاوم به جیوه

نسبت ۳ به ۱ به تمام نمونه ها اضافه گردید. نمونه ها حرارت داده شد و با صافی واتمن ۴۲ میلی متری صاف گردیدند تا ناخالصی- های موجود در آنها از بین برود. سپس حجم آنها با آب مقطر به ۱۰۰ میلی لیتر رسانده شد (۵). میزان فلز سنگین جیوه در نمونه های آب و رسوب با روش بخار سرد توسط دستگاه جذب اتمی اندازه گیری گردید (۳).

### شمارش باکتری ها:

شمارش باکتری ها به روش **Viabale Plate Count** انجام شد. ابتدا از هر یک از نمونه های آب و رسوب رقت های  $10^{-1}$  تا  $10^{-9}$  تهیه گردید. با پیت از هر یک از رقت ها حجم ۱ میلی لیتر برداشته و در دو محیط **LB agar** که یکی حاوی فلز جیوه و دیگری فاقد فلز جیوه است به روش **(Surface plate method)** کشت داده شد. ظرف پتری به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد گرم خانه گذاری گردید. پس از ظاهر شدن کلنی ها ظروف پتری حاوی کلنی های مشخص و قابل شمارش انتخاب و تعداد کلنی ها شمارش و در حجم (۱/۱ میلی لیتر برداشته شده) و در عدد رقت (باتوان مثبت) ضرب گردید تا تعداد باکتری ها در محیط کنترل و محیط فلزدار بر حسب **CFU/ml CFU/g** به دست آید (۳).

در این مطالعه از محیط کشت **Luria Bertani Bbroth** (ساخت شرکت مرک آلمان) جهت غنی سازی باکتری های مقاوم به جیوه استفاده گردید. از آنجا که محیط کشت **LB agar** یک محیط کشت عمومی است و اکثر باکتری ها می توانند در آن رشد نمایند جهت انتخابی کردن محیط، هنگام تهیه آن ۲ درصد نمک طعام **NaCl** اضافه کرده و پس از اتو کلاو ۱۰ میلی گرم در لیتر محلول کلرید جیوه (**HgCl<sub>2</sub>**) با صافی ۰/۴۵، میکرومتری استریل کرده و به محیط افزوده گردید. سپس از کلنی های تشکیل شده کشت خالص تهیه گردید. **pH** محیط در تمام محیط های مورد استفاده در محدوده ۷-۸ تنظیم گردید. در نهایت باکتری های خالص شده مطابق با روش های تشخیصی کتاب **Bergeys Manual of systematic bacteriology** (رنگ آمیزی گرم و آزمایش های بیوشیمیایی) تعیین هویت گردیدند (۳).

### سینتیک رشد باکتری ها:

ابتدا از کلیه باکتری های مقاوم جدا شده در هر فصل کشت ۲۴ ساعته در محیط **LB broth** تهیه گردید. پس از رشد باکتری ها، در غلظتی معادل نیم مک فارلند، به ازاء هر باکتری ۳ ارلن محیط کشت **LB broth** در حجمی معادل ۱۰۰ میلی لیتر تهیه شد. به محیط اول از ابتدا **۵ mg/l** کلرید جیوه اضافه شد و به محیط دوم در نیمه فاز رشد لگاریتمی یعنی در فاصله زمانی

باشد. این دریاچه توسط رودخانه های فصلی خشک، پل فسا، نظرآباد سروستان و سلامیه مورد هجوم انواع آلودگی ها قرار می-گیرد. 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، بیمارستان ها و تعمیرگاه ها، رستوران ها و ... وجود دارد. هر کدام از آنها در پساب خود دارای فلزات سنگین مختلف هستند، که در نهایت به دریاچه مهارلو تخلیه می گردند (۷).

هدف از این مطالعه جداسازی، شناسایی و بررسی سینتیک رشد باکتری های نمک دوست و مقاوم به جیوه در دریاچه مهارلو و بررسی فرضیه ارتباط بین افزایش آلودگی محیط به جیوه و افزایش احتمال جداسازی باکتری های مقاوم به جیوه است.

### مواد و روش ها:

محدوده مطالعاتی ورودی رودخانه های خشک، پل فسا، سلامیه و وسط دریاچه، یعنی ۴ ایستگاه تعیین گردید. سه ایستگاه ورودی رودخانه ها به دریاچه آلوده ترین ایستگاه ها جهت جداسازی باکتری های نمک دوست مقاوم به جیوه و ایستگاه وسط دریاچه با آلودگی کمتر به عنوان ایستگاه کنترل، انتخاب گردیدند. در هنگام نمونه برداری موقعیت جغرافیایی ایستگاه ها به وسیله دستگاه موقعیت یاب جهانی (**GPS**) تعیین گردید نمونه برداری از آب و رسوبات سطحی چهار ایستگاه در چهار فصل سال از تابستان ۱۳۸۸ تا بهار ۱۳۸۹ انجام گرفت. نمونه ها در ظروف پلاستیکی استریل درب دار جمع آوری و در محفظه حاوی یخ برای انجام آزمایش های مورد نظر بلافاصله به آزمایشگاه منتقل شدند (۳). زمان نمونه برداری در هر فصل نیمه دومین ماه از آن فصل بود.

### آماده سازی نمونه ها جهت اندازه گیری میزان جیوه:

۱- نمونه های آب: نمونه ها با صافی (فیلتر) واتمن ۴۲ میلی متری صاف گردیدند تا ناخالصی های موجود در آنها حذف گردد. تمام نمونه های صاف شده با مخلوطی از نیتریک اسید و کلریدریک اسید (به نسبت ۳ به ۱) هضم شدند (۳).

۲- نمونه های رسوب: برای این منظور ابتدا نمونه ها کاملاً یکنواخت گردیدند و سپس در ظرف پتری قرار داده شد و با ترازو وزن گردیدند. سپس آنها را در فور قرار داده (دمای ۱۰۳ درجه سانتی گراد) تا خشک شوند. وزن آنها تعیین گردید تا درصد رطوبت به دست آید. سپس از نمونه های خشک یک گرم برداشته شد و ۱۰ میلی لیتر مخلوط کلریدریک اسید و نیتریک اسید به

با میانگین تعداد باکتری‌ها در محیط کشت کنترل (تعداد کل باکتری‌های هوای قابل کشت) بسیار کمتر بود و در سطح ۵ درصد اختلاف معنی‌دار داشتند ( $P < 0/05$ ). در جداسازی و شناسایی باکتری‌های مقاوم به جیوه درصد فراوانی باکتری‌های گرم منفی شناسایی شده بیشتر از باکتری‌های گرم مثبت بود و تفاوت معنی‌داری در سطح ۵ درصد داشتند ( $P < 0/05$ ). بر این اساس ۶۵ درصد باکتری‌های مقاوم جدا شده گرم منفی و ۳۵ درصد باکتری‌ها گرم مثبت بودند. بیشترین درصد فراوانی باکتری شناسایی شده در ایستگاه‌ها و فصول مختلف مربوط به باکتری *Vibrio sp* با فراوانی ۷۵ درصد و کمترین آن مربوط به *Citrobacter* با ۱۲/۵ درصد بود.

#### سینتیک رشد:

با اضافه کردن جیوه از میانه فاز رشد لگاریتمی به محیط کشت باکتری *Vibrio alginolyticus*، در منحنی رشد تغییر زیادی مشاهده نشد. اما با اضافه کردن جیوه از ابتدا منحنی رشد این باکتری در فاز لگاریتمی و سپس در فاز ایستایی کاهش رشدی نسبت به دو منحنی دیگر دارد (نمودار ۱). در مورد باکتری *Citrobacter* جدا شده در فصل بهار این موضوع برعکس شده است. به طوری که منحنی مربوط به اضافه کردن جیوه از ابتدا، شباهت بیشتری به منحنی کنترل (بدون جیوه) دارد. در این باکتری با اضافه کردن جیوه از میانه فاز رشد لگاریتمی سرعت رشد به یکباره کاهش شدیدی نشان داده است. (نمودار ۲). نتایج نشان می‌دهد که کمترین تغییر در منحنی رشد در حضور جیوه مربوط به باکتری *Proteus sp* به خصوص جدا شده در فصل پاییز مشاهده گردید (نمودار ۳).

در مورد باکتری استافیلوکوکوس جدا شده در فصل زمستان نیز منحنی مربوط به اضافه کردن جیوه از ابتدا تقریباً منطبق با منحنی کنترل می‌باشد. با اضافه کردن جیوه از نیمه فاز رشد لگاریتمی سرعت رشد این باکتری نیز کاهش یافته است (نمودار ۴).

۲۴۰ تا ۳۲۰ دقیقه همان میزان (۵ mg/l) کلرید جیوه اضافه شد. محیط سوم که فاقد فلز بود به عنوان شاهد 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 LB broth نیز به عنوان شاهد در نظر گرفته شد تا در تنظیم (صفر کردن) دستگاه اسپکتروفتومتر از آن استفاده گردد. بلافاصله پس از تلقیح سوسپانسیون باکتریایی، جذب نوری هر یک از محیط‌ها در طول موج ۵۴۰ nm قرائت شد. سپس محیط‌ها در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۲ ساعت در گرم‌خانه شیکردار در ۱۵۰ rpm شیک گردیدند. سپس جذب نوری آنها در مرحله دوم به مدت نیم ساعت و از آن به بعد به مدت یک ساعت خوانده شد. این کار در ۱۲ ساعت متوالی تکرار شد تا در نهایت نمودار رشد باکتری‌ها در حضور جیوه به دست آمد (۳).

#### تجزیه تحلیل آماری:

اطلاعات با نرم افزار SPSS پردازش شد. تجزیه تحلیل آماری مربوط به تعداد باکتری‌ها با استفاده از آنالیز واریانس (ANOVA) و آزمون دانکن (Duncan) انجام گرفت.

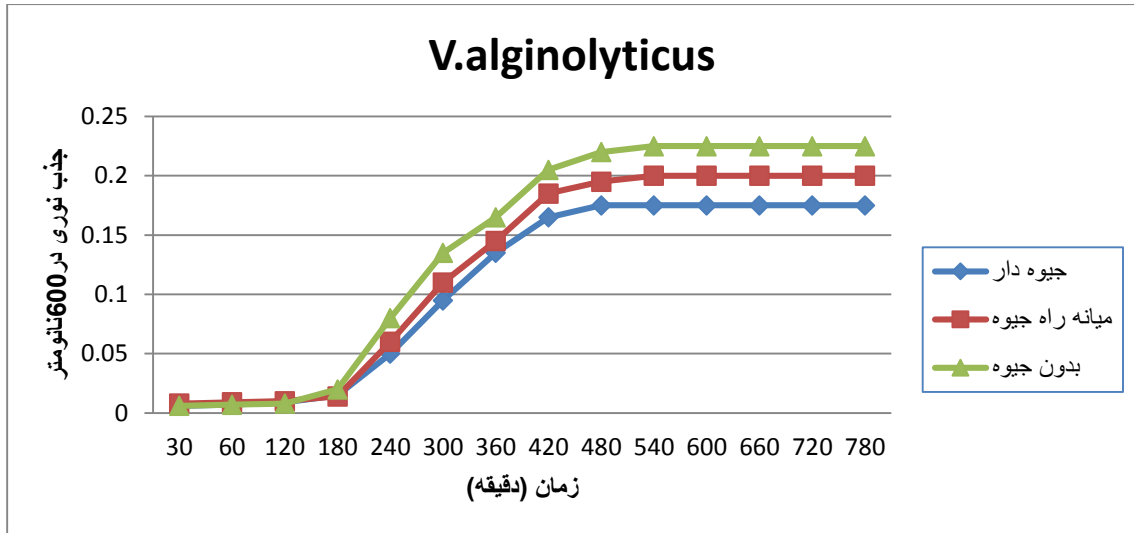
#### یافته‌ها:

**میزان جیوه در نمونه‌ها:** بیشترین میزان جیوه در نمونه‌های آب و رسوب در ایستگاه ورودی رودخانه خشک به ترتیب  $17/951 \mu\text{g/l}$  و  $31/251 \mu\text{g/l}$  به دست آمد. کمترین میزان جیوه نیز در نمونه‌های آب و رسوب در ایستگاه وسط دریاچه به ترتیب  $8/243 \mu\text{g/l}$  و  $16/067 \mu\text{g/l}$  مشاهده شد.

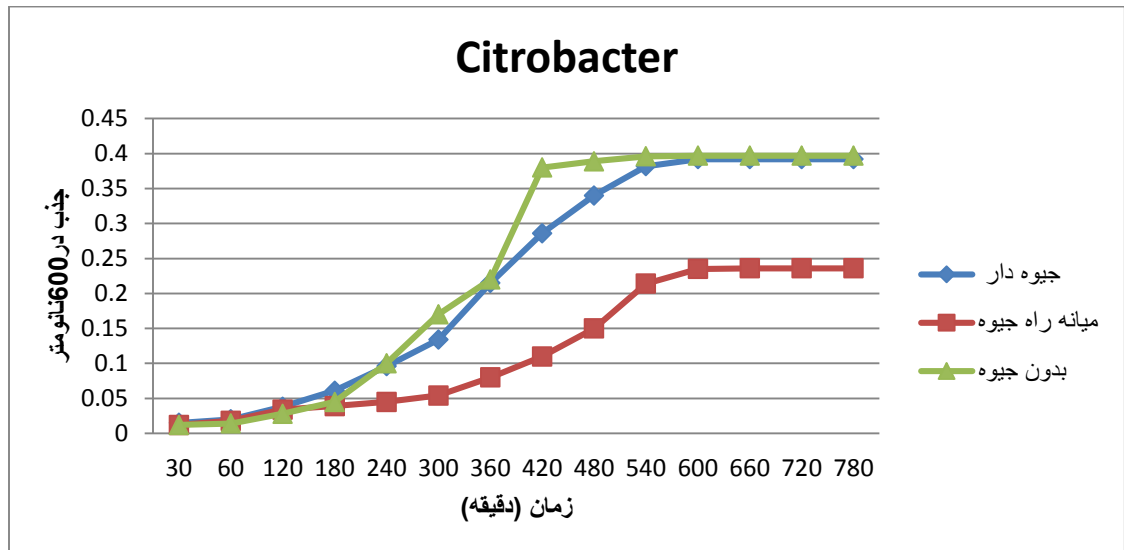
#### شمارش باکتری‌ها:

بیشترین تعداد باکتری مقاوم به جیوه در ایستگاه‌های رودخانه خشک و پل فسا بر حسب CFU/ml یا CFU/g به ترتیب  $2/8 \times 10^4$  و  $8/375 \times 10^3$  و کمترین آن در ایستگاه وسط دریاچه ( $7 \times 10^2$ ) به دست آمد. در این رابطه تفاوت بین ایستگاه خشک و پل فسا معنی‌دار نبود ( $P > 0/05$ ). تفاوت سایر ایستگاه‌ها از نظر تعداد باکتری‌های مقاوم به جیوه در سطح ۵ درصد معنی‌دار بود ( $P < 0/05$ ).

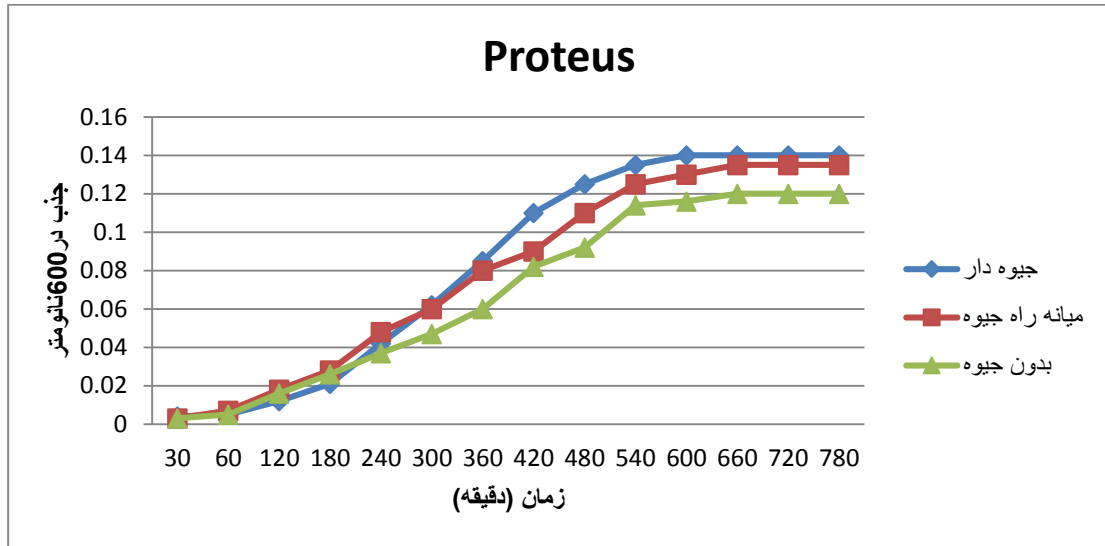
باکتری‌های ویبریو، سیتروباکتر، استافیلوکوکوس، پروتئوس، اشریشیاکولی و سودوموناس به عنوان باکتری‌های مقاوم به جیوه در دریاچه مهارلو شناسایی شدند. میانگین‌های تعداد باکتری‌ها در محیط کشت حاوی جیوه (باکتری‌های مقاوم به جیوه) در مقایسه



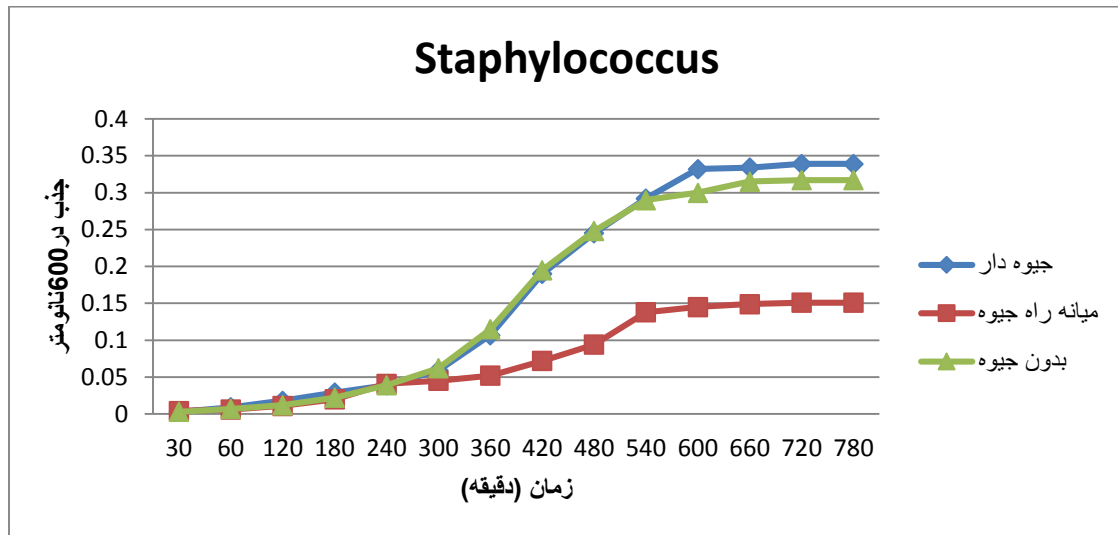
نمودار ۱: سینتیک رشد باکتری *V.alginolyticus* در تابستان



نمودار ۲: سینتیک رشد باکتری *Citrobacter sp* در بهار



نمودار ۳: سینتیک رشد باکتری *Proteus sp* در پاییز



نمودار ۴: سینتیک رشد باکتری *Staphylococcus sp* در زمستان

آلودگی محیط به جیوه و افزایش تعداد باکتری‌های مقاوم به جیوه را تایید می‌کند. به دلیل غلظت بالای جیوه در ایستگاه‌های رودخانه خشک و پل فسا، تعداد باکتری‌های مقاوم به جیوه بیشتر به دست آمد. در حالیکه در ایستگاه وسط دریاچه به دلیل غلظت کمتر جیوه، تعداد باکتری‌های مقاوم به این فلز کمتر بود. باکتری‌ها برای بقا در مناطق آلوده به جیوه پلاسمیدها و ترانسپوزون‌های حاوی ژن‌های مقاومت به جیوه را بین یکدیگر رد و بدل می‌کنند (۹).

#### بحث:

Osborn و همکارانش در سال ۱۹۹۳ محدوده‌ی  $10^3/1$  تا  $10^6/CFU/g$  را در تعداد باکتری‌های مقاوم به جیوه در رسوبات ۴ ایستگاه مورد بررسی گزارش کردند. آنها نشان دادند که تعداد باکتری‌های مقاوم به جیوه در ایستگاه‌های با آلودگی کمتر پایین می‌باشد (۸). نتایج به دست آمده از تحقیق حاضر نیز فرضیه رابطه میان افزایش

## کفیل زاده و همکاران / جدا سازی باکتری های مقاوم به جیوه

(Conjugation) به صورت درون گونه‌ای و برون گونه‌ای قادر به انتقال ژن‌های مقاومت به جیوه بین یکدیگر هستند. علاوه بر این اولین مرحله از برهم کنش باکتری و جیوه در محیط، عبور این فلز از دیواره سلولی است. باکتری‌های گرم منفی به دلیل داشتن غشای خارجی (که از عبور مواد سمی به داخل سیتوپلاسم جلوگیری می‌کند) در مقایسه با باکتری‌های گرم مثبت کمتر تحت تاثیر جیوه قرار می‌گیرند. از این رو احتمال جداسازی آنها از محیط نیز افزایش می‌یابد (۱۵). در مطالعه حاضر رشد باکتری‌هایی مانند *سیتروباکتر* و *استافیلوکوکوس* در حضور جیوه از میانه فاز رشد لگاریتمی، به یکباره کاهش شدیدی یافته است. زیرا در این حالت باکتری دچار شوک ناگهانی شده و فرصت سازگاری با جیوه را نداشته است. در مطالعه ای که Hansen و همکارانش در سال ۱۹۸۴ بر روی تعدادی از باکتری‌های مقاوم به جیوه انجام دادند و رشد آنها را در حضور جیوه بررسی کردند، متوجه شدند که وجود جیوه در محیط کشت از نیه فاز رشد لگاریتمی، موجب کاهش شدید رشد می‌شود (۱۶).

منحنی رشد باکتری پروتئوس در غیاب جیوه و در حضور آن تقریباً مشابه می‌باشد که به دلیل داشتن تاژک سرتاسری و همچنین ژن‌های اپرون mer در این باکتری می‌باشد. به نظر می‌رسد تماس مداوم با جیوه در محیط زندگی و بکارگیری روش غنی سازی، این باکتری را با شرایط استرس‌زای ناشی از وجود این فلز سمی سازگار و آن را به یک باکتری مقاوم تبدیل کرده است.

باکتری ویبریو تقریباً در تمامی فصول و ایستگاه‌های مورد بررسی جدا شد. بنابراین می‌توان گفت این باکتری، بومی دریاچه مهارلو بوده و ژن‌های مقاومت به جیوه را از باکتری‌های مقاوم از طریق انتقال پلاسمید یا ترانسپوزون‌های حاوی اپرون mer کسب کرده است. ژن‌هایی که بیان آنها موجب مقاومت باکتری‌ها در برابر جیوه می‌شوند، عمدتاً بر روی پلاسمید یا ترانسپوزون قرار گرفته‌اند (۱۷ و ۱۸).

باکتری‌های جدا شده از محیط‌های آلوده از پتانسیل خوبی در حذف جیوه برخوردار هستند. با فراهم نمودن شرایط و بستر مناسب جهت رشد این باکتری‌ها برای پالایش زیستی پساب (فیلترها و راکتورهای زیستی) می‌توان از این باکتری‌ها جهت سمیت زدایی و حذف از پساب کارخانجات آلوده

در مطالعه Mahler و همکارانش در سال ۱۹۸۶ و Barkay در سال ۱۹۸۷ تعداد باکتری‌ها در محیط کشت حاوی جیوه بسیار کمتر از تعداد باکتری‌ها در محیط کشت کنترل (بدون جیوه) به دست آمد (۱۱ و ۱۰). در مطالعه جاری نیز نتایج حاصل از شمارش باکتری‌ها در محیط کشت کنترل و فلزدار، گویای این مطلب است که تعداد باکتری در محیط کشت کنترل بیشتر از محیط کشت حاوی جیوه می‌باشد. زیرا وجود جیوه در محیط کشت موجب توقف رشد و مرگ بسیاری از باکتری‌ها می‌شود.

در این بررسی باکتری‌های مقاوم به جیوه با روش غنی سازی اولیه در حضور ۵ mg/l کلرید جیوه و ۲ درصد نمک و سپس با روش کشت مستقیم در محیط جامد جداسازی گردیدند. باکتری‌های جدا شده با روش غنی سازی، در مراحل بعد در حضور جیوه رشد بهتر، مقاومت بیشتر و توانایی بیشتری در حذف جیوه و تحمل نمک نشان دادند. غنی سازی اولیه موجب بیان ژن‌های مقاومت به جیوه در باکتری‌ها، سازگاری آنها با شرایط استرس‌زای ناشی از وجود جیوه و نمک و در نتیجه رشد بهتر آنها می‌شود (۱۲). Wanger Dobler و همکارانش در سال ۲۰۰۰ جهت جداسازی باکتری‌های مقاوم به جیوه از پساب کارخانجات کلرآلکالی از روش کشت مستقیم استفاده کردند و باکتری‌هایی جدا کردند که میزان مقاومت به جیوه در آنها نسبتاً کم بود. نتایج به دست آمده نشان می‌دهد که باکتری‌های جدا شده با این روش توانایی تحمل غلظت بالاتر از میزان لازم فلز را برای جداسازی ندارند. در مطالعه آن‌ها جنس‌های باکتریایی *سودوموناس*، *باسیلوس*، *کلبسیلا*، *ویبریو* و *اشریشیاکولی* به عنوان باکتری‌های مقاوم به جیوه شناسایی شدند (۱۳). در سال ۱۳۸۶ باکتری‌های *کلبسیلا*، *استافیلوکوکوس*، *اشریشیاکولی*، *سودوموناس*، *سراسیا* و *باسیلوس* به عنوان باکتری‌های مقاوم به جیوه در رودخانه کر گزارش گردید (۳). Pahan و همکاران در سال ۱۹۹۰ مقاومت به جیوه را در جنس‌های باکتریایی *سودوموناس*، *باسیلوس*، *اشریشیا* و *کلبسیلا* گزارش کردند (۱۴). از آنجا که باکتری‌های مناطق بومی آلوده به طور مداوم در تماس با غلظت‌های سمی جیوه هستند لذا این باکتری‌ها به نحوی باید قادر به حذف این فلز سمی از اطراف خود باشند.

در تحقیق جاری درصد فراوانی باکتری‌های گرم منفی در مقایسه با باکتری‌های گرم مثبت بیشتر بود. باکتری‌های گرم منفی در شرایط سخت از طریق فرایند هم یوغی



۶- بنایی ک، ۱۳۷۳، بررسی آلودگی رودخانه کر به فلزات سنگین، طرح تحقیقاتی، اداره کل محیط زیست استان فارس.

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

8. Osborn AM, Bruce KD, Strike P, Ritchie DA. 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.

9. Schneiker S, Keller M, Droge M, Lanka E, Pühler A, Selbitschka W. The genetic organization and evolution of the broad host range mercury resistance plasmid pSB 102 isolated from a microbial pollution residing in the rizhospher of alfalfa. *Nucleic Acids Res.* 2001; 29(24): 5169-5181.

10. Barkay T. Adaptation of aquatic microbial communities to Hg(II) stress. *Appl Environ Microbiol.* 1987; 53(12): 2725-2732.

11. Mahler I, Levinson HS, Wang Y, Halvorson HO. Cadmium and mercury resistance *Bacillus* strains from a salt marsh and from Boston Harbor. *Appl Environ Microbiol.* 1986; 52(6): 1293-1298.

12. Robinson JB, Tuovinen OH. Mechanisms of microbial resistance and detoxification of mercury and organomercury compounds: physiological, biochemical and genetic analysis. *Microbiol Rev.* 1984; 48(2): 95-124.

13. Wagner Dobler I, Lunsdorf H, Lubbenhausen T, von Canstein HF, Li Y. Structure and species composition of mercury reducing biofilms. *Appl Environ Microbiol.* 2000; 66(10): 4559-4563.

14. Pahan K, Ray S, Gachui R, Chaudhuri J, Mandal A. Ecological and biochemical studies on mercury resistance bacteria. *Indian J Environ Health.* 1990; 32(3): 250-261.

15. Gluszc P, Ledakowicz S, Petera J, Deckwer WD. Thermodynamic and kinetic aspects of mercury sorption on activated carbon in the

کننده محیط زیست دریاچه مهارلو یا سایر مناطق آلوده کشور استفاده کرد.

#### نتیجه گیری:

دریاچه مهارلو توسط رودخانه‌های ورودی به آن (پل فسا، سلامیه و خشک) به فلزات سنگین از جمله جیوه آلوده شده است. نتایج این تحقیق نشان داد که رابطه مستقیمی میان افزایش میزان جیوه در محیط و افزایش تعداد باکتری‌های مقاوم به جیوه وجود دارد. بیشترین تعداد باکتری‌های مقاوم به جیوه در ایستگاه‌های ورودی رودخانه‌های خشک و پل فسا مشاهده شد. تماس مداوم باکتری‌های دریاچه مهارلو با جیوه و بکارگیری روش غنی سازی، آن‌ها را با شرایط استرس‌زای ناشی از وجود این فلز سمی سازگار و به باکتری‌های مقاوم تبدیل کرده است. وجود جیوه در محیط کشت موجب افزایش مدت زمان فاز تاخیری رشد می‌شود.

#### ۳. تقدیر و تشکر:

بدین وسیله از زحمات دکتر عبدالعلی مشفق، دکتر میرزایی، رضا محمدی، خانم جابری و کارکنان محترم دانشکده علوم پزشکی یاسوج که در انجام این پژوهش ما را یاری کردند تشکر و قدردانی می‌شود.

#### References

1. Afrasayab SH, Yasmin A, Hasnain, SH. Characterization of some indigenous mercury resistant bacteria from polluted environment. *Pakistan J Biol Sci.* 2002; 5(7): 792-797

۲- رضایی ع، ۱۳۸۸. حذف جیوه از پساب پتروشیمی شیراز با استفاده از تکنیک‌های بیوتکنولوژیک. طرح پژوهشی، دانشگاه تربیت مدرس و شرکت ملی صنایع پتروشیمی.

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

4. Kiefer N. Mechanisms of microbial metal resistance. *Appl Environ Microbiol.* 2000; 58: 1223-1226.

۵- فولادی فرد ر، کمانی ح، خائفی م، ۱۳۸۳. حذف

فلزات سنگین به روش جذب بیولوژیک از محلول‌های آبی. نهمین کنگره ملی مهندسی شیمی ایران، تهران، دانشگاه علم و صنعت ایران.

process of mercury bioreduction. *Chem Biochem Eng Q.* 2007; 21(4) 306-314.

16. Hansen CL, Zwolinski G, Martin D, Williams JW. Bacterial removal of mercury from sewage. *Biotechnol Bioeng.* 1984; 26(11): 1330-1333.

17. Barkay T, Liebert C, Gillman M. Environmental significance of potential for mer(Tn 21) mediated reduction of Hg(II) to Hg(0) in natural waters. *Appl Environ Microbiol.* 1989; 55(5): 1196-1202.

18. Essa AM, Macaskie LE, Brown NL. Mechanisms of mercury. *Biochem Soc Trans.* 2002; 30(4): 672-674.