Isolation, characterization and tolerance survey of bacterial strains to cadmium in soils receiving Hamadan industrial parks wastewater treatment plant effluent

Mohammad Taghi Samadi[1], Mohammad Yousef Alikhani[2], Alireza Rahmani[3], Fatemeh Taherkhani[4*]

1. Associate professor, Department of Environmental Health Engineering Factually of health and center for health researches, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran
2. Associate professor, Department of Medical Microbiology, School of Medical Sciences, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran
3. professor, Department of Environmental Health Engineering Factually of health, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran
4. MSc Student of Environmental Health, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran

ABSTRACT

Background and Aims: Biosorption is a relatively new clean up method used for the removal of heavy metals from the environment. Entry of heavy metals into the environment may result in change in population structure and further alteration of resistance mechanism(s) in exposed microorganisms. The first question in this study sought to determine the threshold of bacterial resistance to cadmium (Cd). The second question was to identify indigenous bacterial species capable of removing the Cd from the soil and consequently to achieve a more efficient biological treatment for industrial effluents.

Materials and Methods: Natural topsoil samples were obtained from three industrial parks in Hamadan, Iran. The concentration of Cd in soil samples was measured and thence the bacterial cultures were prepared. Following the screening process, the minimum inhibitory concentration [MIC] and minimum bactericidal concentration [MBC] were determined in order to find the threshold of bacterial tolerance. Indeed, the adsorption capacity of bacterial strains came down in favor of the identification of resistant bacteria.

Results: Respectively, 42, 4 and 4 bacterial strains were identified for cultures having average cadmium concentrations of 0.78, 500 and 750 mg/L. This experiment did also detect that Tcd2 and Tcd4 showed the highest MIC with 1250 mg Cd/L. Moreover, TCd2, belonging to the family of Enterobacteriaceae and Enterobacter genus, demonstrated the maximum cadmium removal efficiency (30.2%).

Conclusion: The test was successful as it was able to identify the indigenous cadmium tolerant bacteria with high adsorption capacity. This finding has important implications for developing special biological wastewater treatment such as a biofilter in the cadmium-releasing industries.

Key words: Cadmium, Hamadan, Industrial park, Resistant bacteria, Soil

***Corresponding Author:**
MSc Student of Environmental Health, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran
Email: fatemeh.taherkhani@yahoo.com

Received: 7 May 2014
Accepted: 29 December 2014

فصلنامه بهداشت در عرصه
دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی ـ دانشکده بهداشت
دوره ۲، شماره ۱، بهار ۱۳۹۳، صفحات ٦٠ تا ٦٦

بررسی آستانه تحمل و شناسایی سویه باکتریایی مقاوم به کادمیم در خاک های پذیرنده پساب شهرک‌های صنعتی همدان

محمدتقی صمدی[۱]، محمد یوسف علیخانی[۲]، علیرضا رحمانی[۳]، فاطمه طاهرخانی[*٤]

[۱] دانشیار گروه مهندسی بهداشت محیط، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران
[۲] دانشیار گروه میکروبیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران
[۳] استاد گروه مهندسی بهداشت محیط، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران
[٤] دانشجوی کارشناسی ارشد بهداشت محیط، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران

چکیده

زمینه و هدف: جذب زیستی فلزات سنگین یکی از روش‌های نوین جهت پاکسازی محیط می‌باشد. ورود فلزات سنگین از صنایع مختلف به محیط باعث تغییر ساختار جمعیتی و بروز ساز و کار مقاومتی در میکروارگانیسم‌ها می‌گردد. هدف این تحقیق، تعیین آستانه مقاومت باکتری‌ها به کادمیم، شناسایی باکتری‌های بومی جهت حذف این فلز از خاک و دستیابی به کارایی بیشتر در تصفیه بیولوژیکی پساب‌های صنعتی بوده است.

مواد و روش‌ها: دراین تحقیق نمونه برداری از خاک سه شهرک صنعتی همدان انجام گرفته و پس از اندازه گیری غلظت کادمیم در خاک، از نمونه‌ها کشت باکتریایی تهیه شده است. پس از غربالگری، جهت تعیین آستانه تحمل باکتری‌ها، حداقل غلظت ممانعت کننده رشد و حداقل دوز کشنده باکتری مشخص گردید. سپس میزان جذب سویه‌ها مطالعه شد و در نهایت باکتری مقاوم شناسایی شد.

یافته‌ها: از کشت اولیه با میانگین غلظت ۰/۷۸ ، ۵۰۰ و ۷۵۰ mg/L فلز کادمیم به ترتیب تعداد ٤٢ ،٤ و ٤ سویه باکتریایی شناسایی گردیدند. بررسی حداقل غلظت ممانعت کننده رشد ٤ سویه نشان داد که بالاترین مقدار مربوط به سویه‌های TCd_2 و TCd_4 با غلظت ۱۲۵۰ mg/L بوده است، ولی نتایج جذب نشان داد که بیشترین جذب توسط سویه TCd_2 با ۳۰/۲٪ بوده است که این سویه از خانواده انتروباکتریاسه و متعلق به جنس انتروباکتراست.

نتیجه گیری: باکتری بومی شناسایی شده قابلیت تحمل و جذب غلظت بالایی از فلز کادمیم را دارا می‌باشد که می‌توان از آن در تصفیه زیستی فاضلاب‌ها و یا به عنوان بیوفیلتر در صنایع تولید کننده این فلز استفاده نمود.

کلید واژه‌ها: کادمیم، باکتری، مقاوم، خاک، شهرک صنعتی، همدان

[*]آدرس نویسنده مسئول:
همدان، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی همدان ، تلفکس: ۰۸۱۳۸۳۸۰۵۰۹

Email: fatemeh.taherkhani@yahoo.com

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۳/۰۲/۱۷
تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۳/۱۰/۰۸

مقدمه

فلزات سنگین و سمی در اثر فعالیت‌های صنعتی متعدد موجب آلودگی محیط زیست می‌شوند. یکی از منابع اصلی آلودگی آب و خاک به فلزات سنگین، ورود پساب‌های شهری و صنعتی می‌باشد این آلاینده‌ها وارد محیط‌های آبی و خاکی شده و در محل ورود به محیط غلظت بسیار بالایی از آنها دیده می‌شود [۱]. اگرچه برخی فلزات برای فرآیندهای بیولوژیکی لازم هستند ولی همه آنها در غلظت‌های بالا سمی هستند، این امر به علت ظرفیت اکسیداتیو رادیکالهای آزادشان می‌باشد که موجب جایگزینی فلزات ضروری در آنزیم‌ها و مختل نمودن فعالیت‌های طبیعی آنها می‌گردد [۲]. انباشت بیش از حد آنها در خاک‌های کشاورزی و انتقال آنها در طول زنجیره غذایی و خاصیت تجمع زیستی در موجودات زنده حائز اهمیت می‌باشد. اثرات سمی فلزات شامل بلوکه کردن گروه‌های متابولیسمی مهم [آنزیم‌ها یا سیستم‌های انتقال یون‌ها و مواد مغذی به سلول ها]، تغییر شکل فضایی، واسرشتی و غیر فعال سازی آنزیم‌ها، اختلال در ساختار غشای اندامک‌ها و سلول‌ها و تخریب سلولها به عنوان آنتی بیوتیک یا به صورت رسوب یا شلاته شدن در متابولیت‌های ضروری بدن می‌گردند [۳]. مطالعات نشان داده‌اند که آلودگی طولانی مدت خاک به فلزات سنگین اثر سوء بر فعالیت‌های میکروبی خاک، به خصوص تنفس میکروبی دارد. علاوه بر تغییرات طولانی مدت فلزات بر فعالیت‌های آنزیمی خاک، گزارشات بسیاری حاکی از کاهش شدید فعالیت‌های میکروبی به علت تماس کوتاه مدت با فلزات سمی نیز منتشر گردیده است [٤]. وجود فلزات سنگین در پساب، علاوه بر اهمیت محیط زیستی، فعالیت میکروبی را نیز به شدت کاهش میدهد و در نتیجه بر روند فرآیند تصفیه زیستی پساب اثرات سوئی بر جای می‌گذارد [۲]. رهاسازی فلزات سنگین مانند کادمیم، کروم، سرب و نیکل به محیط در سال‌های اخیر به نحو نگران کننده‌ای افزایش یافته است [۵]. نیمه عمر بیولوژیکی کادمیم در محیط به طور متوسط حدود ۱۸ سال تخمین زده می‌شود [٤]. مهمترین اثرات سوء کادمیم، تجمع مزمن آن در قشر کلیه بوده و زمانی که غلظت آن به ۲۰۰ میکروگرم در هر کیلوگرم وزن تر کلیه برسد، سبب آسیب شدید به مجاری کلیوی می‌گردد. نرم شدن استخوان‌ها به واسطه اختلال درتنظیم موازنه کلسیم و فسفر از دیگر علائم مسمومیت با کادمیم می‌باشد [٦]. شناسایی میکروارگانسیم‌های مقاوم به این فلزات نقش مهمی در خصوص آلودگی محیط و در نهایت پاکسازی آن ایفا می‌کند.

باتوجه به غلظت بسیار بالای برخی از فلزات در پسابها و به طور کلی در محیط‌های آلوده به فلز، باکتری‌ها مکانیسم‌های مقاومتی ایجاد می‌نمایند که می‌تواند منجر به انتخاب گونه‌های مقاوم با توانایی تحمل سمیت فلزی گردند [۷]. برحسب میزان آلودگی ممکن است ظرفیت پلاسمیدی یا ساختار سلولی آنها تغییر یابد. به نحوی که قدرت تحمل غلظت‌های بالاتر ترکیبات سمی را نیز داشته باشند و به عبارت دیگر با غلظت‌های بالاتر نیز سازگار گردند. از طرف دیگر باکتریهای مقاوم قادرند با انتقال عناصر ژنتیکی به سویه‌های دیگر سبب گسترش مقاومت گردند. از این جمله مکانیسم‌ها می‌توان به تغییر در توپولوژی DNA و تغییر عملکرد اختصاصی RNA پلیمراز اشاره نمود [۷]. با توجه به اثراتی که فلزات بر محیط و سلامتی انسان دارند، لزوم یافتن راهکارهایی جهت کاهش آنها در محیط ضروری به نظر می‌رسد. در این بین روش اصلاح زیستی و استفاده از باکتری‌ها در سالیان اخیر توجه محققین را به خود جلب کرده است. شاخصه استفاده از باکتری‌ها، انتخاب باکتری با قابلیت تحمل غلظت‌های بالا و میزان جذب بالا می‌باشد. جهت استفاده از این روش، شناسایی باکتری‌های موثر بومی هزینه کمتری را خواهد داشت و در ضمن می‌توان میزان قابلیت طبیعی خاک منطقه را در حذف فلز مذکور تعیین کرد. لذا این پژوهش با هدف تعیین مقادیر کادمیم خاک و تعیین طیف مقاومت/تحمل از طریق اندازه گیری حداقل غلظت بازدارنده رشد [MIC] و حداقل غلظت کشنده باکتری [MBC] و شناسایی باکتری‌هایی مقاوم می‌باشد تا با استفاده از این باکتریها، در ساختار صافی‌های زیستی یا برای اصلاح زیستی پساب‌ها و حذف فلزات سنگین استفاده نمود. همچنین از این باکتری‌ها می‌توان به عنوان شاخص زیستی در محیط استفاده کرد.

مواد و روشها

نمونه برداری

منطقه مورد پژوهش، محدوده شهرک‌های صنعتی همدان می‌باشد و با توجه به اینکه هدف شناسایی گونه‌های مقاوم بوده است، لذا نمونه‌ها از خاک آلوده به پساب تصفیه خانه‌های فاضلاب سه شهرک صنعتی بهاران، ویان و بوعلی جمع‌آوری گردید. در هر یک از شهرک‌های مورد مطالعه، با بکارگیری روش سیستماتیک نمونه برداری، نمونه هایی با وزن ۱kg از ۲۰نقطه با فواصل حدود ٤ متری و از عمق ۳۰-۲۰ cm گرفته شد. نمونه‌های برداشت شده در محل مخلوط گردیده و در

نهایت ۱kg نمونه معرف با حفظ زنجیره سرما به آزمایشگاه منتقل گردید. عوامل دما و pH خاک نیز اندازه گیری گردید.

آنالیز نمونه‌های خاک

کلیه مواد مورد استفاده در این تحقیق از شرکت مرک آلمان تهیه گردید. برای تعیین غلظت کادمیم خاک، ابتدا نمونه خاک در هوای آزاد خشک گردید و از الک با قطر سوراخ‌های ۲mm عبور داده شد. سپس ۲gr از خاک با ۱۲/۵ ml از $4HNO_3$ مولار به مدت۲۴ ساعت در دمای ۸۰ °C قرار گرفت و بعد از عبور دادن از صافی واتمن ۰/۴۵ میکرون، با استفاده از دستگاه اسپکتوفتومتر جذب اتمی [AAS] Perkin Elmer 5000 و طول موج ۲۲۶/۸ nm و رسم منحنی استاندارد تعیین مقدار گردید [۸].

تعیین pH خاک

برای این منظور از عصاره ۱:۱ استفاده شد. به این ترتیب که مقدار ۴۰gr از نمونه خاک را در یک بشر ۱۰۰ ml وزن نموده و سپس ۴۰ ml از کلسیم کلراید ۰/۱ مولار به آن اضافه کردیم و این مخلوط را به مدت ۳۰min به طور متناوب در هر دفعه ۱۰min به آرامی بهم زده و با استفاده از pH متر،pH آنرا اندازه گیری کردیم [۹].

غربالگری باکتریهای مقاوم به کادمیم

ابتدا ۱۰gr از خاک آلوده را در ۹۰ mL آب مقطر به صورت سوسپانسیون درآورده و به مدت ۳۰ دقیقه در شیکر ۱۰۰ rpm سانتریفوژ گردید. بعد از ۲۰ دقیقه زمان ته نشینی در نهایت ۱ mL از نمونه صاف شده به محیط LB آگار [۱۰گرم پپتون، ۵ گرم عصاره مخمر، ۱۰گرم کلرید سدیم] کشت خطی داده شد. پلیت‌ها به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۵ °C گرماگذاری شدند. پس از طی مدت زمان مذکور، پلیت‌ها مورد بررسی قرار گرفته و خالص سازی آنها تا به دست آوردن تک کلنی‌های باکتریایی بر روی محیط نوترینت آگار ادامه یافت. به دلیل رشد تعداد بالای سویه‌های باکتریایی غربالگری انجام گردید. بدین صورت که از تک تک سویه‌های خالص سازی شده بر روی LB Agar حاوی ۵۰۰ و ۷۵۰ mg/L کادمیم کشت انجام شد [۱۰].

تعیین حداقل غلظت ممانعت کننده رشد [MIC]

بر اساس روش Macrodillution broth، در ابتدا محیط LB broth حاوی غلظت [w/w] [mg/L] ۷۵۰-۱۶۵۰ با تفاوت غلظت [mg/L] ۱۰۰ فاصله از $Cd[NO_3]_2.4H_2O$ که هر کدام حاوی سوسپانسیون باکتریایی با کدورت نیم مک فارلند و معادل CFU/L $1/5\times10^8$ بودند به طور جداگانه تهیه گردید. این عمل برای تمامی گونه‌های به دست آمده از مرحله قبل به انجام رسید. در نهایت پلیت‌ها در دمای ۳۵ °C و به مدت ۴۸ ساعت گرماگذاری شدند و نخستین لوله ای که شفاف و فاقد رشد میکروبی بوده به عنوان کمترین غلظت باز دارنده رشد یا MIC محسوب گردید [۱۱].

تعیین حداقل دوز کشنده باکتری [MBC]

در این مرحله و به دنبال مشخص شدن MIC، از غلظت تعیین شده MIC و غلظت‌های بعدی آن به میزان ۰/۱ mL در محیط کشت جامد کشت داده شد. پس از انکوباسیون شبانه پلیت‌ها مورد بررسی قرار گرفتند غلظتی از فلز که در آن کلنی رشد نکرده و یا تعداد کلنی‌ها نسبت به پلیت کنترل ۹۹/۹٪ کاهش یافته باشد به عنوان غلظت MBC در نظر گرفته شد [۱۲].

جذب کادمیم

جهت به دست آوردن مقدار فلز کادمیم جذب شده توسط سویه‌های باکتریایی مرحله قبلی و انتخاب بهترین گونه جاذب فلز، هر یک از سویه‌های باکتریایی با غلظت نهایی نیم مک فارلند، به طور جداگانه با ۲۰ mL از محلول $Cd[NO_3]_2.4H_2O$ و غلظت ۲۵۰، ۳۵۰، ۵۰۰ mg/L به مدت ۲۴ ساعت و درpH اولیه خاک، در دمای ۳۵°C و دور همزن ۲۲۰ rpm مجاور سازی گردید. همزمان محیط کشت کنترلی نیز تهیه شده و پس از طی مدت مجاور سازی، سوسپانسیون‌های حاصله به مدت ۸ دقیقه و با دور ۱۰۰۰۰ rpm سانتریفوژ گردید. در نهایت میزان غلظت کادمیم در نمونه سانتریفیوژ شده با استفاده از دستگاه جذب اتمی [AAS] تعیین گردید [۱۳].

تست‌های افتراقی

جهت تشخیص سویه مقاوم به فلز کادمیم آزمون‌های cell shape، Gram reaction، Oxidase، Catalase، Lysin، KIA، TSI، SC، SIM، OF، MR، VP انجام پذیرفت و درنهایت سویه با بالاترین مقاومت و راندمان حذف مورد شناسایی قرار گرفت.

نتایج

نتایج حاصل از اندازه گیری دما، pH و میزان کادمیم خاک در نقاط نمونه برداری شده در سه شهرک مورد مطالعه در جدول۱ آورده شده است.

جدول ۲ تعداد سویه‌های رشد یافته جهت غربالگری و یافتن نمونه هایی با بالاترین ساز و کار مقاومتی در سه شهرک صنعتی مورد مطالعه و تعداد سویه‌های رشد یافته در محیط حاوی کادمیم با غلظت ۵۰۰ و ۷۵۰ mg/L را نشان می‌دهد.

جدول۱- مقادیر متوسط پارامترهای مورد اندازه گیری شده خاک مناطق مورد مطالعه

شهرک صنعتی			
متغیر	بوعلی	بهار	ویان
دما [°C]	۱۵	۱۲	۱۷
pH	۷/۵	۸ /۶	۷/۷
کادمیم mg/L	۰/۵۹	۰/۹۷	۰/۷۹

جدول۲- تعداد سویه‌های شمارش شده در کشت‌های اولیه و ثانویه

تعداد سویه			
شهرک	کشت اولیه	کشت ثانویه [۵۰۰mg/L]	کشت ثانویه [۷۵۰mg/L]
بوعلی	۱۳	-----	-----
ویان	۱۵	۲	۲
بهار	۱۴	۲	۲

بعد از کشت ثانویه و یافتن ٤ سویه مقاوم به غلظت ۷۵۰ mg/L کادمیم، تست MIC و MBC برای ٤ سویه به دست آمد که نتایج آن در جداول ۳ و ٤ آورده شده است.

حداکثر MIC به دست آمده ۱۲۵۰ mg/L بوده که مربوط به سویه‌های TCd_2 و TCd_4 می‌باشد و حداقل MIC مربوط به سویه‌های شماره TCd_1 و TCd_3 با ۱۰۵۰ mg/L بوده است. نتایج به دست آمده برای MBC نیز همین نتایج را نشان می‌دهد.

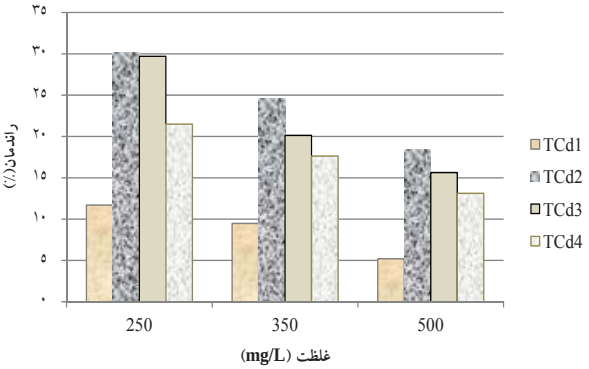
جدول۳- MIC سویه‌ها در مجاورت با غلظت‌های مختلف کادمیم

	غلظت [mg/L]									
سویه‌ها	۷۵۰	۸۵۰	۹۵۰	۱۰۵۰	۱۱۵۰	۱۲۵۰	۱۳۵۰	۱۴۵۰	۱۵۵۰	۱۶۵۰
TCd_1	+	+	+	+	–	–	–	–	–	–
TCd_2	+	+	+	+	+	–	–	–	–	–
TCd_3	+	+	+	+	–	–	–	–	–	–
TCd_4	+	+	+	+	+	–	–	–	–	–

جدول٤- MBC سویه‌ها در غلظت‌های مختلف کادمیم

	غلظت [mg/L]									
سویه‌ها	۷۵۰	۸۵۰	۹۵۰	۱۰۵۰	۱۱۵۰	۱۲۵۰	۱۳۵۰	۱۴۵۰	۱۵۵۰	۱۶۵۰
TCd_1	+	+	+	+	+	–	–	–	–	–
TCd_2	+	+	+	+	+	+	–	–	–	–
TCd_3	+	+	+	+	+	–	–	–	–	–
TCd_4	+	+	+	+	+	+	–	–	–	–

با توجه به نتایج حاصله از MIC و MBC سویه‌های TCd_2 و TCd_4 دارای بالاترین MIC بوده اند. برای بررسی کارایی جذب سویه‌ها در حذف کادمیم آزمایش جذب انجام گرفت که نتایج در نمودار ۱ نشان داده شده است.



نمودار۱- راندمان جذب سویه‌ها در مقادیر متفاوت غلظت
[زمان: ٢٤ ساعت، دما: ۳۵°C، pH: اولیه خاک]

بررسی جذب سویه‌ها در سه غلظت 500، 350، 250 mg/L نشان داد که سویه TCd_2 بالاترین میزان جذب را داشته است. از اینرو سویه TCd_2 با بالاترین میزان مقاومت و راندمان حذف به عنوان سویه مقاوم به فلز کادمیم انتخاب گردید و آزمون‌های افتراقی جهت تشخیص سویه انجام شد که نتایج آن در جدول ٤ مشاهده می‌گردد.

جدول ٤- آزمون‌های افتراقی سویه مقاوم استخراج شده

Character	TCd_2 strain
Cell shape	Coccobacill
Gram reaction	Gram [-]ve
TSI	A/A
KSA	A/A
SC	+
SIM	--+
Lysin	-
OF	++
Oxidase	-
Catalase	+
MR	-
VP	+
Genus	entrobacter

بحث

این پژوهش به منظور ارزیابی توان میکروارگانیسم‌ها در جذب فلزات سنگین و سمی انجام شد. افزایش بازده کاربرد میکروارگانیسم‌ها در حذف فلزات سنگین از محیط‌های طبیعی با تعیین میانگین حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد بسیار راه گشا بوده و امکان مدیریت بهتر و کارایی بالاتری را در این زمینه فراهم می‌سازد [١٤].

یکی از عوامل موثر در رشد باکتریها قرار گرفتن آنها در درجه حرارت مطلوب می‌باشد. بررسیهای انجام شده نشان داد که میانگین دمای خاک نمونه برداری ۱٤/٦ °C بوده است. این در حالیست که دمای مناسب رشد اکثر باکتریها ۳۷-۳۰ °C می‌باشد. تغییرات دمایی خارج از محدوده مورد نظر باعث قرار گرفتن باکتریها در شرایط نامناسب از لحاظ رشد خواهد شد، هرچند باکتریها می‌توانند در طی زمان خود را با شرایط نامناسب سازگار نمایند و به بقاء خود ادامه دهند. وقتی دما به بالای ۵۰ °C می‌رسد تغییرات نامطلوبی بر روی باکتریها بوجود می آورد، آنزیم‌های موثر بر رشد باکتری دناتوره و تخریب می‌شوند که در نهایت متابولیسم سلولی مختل شده و موجب مرگ باکتری می‌شود و زمانی که دما پایین می‌آید متابولیسم کم می‌شود در نتیجه باکتریها مجبور خواهند شد در شرایطی با متابولیسم کم به بقاء خود ادامه دهند. با این وجود طی مطالعات انجام شده، مشخص شده که جامعه میکروبی تحت تغییرات ساختاری و عملکردی به علت تغییرات دمایی در فصول مختلف خصوصا زمستان و بهار قرار می‌گیرد و این مطالعات نشان می‌دهد که تنفس میکروبی در خاک در فصول سرد که دما صفر درجه سانتیگراد می‌باشد بیشتر از فصول گرم بوده است و میزان باکتری‌ها و قارچ‌ها به علت آدپتاسیون به دمای پایین و کاربرد مواد کمپلکسی، سلولزو اسید وانیلیک نیز بیشتر می‌باشد [۱۵]. گروه‌های مختلف میکروارگانیسمی با وجود تاثیر مستقیمی که خود بر روی واکنش خاک دارند، محتاج به محیط‌های واکنشی متفاوت نیز می‌باشند. باکتری‌ها به اسیدیته خاک تا حدودی حساسیت نشان می‌دهند. چنانکه pH بین ٦ تا ۸ شرایط مناسب‌تری برای باکتری‌هاست. از نظر جمعیت میکروبی نیز باکتری‌ها در خاک‌های خنثی تا قلیایی ضعیف یافت می‌شوند. اندازه گیری‌ها از pH محیط [جدول ۱] نشان داد که شهرک بوعلی، بهار و ویان به ترتیب دارای pH ۷/۵۱، ۸/٦٤ و۷/۷۳ بوده اند که نشان می‌دهد باکتری‌ها در یک محیطی خنثی با قلیائیت اندک رشد یافته اند. pH نامناسب حداقل به دو علت تنفس سلول را تحت تاثیر قرار می‌دهد، یکی اختلال در عمل آنزیم‌ها و دیگری اختلال در انتقال مواد مغذی به داخل سلول. در صورت تغییرات شدید pH محیط، pH درون سلولی همیشه ثابت و در حدود pH خنثی باقی نمی‌ماند و غشا سیتوپلاسمی در تنظیم pH و حفظ تعادل دچار مشکل می‌گردد. در مطالعات انجام گرفته توسط Rousk و همکارانش در سال ۲۰۱۰ در سوئد که به بررسی رابطه pH و رشد باکتریها و قارچ‌ها در خاک پرداختند دو مکانسیم عدم رشد باکتری‌ها در pH نامناسب را یکی تعامل نامناسب بین گروه‌های تجزیه شونده و دیگری برهم خوردن تعادل pH داخل سلولی عنوان کرده‌اند [۱٦]. نتایج به دست آمده از میزان فلز کادمیم خاک در طول موج ۲۲٦/۸ با دستگاه جذب اتمی در شهرک‌های بوعلی، بهار و ویان به ترتیب mg/L ۰/۵۹، ۰/۹۷، ۰/۷۹ بوده است. طبق گزارش USEPA نمونه غلظت فلز در خاک آلوده نشده mg/kg ۰/۵ ولی حداکثر غلظت قابل قبول این فلز در خاک‌های قابل کشت mg/kg ۲۰ می‌باشد [۱۷]. وجود این مقادیر فلز در خاک این شهرک‌ها به دلیل تخلیه پساب خام صنایع در طول زمان و خاصیت تجمع پذیری این فلز می‌باشد [۱۸].

در کشت اولیه بر روی محیط آگار از نمونه‌های خاک جمع آوری شده با غلظت کادمیم بیش از حد استاندارد، مجموعا ٤۲ سویه بر روی محیط کشت رشد یافتند که به تفکیک مشاهده گردید [جدول۲]. هنگامی که غلظت کادمیم در محیط کشت به mg/L ۵۰۰ و ۷۵۰ رسید تعداد سویه‌ها به ٤ عدد رسید، به نحوی که با افزایش غلظت تعداد سویه‌ها کاهش یافت. از ٤سویه، دو سویه از شهرک ویان و دو از شهرک بهار بوده است که نتایج حاکی از آن است که این سویه‌های مقاوم مربوط به دو شهرکی بوده‌اند که دارای میزان کادمیم بیشتری در خاک بوده اند، در نتیجه میزان آداپتاسیون محیطی باکتری‌ها در این مناطق بیشتر بوده است.

نتایج حاصل از بررسی MIC و MBC سویه‌ها که در محدوده mg/L ۷۵۰ تا ۱٦۵۰ انجام پذیرفت نشان داد که سویه‌های TCd_2 و TCd_4 با MIC و MBC، به ترتیب mg/L ۱۲۵۰ و ۱۳۵۰ دارای بالاترین مقاومت در برابر کادمیم بودند. این در حالیست که در مطالعاتی که توسط عبدل مالیک و همکارانش در سال ۲۰۰٦ در هند جهت شناسایی باکتریهای مقاوم از خاک‌های پذیرنده فاضلاب کادمیم انجام پذیرفت حداکثر MIC، [mg/L] ۲۰۰ حاصل گردید [۱۹]. نتایج حاصل از میزان کمی جذب فلز کادمیم با ٤ سویه مقاوم نیز نشان داد که سویه TCd_2 در شرایط برابر با سایر سویه‌ها توانست کادمیم mg/L ۲۵۰ را به میزان mg/L ۷۵/٦ کاهش دهد که درصد جذب آن ۳۰/۲ می‌باشد که بالاترین میزان حذف را در بین ٤ سویه داشته است. مطالعات انجام گرفته توسط تری و همکارانش در سال ۲۰۰۱ بر روی جذب کادمیم و مس توسط Scenedesmus abundans نشان داد که در شرایط بهینه میزان جذب کادمیم ۳٤/٤ درصد بوده است [۲۰]. همچنین مشخص گردید که این سویه از خاک شهرک ویان بوده است.

با توجه به قدمت بیشتر شهرک ویان نسبت به بهار [شهرک ویان در سال ۱۳۶۸ بهره برداری گردید در حالی که شهرک بهار در سال ۱۳۸۵ مورد بهره‌برداری قرار گرفته است] باعث تخلیه طولانی مدت پساب صنایع شهرک ویان به خاک‌های آن منطقه و تجمع فلزات در طول زمان شده است. در نتیجه با گذشت زمان و تماس طولانی مدت باکتری‌ها با فلز، مکانیسم‌های مقاومتی در باکتری‌ها شکل می‌گیرد [۲۱]. با توجه به بالاتر بودن مقاومت و جذب در سویه TCd_2، آزمون‌های تفریقی جهت تشخیص این سویه نشان داد که این سویه متعلق به خانواده انتروباکتریاسه، جنس انتروباکتر می‌باشد. انتروباکتریاسه شایع ترین گروه باسیل‌های گرم منفی می‌باشند [۲۲]. باکتری‌های گرم منفی به دلیل فرم کشیده و بار منفی سطحی LPS و ساختار، در جذب کادمیم بهتر عمل می‌نمایند که این موضوع با تحقیقات دیگر نیز تطابق دارد [۲۲]. در مطالعه ای که بر روی باکتریهای مقاوم به فلزات در خاک‌ها و معادن آلوده به فلزات سنگین در سال ۲۰۰۴ توسط kozdroj و همکارانش انجام گردید، کلیه باکتریهای مقاوم به کادمیوم از گروه گرم منفی بوده‌اند [۲۴]. مطالعات انجام شده توسط Bahig EI-Deeb که به بررسی نقش پلاسمید باکتریها در تجمع فلزات سنگین پرداخت، نشان داد که انتروباکتر قادر به جذب فلزات سنگین از جمله کادمیوم می‌باشد [۲۵]. همچنین نتایج بررسی‌های Chang و همکاران نیز نشان داد که یکی از سویه‌های مقاوم به فلز کادمیوم انتروباکتر می‌باشد که علاوه بر تحمل غلظت های بالا، قادر به جذب این فلز نیز می‌باشد[۲۶].

نتیجه گیری

نتایج این بررسی نشان داد بیشترین میزان کادمیوم با mg/L ۰/۹۷ از شهرک ویان و سپس بهار با mg/L ۰/۷۹ بوده است. تعداد سویه‌های بدست آمده در کشت اولیه در محیطی با میانگین غلظت mg/L ۰/۷۸فلز، ۴۲ سویه بوده است که با افزایش میزان غلظت کادمیوم این تعداد به ٤ سویه کاهش یافت. بالاترین میزان MIC و MBC در بین ٤ سویه مقاوم برای سویه TCd_2 و TCd_4 با میزان mg/L ۱۲۵۰و ۱۳۵۰ تعیین گردیده است، ولی بررسی بالاترین میزان جذب فلز توسط این دو سویه حاکی از جذب بالای TCd_2 با میزان جذب ۳۰٪ بوده است و نتایج این آزمایشات نشان داد که این سویه متعلق به خانواده انتروباکتریاسه و جنس انتروباکتر بوده است.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان نامه کارشناسی ارشد بوده و بدینوسیله از حمایت مالی معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی همدان، شرکت شهرک‌های صنعتی استان همدان و حمایت‌های تخصصی و تجهیزاتی آزمایشگاههای دانشکده بهداشت تشکر و قدردانی می‌گردد.

REFERENCES

1. Asbchin AS, Andres Y, Malekzdeh F. Biosorption and Optimization of Condition Uptake of Cesium by Bacterium. Water&Wastwater. 2011; 22 (4): 50-56.[In Persian].

2. Velasquez L, Dussan J. Biosorption and bioaccumulation of heavy metals on dead and living biomass of Bacillus sphaericus. Journal of hazardous materials. 2009;167(1) :713-6.

3. Soltaninejad SH, Emtiazi G, Mokhtari ST. Uptake of heavy metals [lead and zinc] by bacterial extracellular polymers. Journal of Microbial Biotechnology, Islamic Azad University. 2010; 2(7):23-8 [In Persian].

4. Sobolev D, Begonia M. Effects of heavy metal contamination upon soil microbes: lead-induced changes in general and denitrifying microbial communities as evidenced by molecular markers. International journal of environmental research and public health. 2008; 5(5):450-6.

5. Raja CE, Anbazhagan K, Selvam GS. Isolation and characterization of a metal-resistant Pseudomonas aeruginosa strain. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 2006; 22(6):577-85.

6. Dayani M, Mohammadi J, Naderi M. Geostatistical Analysis of Pb, Zn and Cd concentration in soil of Sepahanshahr suburb [south of Esfahan]. Journal of water and soil. 2009; 23(4): 67-76.
7. Tahmourespour A KR. Adaptability of Bacterical Isolates to Heavy Metals in Industrial Wastwater. Water&Wastwater. 2007;18(61):53-9.[In Persian].
8. Jalali M, Khanboluki G. Redistribution of zinc, cadmium, and lead among soil fractions in a sandy calcareous soil due to application of poultry litter. Environmental Monitoring and Assessment. 2008;136(1):327-335.[In Persian].
9. Jacob H, Dane G, Clarbe Topp. Method of Soil Analysis .part 4 [physical method]. Soil Science Society of America,Inc. Madison,Wisconsin,USA; 2002.
10. Congeevaram S, Dhanarani S, Park J, Dexilin M, Thamaraiselvi K. Biosorption of chromium and nickel by heavy metal resistant fungal and bacterial isolates. Journal of hazardous materials. 2007;146(1):270-7.
11. Gabr RM, Hassan SHA, Shoreit AAM. Biosorption of lead and nickel by living and non-living cells of Pseudomonas aeruginosa ASU 6a. International Biodeterioration & Biodegradation. 2008;62(2):195-203.
12. Yu J, Lei J, Yu H, Cai X, Zou G. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of Scutellaria barbata. Phytochemistry. 2004;65 (7):881-4.
13. Lu WB, Shi JJ, Wang CH, Chang JS. Biosorption of lead, copper and cadmium by an indigenous isolate Enterobacter sp. J1 possessing high heavy-metal resistance. Journal of hazardous materials. 2006;134(1):80-86.
14. Hoodchi M, Tahmourespour A, Azadani N A. Determine the threshold of bacteria, lead, zinc, cadmium in industrial wastewater. Ecology 2010; 56(36): 75-86.[In Persian].
15. Lipson D, Schadt C, Schmidt S. Changes in soil microbial community structure and function in an alpine dry meadow following spring snow melt. Microbial Ecology 2002; 43(3): 307-14
16. Rousk J, Brookes PC, Baath E. Investigating the mechanisms for the opposing pH relationships of fungal and bacterial growth in soil. Soil Biology and Biochemistry 2010; 42(6): 926-34.
17. Pais I, Jones Jr JB. The handbook of trace elements: CRC Press; 1997.
18. Morin S, Duong TT, Herlory O, Feurtet-Mazel As, Coste M. Cadmium toxicity and bioaccumulation in freshwater biofilms. Archives of environmental contamination and toxicology. 2008; 54(2): 173-86.
19. Ansari MI, Malik A. Biosorption of nickel and cadmium by metal resistant bacterial isolates from agricultural soil irrigated with industrial wastewater. Bioresource technology. 2007; 98[16]: 3149-53.
20. Terry PA, Stone W. Biosorption of cadmium and copper contaminated water by Scenedesmus abundans. Chemosphere. 2002; 47(3): 249-55.
21. Kozdroj J, van Elsas JD. Response of the bacterial community to root exudates in soil polluted with heavy metals assessed by molecular and cultural approaches. Soil Biology and Biochemistry. 2000; 32(10):1405-17.
22. Jawetz E. Enterobacteriaceae In: Brooks GF, Butel JS, Morse SA eds. Medical Microbiology. Stanford-Connecticut. Appleton and Lange; 2004.
23 Kafilzadeh s, Abvalahrar H, Karegar, qodsi. Effect of cadmium toxicity and determine the range of resistance / tolerance to bacterial species detected in the river water and sediment study Choir Ray Fars Province .Journal of Public Health and Institute of Health Research. 2010; 8(1): 69-80. .[In Persian].
24. Piotrowska-Seget Z, Cycoń M, Kozdroj J. Metal-tolerant bacteria occurring in heavily polluted soil and mine spoil. Applied Soil Ecology 2005; 28(3): 237-46.
25. El-Deeb B. Plasmid Mediated tolerance and Removal of Heavy Metals by Enterobacter sp. American Journal of Biochemistry and Biotechnology 2009; 5[1]: 47.
26. Lu W-B, Shi J-J, Wang C-H, Chang J-S. Biosorption of lead, copper and cadmium by an indigenous isolate Enterobacter sp. J1 possessing high heavy-metal resistance. Journal of Hazardous Materials 2006; 134[1]: 80-6.