Journal of Microbial World
Volume 14, No. 1, May 2021

Short Communication

Biosorption of arsenic in laboratory condition from municipal wastewaters treatment plants as well as Polyacrylic effluent in Isfahan

Neda Heidari Khoii [1], Monir Doudi [2]

[1]MS Student, Department of Microbiology, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran.
[2]Associatet Professor, Department of Microbiology, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran.

Abstract

Pollution of the invironment with metals is a serious threatment to human health and the environments. The purpose of this study of arsenic biosorption was from several industrial effluents. In this analytical study samples were collected from two wastewater treatment plants of ShahinShahr (1) and Polyacrylic Company (2). Temprature, pH, BOD, COD, and arsenic were measured. Heterotrophic bacteria were counted and arsenic-resistant bacteria were isolated by PHG II medium and evaluated for resistance to several antibiotics. Agar diffusion method (MIC) and (MBC) were used bacterial determinationand for colony-PCR. The concertrations of arsenic in effluents (1) and (2) were 0.730 and 1.895 mg/L, respectively and the pH of both effluents was neutral. The effluent BOD and COD effluent (2)was within the standard range, but the BOD and COD effluent (1) was somewhat higher. The number of heterotrophic bacteria in effluent (1) was higher than effluent (2), but there was no significant difference between these two effluents. Arsenic-resistant isolates in both effluents were Bacillus syphenis OPL, Pseudomonas aeruginosa IAUF-11ZBK, Stenotrophomonasmaltophilia IR-Isfahan (G) and 5633. Pseudomonas aeruginosaZBK showed the highest sensitivity to antibiotics, which was able to biosorption of arsenic from municipal wastewater up to 1.4 mg/L in vitro.Pseudomonas aeruginosa strain ZBK had a good ability to biosorption of arsenic and low resistance to antibiotics. This strain is recommended for bioabsorption of arsenic from effluents.

Keywords: Wastewater, Arsenic resistant, Biosorption, Colony-PCR, MIC.

Received: 9 September 2020 Revised: 10 January 2021 Accepted: 13 March 2021

Correspondence to: Monir Doudi
Tel: +98 31-37420134-5
E-mail: Doudi@iaufala.ac.ir
Journal of Microbial World 2021, 14(1): 59-69
DIO: 10.30495/jmw.2021.690440

Copyright © 2019, This article is published in Journal of Microbial World as an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License. Non-commercial, unrestricted use, distribution, and reproduction of this article is permitted in any medium, provided the original work is properly cited.

مجله دنیای میکروب‌ها
سال چهاردهم شماره اول (پیاپی٤٦) بهار ١٤٠٠
صفحات ٦٩-٥٩

Short Communication

جذب زیستی آرسنیک در شرایط آزمایشگاهی از فاضلاب‌های شهری تصفیه خانه شاهین‌شهر و شرکت پلی‌اکریل در اصفهان

ندا حیدری خویی[1]، منیر دودی [2*]

[1]دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان، فلاورجان، اصفهان، ایران.
[2]دانشیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان، فلاورجان، اصفهان، ایران.

چکیده

آلودگی محیط زیست با فلزات تهدیدی جدی برای سلامت انسان و محیط است. هدف از این بررسی جذب زیستی آرسنیک از چندین فاضلاب صنعتی بود. در این مطالعه تحلیلی نمونه‌گیری از تصفیه خانه شاهین‌شهر(١) و شرکت پلی‌اکریل (٢) انجام شد. پس از اندازه‌گیری فاکتورهای دما، pH، BOD، COD و آرسنیک از پساب‌ها شمارش باکتری‌های هتروتروف انجام شد و باکتری‌های مقاوم به آرسنیک در محیط PHGII جداسازی و آنتی‌بیوگرام شدند. جهت تعیین (MIC) و (MBC) از روش کشت سطحی و برای شناسایی باکتری‌ها از کلنی-PCR استفاده شد. بمنظور مقایسه میانگین جمعیت هتروتروف‌ها از آنالیز آماری آنوا و نرم افزار SPSS 19 استفاده گردید. مقدار آرسنیک در پساب‌های (١) و (٢) به ترتیب ٠/٠٧٣ mg/L و ١/٨٩٥ و pH هر دو پساب خنثی بود. BOD و COD پساب (٢) در محدوده مشابه پساب‌های صنعتی ولی پساب (١) برای BOD و COD بترتیب در حدود ٤٠٠ و ٢٧٠٠ واحد بالاتر بود. تعداد هتروتروف‌ها در پساب (١) بیشتر از (٢)، اما تفاوت معنی داری مشاهده نشد. جدایه‌های مقاوم به آرسنیک در هر دو پساب مربوط به باسیلوس سفنسیس OPL، سودوموناس آئروژینوزا IAUF-11ZBK، استنوتروفوموناس مالتوفیلیا IR-Isfahan (G) و 5633 بودند. سودوموناس آئروژینوزا ZBK بیشترین حساسیت را نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها نشان داد و قادر به جذب زیستی آرسنیک تا حد ١/٤ ppm در شرایط آزمایشگاهی بود. سودوموناس آئروژینوزا ZBK دارای قابلیت زیادی برای جذب زیستی آرسنیک و در عین حال مقاومت پایینی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها داشت. این سویه جهت جذب زیستی آرسنیک از فاضلاب‌ها پیشنهاد می‌شود.

واژگان کلیدی: فاضلاب، مقاومت به آرسنیک، جذب زیستی، کلنی-PCR، MIC.

دریافت مقاله: ١٣٩٩/٦/١٩ ویرایش مقاله: ١٣٩٩/١٠/٢١ پذیرش مقاله: ١٣٩٩/١٢/٢٣

مقدمه

آلودگی فلزی یک مشکل جهانی است، میزان فلزات در کلیه محیط‌ها از قبیل هوا، خاک و آب رو به افزایش است و در برخی موارد به حد سمی می‌رسد که یکی از دلایل آن انتشار آلودگی از منابع صنعتی به محیط زیست است. اصطلاح فلز سنگین که قبلاً به فلزها یا شبه‌فلزهای دارای اثرات زیست‌محیطی مانند سرب، جیوه و کادمیوم گفته می‌شد که چگالی آن‌ها بیشتر از آهن بود اما امروزه همه فلزها و شبه‌فلزهای آسیب‌رسان با هر چگالی مانند آرسنیک را در بر می‌گیرد (١). تجمع فلزات سنگین در بافت‌ها موجب کاهش

*) آدرس برای مکاتبه: دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان، دانشکده علوم زیستی، گروه میکروبیولوژی.
تلفن: ٠٣١-٣٧٤٢٠١٣٤ پست الکترونیک: Doudi@iaufala.ac.ir

حقوق نویسندگان محفوظ است. این مقاله با دسترسی آزاد و تحت مجوز مالکیت خلاقانه (http://creativecommons.org/licenses/bync/4.0/) در فصلنامه دنیای میکروب‌ها منتشر شده است. هرگونه استفاده غیرتجاری فقط با استناد و ارجاع به اثر اصلی مجاز است.

رشد، عوارضی از قبیل کمبود فسفر خون، آسیب‌های مغزی و کلیوی، سرطان، بیماری‌های قلبی عروقی و آسیب به سیستم اعصاب مرکزی خواهد شد (۲). آرسنیک شبه فلزی سمی است که به دو فرم آلی و معدنی وجود دارد. این شبه فلز به طور گسترده‌ای در آب، خاک و هوا وجود دارد. شایع‌ترین اشکال معدنی آرستیک شامل آرسنیت سه ظرفیتی و آرسنات پنج ظرفیتی است. فلزات سنگین سمیت خود را برای ارگانیسم‌های زنده در فرم یونی و متحرک ایجاد می‌کند آرسنیک نیز عنصری است که در محیط زیست یافت می‌شود که می‌تواند از طریق ترکیب فرآیندهای طبیعی مانند هوازدگی و فرسایش، فعالیت زیستی و فوران آتشفشانی و همچنین از طریق فعالیت‌های انسانی تحریک گردد اگرچه بیشتر مشکلات محیطی آرسنیک در نتیجه تحرک در اثر شرایط طبیعی است، اما تأثیر فعالیت‌های انسانی مانند معدن‌کاری، استفاده از سوخت‌های فسیلی، استفاده از آفت‌کش‌های آرسنیکی، علف‌کش‌ها، مواد خشک کننده محصولات و افزودنی‌های آرسنیکی در علوفه دام‌ها نیز قابل توجه است (۳و٤). فرم سه ظرفیتی آرسنیک سمی تر از فرم پنج ظرفیتی آن می‌باشد. فرم سه ظرفیتی باعث اختلال در عملکرد بسیاری از پروتین‌ها از طریق واکنش با گروه سولفیدریل آن‌ها می‌شود، در حالی که فرم پنج ظرفیتی آن آنالوگ مولکولی فسفات است که منجر به مهار فسفریلاسیون اکسیداتیو و نهایتاً آسیب به سیستم تولید انرژی می‌شود (۳). آرسنیک در گیاهان نیز اثر سمی دارد و به راحتی توسط سلول‌های ریشه گیاهان گرفته می‌شود و باعث تخریب متابولیسم در گیاهان حساس می‌گردد (۵). آژانس بین المللی سرطان نیز آرسنیک را به عنوان یک ماده سرطان زا معرفی نموده است. بنابراین این عنصر به عنوان یک تهدید جدی برای بهداشت عمومی در سراسر جهان مورد توجه بسیار قرار گرفته است (٦).

بسیاری از راهبردهای فیزیکی و شیمیایی مانند رسوب با مواد شیمیایی، فیلتراسیون، تکنولوژی غشا، تبادل یونی، تیمار الکتروشیمیایی اکسیداسیون/ احیا برای حذف فلزات سنگین بکار برده می‌شوند. تصفیه پساب‌های حاوی این فلزات با روش‌های فیزیکی و یا شیمیایی به دلیل گران بودن و یا عدم کارایی با مشکل همراه است. از این رو زیست پالایی به استفاده از میکروارگانیسم‌ها، گیاهان و توده‌های زیستی برای سم زدایی و یا کاهش آلاینده‌های زیست محیطی گفته می‌شود که در سال‌های اخیر برای پاکسازی محیط‌های آلوده مورد توجه قرار گرفته است (۷و۸و۹). میکروارگانیسم‌هایی که می‌توانند در غلظت‌های بالای فلزات رشد کنند برای پاکسازی بسیار مناسب هستند زیرا باعث تغییر حالت اکسیداسیون و احیا و یا تثبیت فلز می‌شوند (۱۰).

آنتی‌بیوتیک‌ها ابزار قدرتمندی در کنترل باکتری‌های پاتوژن هستند، اما ظهور مقاومت آنتی بیوتیکی در باکتری‌ها مشکلات عمده‌ای ایجاد نموده و از قدرت این ابزار تا حد زیادی کاسته است (۱۱و۱۲). شاخص‌های ژنتیکی مقاومت به فلزات سنگین و آنتی‌بیوتیک‌ها اغلب در کنار یکدیگر روی پلاسمیدها و ترانسپوزون‌ها قرار گرفته‌اند (۱۲). به همین دلیل حضور فلز سنگین در محیط به عنوان یک آلاینده نه تنها باعث افزایش باکتری‌های مقاوم به فلز بلکه باعث افزایش مقاومت آنتی‌بیوتیکی نیز می‌گردد (۱۳). راجا (Raja) و همکاران در سال ۲۰۰۹ (۱۳) چهار جدایه مقاوم به فلز و آنتی‌بیوتیک از گونه‌های *پروتئوس ولگاریس*، *سودوموناس آئروجینوسا* و *آسینتوباکتر ردیورزیستنس* را از فاضلاب جداسازی نمودند. این جدایه‌ها به فلزات جیوه، آرسنیک، کروم، کادمیوم، سرب و نیکل مقاوم بودند. مقاومت هم زمان چندگانه فلزی این جدایه‌ها به آنتی‌بیوتیک‌ها نیز بررسی شد و مشاهده شد که ارتباط مستقیم مقاومت به فلز با مقاومت به آنتی‌بیوتیک وجود داشت. چنیا و جاکوبس (Chenia and Jacobs) در سال۲۰۱۷ (١٤)، میزان مقاومت به فلزات سنگین و آنتی‌بیوتیک را در ٤٢ باکتری گرم منفی که از یک سیستم پرورش ماهی تیلاپیا جداسازی شده بودند، جهت شناسایی ارتباط احتمالی بین این فتوتیپ‌ها مورد بررسی قرار دادند. ایشان همبستگی مثبتی بین الگوی مقاومتی فلزات سنگین مس، کروم، جیوه و آرسنیک با مقاومت به اریترومایسین مشاهده کردند. هدف از مطالعه حاضر جداسازی باکتری‌های مقاوم به آرسنیک از نمونه‌های فاضلاب شهری، شناسایی مولکولی پس از بررسی مقاومت آن‌ها نسبت به چند

آنتی‌بیوتیک رایج در کشور و ارزیابی قدرت جذب زیستی آرسنیک توسط جدایه‌های مقاوم در شرایط آزمایشگاهی بود.

مواد و روش‌ها

الف) نمونه‌برداری: در این مطالعه تحلیلی نمونه برداری از فاضلاب ورودی فاز ۲ تصفیه خانه فاضلاب شاهین‌شهر و فاضلاب شرکت پلی‌اکریل اصفهان انجام شد. نمونه‌برداری در بطری‌های دهان گشاد شیشه‌ای یا پلاستیکی انعطاف پذیر یک لیتری استریل انجام گردید. دربطری تا زمان آزمون بر روی نمونه‌ها باز نشد و حدود ۲/۵ سانتی متر از سر ظرف (به منظور قابلیت مخلوط کردن نمونه قبل از استفاده) خالی گذاشته شد. نمونه‌ها روی یخ به آزمایشگاه منتقل گردید و در مدت ۵ الی ٦ ساعت آزمون بر روی آن‌ها انجام گرفت (۱۵).

ب) اندازه‌گیری پارامترهای فیزیکوشیمیایی و زیستی نمونه‌های پساب: ابتدا دمای نمونه‌ها با استفاده از دماسنج جیوه‌ایی و pH آن‌ها با استفاده از دستگاه pH متر (Metrohm 827, Swiss) اندازه‌گیری شد. سپس پارامترهای BOD و COD هر نمونه با روش‌های استاندارد سنجش شد (١٦).

ج) اندازه گیری میزان آرسنیک در نمونه‌های پساب: پس از مخلوط کردن قسمت‌های مختلف هر نمونه، مقدار ۵۰ تا ۱۰۰ میلی‌لیتر از آن‌ها به یک بالون ۲۰۰ میلی‌لیتری انتقال داده شد. مقدار ۵ میلی لیتر اسید نیتریک غلیظ به نمونه اضافه گردید و بر روی حمام به آرامی تبخیر شد. عمل هضم تا رسیدن به محلول شفاف ادامه داده شد و اجازه داده نشد که نمونه در طول مرحله هضم خشک گردد. هنگامی که میزان نمونه به ۱۰ الی ۲۰ میلی‌لیتر تقلیل یافت، جدار بالون با آب مقطر شستشو داده شد و نمونه به حجم رسانده شد. سپس میزان آرسنیک بر حسب میلی‌گرم بر لیتر (ppm) با روش جذب اتمی توسط دستگاه (ICP Nikon,Japan) تعیین شد (۱۷).

د) آنالیز میکروبی و جداسازی باکتری‌های مقاوم به آرسنیک: شمارش تعداد باکتری‌های هتروتروف موجود در پساب‌ها به روش پورپلیت انجام گرفت. به منظور جداسازی باکتری‌های مقاوم به آرسنیک از روش کشت سطحی در محیط کشت PHG II حاوی فلز استفاده شد. ترکیبات این محیط شامل: پپتون: ٤ گرم، عصاره مخمر: ۱ گرم، گلوکز: ۲ گرم، آگار: ۱۵ گرم بودند.پس از حل کردن ترکیبات یادشده در ۱۰۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر دیونیزه ۱۵ دقیقه در ۱۲۱ درجه سلسیوس در اتوکلاو استریل شد. هنگامی که حرارت محیط کشت در حدود ۵۵ درجه سلسیوس رسید، محلول نمک آرسنات سدیم استریل شده با فیلتر ۰/٤۵ میکرومتری به محیط کشت افزوده شد تا غلظت نمک در محیط کشت به ۱ میلی‌مولار رسید. سپس pH محیط کشت در محدوده ۷ تنظیم شد. در این مرحله ۰/۵– ۰/۱ میلی‌لیتر از رقت‌های مختلف پساب از 10^{-1} تا 10^{-6} با سمپلر استریل در سطح محیط کشت فلزدار PHG II اضافه شد و با میله‌ی شیشه‌ای سرکج استریل در سطح پلیت پخش گردید و در دمای ۳۰ درجه سلسیوس به مدت ۲ تا ۵ روز گرمخانه‌گذاری شد. پس از رشد کلنی‌های مقاوم، هر کلنی در لوله‌های حاوی محیط کشت PHG II براث با همان غلظت فلز محیط اولیه (۱ میلی‌مولار) غنی سازی و در محیط کشت PHG II آگار خالص‌سازی شد (۱۸). کلنی‌های خالص شده به کمک رنگ آمیزی گرم مورد بررسی اولیه میکروسکوپی از لحاظ مرفولوژی، آرایش و واکنش گرم قرار گرفت. پس از این مرحله به منظور نگهداری باکتری‌ها، محیط PHG II آگار حاوی فلز به صورت شیب دار تهیه شد و کلنی‌ها بر روی آن کشت داده شد. پس از ٢٤ ساعت گرماگذاری در دمای ۳۰ درجه سلسیوس و رشد باکتری‌ها، محیط‌های کشت به یخچال ٤ درجه سلسیوس منتقل و نگهداری گردید (۱۹و۲۰).

ه) تعیین حداقل غلظت ممانعت کننده رشد آرسنیک: به منظور تعیین MIC آرسنیک بر روی باکتری‌های مقاوم جداسازی شده از روش کشت سطحی استفاده شد. برای این هدف پلیت‌های حاوی محیط کشت PHG II آگار با غلظت‌های مختلف سدیم ارسنات (۱، ۲، ٤، ۸، ١٦ و ۳۲ میلی‌مولار) به ازای هر باکتری با ۳ تکرار تهیه شد به طوری که هر پلیت حاوی یک غلظت معین از فلز بود. سپس کلنی‌های مقاوم به صورت کشت سطحی کشت داده شد (۲۱) و در نهایت پلیت‌ها به مدت ۲ روز در ۳۰ درجه سلسیوس قرار داده شد. پس از طی مدت ٢٤ ساعت پلیت‌ها بررسی شده و بر اساس حداقل غلظتی از فلز که از رشد

باکتری ممانعت کرده بود، MIC تعیین گردید (۲۱).

و) تعیین حساسیت باکتری‌ها به آنتی‌بیوتیک‌ها: با استفاده از ۱۶ آنتی‌بیوتیک متداول در کشور، آزمون انتشارِ دیسکِ بر روی باکتری‌هایی که بالاترین مقاومت به آرسنیک را نشان دادند انجام شد و بر اساس قطر هاله عدم رشد در محیط کشت مولر هینتون آگار سنجیده شد. قطر هاله ها با خط کش میلی متری اندازه‌گیری گردید (۱۳).

ز) شناسایی مولکولی باکتری های مقاوم به آرسنیک: به منظور شناسایی مولکولی باکتری‌ها با روش کلنی- PCR یک کلنی از باکتری به مخلوط PCR اضافه شد و برای لیز سلول‌ها به مدت یک دقیقه در دمای جوش قرار داده شد و توالی ژن 16S rRNA در مخلوط با استفاده از پرایمرهای یونیورسال به طول ۱۸ نوکلئوتید به نام‌های:

OR BUN;(3'-TATGTACACACCGCCCGT-5')
OF BUN;(3'-CGCATTTCACCGCTACAC-5')
IR BUN;(3'-ACACACGTGCTACAATGG-5')
IF BUN; (3'-TAAACCACATGCTCCACC-5')

تکثیر گردید. توالی‌های تکثیر شده در سایت NCBI به کمک سرور BLAST مورد ارزیابی قرار گرفت. در نهایت بر اساس هومولوژی ۹۵ تا ۹۹ درصد، گونه باکتری شناسایی شد (۲۲).

ح) تعیین میزان جذب آرسنیک توسط باکتری‌های مقاوم جدا شده در شرایط آزمایشگاهی: میزان جذب این فلز توسط ٤ جدایه باکتریایی که بیشترین MIC از خود نشان داده بودند مورد سنجش قرار گرفت. ابتدا باکتری‌های مورد نظر در محیط کشت مولرهینتون براث در دمای ۳۰ درجه سلسیوس و دور 200 rpm تا زمان رسیدن به کدورت استاندارد نیم مک فارلند ($۱/۵ \times ۱۰^{۶}$ cfu/ml) رشد داده شدند. سپس ۱۰ میکرولیتر از کشت هر باکتری به پلیت نوترینت آگار (Scharlu, Spain) به عنوان شاهد و ۱۰ میکرولیتر به پلیت حاوی بالاترین غلظتی از آرسنیک که باکتری مورد آزمون در آن رشد کرده بود، منتقل شد و پلیت‌ها در دمای ۳۰ درجه سلسیوس به مدت ۲ روز گرماگذاری شدند. سپس چند کلنی ازهر باکتری به محیط کشت مولرهینتون براث (Merck, Germany) بدون فلز منتقل شد و در دمای ۳۰ درجه سلسیوس و دور ۲۰۰rpm تا زمان رسیدن به کدورت استاندارد نیم مک فارلند گرماگذاری شد. در مرحله بعد نمک آرسنات سدیم در غلظت ۲/۵ میلی‌مولار به کشت هر باکتری اضافه شد. پس از اضافه نمودن محلول آرسنیک، در زمان‌های مختلف (۰، ٤٠، ٨٠، ١٢٠ و ١٦٠دقیقه) مقدار ۱ میلی‌لیتراز این کشت به مدت ۸ دقیقه در دور ۱۰۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شد. سپس رسوب باکتری جداسازی و پس از شستشو با سرم فیزیولوژی و سانتریفیوژ مجدد برای محاسبه وزن بیومس باکتری نگه داشته شد. در مرحله بعد باکتری‌های رسوب کرده در دمای ٦٠ درجه سلسیوس به مدت ٦ ساعت خشک گردیدند و وزن خشک به عنوان بیومس باکتری در نظر گرفته شد (۲۱و۱۹). همچنین مقدار آرسنیک ذخیره شده در بیومس توسط جذب اتمی محاسبه گردید (۱۷).

ط) آنالیز آماری داده‌ها: به منظور مقایسه میانگین جمعیت باکتری‌های هتروتروف و مقاوم جداسازی شده از آنالیز آماری آنوا با نسخه نوزدهم نرم افزار SPSS استفاده شد. همچنین از نرم افزار Excel برای مقایسه نتایج و تعیین فاصله اطمینان توافقی با خطای استاندارد استفاده گردید. مرز معنی داری در $P < ۰/۰۵$ قرار داده شد.

یافته‌ها

الف) ویژگی های فیزیکی و شیمیایی نمونه‌های پساب : نتایج اندازه‌گیری پارامترهای فیزیکوشیمیایی و همچنین غلظت آرسنیک در جدول ۱ ارائه شده است.

ب) باکتری‌های هتروتروف و جدایه‌های باکتریایی مقاوم به آرسنیک: میانگین جمعیت باکتری‌های هتروتروف در پساب تصفیه خانه فاضلاب شاهین‌شهر و پساب کارخانه پلی‌اکریل اصفهان به ترتیب برابر با ۵×۱۰^{۱۲} و $٤/٤ \times ۱۰^{۱٤}$ cfu/ml بود و تفاوت معنی داری در میانگین جمعیت باکتری‌های دو پساب مشاهده نشد($P<۰/۰۵$). به طور کلی ٤ جدایه باکتریایی (As1, As2, As3, As4) مقاوم به آرسنیک از دو پساب جداسازی شدند، که مشخصات آن‌ها همراه با نتایج حاصل از بررسی میزان مقاومت آن‌ها به آرسنیک بر اساس حداقل غلظت

مهارکننده رشد (MIC) و حداقل غلظت کشنده(MBC) در جدول ۲ ارائه شده است. بالاترین میزان MIC و MBC متعلق به جدایه As3 به ترتیب برابر با ۱۴ و ۱۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به دست آمد.

ج) شناسایی مولکولی جدایه‌های مقاوم به آرسنیک: تکثیر ژن 16S rRNA در جدایه‌های مقاوم به آرسنیک منجر به پیدایش قطعات ۳۵۰ تا ۳۷۰ جفت بازی در ژل آگارز گردید. بلاست توالی قطعات موجب شناسایی جدایه‌ها مطابق جدول ۳ شد.

جدول ۱: ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی و زیستی میزان آرسنیک موجود در پساب‌های مورد مطالعه

پساب‌ها	BOD5 (mg/L)	COD (mg/L)	اسیدیته	دما (^{o}C)	میزان آرسنیک (mg/L)
ورودی فاز ۲ تصفیه‌خانه فاضلاب شاهین‌شهر	۸۷۰	۴۵۷۳	۷/۳۳	۱۶/۸	۰/۷۳۰
پساب پلی‌اکریل اصفهان	۳۷۵	۲۰۹۳	۷/۲۴	۱۴/۹	۱/۸۹۵
حد مجاز و استاندارد	۲۰-۵	۱۲۰۰	۰/۱۵	۱۴	۰/۹۱

جدول۲: آزمون‌های مرفولوژیکی باکتری‌ها و حداقل غلظت مهار کننده رشد MIC و حداقل غلظت کشنده MBC (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) باکتری‌های مقاوم به آرسنیک.

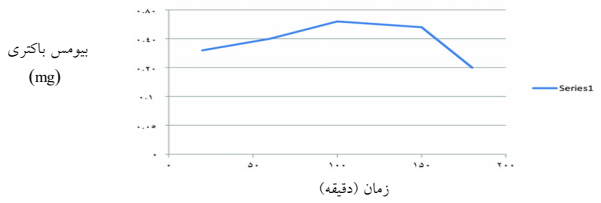
علامت اختصاری	مورفولوژی	واکنش گرم	MIC (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)	MBC (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)
As1	باسیل	گرم مثبت	۷	۸
As2	باسیل	گرم منفی	۷	۸
As3	باسیل	گرم منفی	۱۴	۱۶
As4	باسیل	گرم منفی	۸	۱۰

جدول ۳: شناسایی مولکولی جدایه‌های مقاوم به آرسنیک جدا شده از پساب‌ها در این مطالعه

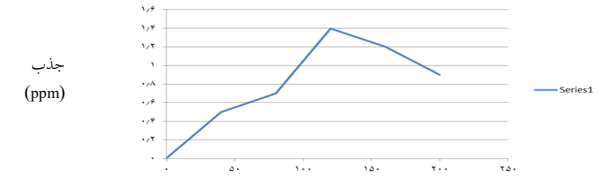
علامت اختصاری	نام جنس و گونه باکتری
As1	*باسیلوس سفنسیس* OPL
As2	*سودوموناس آئروجینوسا* ZBK-IAUF-11
As3	*استنوتروفوموناس مالتوفیلیا* سویه IR Isfahan (G)
As4	*استنوتروفوموناس مالتوفیلیا* سویه 5633

د) مقاومت آنتی‌بیوتیکی باکتری‌های مقاوم به آرسنیک: مطابق جدول ٤ جدایه As1 به بیشتر آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده در این پژوهش مقاوم بود. جدایه As2 بیشترین حساسیت را به آنتی‌بیوتیک‌ها نشان داد، این جدایه تنها به آنتی‌بیوتیک‌های متی‌سیلین، سفتریاکسون، جنتامایسین، سفوکستین و تری‌متوپریم مقاوم بود. جدایه As3 به آنتی‌بیوتیک‌های سولفامتوکسازول و کلرامفنیکل حساس بود و جدایه As4 تنها در برابر سولفامتوکسازول حساس بود (جدول ٤).

ه) جذب آرسنیک توسط باکتری مقاوم جدا شده در شرایط آزمایشگاهی: نتایج نمودار ۱ نشان می‌دهد که، رشد باکتری در حضور فلز آرسنیک نیز با فرایند جذب آن همخوانی داشته است. به طوری که تا ۱۰۰ دقیقه اول که نقطه پیک می‌باشد، روند افزایشی با شیب ملایم نشان داده است و پس از آن با گذشت زمان بعد از ۱۵۰ دقیقه کاهش چشمگیری به دنبال داشته است. در حالی که نتایج نمودار ۲ نشان داد که، میزان جذب آرسنیک توسط باکتری *سودوموناس آئروجینوسا* ZBK-IAUF-11 که از فاضلاب پلی‌اکریل اصفهان جداسازی شده بود، در دقایق ابتدایی (۰ تا ٤۰ دقیقه) سریع‌تر بوده است، و از زمان ۱۰۰ تا ۱۲۰ دقیقه این فرایند با سرعت بسیار بالایی دنبال شده است. سپس در فاصله ۱۲۰ تا ۲۰۰ دقیقه با یک شیب تندی افت شدیدی را در میزان جذب آرسنیک نشان داده است.



نمودار ۱: میزان بیومس باکتری *سودوموناس آئروجینوسا* سویه ZBK-IAUF-1 در زمان‌های مختلف (صفر،۵۰، ۱۰۰،۱۵۰، ۲۰۰ دقیقه پس از شروع گرمخانه‌گذاری).



نمودار۲: میزان جذب آرسنیک توسط باکتری *سودوموناس آئروجینوسا* سویه ZBK-IAUF-1 در زمان‌های مختلف (صفر،۵۰، ۱۰۰،۱۵۰، ۲۰۰ دقیقه پس از شروع گرمخانه‌گذاری).

جدول ٤: حساسیت آنتی‌بیوتیکی باکتری‌های مقاوم به آرسنیک جداسازی شده در این پژوهش

آنتی‌بیوتیک	AZM	ME	MEN	CN	FM	CP	TE	CF	NA	V	GM	FOX	SXT	AMX	E	C
As1	R	R	S (10)	R	R	S (30)	S (15)	R	R	R	R	R	R	R	R	S (18)
As2	S (23)	R	S (17)	S (32)	S (18)	S (37)	S (35)	R	S (23)	S (23)	R	R	R	S (23)	S (26)	S (21)
As3	R	R	R	R	R	S (29)	R	R	S (26)	R	R	R	R	R	R	S (20)
As4	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R

Azm: Azithromycin, ME: Methicillin, MEN: Meropenem, CN: Cephalexin, FM: Nitrofurantion, CP: Ciprofloxacin, TE: Tetracycline, CF: Cefoxitin, NA: Nalidixic Acid, V: Vancomycin, GM: Gentamycin, FOX: Cefoxition, SXT: Sulfametoxazol, AMX: Amoxicillin, E: Erythromycin, C: Chloramphenicol. **R**: Resistant, **S**: Susceptible, **I**: Intermediate.

بحث

در این مطالعه از دو نمونه پساب ورودی فاز ۲ تصفیه خانه فاضلاب شاهین‌شهر و پساب کارخانه پلی‌اکریل اصفهان برای جداسازی باکتری‌های مقاوم به آرسنیک استفاده شد. این پساب‌ها حاوی ۰/۷۳۰ تا ۱/۸۹۵ میلی‌گرم در لیتر فلز آرسنیک بودند.

هر دو پساب مورد مطالعه در بررسی حاضر دارای pH نزدیک به خنثی بودند که برای رشد اکثر باکتری‌ها مطلوب است. در مطالعه کوهن و فیستر (Kuhn and Pfister) در سال ۱۹۹۰ (۲۳) نشان داده است در محدوده‌های pH اسیدی و قلیایی، جمعیت میکروبی مقاوم به انواع فلزات کاهش می‌یابد. در چنین شرایطی باکتری‌هایی که بتوانند شرایط اسیدی و قلیایی محیط را تحمل کنند باقی خواهند ماند. یافته‌های این پژوهش نشان داد که، پساب کارخانه پلی‌اکریل دارای BOD و COD مشابه با سایر پساب‌های صنعتی BOD و COD به طور متوسط به ترتیب ۵۰۰ و ۱۹۰۰ میلی‌گرم بر لیتر) بود (۲٤). در صورتی که این مقادیر در مورد پساب ورودی فاز ۲ تصفیه خانه فاضلاب شاهین‌شهر برای BOD و COD به ترتیب در حدود ٤۰۰ و ۲۷۰۰ واحد بالاتر از پساب‌های صنعتی مشابه بود. ضمن این که جمعیت باکتری‌های هتروتروف نیز در پساب ورودی فاز ۲ تصفیه خانه فاضلاب شاهین‌شهر بیشتر از پساب کارخانه پلی‌اکریل اصفهان شمارش شد. سایر تحقیقات نشان داده است وقتی ترکیبات سمی به ویژه فلزات سنگین در پساب حضور داشته باشند، از فعالیت میکروارگانسیم‌ها که مواد آلی را تخریب می کنند، ممانعت می‌شود. حضور این ترکیبات در روند انجام آزمایش باعث کاهش میزان BOD حاصل از آزمون می‌گردد. به همین دلیل پساب‌های صنعتی اغلب به وسیله COD ارزیابی می‌گردد (۱٦).

در بررسی حاضر ابتدا برای غنی‌سازی و جداسازی باکتری‌های مقاوم به آرسنیک، از محیط کشت PHG II حاوی آرسنات سدیم ۱ میلی‌مولار استفاده شد. سپس باکتری‌هایی که بیشترین مقاومت را به آرسنیک نشان داده بودند، جهت ارزیابی مقاومت به غلظت‌های بالاتر آرسنیک مورد بررسی قرار گرفتند و از مقاوم ترین جدایه‌ها برای جذب زیستی آرسنیک در شرایط آزمایشگاهی استفاده شد. جدایه‌های مقاوم به آرسنیک مطابق با اشکال (۱تا ٤) و جدول (۳) مربوط به سویه‌های *استنوتروفوموناس مالتوفیلیا* 5633، *استنوتروفوموناس مالتوفیلا* IR-Isfahan (G)، *سودوموناس آئروجینوسا* ZBK و *باسیلوس سفنسیس* OPL بودند که با روش کلنی-PCR شناسایی مولکولی شدند. گونه‌های متعلق به جنس‌های *باسیلوس*، *استنوتروفوموناس* و *سودوموناس* در مطالعات قبلی هم به عنوان جدایه‌های مقاوم به آرسنیک شناسایی شده بودند، به عنوان نمونه سای (Cai) و همکاران در سال ۲۰۰۹ (۲۵) از نمونه‌های مختلف خاک، باکتری‌های مقاوم به آرسنیک را

جداسازی کردند. این باکتری‌ها شامل جدایه‌هایی از جنس‌های *اسینتوباکتر*، *آگروباکتریوم*، *آرتروباکتر*، *کوموموناس*، *رودوکوکوس*، *استنوتروفوموناس* و *سودوموناس* بودند که با MIC بالاتر از ۲ میلی‌گرم بر لیتر به آرسنیک مقاومت نشان داده بودند. *استنوتروفوموناس* در سایر مطالعات نیز از جمله مقاوم‌ترین باکتری‌ها به آرسنیک گزارش شده است (۲۳).

استنوتروفوموناس مالتوفیلا هم از گروه باکتری‌هایی است که در مطالعات قبلی بیشترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی از آن گزارش شده است و ژن‌های مقاومت هم به کرات در آن مطالعه شده است (۲۶و ۲۷). دی(Dey) و همکاران در سال ۲۰۱۶ (۲۸) از آب‌های زیرزمینی در هندوستان جدایه‌هایی از *باسیلوس* را جدا کردند که قادر به حذف ۵۱/۴۵ تا ۵۱/۹۹ درصد از آرسنیک از محیط کشت بودند . عباس(Abbas) و همکاران در سال ۲۰۱۴ (۲۹) ۳ جدایه مقاوم به آرسنیک را از نمونه‌های پساب شهری جداسازی کردند. این جدایه‌ها که متعلق به جنس‌های *انتروباکتر* و *کلبسیلا* شناسایی شدند، قادر به حذف آرسنیک تا میزان 3 ppm از محیط کشت به روش اکسیداسیون بودند.

مطابق با جدول ٤ مقاومت و حساسیت باکتری‌های مقاوم به فلز آرسنیک نسبت به تعدادی از آنتی‌بیوتیک‌های رایج کشور ارزیابی شد. *استنوتروفوموناس مالتوفیلیا* 5633 بیشترین مقاومت و *سودوموناس آئروجینوسا* ZBK بیشترین حساسیت را نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مورد مطالعه نشان دادند. *استنوتروفوموناس مالتوفیلیا* سویه IR-Isfahan (G) ضمن اینکه دارای MIC بالاتری در مقایسه با سایر باکتری‌ها در برابر فلز آرسنیک بود (MIC–14 میلی‌گرم در لیتر)، از بین ۱۶ آنتی‌بیوتیک مورد بررسی، به ۱۵ آنتی‌بیوتیک نیز مقاوم بود. اما *سودوموناس آئروجینوسا* ZBK-IAUF با وجود اینکه مقاومت پایین‌تری نسبت به آرسنیک نشان داده بود (MIC–7 میلی‌گرم در لیتر)، نسبت به بیشتر آنتی‌بیوتیک‌های رایج حساس بود. به همین دلیل این جدایه برای بررسی میزان جذب زیستی آرسنیک در شرایط آزمایشگاهی مورد ارزیابی قرار گرفت. برخی از مطالعات جذب و حذف زیستی آرسنیک را با استفاده از گیاهان، طی پدیده پاک‌سازی زیستی‌گیاهی (Phytoremediation) نشان داده است (۵) و گزارش‌هایی نیز توسط آچور(Achour) و همکاران در سال ۲۰۰۷ (۲۶) مبنی بر تنوع ژن‌های جذب کننده آرسنیک در انواع باکتری‌های خاک و مقایسه بین عملکرد جذب و حذف زیستی آرسنیک توسط *استنوتروفوموناس مالتوفیلیا* در مقایسه با سایر باکتری‌های مقاوم به این فلز با استفاده از تکنیک‌های مولکولی توسط کروسمان (Crossman) و همکاران در سال ۲۰۰۸ (۲۷) ارائه شده است. در مورد میکروارگانیسم‌ها بیشتر تحقیقات جهت پاک‌سازی زیستی آرسنیک بر روی باکتری‌ها صورت پذیرفته است (۲۸). میکروارگانیسم‌ها معمولاً سمیت آرسنیک را از طریق اکسیداسیون کاهش می‌دهند. ایک (Ike) و همکاران در سال ۲۰۰۸ (۳۰) توانستند حذف آرسنیک را با استفاده از مخلوطی از باکتری‌ها از طریق سنجش فعالیت اکسیداسیون نشان دهند. در بررسی حاضر مطابق با نمودار ۱ رشد باکتری در حضور آرسنیک نیز با فرایند جذب آن هم‌خوانی داشت. به طوری که تا ۱۰۰ دقیقه اول که نقطه پیک بود روند افزایشی با شیب ملایم نشان داد و پس از آن با گذشت زمان بعد از ۱۵۰ دقیقه کاهش چشمگیری به دنبال داشت. در حالی که مطابق نمودار ۲ در قسمت یافته‌ها، میزان جذب آرسنیک توسط باکتری *سودوموناس آئروجینوسا* ZBK-IAUF-11 در دقایق ابتدایی (۰ تا ٤۰ دقیقه) سریع‌تر بود و از زمان ۱۰۰ تا ۱۲۰دقیقه این روند با سرعت بسیار بالایی دنبال شده بود. سپس در فاصله ۱۲۰ تا ۲۰۰ دقیقه با یک شیب تندی افت شدیدی را در میزان جذب آرسنیک نشان داده بود. البته در بررسی حاضر مکانیسم سمیت‌زدایی مورد بررسی قرار نگرفت.

نتیجه‌گیری

یافته‌های این تحقیق نشان داد که، *سودوموناس آئروجینوسا* سویه ZBK-IAUF-1 جداسازی شده از فاضلاب، نه تنها نسبت به سایر باکتری‌های جداسازی و شناسایی شده حساسیت قابل توجهی نسبت به اکثر آنتی‌بیوتیک‌های مورد مطالعه نشان

داد بلکه همچنین در شرایط آزمایشگاهی قادر به جذب زیستی فلز آرسنیک تا مرز ۱/٤ میلی‌گرم در لیتر بود و به عنوان یک سویه برتر باکتریایی جهت جذب زیستی این فلز در شرایط آزمایشگاهی، پس از مطالعات بیشتر بر روی ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی و حذف کامل آن‌ها پیشنهاد می‌شود.

ملاحظات اخلاقی

نویسندگان این مقاله تمامی نکات اخلاقی شامل عدم سرقت ادبی، انتشار دوگانه، تحریف داده‌ها و داده سازی را در این مقاله رعایت کرده‌اند.

تشکر و قدردانی

این مقاله مستخرج از پایان‌نامه دانشجوی کارشناسی ارشد با کد ۱۷۲۳۰۵۰۷۹٤۱۰۲۲ می‌باشد. نویسندگان مقاله ازمسئولین محترم آزمایشگاه تحقیقاتی دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان به ویژه سرکار خانم مهندس شاهسار و پارسافر و مسئولین آزمایشگاه شرکت دانش بنیان تالی ژن پارس به ویژه سرکار خانم مهندس شاه سنایی کمال تشکر و قدردانی را دارند.

تعارض منافع

وجود ندارد.

References

1. WHO. 2010. Guideline for drinking water quality recommendation, Vol. 1, Geneva: World Health Organization, 154 .
2. Mahvi AH. 2008. Application of agricultural fibers in pollution removal from aqueous solution. International Journal of Environmental Science and Technology, 5(2): 275-285.
3. Shen Z, Han J, Wang Y. 2013. The contribution of ArsB to arsenic resistance to *Campilobacter jejuni*. Plos One, 8(3): e58894.
4. Abbas SZ, Riaz M, Ramzan N, Zahid MT, Shakoori FR, Rafatullah M. 2014. Isolation and characterization of arsenic resistant bacteria from wastewater. Brazilian Journal of Microbiology, 45(4): 1309-1315.
5. Finnegan PM, Chen W. 2012. Arsenic toxicity: The effects on plant metabolism. Front Physiol. 3: 182.
6. Naujokas MF, Anderson B, Ahsan H, Aposhian HV, Graziano JH, Thompson C, Suk WA. 2013. The broad scope of health effects from chronic arsenic exposure: update on a worldwide public health problem. Environmental Health Perspectives, 121(3): 295-302.
7. Guo H, Luo S, Chen L, Xiao X, Xi Q, Wei W, Zeng G, Liu C, Wan Y, Chen J, He Y. 2010. Bioremediation of heavy metals by growing hyperaccumulaorendophytic bacterium Bacillus sp. L14. Bioresource Technology, 101(22): 8599-8605.
8. Dey U, Chatterjee S, Mondal NK. 2016. Isolation and characterization of arsenic resistant bacteria and possible application in bioremediation. Biotechnology Report, 10: 1-7.

9. Kushwaha A, Hans N, Kumar S, Rani R. 2018. A critical review on speciation, mobilization and toxicity of lead in soil-microbe-plant system and bioremediation strategies. Ecotoxicology and Environmental Safety, 147: 1035-45.

10. Vijayaraghavan K, Yun YS. 2008. Bacterial biosorption. Biotechnology, 26: 266-291.

11. Chattopadhayay MK, Grossart HP. 2010. Antibiotic resistance intractable, and here's why. British Medical Journal, 341: c6848.

12. Chattopadhayay MK, Grossart HP. 2011. Antibiotic and heavy metal resistance of bacterial isolates obtained from some lakes in northern Germany. NSHM Journal of Pharmacy and Healthcare Management, 2: 74-75.

12. Fillali BK, Taoufik J, Dzairi FZ, Talbi M, Blaghen M. 2000. Waste water bacterial isolates resistant to heavy metals and antibiotics. Current Microbiology, 41: 151-156.

13. Raja EC, Selvam GS, Omine K. 2009.Identification and characterization of heavy metal resistant bacteria from sewage. Proceeding of International Joint Sysposium on Geodisaster Preventation and Geo Environment in Asia. Japan. Nov 25: 205-211.

14. Chenia HY, Jacobs A. 2017. Antimicrobial resistance heavy metal resistance and integron content in bacteria isolated from South African tilapia aquaculture system. Diseases of Aquatic Organisms, 126(3): 199-209.

15. Pumpel T, Perfub B, Pigher B, Diels L, Schinner F. 1995. A rapid screening method for the isolation of metal accumulating microorganism. Journal of Industrial Microbiology, 14: 213-217.

16. Rice EW, Baird RB, Eaton AD, Clesceri LS. 2012. Standard methods for the examination of water and wastewater. 22nd ed., USA: American Public Health Association, 1496.

17. Baghel A, Singh B, Pandey P, Sekhar K. A 2007. A rapid field detection method for arsenic in drinking water. Analytical Sciences, 23(2):135-7.

18. Cappuccino JG, Sherman N. 1996. Microbiology, A Laboratory Manual. 4th Ed. California: The Benjamin-Cumming Publishing Company, Menlopark, 186 .

19. Teitzel GM, Psrsek MR. 2003. Heavy metal resistance of biofilm planktonic Pseudomonas aeroginosa. Appleied and Environmental Microbiology, 69: 2313-2320.

20. Anyanwu CU, Nwachukwu ON. 2011. Heavy metal resistance in bacteria isolated from contaminated and uncontaminated soils. International Journal of Research in Chemistry and Environment, 1: 171-173.

21. Hassen A, Saidi N, Cherif M, Boudabous A. 1998. Resistance of environmental bacteria to heavy metals. Bioresource Technology, 64: 7-15.

22. Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. Journal of Bacteriology, 173(2): 697–703.

23. Kuhn SP, Pfister RM. 1990. Accumulation of cadmium by immobilized Zoogloearamigera 115. Journal of Industrial Microbiology, 6(2): 123-128.

24. Mishra V, Sharma R. 2015. Green synthesis of zinc oxide nanoparticles using fresh peels extract of Punicagranatum and its antimicrobial activities. International Journal OfPharma Research and Health Sciences, 3(3): 694-699.

25. Cai L, Liu G, Rensing C, Wang G. 2009. Genes involved in arsenic transformation and resistance associated with different levels of arsenic-contaminated soils. BMC microbiology, 9 (1):4.

26. Achour AR, Bauda P, Billard P. 2007. Diversity of arsenite transporter genes from arsenic-resistant soil bacteria. Research In Microbiology, 158(2): 128-137.

27. Crossman LC, Gould VC, Dow JM, Vernikos GS, Okazaki A, Sebaihia M, Saunders D, Arrowsmith C, Carver T, Peters N, Adlem E. 2008. The complete genome, comparative and functional analysis of Stenotrophomonas maltophilia reveals an organism heavily shielded by drug resistance determinants. Genome Biology, (4): R74.

28. Dey U, Chatterjee S, Mondal NK. 2016. Isolation and characterization of arsenic-resistant bacteria and possible application in bioremediation. Biotechnology Reports,10: 1-7.

29. Abbas SZ, Riaz M, Ramzan N, Zahid MT, Shakoori FR, Rafatullah M. 2014. Isolation and characterization of arsenic resistant bacteria from wastewater. Brazilian Journal of Microbiology, 45(4):1309-15.

30. Ike M, Miyazaki T, Yamamoto N, Sei K, Soda S. 2008. Removal of arsenic from groundwater by arsenite-oxidizing bacteria. Water Science and Technology, 58(5): 1095-100.