



## جداسازی و شناسایی باکتری های مقاوم به جیوه از آب و رسوبات رودخانه کر

دکتر فرشید کفیل زاده<sup>\*</sup>، نیما میرزائی<sup>۱</sup>، مهدی کارگر<sup>۱</sup>

<sup>۱</sup>گروه میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد جهرم

### چکیده

سابقه و هدف: جیوه یکی از سمی ترین فلزات سنگین می باشد. مقادیر اندک جیوه برای همه موجودات زنده سمی است. با این وجود برخی از باکتری ها با مکانیسم های خاص در برابر جیوه مقاوم هستند. هدف از این پژوهش جداسازی و شناسایی باکتری های مقاوم به جیوه و بررسی ارتباط بین میزان آلودگی محیط به جیوه و احتمال جداسازی باکتری های مقاوم است.

مواد و روش ها: نمونه برداری از آب و رسوبات چهار ایستگاه در طول رودخانه کر و از تابستان ۱۳۸۵ تا بهار ۱۳۸۶ انجام گرفت. میزان جیوه در نمونه ها با روش بخار سرد و به وسیله دستگاه جذب اتمی اندازه گیری شد. تعداد باکتری ها در دو محیط کشت حاوی ۱۰ mg/l کلرید جیوه و بدون کلرید جیوه شمارش گردید. جداسازی باکتری های مقاوم از طریق غنی سازی اولیه و کشت مستقیم در محیط جامد حاوی ۱۰ mg/l کلرید جیوه صورت گرفت. باکتری ها به وسیله تست های متداول بیوشیمیایی شناسایی گردیدند.

یافته ها: تعداد باکتری ها در محیط کشت بدون جیوه  $1 \times 10^7$  CFU/ml و بیشتر از محیط فلز دار بود. فراوانی باکتری های مقاوم به جیوه در ایستگاه پل خان ۵۴/۲ و در ایستگاه درودزن ۴/۳ درصد شناسایی شد. این ایستگاه ها از نظر میزان آلاینده جیوه به ترتیب آلوده ترین و پاک ترین ایستگاه ها بودند. باکتری های *Pseudomonas sp.*، *Serratia marcescens*، *E.coli*، *Klebsiella sp.*، *Enterobacter sp.* به عنوان باکتری های مقاوم به جیوه جداسازی و شناسایی گردیدند.

نتیجه گیری: نتایج این پژوهش نشان داد که استفاده از روش غنی سازی اولیه در مقایسه با روش کشت مستقیم، موجب جداسازی بهتر باکتری های مقاوم می شود. علاوه بر این افزایش میزان جیوه در محیط، احتمال جداسازی باکتری های مقاوم به جیوه را افزایش می دهد.

واژگان کلیدی: باکتری های مقاوم به جیوه، *Serratia marcescens*، رودخانه کر

پذیرش برای چاپ: مهر ۱۳۸۷

دریافت مقاله: اردیبهشت ۱۳۸۷

### مقدمه

پالایش جیوه از پساب کارخانجات علاوه بر کم بازده بودن بسیار پرهزینه می باشند. بنابراین برای داشتن طبیعتی سالم، استفاده از تکنولوژی های پاکسازی موثر و در عین حال کم هزینه، اجتناب ناپذیر است (۳). ورود سمی ترین شکل جیوه یعنی متیل مرکوری به بدن انسان باعث ایجاد بیماری مینی ماتا می گردد. این بیماری با بروز علائم متعدد عصبی مشخص می شود (۴). مقادیر اندک جیوه برای تمام موجودات زنده سمی و خطرناک می باشد. با این وجود برخی از باکتری های ساکن رودخانه های آلوده به دلیل اینکه به میزان زیاد در معرض جیوه قرار می گیرند، قادرند ژن های مقاومت به جیوه را بین یکدیگر رد و بدل کنند و بدین ترتیب در برابر غلظت های سمی جیوه مقاوم می شوند (۳). مقاومت در برابر

امروزه مقامات بهداشتی در ارتباط با مواد شیمیایی سمی نظیر جیوه که در رودخانه ها یافت می شوند و از طریق مصرف آبریان وارد بدن انسان می گردند، نگرانی های زیادی دارند (۱). جیوه به صورت طبیعی در محیط های مختلف به مقدار بسیار کم وجود دارد. با این حال در نتیجه فعالیت های انسانی میزان آن در محیط افزایش یافته است (۲). جیوه به دلیل خاصیت تجمع پذیری در بافت ها و واکنش با گروه های سولفیدریل پروتئین ها، مشکلات بهداشتی عدیده ای در انسان ایجاد می کند. روش های مرسوم

\* آدرس برای مکاتبه: جهرم، میدان چمران، دانشگاه آزاد اسلامی، گروه میکروبیولوژی

است که این ژن ها از پتانسیل خوبی برای به کارگیری جهت حذف جیوه از پساب کارخانجات برخوردار هستند (۲). Brunke و همکاران در سال ۱۹۹۳ برای اولین بار نشان دادند که باکتری های مقاوم به جیوه، قادر به حذف این فلز سمی از پساب کارخانجات می باشند (۱۴). Von canstein و همکاران در سال ۱۹۹۹ باکتری *Pseudomonas putida* مقاوم به جیوه را از رسوبات رودخانه ای آلوده در آلمان جدا کردند که این باکتری قادر به حذف جیوه از پساب کارخانه کلرآلکالی با بازده ۹۰ تا ۹۸ درصد بود (۱۵). بنابراین شناسایی دقیق باکتری های مقاوم به جیوه اولین گام در استفاده از روش حذف زیستی جیوه از پساب آلوده کارخانجات می باشد. رودخانه کر مهم ترین رودخانه استان فارس است و بخش اعظم آب شرب شیراز را تامین می کند. پساب کارخانجات مختلف از جمله پتروشیمی که حاوی مقادیر زیاد جیوه می باشند، وارد این رودخانه می شود. هدف از این پژوهش اندازه گیری میزان جیوه در آب و رسوبات رودخانه کر، جداسازی، شناسایی و معرفی باکتری های بومی مقاوم به جیوه در این رودخانه، جهت به کارگیری در تصفیه پساب کارخانجات آلوده کننده و بررسی فرضیه ارتباط بین افزایش آلودگی محیط به جیوه و افزایش احتمال جداسازی باکتری های مقاوم به این فلز سمی می باشد.

### مواد و روش ها

محدوده طرح: با توجه به نتایج حاصل از مطالعات و اندازه گیری های قبلی (۱۶، ۱۷) و همچنین شناخت کامل از کلیه فعالیت های صنعتی، کشاورزی و خدماتی موجود در حاشیه رودخانه کر، محدوده طرح از سد درودزن تا دریاچه بختگان در ۴ ایستگاه نمونه گیری تعیین شد. موقعیت ایستگاه ها هنگام نمونه برداری به وسیله دستگاه موقعیت یاب جهانی (GPS) مشخص گردید (جدول ۱ و شکل ۱).

نمونه برداری: نمونه برداری از آب و رسوبات سطحی ۴ ایستگاه و در چهار فصل از تابستان ۱۳۸۵ تا بهار ۱۳۸۶ انجام شد. در هر فصل سه مرتبه نمونه برداری به عمل آمد. نمونه ها برای کشت میکروبی در ظروف شیشه ای استریل و برای اندازه گیری میزان فلز سنگین جیوه، در ظروف پلی اتیلن شسته شده با اسید نیتریک، جمع آوری شدند. نمونه ها در مجاورت یخ قرار گرفتند و حداکثر ۴ ساعت پس از نمونه گیری به آزمایشگاه منتقل گردیدند (۱۸).

آماده سازی نمونه ها: پیش از اندازه گیری میزان جیوه،

غلظت های سمی جیوه در باکتری ها به واسطه محصولات ژن های اپرون *mer* صورت می گیرد. در اکثر باکتری ها اپرون *mer* از ژن های *merRTPABD* تشکیل شده است و *MerD* و *MerR* در تنظیم بیان ژن های اپرون، *MerP* و *MerT* در انتقال جیوه به درون سیتوپلاسم و *MerB* نیز در تجزیه جیوه آلی نقش دارند. آنزیم مرکوریک ردوکتاز *Hg(II)* که بسیار سمی است را به *Hg(0)* احیا می کند. *Hg(0)* بسیار فرار است و به سرعت از محیط اطراف باکتری خارج می شود (۵، ۶، ۷).

Moore و همکاران اولین بار در دهه ۱۹۶۰ مقاومت باکتری *Staphylococcus aureus* (جدا شده از نمونه های کلینیکی) به ترکیبات جیوه را گزارش کردند (۸). از آن پس تاکنون تحقیقات گسترده ای بر روی مقاومت به جیوه در باکتری های جدا شده از محیط های طبیعی صورت گرفت. Barkay و همکاران در سال ۱۹۸۷ با اندازه گیری میزان حذف *Hg(II)* از فلاسک های حاوی باکتری های مقاوم به جیوه، مکانیسم مقاومت در برابر جیوه را مورد بررسی قرار دادند (۹). همچنین Ray و همکاران در سال ۱۹۸۹ توانایی حذف جیوه توسط باکتری های آزادی تثبیت کننده ازت (که عمدتاً *Beijerinckia* و *Azotobacter*) می باشند که در برابر غلظت های بالای جیوه مقاوم بودند را ارزیابی کردند. مطالعات آنها نشان داد که رابطه مستقیمی میان افزایش مصرف علف کش ها و گسترش مقاومت در برابر جیوه، در باکتری های موجود در خاک های کشاورزی وجود دارد (۱۰). از طرف دیگر Masaru و همکاران در سال ۱۹۹۹ برای اولین بار مقاومت به جیوه را در باکتری های بی هوازی به خصوص جنس کلاستریدیوم مورد بررسی قرار دادند (۱۱). Schelert و همکاران در سال ۲۰۰۴ آرکیای گرمادوست مقاوم به جیوه از دهانه چشمه های آب گرم جدا کردند (۱۲). اکنون پنج دهه از اولین تحقیقات در زمینه مقاومت به جیوه در باکتری ها می گذرد. این تحقیقات بیشتر به سمت شناسایی باکتری های مقاوم به جیوه جدا شده از محیط های طبیعی و مطالعه و دست ورزی ژن های مقاومت به جیوه در این باکتری ها سوق داده شده است (۸). Chen و همکاران در سال ۱۹۹۷ با دست ورزی ژنتیکی *E.coli* این باکتری را برای پاک سازی محیط های آلوده به جیوه آماده کردند. این سوش ها به نحوی دستکاری شدند که پروتئین های *MerP*، *MerT* را برای انتقال هر چه بیشتر *Hg(II)* به درون سیتوپلاسم، در سطح خود بروز دهند (۱۳). امروزه مکانیسم مقاومت به جیوه و ژن های مسئول آن در باکتری ها به طور کامل شناسایی شده است. مطالعات محققان نشان داده

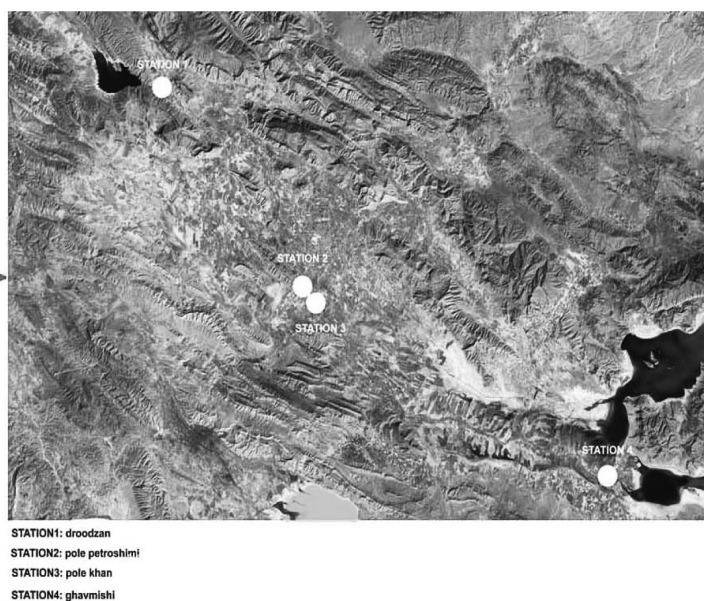
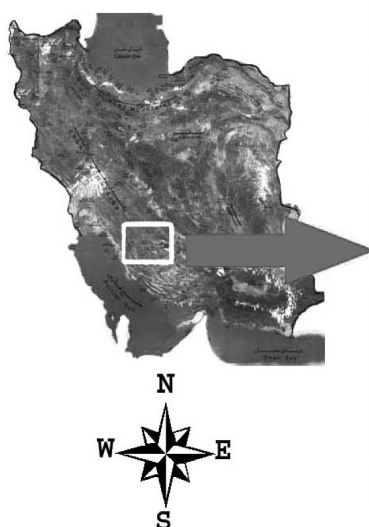
جدول ۱) مشخصات ایستگاه های نمونه برداری						
ایستگاه	نام منطقه	ارتفاع از سطح دریا (متر)	ویژگی منطقه		موقعیت جغرافیایی	
			طول شرقی	عرض شمالی		
۱	دروذن	۱۶۳۴	بعد از سد درودزن، بدون هرگونه ورودی فاضلاب		۳۰°۱۲'۲۲"/۰۰"	۵۲°۲۵'۳۲"/۲۶"
۲	پل پتروشیمی	۱۵۹۳	بعد از خروجی فاضلاب پتروشیمی شیراز		۲۹°۵۱'۴۲"/۴۳"	۵۲°۴۵'۳۹"/۵۰"
۳	پل خان	۱۵۸۸	بعد از ورودی رودخانه سیوند، حاوی فاضلاب خانگی شهر مرودشت		۳۰°۵۱'۰۰"/۷۷"	۵۲°۴۶'۱۵"/۴۴"
۴	گاو میشی	۱۵۶۳	نزدیک به انتهای رودخانه کر ورودی به دریاچه بختگان		۲۹°۳۲'۵۹"/۷۱"	۵۲°۲۵'۰۰"/۲۰"

شمارش باکتری ها: پس از انتقال نمونه ها به آزمایشگاه شمارش باکتری ها با روش Total viable plate count صورت گرفت. از نمونه ها به وسیله سرم فیزیولوژی رقت های  $10^{-1}$  تا  $10^{-7}$  تهیه و در محیط Luria-Bertani agar (ساخت شرکت Merck آلمان) واجد ۵ mg/l کلرید جیوه و محیط Luria-Bertani agar بدون جیوه، کشت سطحی (Surface plate method) داده شد. پلیت های کشت داده شده به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد گرمخانه گذاری شدند. پس از مدت زمان گرمخانه گذاری تعداد باکتری ها در محیط های کشت حاوی جیوه و بدون جیوه شمارش گردید (۱۹).

جداسازی و شناسایی باکتری های مقاوم به جیوه: جداسازی باکتری های مقاوم به جیوه از طریق غنی سازی اولیه و کشت مستقیم در محیط جامد، با استفاده از روش تغییر یافته Wagner Dobler

نمونه ها آماده سازی گردیدند. تمام نمونه های آب به وسیله فیلتر واتمن ۴۲ میکرومتری صاف گردیدند. نمونه های فیلتر شده با مخلوطی از اسیدنیتریک و اسید کلریدریک (به نسبت ۳ به ۱) هضم شدند. نمونه های رسوب ابتدا در آون (oven) در دمای ۱۰۳ درجه سانتیگراد خشک گردیدند. نمونه های خشک شده در هاون کوبیده شدند تا اندازه تمامی ذرات یکنواخت گردد. سپس یک گرم از هر نمونه با مخلوطی از ۶ میلی لیتر نیتریک اسید و ۲ میلی لیتر کلریدریک اسید هضم و حرارت داده شدند. در مرحله آخر نمونه ها با فیلتر واتمن ۴۲ میکرومتری صاف گردیدند (۱۸).

اندازه گیری میزان جیوه: پس از آماده سازی نمونه ها، میزان جیوه در نمونه ها به وسیله دستگاه طیف سنجی جذب اتمی (Atomic absorption spectroscopy) مدل Varian و با روش بخار سرد اندازه گیری شد (۱۸).



شکل ۱) موقعیت جغرافیایی و مکان یابی ایستگاه های نمونه برداری

جدول ۲) مقایسه ایستگاه‌ها از نظر میانگین تعداد باکتری مقاوم به جیوه			
تعداد باکتری ایستگاه	میانگین تعداد کل باکتری (CFU/ml یا CFU/g)	میانگین تعداد باکتری‌های مقاوم به جیوه (CFU/ml یا CFU/g)	درصد باکتری‌های مقاوم به جیوه
دروازن	$3/7 \times 10^6$	$1/6 \times 10^5$	۴/۳
پل پتروشیمی	$5/5 \times 10^6$	$2 \times 10^6$	۳۶/۳
پل خان	$4/8 \times 10^6$	$2/6 \times 10^6$	۵۴/۲
گاومیشی	$3/3 \times 10^6$	$1/9 \times 10^5$	۵/۷

وجود داشت.

شمارش باکتری‌ها: میانگین تعداد باکتری‌ها در محیط کشت حاوی جیوه CFU/g یا CFU/ml  $9/1 \times 10^5$  و در مقایسه با میانگین تعداد باکتری‌ها در محیط کشت کنترل CFU/g یا CFU/ml  $1 \times 10^7$  بسیار کمتر بود. بین مقادیر میانگین تعداد باکتری در محیط بدون جیوه و محیط حاوی جیوه، در سطح ۵ در صد اختلاف معنی دار وجود داشت. در مقایسه ایستگاه‌ها از نظر میانگین تعداد باکتری مقاوم به جیوه بیشترین تعداد باکتری‌های مقاوم به جیوه، CFU/g یا CFU/ml  $2 \times 10^6$  و  $2/6 \times 10^6$  در ایستگاه‌های پل خان و پل پتروشیمی و کمترین تعداد باکتری مقاوم به جیوه نیز CFU/g یا CFU/ml  $1/6 \times 10^5$  در ایستگاه دروازن به دست آمد. میانگین تعداد باکتری‌های مقاوم به جیوه در ایستگاه‌های مختلف در سطح ۰/۰۵ اختلاف معنی دار داشتند (جدول ۲).

جداسازی و شناسایی باکتری‌های مقاوم به جیوه: درصد فراوانی باکتری‌های گرم منفی شناسایی شده بیشتر از باکتری‌های گرم مثبت بود و تفاوت معنی داری در سطح ۵ درصد داشتند. بر این اساس ۷۷ درصد باکتری‌های مقاوم جدا شده گرم منفی و ۲۳ درصد باکتری‌ها گرم مثبت بودند. بیشترین درصد فراوانی مربوط به *Serratia marcescens* (۸۸٪) و کمترین فراوانی مربوط به *Citrobacter sp.* (۶٪) و *Micrococcus sp.* (۶٪) بودند (نمودار ۱).

## بحث

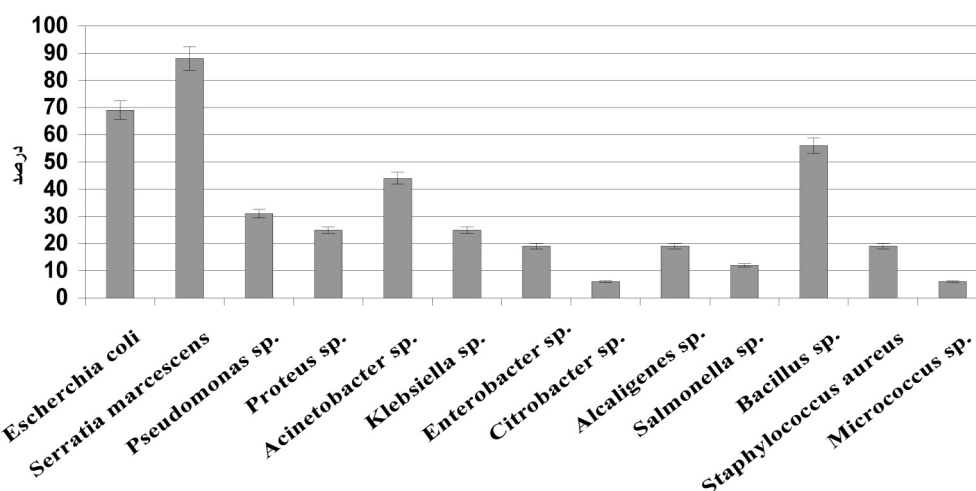
در این مطالعه بیشترین میزان جیوه در نمونه‌های ایستگاه‌های پل خان و پل پتروشیمی به دست آمد. در تحقیقات گذشته که توسط کفیل زاده و همکاران بر روی رودخانه کر در سال ۱۳۸۴ انجام گرفت، بیشترین میزان آلودگی به جیوه در ناحیه پل

و همکاران صورت گرفت (۳). در غنی سازی اولیه، ابتدا ۱ گرم یا ۱ میلی لیتر از هر نمونه به ۹ میلی لیتر محیط کشت broth Luria Bertani (ساخت شرکت Scharlau اسپانیا) واجد ۱۰ mg کلرید جیوه اضافه گردید و محیط‌های کشت به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد گرمخانه گذاری شدند. پس از ۴۸ ساعت گرمخانه گذاری، ۰/۱ میلی لیتر از محیط حاوی باکتری‌های رشد کرده، در محیط کشت LB agar به صورت سطحی کشت و گرمخانه گذاری شدند. سپس از کلنی‌های تشکیل شده کشت خالص تهیه گردید. در روش کشت مستقیم، نمونه‌های رقیق شده با سرم فیزیولوژی در محیط LB agar حاوی ۱۰ mg/l کلرید جیوه کشت داده و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد گرمخانه گذاری و سپس از کلنی‌های حاصل کشت خالص تهیه گردید. شناسایی باکتری‌های خالص سازی شده با استفاده از رنگ‌آمیزی گرم و تست‌های بیوشیمیایی مطابق با کتاب *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* صورت گرفت (۲۰).

تجزیه و تحلیل آماری: تجزیه و تحلیل آماری نتایج به دست آمده با استفاده از آزمون آنالیز واریانس (ANOVA) و آزمون دانکن به وسیله نسخه دوازدهم نرم افزار SPSS صورت گرفت و مرز معنی داری در سطح  $p < 0/05$  قرار داده شد.

## یافته‌ها

میزان جیوه در نمونه‌ها: بیشترین میزان جیوه به مقدار ppm  $0/086$  و  $0/758$  ppm، به ترتیب در نمونه‌های آب و رسوب ایستگاه پل خان به دست آمد. کمترین میزان جیوه نیز به مقدار ppm  $0/015$  و ppm  $0/266$ ، به ترتیب در نمونه‌های آب و رسوب ایستگاه دروازن مشاهده شد. بین مقادیر میانگین جیوه در ایستگاه‌های مختلف، اختلاف معنی داری در سطح  $p < 0/05$



نمودار ۱: درصد فراوانی باکتری‌های جدا شده مقاوم به جیوه

مربوط به ایستگاه‌های پل خان و پل پتروشیمی به ترتیب با ۵۴/۲ درصد و ۳۶/۳ درصد بود. این دو ایستگاه بیشترین میزان آلودگی به جیوه را داشتند. Osborn و همکارانش در سال ۱۹۹۳ محدوده ۰/۰۵ تا ۲۵ درصد در تعداد باکتری‌های مقاوم به جیوه در ۴ ایستگاه آلوده در معدن استخراج مس به دست آوردند (۲۳). آقای Nakamura و همکارانش در سال ۱۹۹۰ و Petrova و همکارانش در سال ۲۰۰۲ فرضیه افزایش احتمال جداسازی باکتری‌های مقاوم به جیوه در مناطق آلوده به این فلز سمی را در مقایسه با مناطق غیر آلوده مطرح ساختند (۲۴، ۲۵). نتایج به دست آمده در این تحقیق نیز، فرضیه رابطه میان افزایش آلودگی محیط به جیوه و افزایش تعداد باکتری‌های مقاوم به جیوه را تأیید می‌کند. باکتری‌ها برای بقا در مناطق آلوده به جیوه پلاسمیدها و ترانسپوزون‌های حاوی ژن‌های مقاومت به جیوه را بین یکدیگر رد و بدل می‌کنند. این امر موجب گسترش تعداد باکتری‌های مقاوم به جیوه در این مناطق می‌شود (۲۶).

در این بررسی باکتری‌های مقاوم به جیوه از نمونه‌های آب و رسوب با روش کشت مسقیم و غنی‌سازی اولیه در حضور ۱۰ mg/l کلرید جیوه جداسازی گردیدند. روش غنی‌سازی موجب جداسازی بهتر باکتری‌های مقاوم شد. علاوه بر این باکتری‌های جداسازی شده با روش غنی‌سازی در مراحل بعد رشد بهتری در حضور جیوه نشان دادند. بنابراین غنی‌سازی اولیه موجب بیان ژن‌های مقاومت به جیوه در باکتری‌ها، سازگاری آنها با شرایط استرس زای ناشی از وجود جیوه و در نتیجه رشد بهتر آنها می‌شود.

پتروشیمی تا پل خان گزارش گردید (۱۶). مقادیر به دست آمده در این تحقیق بیشتر از مقادیر گزارش شده توسط این گروه بود. ایستگاه پل پتروشیمی در ناحیه‌ای قرار گرفته است که پساب حاوی جیوه واحد کلرآلکالی پتروشیمی شیراز در این منطقه وارد رودخانه کر می‌گردد. ایستگاه پل خان نیز پس از ورودی پساب شهرک صنعتی آب باریک، پالایشگاه شیراز، کارخانه آزمایش و فاضلاب خانگی شهر مرودشت قرار گرفته است. در ایستگاه درودزن هیچ‌گونه پساب صنعتی وارد رودخانه کر نمی‌شود. به همین دلیل بیشترین و کمترین میزان آلودگی به جیوه به ترتیب در این ایستگاه‌ها مشاهده شد.

در تحقیق حاضر تعداد باکتری‌های مقاوم به جیوه (۹/۱ درصد) بسیار کمتر از تعداد باکتری در محیط کشت کنترل بود. در تحقیقات Mahler و همکارانش در سال ۱۹۸۶ و Barkay و همکاران در سال ۱۹۸۷ تعداد باکتری در محیط کشت حاوی جیوه بسیار کمتر از تعداد باکتری در محیط کشت کنترل به دست آمد (۲۱، ۲۲). وجود جیوه در محیط کشت سبب توقف رشد و مرگ بسیاری از باکتری‌ها می‌شود، به همین دلیل تعداد باکتری‌ها در محیط کشت حاوی جیوه بسیار کمتر از محیط کشت کنترل می‌باشد.

درصد باکتری‌های مقاوم به جیوه در ایستگاه‌های مختلف بین ۴/۳ تا ۵۴/۲ درصد متغیر بود. اختلاف تعداد باکتری‌ها در ایستگاه‌های مختلف در نتیجه تفاوت در میزان جیوه در این ایستگاه‌ها می‌باشد. بیشترین تعداد باکتری مقاوم به جیوه

از آنجا که باکتری های بومی مناطق آلوده به طور مداوم در تماس با غلظت های سمی جیوه هستند، لذا این باکتری ها به نحوی باید قادر به حذف این فلز سمی از اطراف خود باشند. Ray و همکارانش در سال ۱۹۸۹ باکتری های مقاوم به جیوه از خاک های آلوده جدا کردند که توانایی بالایی در حذف این فلز سمی از محیط کشت داشتند (۱۰) و Von canstein و همکارانش نیز در سال ۱۹۹۹ باکتری مقاوم به جیوه سودوموناس پوتیدا سوش Spi3 از رسوبات رودخانه ای آلوده در آلمان جدا کردند که قادر به حذف جیوه بود. سپس با طراحی یک بیوراکتور در مقیاس آزمایشگاهی از این باکتری مقاوم برای تصفیه فاضلاب کلر آلکالی استفاده کردند. آنها نشان دادند سوش های مقاوم سودوموناس پوتیدا قادر به حذف جیوه از پساب واحد کلر آلکالی با بازده ۹۸-۹۰ درصد می باشند. تحقیقات آنها موجب شد که چندین واحد کلر آلکالی در آلمان برای تصفیه فاضلاب خود از این سیستم زیستی بهره ببرند (۱۵). بنابراین استفاده از روش حذف زیستی جیوه از پساب آلوده کارخانجات مستلزم جداسازی و شناسایی دقیق باکتری های مقاوم و سپس کاربرد آنها بدین منظور می باشد.

### نتیجه گیری

در این پژوهش باکتری سرایشا مارسه سنس تقریباً در تمامی فصول و ایستگاه های مورد بررسی شناسایی شد. این نتایج نشان می دهد که این باکتری، بومی رودخانه کر می باشد و ژن های مقاوم به جیوه را از طریق پلاسمید های حاوی اپران mer کسب کرده است. ژن هایی که بیان آنها موجب مقاومت باکتری در برابر جیوه می شوند عمدتاً بر روی پلاسمید قرار گرفته اند (۳۰).

چرا که ژن های مقاومت به جیوه القاء پذیر هستند و بیان آنها در حضور جیوه القا می گردد (۲۷). در تحقیقات گذشته در این زمینه، جدا سازی باکتری های مقاوم به فلزات سنگین نظیر جیوه، مستقیماً بر روی محیط جامد حاوی فلز صورت گرفته است. نتایج به دست آمده نشان می دهد که باکتری های جدا شده با این روش بعضاً توانایی تحمل غلظت های بالاتر از میزان لازم برای جداسازی را نداشتند (۹، ۱۵، ۱۶).

در این تحقیق باکتری های گرم مثبت و گرم منفی مختلفی به عنوان باکتری های مقاوم به جیوه شناسایی شدند. درصد فراوانی باکتری های گرم منفی در مقایسه با باکتری های گرم مثبت بیشتر بود. باکتری های گرم منفی در شرایط سخت به راحتی از طریق فرآیند هم یوخی (conjugation) به صورت درون گونه ای و برون گونه ای قادر به انتقال ژن های 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 می باشد. باکتری های گرم منفی به دلیل داشتن غشای خارجی (که از عبور مواد سمی به داخل سیتوپلاسم جلوگیری می کند) در مقایسه با باکتری های گرم مثبت کمتر تحت تاثیر جیوه قرار می گیرند، از این رو احتمال جداسازی آنها از محیط نیز افزایش می یابد. مقاومت به جیوه در طیف وسیعی از باکتری های گرم مثبت و گرم منفی گزارش شده است. Pahan و همکارانش در سال ۱۹۹۰ جنس های باکتریایی مقاوم به جیوه اشیشیاکلی، کلبسیلا، میکروکوکوس، سودوموناس، آلکالیجنس و باسیلوس را شناسایی کردند (۲۸). همچنین Petrova و همکارانش در سال ۲۰۰۲ باکتری های گرم مثبت آرتروباکتر، اکسیگو باکتریوم، میکروکوکوس و باسیلوس و باکتری های گرم منفی پلیزیوموناس، آسینتوباکتر و سودوموناس مقاوم به جیوه را شناسایی نمودند (۲۵) و Felske و همکارانش نیز در سال ۲۰۰۳ *Pseudomonas aeruginosa* مقاوم به جیوه را جداسازی و شناسایی کردند (۲۹).

### References:

1. Kumar H.D, Aquatic ecology Chapter VII, General ecology, First edition, New Delhi India, Vinkas press, 1994, 497-555.
2. Nascimento A., and Chartone Souza E., Operon mer: bacterial resistance to mercury and potential for bioremediation of contaminated environments, Genet. Mol. Res., 2003, 2(1): 92-101.
3. Wagner Dobler I., Von Canstein H., Timmis K.N., Li Y., and Deckwer W.D., Removal of mercury from chemical wastewater by microorganisms in technical scale, Environ.Sci.Techhnol., 2000, 34(21): 4628-4634.
4. Wackett L., Dodge A. and Ellis L., Microbial genomics and the periodic Table, Appl. Environ. Microbiol., 2004, 70(2): 647-655.
5. Kiyono M. and Pan Hau H., Genetic engineering of bacteria for environmental remediation of mercury, J.Health.Sci., 2006, 52(3): 199-204.
6. Tothova T., Pritas P., and Javorsky P., Mercuric reductase gene transfer from soil bacteria to rumen bacteria,

- Folia.Microbiol., 2006, 51(4):317-319.
7. Deckwer W.D., Becker F.U., Ledakowicz S., and Wagner Dobler I., Microbial removal of ionic mercury in a three phase fluidized bed reactor, *Environ.Sci.*, 38(6): 1858-1865.
  8. Barkay T., Miller S.M., and Summers A.O., Bacterial mercury resistance from atoms to ecosystems, *FEMS Microbiol. Rev.*, 2003, 27: 355-384.
  9. Barkay T., Adaptation of aquatic microbial communities to Hg(II) stress, *Appl.Environ.Microbiol.*, 1987, 53(12): 2725-2732.
  10. Ray S., Gachhui R., Pahan K., Chaudhury J., and Mundal A., Detoxification of mercury and organomercurials by nitrogen fixing soil bacteria, 1989, *J.Bio.sci.*, 14(2):173-182.
  11. Masura N., Huang C., Takeshi Y., and Ginro E., Study on ubiquity of mercury resistance genes and multi heavy metal resistance of Clostridia, *Procee. Environ. Engin. Res.*, 1999, 36: 29-37.
  12. Schelert J., Dixit V., Hoang V., Simbahan J., Drozda M., and Blum P., Occurrence and characterization of mercury resistance in the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus sulfataricus* by use of gene disruption, *J.Bacteriol.*, 2004, 186(2):427-437.
  13. Chen Sh., and Wilson B., Construction and characterization of E.coli genetically engineering for bioremediation of contaminated environments, *Appl.Environ.Microbiol.*, 1997, 63(6): 2442-2445.
  14. Brunke M., Deckwer W.D., Frischmuth A., Horn J.M, Lundsorf H., Rhode M., Rohrocht M., Timmis K.N., and Weppen P., Microbial retention of mercury from waste streams in a laboratory column containing merA gene bacteria, *FEMS Microbiol. Rev.*, 1993, 11: 145-152
  15. Von Canstein H., Li Y., Timmis K.N., Deckwer W.D., and Wagner Dobler I., Removal of mercury from chlor alkali electrolysis wastewater by a mercury resistance *Pseudomonas putida* strain, *Appl.Environ.Microbiol.*, 1999, 65(12):5279-5284.
۱۶. کفیل زاده، ف.، بررسی آلودگی فلزات سنگین در رودخانه کر، طرح پژوهشی، ۱۳۸۴، دانشگاه آزاد اسلامی ارسنجان.
۱۷. کریمی، ی.، مطالعه حوزه آبریز رودخانه کر و سیوند، ۱۳۷۴، اداره کل حفاظت از محیط زیست استان فارس.
18. Manual of Oceanographic and Observations Pollutant Analysis Methods, (MOOPAM), Chapter III Analysis method, 1999, ROMPE, Kuwait. 257-342.
  19. Wagner Dobler I., Lundsorf H., Lubbenhausen T., Von Canstein H., and Li Y., 2000, Structure and species composition of mercury reducing biofilms, *Appl.Environ.Microbiol.*, 66(10):4559-4563.
  20. Harley J.P and Prescott L.M., Biochemical activities of bacteria, Laboratory exercises in microbiology, Fifth edition, New York USA, McGraw Hill Pub., 2002, 125-219.
  21. Mahler I., Levinson H.S., Wang Y.and Halvorson H.O., 1986, Cadmium and mercury resistance Bacillus strains from a salt marsh and from Boston harbor, *Appl.Environ.Microbiol.*, 56(6):1293-1298.
  22. Barkay T., Adaptation of aquatic microbial communities to Hg(II) stress, *Appl.Environ.Microbiol.*, 1987, 53(12):2725-2732.
  23. Osborn A.M., Bruce K.D., Strike P., and Ritchie D.A., 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.
  24. Nakamura K., Sakamoto M., Uchiyama H., and Yagi O., Organomercury volatilizing bacteria in the mercury polluted sediment of Minamata bay, Japan, *Appl.Environ.Microbiol.*, 1990, 56(1):304-305.
  25. Petrova M.A., Mindlin S., Gorlenko Z., Kaliaeva E., Soina V., and Bogdanova E., Mercury resistance bacteria from permafrost sediments and prospects for their use in comparative studies of mercury resistance determinants, *Genetika.*, 2002, 38(11):1569-1574.
  26. Schneiker S., Keller M., Droge M., Lanka E., Puhler A., and Selbistschka W., 2001, The genetic organization and evolution of the broad host range mercury resistance plasmid pSB102 isolated from a microbial pollution residing in the rizhospher of alfalfa, *Nucleotide Acid res.*, 29(24): 5169-5181.
  27. Robinson, J.B., and Tuovinen O.H., Mechanisms of microbial resistance and detoxification of mercury and organomercury compounds: physiological, biochemical and genetic analysis, *J.Microbiol.Rev.*, 1984, 48(2): 95-124.
  28. Pahan K., Ray S., Gachhui R., Chaudhuri J., and Mandal A., Ecological and biochemical studies on mercury resistance bacteria. *Indian, J.Environ.Health*, 1990, 32(3): 250-261.
  29. Felske A.D., Fehr W., Pauling B.V., Von Canstein H., and Wagner Dobler I., Functional profiling of mercuric reductase genes in biofilm communities of a technical scale biocatalyzer, *BMC Microbiology*, 2003, 4(6): 1-11.
  30. Barkay T., Fouts D.L., and Olsen B.H., Preparation of a DNA probe for detection of mercury resistance genes in gram negative bacterial communities, *Appl. Environ. Microbiol.*, 1985, 49(3): 686-692.



[www.jmw.ir](http://www.jmw.ir)





## Isolation and identification of mercury resistant bacteria from water and sediments of Kor River, Iran

Kafilzadeh F<sup>1\*</sup>, Mirzaei N<sup>1</sup>, Kargar M<sup>1</sup>

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

### Abstract

*Background and objectives:* Mercury is one of the most toxic heavy metals. Even small amounts of mercury are highly toxic for all organisms, but some bacteria are resistant to mercury using special mechanisms. The aims of this study were isolation and identification of mercury resistant bacteria and survey of relation between levels of environment pollution to mercury and isolation of resistant bacteria.

*Material and methods:* The samples were collected from water and sediments of four stations of Kor River in four seasons from summer 2006 to spring 2007. Amount of mercury in the samples were measured. Bacterial numbers in both medium containing mercury and with out mercury were enumerated. Isolation of mercury resistant bacteria was performed using primary enrichment and direct plating on agar. The bacteria were identified with conventional biochemical tests.

*Results:* The number bacteria in the medium with out Hg was  $1 \times 10^7$  CFU/ml or CFU/g and more than medium containing Hg. Frequencies of mercury resistant bacteria was 54.2 % in Ploe Khan station and 4.3 % in Droodzan station. These stations were the most contaminated and uncontaminated areas of the Kor River Respectively. Different bacterial genera such as *Pseudomonas sp.*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus sp.*, *Enterobacter sp.*, *Klebsiella sp.*, *Serratia marcescens* and etc. were identified as mercury resistant bacteria.

*Conclusion:* Our study showed utilization of primary enrichment in comparing to the direct plating on agar lead to better isolation of mercury resistant bacteria. Moreover, enhancement of mercury levels in the environment will increase the probability of the isolation of mercury resistant bacteria.

*Keywords:* Mercury resistant bacteria, *Serratia marcescens*, mercury, sediment, Kor River.