

تعیین غلظت مؤثر ۵۰ درصد بازدارنده رشد (EC_{۵۰}) فلزات سنگین بر باکتری‌های موجود در راکتور

منقطع متوالی

محمد رضا زارع^۱، علی فاتحی‌زاده^۲، محمدمهدی امین^۳، افشین ابراهیمی^۴، بیژن بینا^۵، آیت رحمانی^۶،
محمد رضا عرفانی^۷، حمیده ابراهیمی^۸، مهناز حیدری^۹

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: در بین آلاینده‌های شیمیایی موجود در فاضلاب، فلزات سنگین جزء ترکیبات مقاومی به شمار می‌روند که سمیت آن‌ها بر فرایندهای بیولوژیکی تصفیه فاضلاب و همچنین بر انسان و محیط در مطالعات مختلفی به اثبات رسیده است. در مطالعه حاضر، غلظت مؤثر ۵۰ درصد بازدارنده رشد (EC_{۵۰} یا Effective concentration ۵۰٪) فلزات کادمیوم، سرب و جیوه بر باکتری‌های غالب موجود در راکتور منقطع متوالی (SBR یا Sequencing batch reactor) مورد بررسی قرار گرفت.

روش‌ها: نمونه بیومس SBR از واحد بیولوژیکی SBR تصفیه‌خانه شهرک صنعتی مورچه‌خورت اصفهان تهیه شد. پس از کشت و ایزوله باکتری‌های غالب موجود در این واحد، توالی DNA آن‌ها به وسیله تکنیک واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR یا Polymerase chain reaction) تعیین و نوع باکتری‌ها نیز مشخص گردید. پس از مواجهه این باکتری‌ها با غلظت‌های مختلفی از فلزات جیوه، کادمیوم و سرب، مقادیر EC_{۵۰} آن‌ها با استفاده از آزمون زیستی Resazurin تعیین شد.

یافته‌ها: چهار گونه باکتریایی «آئروموناس، سودوموناس، باسیلوس و انتروباکتر»، بیشترین تعداد را در SBR داشتند. تفاوت زیادی در حساسیت این چهار باکتری به فلزات سنگین مشاهده گردید و سودوموناس حساس‌ترین باکتری به کادمیوم و جیوه بود؛ در حالی که آئروموناس گونه حساسی به فلز سرب بود.

نتیجه‌گیری: می‌توان گفت که سودوموناس و آئروموناس بیواندیکاتورهای باکتریایی مناسبی جهت ارزیابی سمیت فاضلاب‌ها و پساب‌های آلوده به فلزات سنگین می‌باشند.

واژه‌های کلیدی: غلظت مؤثر بازدارنده، راکتور منقطع متوالی، سمیت، فلزات

ارجاع: زارع محمد رضا، فاتحی‌زاده علی، امین محمدمهدی، ابراهیمی افشین، بینا بیژن، رحمانی آیت، عرفانی محمد رضا، ابراهیمی حمیده، حیدری مهناز. **تعیین غلظت مؤثر ۵۰ درصد بازدارنده رشد (EC_{۵۰}) فلزات سنگین بر باکتری‌های موجود در راکتور منقطع متوالی.** مجله تحقیقات نظام سلامت ۱۳۹۵؛ ۱۲ (۱): ۷۷-۸۳

پذیرش مقاله: ۱۳۹۴/۷/۲۲

دریافت مقاله: ۱۳۹۳/۱۰/۲۴

تحقیقات سم‌شناسی زیادی، سمیت فلزات سنگین یا مقاومت باکتری‌های ایزوله شده در محیط‌های مختلف را مورد بررسی قرار دادند (۹-۶). بررسی میزان رشد موجود برای تعیین اثرات سمی یک ترکیب، یکی از مهم‌ترین فاکتورهایی است که باید مورد بررسی قرار گیرد. بازدارندگی رشد باکتری‌ها را می‌توان به وسیله روش‌های مختلفی از جمله شمارش میکروسکوپی مستقیم، شمارش پلیت، اندازه‌گیری کدورت، وزن خشک، بیولومینسانس، جذب و... تعیین نمود (۱۰). هنگامی که چندین گونه باکتریایی به صورت هم‌زمان باید در یک آزمایش ارزیابی شوند، می‌توان از میکروپلیت‌ها نیز جهت تعیین رشد آن‌ها

مقدمه

فاضلاب‌های صنعتی به خصوص فاضلاب‌های ناشی از صنایع شیمیایی و آبکاری اغلب حاوی ترکیبات بسیار سمی هستند (۲، ۱). راکتور منقطع متوالی (SBR یا Sequencing batch reactors) یکی از روش‌های تصفیه فاضلاب می‌باشد که بر اساس مواجهه دوره‌ای باکتری‌ها با شرایط خاص بهره‌برداری تصفیه‌خانه، توسعه یافته است (۳). یکی از مهم‌ترین فاکتورهایی که راندمان تصفیه واحدهای SBR را تحت تأثیر قرار می‌دهد، فعالیت، زنده بودن و موجود بودن باکتری‌های تجزیه کننده می‌باشد (۵، ۴).

- ۱- استادیار، گروه مهندسی بهداشت محیط، دانشکده بهداشت اوز، دانشکده علوم پزشکی لارستان، لارستان، ایران و مرکز تحقیقات محیط زیست و دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
- ۲- استادیار، مرکز تحقیقات محیط زیست و گروه مهندسی بهداشت محیط، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
- ۳- استاد، مرکز تحقیقات محیط زیست و گروه مهندسی بهداشت محیط، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
- ۴- دانشیار، مرکز تحقیقات محیط زیست و گروه مهندسی بهداشت محیط، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
- ۵- دانشجوی دکتری، گروه مهندسی بهداشت محیط، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
- ۶- استادیار، گروه مهندسی بهداشت محیط، دانشکده بهداشت اوز، دانشکده علوم پزشکی لارستان، لارستان، ایران
- ۷- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه مهندسی بهداشت محیط، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
- ۸- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه مهندسی بهداشت محیط، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران

Email: bbina123@yahoo.com

نویسنده مسؤول: بیژن بینا

گفته‌ای انتخاب شد که غلظت مورد نظر در آزمایش‌های هر آزمون تأمین گردد. هر آزمون با اضافه کردن ۴ ml از باکتری‌های ایزوله شده با دانسیته اپتیکی 1 ± 0.1 صورت گرفت. لوله‌های آزمایش حاوی مواد آزمون‌ها در دمای 21°C انکوبه شدند. پس از ۳۰ دقیقه، ۴ ml از هر لوله برداشت گردید (۱۴). بعد از حذف باکتری‌ها به وسیله سانتریفیوژ (۳۰۰۰ rpm، ۳ دقیقه)، کاهش رزازورین به وسیله اسپکتروفتومتر در طول موج ۶۱۰ nm و بر اساس نمونه شاهد بدون فلز مورد تعیین قرار گرفت. فعالیت آنزیم دهیدروژناز در حضور باکتری‌های زنده و فعال، باعث تغییر رنگ رزازورین از آبی به صورتی می‌شود.

جهت محاسبه EC_{۵۰} در زمان ۳۰ دقیقه از آنالیز Probit در نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶/۰ استفاده گردید. حدود اطمینان برای EC_{۵۰} ۹۵ درصد بود که به صورت \pm میانگین EC_{۵۰} نشان داده شد. آنالیز آماری EC_{۵۰} به وسیله دو آزمون Kruskal-Wallis و One-way ANOVA صورت گرفت. آزمون Dunnett T3 جهت تعیین معنی‌داری تفاوت‌های EC_{۵۰} در بین فلزات مختلف استفاده گردید.

یافته‌ها

گونه‌های غالب در SBR ایزوله شدند و نوع گونه‌ها پس از تعیین توالی DNA مورد شناسایی قرار گرفتند. گونه‌های غالب در SBR در جدول ۱ نشان داده شد. بر اساس این جدول، گونه‌های باکتریایی غالب در SBR مورد بررسی شامل سودوموناس، آئروموناس، انتروباکتر و باسیلوس بودند.

میزان غیر فعال‌سازی باکتری‌ها (\pm حدود اطمینان) بر اساس بازدارندگی در کاهش رزازورین، برای ۴ گونه غالب باکتریایی پس از ۳۰ دقیقه مواجهه با غلظت‌های مختلف فلزات سنگین در شکل ۱ مشخص گردید. میزان‌های EC_{۵۰} برای هر یک از فلزات سنگین نیز در جدول ۲ گزارش شد. تبدیل رزازورین به رزوروفین در هیچ یک از نمونه‌های شاهد بدون فلز وجود نداشت که این موضوع، هر گونه فرضیه‌ای مبنی بر وجود استرس احتمالی در شرایط آزمایش را رد کرد.

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که کادمیوم نسبت به جیوه و سرب سمی‌تر بود. میزان‌های EC_{۵۰} در مدت زمان ۳۰ دقیقه مواجهه با کادمیوم برای تمام باکتری‌ها در محدوده 0.06 تا $2.77 \mu\text{mol/l}$ به دست آمد (جدول ۲). بر اساس این نتایج، باکتری‌های سودوموناس و انتروباکتر بیشترین حساسیت را به فلز کادمیوم نشان دادند.

آنالیز آماری (جدول ۳) با استفاده از One-way ANOVA مشخص نمود که تفاوت معنی‌داری بین EC_{۵۰} فلزات سنگین Hg، Cd و Pb وجود داشت ($P < 0.05$).

استفاده کرد. در این صورت میزان رشد باکتری‌ها از طریق تعیین میزان بیولوژینسانس یا جذب نور آن‌ها امکان‌پذیر می‌باشد (۱۲، ۱۱).

رنگ‌ها بر پایه ترازولیوم همچون رزازورین (Resazurin) و رزوروفین (Resorufin) به عنوان اندیکاتور رشد باکتری‌ها از دهه ۱۹۴۰ تا امروز مورد استفاده قرار گرفته است. با کاربرد این رنگ‌ها به عنوان پذیرنده الکترون، می‌توان میزان فعالیت سیستم‌های آنزیم اکسیداتیو را تعیین نمود (۱۴، ۱۳). بر این اساس، رزازورین می‌تواند در تعیین میزان رشد و حیات میکروارگانیسم‌ها مورد استفاده قرار گیرد (۱۵). اما بر اساس بررسی‌های صورت گرفته، به نظر می‌رسد که این ماده تاکنون جهت تعیین اثرات فلزات سنگین بر باکتری‌های غالب موجود در واحد SBR استفاده نشده است. هدف مطالعه حاضر، کاربرد رزازورین به عنوان یک شاخص جهت ارزیابی اثر فلزهای کادمیوم، سرب و جیوه بر باکتری‌های غالب واحد SBR بود.

روش‌ها

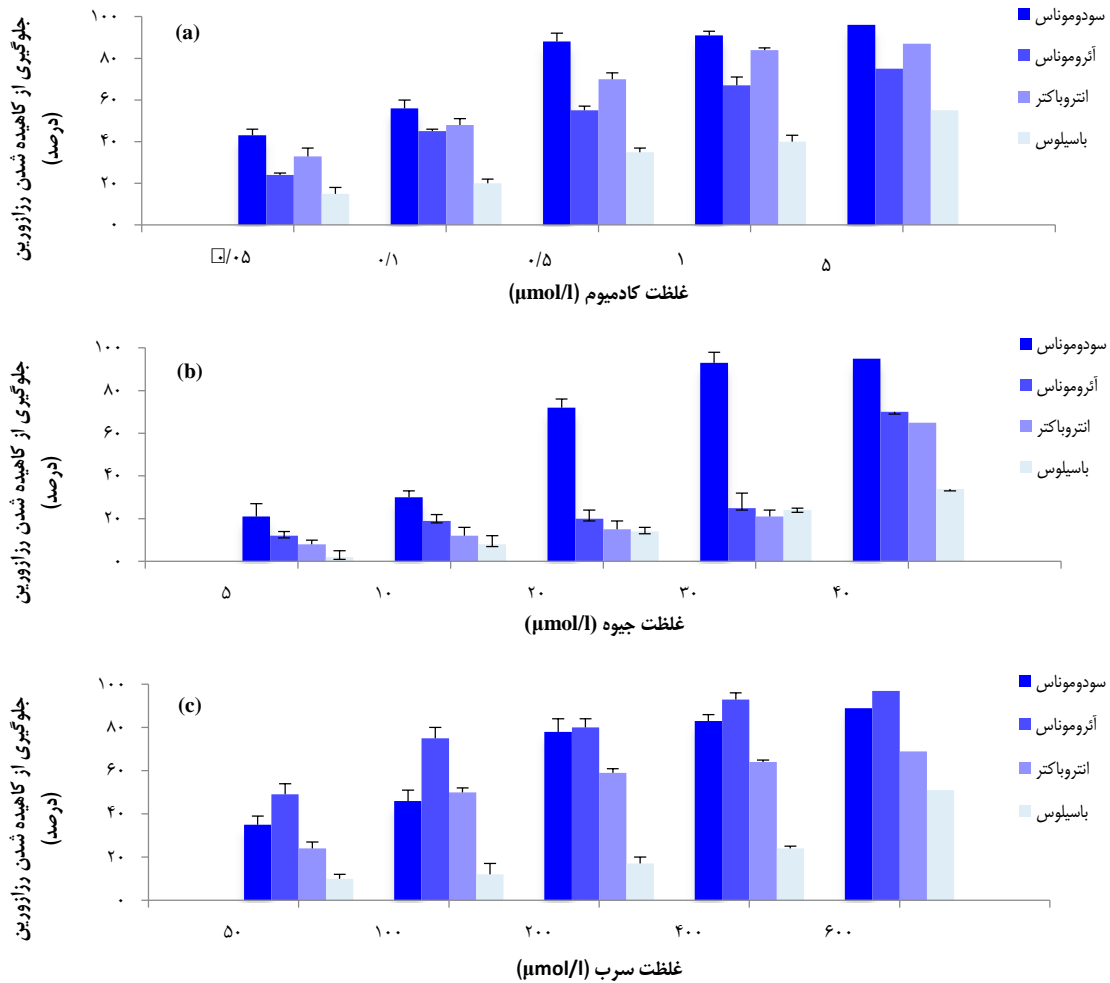
نمونه‌برداری از زیست توده موجود در SBR؛ نمونه زیست توده SBR از واحد بیولوژیکی مربوط به تصفیه‌خانه شهرک صنعتی مورچه خورت شهر اصفهان تهیه گردید. از طریق کشت ۰/۵ ml از فاضلاب رقیق شده SBR در محیط کشت نوترینت آگار، بیومس موجود در SBR جداسازی و کشت شد.

تشخیص مولکولی باکتری‌های جدا شده؛ کلنی‌های جدا شده از باکتری‌ها در ۱۰۰ μl آب دیونیزه حل گردید. استخراج DNA این باکتری‌ها با جوشاندن آن‌ها به مدت ۱۵ دقیقه و سانتریفیوژ کردن (۵ دقیقه با دور ۱۴۰۰۰) صورت گرفت (۱۶). سوپرناتانت محصول سانتریفیوژ در روش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (Polymerase chain reaction یا PCR) با پرایمرهای Eubac ۲۷F و Eubac ۱۴۹۲R استفاده گردید. واکنش PCR در یک ترموسایکلر (MJ Research, USA) تحت شرایط استاندارد انجام شد. خالص‌سازی محصولات PCR به وسیله کیت QIA quick PCR (Qiagen Inc., CA) purification صورت گرفت و توالی ژن‌های DNA تعیین گردید. توالی‌های DNA به وسیله الگوریتم BLAST و مرکز اطلاعات ملی اطلاعات بیوتکنولوژی (National Center for Biotechnology Information یا NCBI) آنالیز شد (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) تا نوع گونه‌های باکتریایی مورد شناسایی قرار گیرد.

آزمون زیستی جهت تعیین سمیت: محلول‌های استوک با حل کردن کلراید جیوه، کلراید کادمیوم و کلراید سرب در آب دیونیزه تهیه گردید. کل مایع هر آزمون قبل از اضافه کردن باکتری‌ها، حجم ۱۶ ml داشت که شامل ۲ ml نوترینت برات (با غلظت $\times 10$)، ۰/۲ ml محلول رزازورین با غلظت ۱ g/l، ۱ ml ۲ بافر phosphate-HCl و ۴ ml از فلز مورد آزمایش بود که در نهایت به وسیله آب مقطر به حجم ۱۶ ml رسید. غلظت فلز سنگین در این مرحله به

جدول ۱. توزیع گونه‌های باکتریایی در نمونه فاضلاب واحد Sequencing batch reactors

نوع باکتری	تعداد کلنی با رقیق‌سازی 10^{-7}	توزیع (درصد)
سودوموناس	۲۸	۶۰/۳۲
آئروموناس	۱۲	۱۹/۰۵
انتروباکتر	۸	۱۲/۷۰
باسیلوس	۵	۷/۹۳
کل باکتری‌ها	۶۳	۱۰۰



شکل ۱. درصد جلوگیری از کاهیده شدن رزازورین برای ۴ گونه باکتریایی غالب واحد sequencing batch reactors (SBR) پس از ۳۰ دقیقه مواجهه با غلظت‌های مختلف فلزات سنگین کادمیوم (a)، جیوه (b) و سرب (c) (برای هر گروه از باکتری‌ها و در هر غلظت، خطای استاندارد در بالای شکل ارائه شده است)

جدول ۲. میانگین EC_{50} بر حسب $\mu\text{mol/l}$ برای ۴ باکتری غالب واحد sequencing batch reactors در اثر مواجهه با فلزات سنگین

EC_{50} ۳۰ دقیقه‌ای (۹۵ درصد حدود اطمینان) ($\mu\text{mol/l}$)			گونه‌های باکتریایی
کادمیوم	جیوه	سرب	
۰/۰۶ (۰/۰۴-۰/۰۹)	۱۱/۷۵ (۷/۱۹-۱۶/۸۱)	۹۱/۹۶ (۷۲/۳۹-۱۱۱/۴۵)	سودوموناس
۰/۴۳ (۰/۲۳-۰/۹۷)	۴۲/۰۱ (۲۹/۹۳-۵۴/۱۳)	۴۸/۲۷ (۳۳/۴۰-۶۲/۴۴)	آئروموناس
۰/۱۳ (۰/۰۸-۰/۱۸)	۴۷/۵۷ (۳۵/۱۲-۵۹/۹۸)	۱۵۵/۰۳ (۵۴/۷۴-۳۱۶/۷۲)	انتروباکتر
۲/۷۷ (۱/۵۷-۶/۶۷)	۶۴/۹۷ (۴۹/۶۰-۱۰۳/۰۷)	۹۶۳/۴۰ (۳۹۰/۸۳-۱۰۲۰/۲۱)	باسیلوس

همان گونه که در جدول ۳ نشان داده شد، این نتیجه به وسیله آزمون Kruskal-Wallis نیز مورد تأیید قرار گرفت. معنی‌دار بودن تفاوت‌ها از لحاظ آماری در خصوص گونه‌های مختلف باکتریایی در جدول ۴ قابل مشاهده است.

آزمون Dunnett حساسیت ۴ باکتری مورد آزمایش را برای هر یک از فلزات به صورت سرب: آئروموناس < سودوموناس < انتروباکتر < باسیلوس، جیوه: سودوموناس < آئروموناس < انتروباکتر < باسیلوس و کادمیوم: سودوموناس < انتروباکتر < آئروموناس < باسیلوس به دست آورد.

آزمون Dunnett تفاوت معنی‌داری بین EC_{50} ‌های به دست آمده به وسیله باکتری‌های آئروموناس و انتروباکتر و نیز باسیلوس و انتروباکتر در تعیین سمیت جیوه نشان نداد. تفاوت EC_{50} به دست آمده به وسیله باکتری‌های

جدول ۳. نتایج آزمون‌های One-way ANOVA و Kruskal-Wallis بر روی مقادیر EC₅₀ با ۴ مرتبه تکرار برای ۴ نوع باکتری

فلزات سنگین	آزمون یک طرفه ANOVA			آزمون Kruskal-Wallis	
	بین گروه‌ها	درون گروه‌ها	کل	درجه آزادی	P
کادمیوم	مجموع مربع‌ها	۱۵/۳۶۴	۱۶/۷۱۸	۳	۰/۰۲۵
	درجه آزادی	۳	۱۱		
	مربع میانگین	۵/۱۲۱	۰/۱۶۹		
	F	۳۰/۲۷۲			
	P	□ ۰/۰۰۱			
جیوه	مجموع مربع‌ها	۴۴۱۸/۳۴۴	۴۶۸۷/۲۶۲	۳	۰/۰۲۲
	درجه آزادی	۳	۱۱		
	مربع میانگین	۱۴۷۲/۷۸۱	۳۳/۶۱۵		
	F	۸۳/۸۱۳			
	P	□ ۰/۰۰۱			
سرب	مجموع مربع‌ها	۱۷۰۰۷۰۵/۹۶۷	۱۷۰۷۷۳۴/۰۸۷	۳	۰/۰۱۶
	درجه آزادی	۳	۱۱		
	مربع میانگین	۵۶۶۹۰۱/۹۸۹	۸۷۸/۵۱۵		
	F	۶۴۵/۲۹۶			
	P	□ ۰/۰۰۱			

آثروموناتس بودند که در مجموع، ۷۹/۳۷ درصد از کل کلنی‌های ایزوله شده را شامل می‌شدند. مطالعه Li و همکاران در این خصوص نشان داد که سودوموناتس و آثروموناتس دارای بیشترین تعداد در واحد SBR هستند (۱۶). با توجه به حضور این گونه‌های باکتریایی در تصفیه‌خانه به عنوان باکتری‌های غالب و نیز با توجه به داشتن بیشترین حساسیت نسبت به سایر گونه‌های مورد بررسی، می‌توان گفت که سودوموناتس و آثروموناتس بیواندیکاتورهای باکتریایی مناسبی جهت ارزیابی سمیت فاضلاب‌ها و پساب‌های آلوده به فلزات سنگین می‌باشد.

سودوموناتس و انتروباکتر در تعیین سمیت فلز کادمیوم نیز از لحاظ آماری معنی‌دار نبود؛ به طوری که میزان EC₅₀ برای این باکتری‌ها به ترتیب ۰/۰۶ و ۰/۱۳ μmol/l به دست آمد.

بحث

در این مطالعه، اثرات سمی کادمیوم، جیوه و سرب بر باکتری‌های غالب واحد SBR در مطالعه حاضر با استفاده از آزمون رزاورین مورد بررسی قرار گرفت. بیشترین تعداد باکتری‌های موجود در واحد SBR مورد مطالعه، سودوموناتس و

جدول ۴. نتایج آزمون Dunnett T3 جهت مقایسه چندگانه EC₅₀‌های به دست آمده با استفاده از باکتری‌ها و فلزات مختلف

فلزات سنگین	گونه‌های باکتریایی	معنی‌داری تفاوت بین مقادیر EC ₅₀		
		سودوموناتس	آثروموناتس	انتروباکتر
کادمیوم	سودوموناتس	-	*	n.s.
	آثروموناتس	*	-	*
	انتروباکتر	n.s.	*	-
جیوه	باسیلوس	*	*	*
	سودوموناتس	-	*	**
	آثروموناتس	*	-	n.s.
سرب	انتروباکتر	**	n.s.	n.s.
	باسیلوس	*	*	n.s.
	سودوموناتس	-	*	*
	آثروموناتس	*	-	**
	انتروباکتر	*	**	-
	باسیلوس	**	**	**

* P < ۰/۰۵؛ ** P < ۰/۰۱؛ n.s.: تفاوت از لحاظ آماری معنی‌دار نبود و P > ۰/۰۵

بر کاربرد این باکتری به عنوان یک روش پایشی در تصفیه‌خانه‌های فاضلاب مطرح شده است. مهم‌ترین دلیل این می‌باشد که چون ویبریو فیشری باکتری محیط‌های دریایی است، حساسیت بیش از اندازه‌ای نسبت به فلزات سنگین و دیگر سموم دارد. در نتیجه، نتایج حاصل از آزمایش‌های تعیین سمیت با استفاده از این باکتری را نمی‌توان به درستی به جمعیت باکتریایی تصفیه‌خانه‌ها نسبت داد و اغلب حساسیت این گروه‌ها نسبت به هم متفاوت است (۲۱، ۲۰). این در حالی می‌باشد که هنگام استفاده از رزازورین جهت ارزیابی سمیت مواد، می‌توان از همان گروه از باکتری‌هایی استفاده نمود که در محیط هدف وجود دارند. بنابراین، اطلاعات آزمایشگاهی به دست آمده از این روش، قابل اعتمادتر و واقعی‌تر خواهند بود.

سمیت حاد ۳ فلز سنگین کادمیوم، جیوه و سرب بر روی ۴ نوع از باکتری‌های غالب واحد SBR در شرایط آزمایشگاهی مورد بررسی قرار گرفت. سودوموناس، آئروموناس، انتروباکتر و باسیلوس باکتری‌های غالب در SBR مورد مطالعه بودند. بر اساس مقادیر EC₅₀ به دست آمده برای ۴ گونه باکتریایی می‌توان نتیجه گرفت که سودوموناس و آئروموناس، بیواندیکاتورهای مناسبی جهت ارزیابی سمیت محیط‌های آبی و فاضلاب‌های آلوده به فلزات سنگین هستند. زمان کوتاه (۳۰ دقیقه) و سادگی آزمون زیستی با رزازورین باعث می‌شود که این آزمون در تصفیه‌خانه‌های کوچک به راحتی قابل استفاده باشد.

تشکر و قدردانی

مطالعه حاضر در قالب پایان‌نامه (با شماره طرح ۲۹۲۰۷۲) و با حمایت‌های مالی مرکز تحقیقات محیط زیست و دانشگاه علوم پزشکی اصفهان انجام گرفت. بدین وسیله نویسندگان، از مسؤولان این مراکز تشکر و قدردانی به عمل می‌آورند.

مطالعه حاضر مشخص نمود که گونه‌های غالب در تصفیه‌خانه مورد بررسی، جزء گونه‌های حساس به فلزات سنگین هستند. بنابراین، نسبت قارچ به باکتری SBR در اثر مواجهه با فلزات سنگین می‌تواند خیلی سریع تغییر کند که این امر می‌تواند باعث اختلال در فرایند تصفیه گردد.

میزان مقاومت در این مطالعه برای حساس‌ترین باکتری (آئروموناس) بین ۲۷ تا ۸۰۰۰۰ برابر بیش از مقادیری به دست آمد که در مطالعات گذشته گزارش شد (۱۹-۱۷). چنین تفاوت بسیار زیادی در آزمایش‌های تعیین سمیت و میزان مقاومت به فلزات سنگین ممکن است به دلیل فاکتورهای متعددی همچون استفاده از میکروارگانیسیم‌های مختلف، فرایند انتقال بیولوژیکی، غلظت آبیون‌های معدنی، ترکیب محیط کشت، رقابت دیگر کاتیون‌ها و غلظت عوامل شلاته کننده باشد (۲۱). همچنین، سمیت فلزات به وسیله روش‌های مختلفی همچون الحاق باکتریایی، تجمع زیستی و تشکیل کمپلکس با مواد آلی می‌تواند تحت تأثیر قرار گیرد (۷). از طرف دیگر، سازگار شدن باکتری‌ها با فلزات نیز ممکن است در محیط‌های آبی صورت پذیرد (۸). در واقع، باکتری‌هایی که از محیط‌های حاوی فلزات سنگین تهیه شدند، مقاومت بیشتری نسبت به سایر باکتری‌ها از خود نشان می‌دهند. نمونه‌های باکتریایی مطالعه حاضر از تصفیه‌خانه شهرک صنعتی مورچه خورت شهر اصفهان تهیه گردید و بی‌شک مواجهه با فلزات سنگین در تصفیه‌خانه شهرک‌های صنعتی بیشتر است. از این رو، تفاوت زیاد نتایج این مطالعه با مطالعات قبلی می‌تواند به همین دلیل باشد.

بیشتر مطالعات گذشته از باکتری‌های بیولومینسانس به عنوان بیواندیکاتور استفاده کردند. مهم‌ترین باکتری بیولومینسانس که در بیشتر مطالعات استفاده شده است، باکتری ویبریو فیشری می‌باشد که باکتری محیط‌های دریایی محسوب می‌گردد. در این خصوص باید توجه داشت که به تازگی ایراداتی مبنی

References

1. Congeevaram S, Dhanarani S, Park J, Dexilin M, Thamaraiselvi K. Biosorption of chromium and nickel by heavy metal resistant fungal and bacterial isolates. *J Hazard Mater* 2007; 146(1-2): 270-7.
2. Venkata Mohan S, Sharma PN. Pharmaceutical wastewater and treatment technologies. *Pharma Bio World* 2002; 11(1): 93-100.
3. Mohan SV, Rao NC, Prasad KK, Madhavi BTV, Sharma PN. Treatment of complex chemical wastewater in a sequencing batch reactor (SBR) with an aerobic suspended growth configuration. *Process Biochem* 2005; 40(5): 1501-8.
4. Irato P, Piccinni E. Effects of cadmium and copper on *Astasia longa*: metal uptake and glutathione levels. *Acta Protozoologica* 1996; 35(4): 281-5.
5. Jose J, Giridhar R, Anas A, LokaBharathi PA, Nair S. Heavy metal pollution exerts reduction/adaptation in the diversity and enzyme expression profile of heterotrophic bacteria in Cochin estuary, India. *Environ Pollut* 2011; 159(10): 2775-80.
6. Abou-Shanab RA, van Berkum P, Angle JS. Heavy metal resistance and genotypic analysis of metal resistance genes in gram-positive and gram-negative bacteria present in Ni-rich serpentine soil and in the rhizosphere of *Alyssum murale*. *Chemosphere* 2007; 68(2): 360-7.
7. Kim SJ. Effect of heavy metals on natural populations of bacteria from surface microlayers and subsurface water. *Mar Ecol Prog Ser* 1985; 26: 203-6.
8. Hassen A, Saidi N, Cherif M, Boudabous A. Resistance of environmental bacteria to heavy metals. *Bioresour Technol* 1998; 64(1): 7-15.
9. Sprocati AR, Alisi C, Segre L, Tasso F, Galletti M, Cremisini C. Investigating heavy metal resistance, bioaccumulation and metabolic profile of a metallophilic microbial consortium native to an abandoned mine. *Sci Total Environ* 2006; 366(2-3): 649-58.
10. Brock TD, Madigan MT, Martinko JM. *Biology of microorganisms*. 7th ed. Upper Saddle River, NJ: Prentice Hall; 1994.
11. Gellert G. Sensitivity and significance of luminescent bacteria in chronic toxicity testing based on growth and bioluminescence. *Ecotoxicol Environ Saf* 2000; 45(1): 87-91.
12. Gellert G, Stommel A. Influence of microplate material on the sensitivity of growth inhibition tests with bacteria assessing toxic organic substances in water and waste water. *Environ Toxicol* 1999; 14(4): 424-8.
13. Glenner GG. Tetrazolium salts. In: Conn HJ, Editor. *Biological stains: A handbook on the nature and uses of the dyes employed in the biological laboratory*. Philadelphia, PA: Williams & Wilkins; 2009. p. 230-5.

14. Liu D.A rapid biochemical test for measuring chemical toxicity. *Bull Environ Contam Toxicol* 1981; 26(2): 145-9.
15. Sreenivasan PK, Tambs G, Gittins E, Nabi N, Gaffar A. A rapid procedure to ascertain the antimicrobial efficacy of oral care formulations. *Oral Microbiol Immunol* 2003; 18(6): 371-8.
16. Li J, Xing XH, Wang BZ. Characteristics of phosphorus removal from wastewater by biofilm sequencing batch reactor (SBR). *Biochem Eng J* 2003; 16(3): 279-85.
17. Fulladosa E, Murat JC, Villaescusa I. Study on the toxicity of binary equitoxic mixtures of metals using the luminescent bacteria *Vibrio fischeri* as a biological target. *Chemosphere* 2005; 58(5): 551-7.
18. Tsiridis V, Petala M, Samaras P, Hadjispyrou S, Sakellaropoulos G, Kungolos A. Interactive toxic effects of heavy metals and humic acids on *Vibrio fischeri*. *Ecotoxicol Environ Saf* 2006; 63(1): 158-67.
19. Sillanpää M, Oikari A. Assessing the impact of complexation by EDTA and DTPA on heavy metal toxicity using microtox bioassay. *Chemosphere* 1996; 32(8): 1485-97.
20. Sterritt RM, Lester JN. Interactions of heavy metals with bacteria. *Sci Total Environ* 1980; 14(1): 5-17.
21. Kelly CJ, Lajoie CA, Layton AC, Sayler GS. Bioluminescent reporter bacterium for toxicity monitoring in biological wastewater treatment systems. *Water Environ Res* 1999; 71(1): 31-5.

Assessment of the Half Maximal Effective Concentration of Growth Inhibition for Heavy Metals on Bacteria Present in Sequencing Batch Reactors

Mohammad Reza Zare¹, Ali Fatehizadeh², Mohammad Mehdi Amin³, Afshin Ebrahimi⁴, Bijan Bina³, Ayat Rahmani⁵, Mohammadreza Erfani⁶, Hamideh Ebrahimi⁷, Mahnaz Heydari⁸

Original Article

Abstract

Background: Among the chemical pollutants present in wastewater, heavy metals are persistent compounds the toxicity of which on biological wastewater processes, humans, and the environment has been proven in various studies. In this study, the half maximal effective concentration (EC₅₀) of growth inhibition of cadmium, lead, and mercury was assessed on dominant bacterial species present in sequencing batch reactors (SBR).

Methods: Biomass sample was obtained from the biological unit of the SBR established in Moorchehort Industrial Settlement, Isfahan, Iran. After cultivation and isolation of the dominant bacterial species, their DNA was sequenced through polymerase chain reaction (PCR) technique and the bacteria species were determined. After exposure of these bacteria to different concentrations of mercury, cadmium, and lead, their EC₅₀ was determined using resazurin bioassay.

Findings: Aeromonas, Pseudomonas, Bacillus, and Enterobacter were registered as the 4 dominant bacterial species in the SBR. A great difference was observed in the sensitivity of these 4 bacteria to the heavy metals. Pseudomonas was the most sensitive bacteria to cadmium and lead, while Aeromonas was the most sensitive specie to lead.

Conclusion: It can be concluded that Aeromonas and Pseudomonas are suitable bioindicators for toxicity assessment of wastewater and effluents contaminated with heavy metals.

Keywords: Inhibitory effective concentration, Sequencing batch reactor, Toxicity, Metals

Citation: Zare MR, Fatehizadeh A, Amin MM, Ebrahimi A, Bina B, Rahmani A, et al. **Assessment of the Half Maximal Effective Concentration of Growth Inhibition for Heavy Metals on Bacteria Present in Sequencing Batch Reactors.** J Health Syst Res 2016; 12(1): 77-83.

1- Assistant Professor, Department of Environmental Health Engineering, Evaz School of Health, Larestan School of Medical Sciences, Larestan AND Environment Research Center AND School of Health, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

2- Assistant Professor, Environment Research Center AND Department of Environmental Health Engineering, School of Health, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

3- Professor, Environment Research Center AND Department of Environmental Health Engineering, School of Health, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

4- Associate Professor, Environment Research Center AND Department of Environmental Health Engineering, School of Health, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

5- PhD Candidate, Department of Environmental Health Engineering, School of Health, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

6- Assistant Professor, Department of Environmental Health Engineering, Evaz School of Health, Larestan School of Medical Sciences, Larestan, Iran

7- MSc Student, Department of Environmental Health Engineering, School of Health, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

8- MSc Student, Department of Environmental Health Engineering, School of Health, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran

Corresponding Author: Bijan Bina, Email: bbina123@yahoo.com