تعیین غلظت مؤثر ۵۰ درصد بازدارنده رشد (EC_{50}) فلزات سنگین بر باکتری‌های موجود در راکتور منقطع متوالی

محمدرضا زارع[۱]، علی فاتحی‌زاده[۲]، محمدمهدی امین[۳]، افشین ابراهیمی[۴]، بیژن بینا[۳]، آیت رحمانی[۵]، محمدرضا عرفانی[۶]، حمیده ابراهیمی[۷]، مهناز حیدری[۸]

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 (Effective concentration ۵۰% یا EC_{50}) فلزات کادمیوم، سرب و جیوه بر باکتری‌های غالب موجود در راکتور منقطع متوالی (Sequencing batch reactor یا SBR) 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 پلیمراز (Polymerase chain reaction یا PCR) تعیین و نوع باکتری‌ها نیز مشخص گردید. پس از مواجهه این باکتری‌ها با غلظت‌های مختلفی از فلزات جیوه، کادمیوم و سرب، مقادیر EC_{50} آن‌ها با استفاده از آزمون زیستی Resazurin تعیین شد.

یافته‌ها: چهار گونه باکتریایی «آئرومونas، 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 آئرومونas گونه حساسی به فلز سرب بود.

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

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

ارجاع: زارع محمدرضا، فاتحی‌زاده علی، امین محمدمهدی، ابراهیمی افشین، بینا بیژن، رحمانی آیت، عرفانی محمدرضا، ابراهیمی حمیده، حیدری مهناز. **تعیین غلظت مؤثر ۵۰ درصد بازدارنده رشد (EC_{50}) فلزات سنگین بر باکتری‌های موجود در راکتور منقطع متوالی.** مجله تحقیقات نظام سلامت ۱۳۹۵؛ ۱۲ (۱): ۸۳-۷۷

دریافت مقاله: ۱۳۹۳/۱۰/۲۴ پذیرش مقاله: ۱۳۹۴/۷/۲۲

مقدمه

فاضلاب‌های صنعتی به خصوص فاضلاب‌های ناشی از صنایع شیمیایی و آبکاری اغلب حاوی ترکیبات بسیار سمی هستند (۲، ۱). راکتور منقطع متوالی (Sequencing batch reactors یا SBR) 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).

تحقیقات سم‌شناسی زیادی، سمیت فلزات سنگین یا مقاومت باکتری‌های ایزوله شده در محیط‌های مختلف را مورد بررسی قرار دادند (۹-۶، ۱). 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

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
نویسنده مسؤول: بیژن بینا
Email: bbina123@yahoo.com

[Downloaded from hsr.mui.ac.ir on 2026-11-06]

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

رنگ‌ها بر پایه تترازولیوم 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 (۶، ۱). سوپرناتانت محصول سانتریفیوژ در روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (Polymerase chain reaction یا PCR) با پرایمرهای Eubac ۲۷F و 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 دیونایز تهیه گردید. کل مایع هر آزمون قبل از اضافه کردن باکتری‌ها، حجم ۱۶ ml داشت که شامل ۲ ml نوترینت براث (با غلظت ۱۰×)، ۰/۲ ml محلول رزازورین با غلظت ۱ g/l، 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 گونه‌ای 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 ۰/۰۱ ± ۱ صورت گرفت. لوله‌های آزمایش حاوی مواد آزمون‌ها در دمای ۲۱ °C انکوبه شدند. پس از ۳۰ دقیقه، ۴ ml از هر لوله برداشت گردید (۱۴). بعد از حذف باکتری‌ها به وسیله سانتریفیوژ (۱۰۰۰۰ 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_{50} در زمان ۳۰ دقیقه از آنالیز Probit در نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶/۰ استفاده گردید. حدود اطمینان برای EC_{50}، ۹۵ درصد بود که به صورت ± میانگین EC_{50} نشان داده شد. آنالیز آماری EC_{50} به وسیله دو آزمون Kruskal-Wallis و One-way ANOVA صورت گرفت. آزمون Dunnett T3 جهت تعیین معنی‌داری تفاوت‌های EC_{50} 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 (± 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_{50} 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.

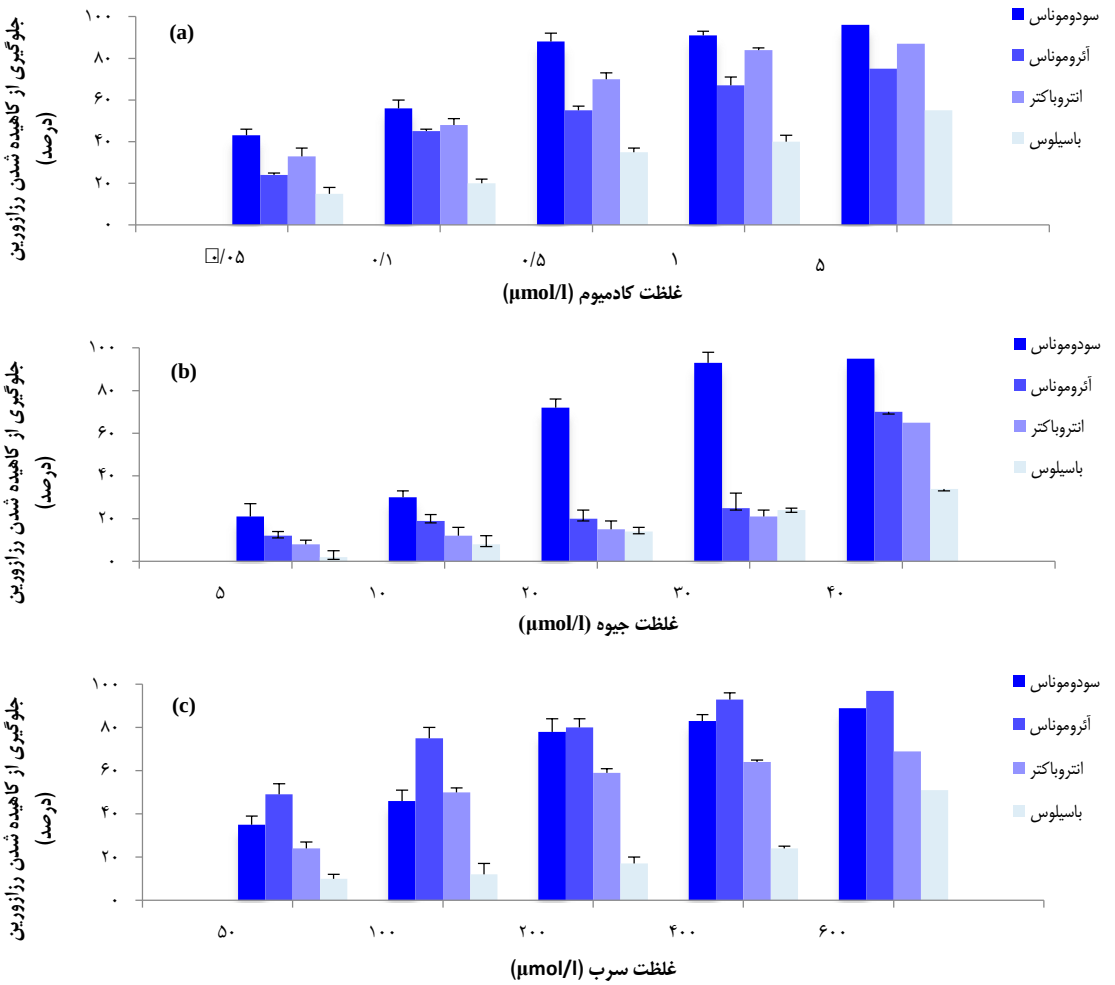
نتایج مطالعه حاضر نشان داد که کادمیوم نسبت به جیوه و سرب سمی‌تر بود. میزان‌های EC_{50} در مدت زمان ۳۰ دقیقه مواجهه با کادمیوم برای تمام باکتری‌ها در محدوده ۰/۰۶ تا ۲/۷۷ µmol/l به دست آمد (جدول ۲). بر اساس این نتایج، باکتری‌های سودوموناس و انتروباکتر بیشترین حساسیت را به فلز کادمیوم نشان دادند.

آنالیز آماری (جدول ۳) با استفاده از One-way ANOVA مشخص نمود که تفاوت معنی‌داری بین EC_{50} فلزات سنگین Cd، Hg و Pb وجود داشت ($P < 0/05$).

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

نوع باکتری	تعداد کلنی با رقیق‌سازی 10^{-7}	توزیع (درصد)
سودوموناس	۳۸	۶۰/۳۲
آئروموناس	۱۲	۱۹/۰۵
انتروباکتر	۸	۱۲/۷۰
باسیلوس	۵	۷/۹۳
کل باکتری‌ها	۶۳	۱۰۰

[Downloaded from hsr.mui.ac.ir on 2026-11-06]



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 ارایه شده است)

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

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

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

[Downloaded from hsr.mui.ac.ir on 2026-11-06]

جدول ۳. نتایج آزمون‌های One-way ANOVA و Kruskal-Wallis بر روی مقادیر EC_{50} 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	۱/۳۵۳	۱۶/۷۱۸	۳	۰/۰۲۵
	درجه آزادی	۳	۸	۱۱		
	مربع میانگین	۵/۱۲۱	۰/۱۶۹			
	F	۳۰/۲۷۲				
	P	□ ۰/۰۰۱				
جیوه	مجموع مربع‌ها	۴۴۱۸/۳۴۴	۲۶۸/۹۱۸	۴۶۸۷/۲۶۲	۳	۰/۰۲۲
	درجه آزادی	۳	۸	۱۱		
	مربع میانگین	۱۴۷۲/۷۸۱	۳۳/۶۱۵			
	F	۸۳/۸۱۳				
	P	□ ۰/۰۰۱				
سرب	مجموع مربع‌ها	۱۷۰۰۷۰۵/۹۶۷	۷۰۲۸/۱۲۰	۱۷۰۷۷۳۴/۰۸۷	۳	۰/۰۱۶
	درجه آزادی	۳	۸	۱۱		
	مربع میانگین	۵۶۶۹۰۱/۹۸۹	۸۷۸/۵۱۵			
	F	۶۴۵/۲۹۶				
	P	□ ۰/۰۰۱				

سودوموناس و انتروباکتر در تعیین سمیت فلز کادمیوم نیز از لحاظ آماری معنی‌دار نبود؛ به طوری که میزان EC_{50} 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 رزازورین مورد بررسی قرار گرفت. بیشترین تعداد باکتری‌های موجود در واحد SBR مورد مطالعه، سودوموناس و آئروموناس 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 سودوموناس و آئروموناس 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 سودوموناس و آئروموناس بیوانديکاتورهای باکتریایی مناسبی جهت ارزیابی سمیت فاضلاب‌ها و پساب‌های آلوده به فلزات سنگین می‌باشد.

جدول ۴. نتایج آزمون Dunnett T3 جهت مقایسه چندگانه EC_{50}های به دست آمده با استفاده از باکتری‌ها و فلزات مختلف

فلزات سنگین	گونه‌های باکتریایی	معنی‌داری تفاوت بین مقادیر EC_{50}			
		سودوموناس	آئروموناس	انتروباکتر	باسیلوس
کادمیوم	سودوموناس	-	*	n.s.	*
	آئروموناس	*	-	*	*
	انتروباکتر	n.s	*	-	*
	باسیلوس	*	*	*	-
جیوه	سودوموناس	-	*	**	*
	آئروموناس	*	-	n.s.	*
	انتروباکتر	**	n.s.	-	n.s.
	باسیلوس	*	*	n.s.	-
سرب	سودوموناس	-	*	**	**
	آئروموناس	*	-	**	**
	انتروباکتر	*	**	-	**
	باسیلوس	**	**	**	-

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

[Downloaded from hsr.mui.ac.ir on 2026-11-06]

مطالعه حاضر مشخص نمود کـه گونـه‌هـای غالـب در تصـفیه‌خانـه مـورد بررسی، جزء گونه‌های حساس به فلزات سنگین هستند. بنابراین، نسبت قارچ بـه 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) بـین 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 سـمیت و میـزان مقاومت به فلزات سنگین ممکن است بـه دلیـل فاکتورهـای متعـددی همچـون اسـتفاده از میکروارگانیسـم‌هـای مختلـف، فراینـد انتقـال بیولـوژیکی، غلظـت آنیون‌های معدنی، ترکیب محیط کشت، رقابت دیگر کاتیون‌ها و غلظـت عوامـل شلاته کننده باشد (۲۱). همچنین، سمیت فلزات به وسـیله روش‌هـای مختلفـی همچون الحاق باکتریایی، تجمع زیستی و تشکیل کمپلکس با مواد آلی می‌توانـد تحت تأثیر قرار گیرد (۷). از طرف دیگر، سازگار شدن باکتری‌هـا بـا فلـزات نیـز ممکن است در محیط‌های آبی صورت پذیرد (۸). در واقع، بـاکتری‌هـایی کـه از محیط‌های حاوی فلزات سنگین تهیـه شـدند، مقاومـت بیشـتری نسـبت بـه سـایر باکتری‌ها از خود نشان می‌دهند. نمونه‌های باکتریایی مطالعه حاضـر از تصـفیه‌خانـه شهرک صنعتی مورچه خورت شهر اصفهان تهیه گردید و بی‌شک مواجهه با فلـزات سنگین در تصفیه‌خانه شهرک‌های صنعتی بیشتر است. از این‌رو، تفاوت زیـاد نتـایج این مطالعه با مطالعات قبلی می‌تواند به همین دلیل باشد.

بیشتر مطالعات گذشته از باکتری‌های بیولومینسانس به عنوان بیوانـدیکاتور استفاده کردند. مهم‌ترین باکتری بیولومینسنت کـه در بیشـتر مطالعـات اسـتفاده شده است، باکتری ویبریو فیشری مـی‌باشـد کـه بـاکتری محـیط‌هـای دریـایی محسوب می‌گردد. در این خصوص باید توجه داشت که به تازگی ایراداتی مبنـی بر کاربرد این باکتری به عنوان یک روش پایشی در تصفیه‌خانـه‌هـای فاضـلاب مطرح شده است. مهم‌ترین دلیل این می‌باشد که چون ویبریـو فیشـری بـاکتری محیط‌های دریایی است، حساسیت بیش از اندازه‌ای نسبت بـه فلـزات سـنگین و دیگر سموم دارد. در نتیجه، نتایج حاصل از آزمایش‌های تعیین سمیت با اسـتفاده از این باکتری را نمی‌توان به درستی به جمعیت باکتریایی تصفیه‌خانـه‌هـا نسـبت داد و اغلب حساسیت این گروه‌ها نسبت به هم متفاوت اسـت (۲۱، ۲۰). ایـن در حالی می‌باشد که هنگام استفاده از رزازورین جهت ارزیابی سمیت مواد، می‌تـوان از همان گروه از باکتری‌هایی استفاده نمـود کـه در محـیط هـدف وجـود دارنـد. بنابراین، اطلاعات آزمایشگاهی به دسـت آمـده از ایـن روش، قابـل اعتمـادتر و واقعی‌تر خواهند بود.

سـمیت حـاد ۳ فلـز سـنگین کـادمیوم، جیـوه و سـرب بـر روی ۴ نـوع از باکتری‌های غالب واحد SBR در شرایط آزمایشگاهی مورد بررسی قـرار گرفـت. سودوموناس، آئروموناس، انتروباکتر و باسـیلوس بـاکتری‌هـای غالـب در SBR مورد مطالعه بودند. بر اساس مقادیر EC_{50} به دست آمده برای ۴ گونه باکتریایی می‌توان نتیجه گرفت که سودوموناس و آئروموناس، بیوانـدیکاتورهای مناسـبی جهت ارزیابی سمیت محیط‌های آبی و فاضلاب‌هـای آلـوده بـه فلـزات سـنگین هستند. زمان کوتاه (۳۰ دقیقـه) و سـادگی آزمـون زیسـتی بـا رزازورین باعـث 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 بـا حمایـت‌هـای مـالی مرکز تحقیقات محیط زیست و دانشگاه علوم پزشکی اصفهان انجام گرفـت. بـدین وسیله نویسندگان، از مسؤولان این مراکز تشکر و قدردانی به عمل می‌آورند.

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 BerkumP, 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 metallophile 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.

[Downloaded from hsr.mui.ac.ir on 2026-11-06]

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.

[Downloaded from hsr.mui.ac.ir on 2026-11-06]

Journal of Health System Research
Received: 14.01.2015
Vol. 12, No. 1, Spring 2016
Accepted: 14.10.2015

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

Mohammad Reza Zare[1], Ali Fatehizadeh[2], Mohammad Mehdi Amin[3], Afshin Ebrahimi[4], Bijan Bina[3], Ayat Rahmani[5], Mohammadreza Erfani[6], Hamideh Ebrahimi[7], Mahnaz Heydari[8]

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 (EC_{50}) 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 Moorchekhort 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 EC_{50} 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

[Downloaded from hsr.mui.ac.ir on 2026-11-06]