

تعیین غلظت مؤثر ۵۰ درصد بازدارنده رشد (EC₅₀) فلزات سنگین بر باکتری‌های موجود در راکتور منقطع متوالی

محمد رضا زارع^۱, علی فاتحی‌زاده^۲, محمد مهدی 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 جزو ترکیبات مقاومی به شمار می‌روند که سمیت آن‌ها بر فرایندهای بیولوژیکی تصوفیه فاضلاب و همچنین، بر انسان و محیط در مطالعات مختلفی به اثبات رسیده است. در مطالعه حاضر، غلظت مؤثر ۵۰ درصد بازدارنده رشد (EC₅₀) یا ۵۰% Effective concentration (EC₅₀) فلزات کادمیوم، سرب و جیوه بر باکتری‌های غالب موجود در راکتور منقطع متوالی (SBR) مورد بررسی قرار گرفت.

روش‌ها: نمونه بیومس SBR از واحد بیولوژیکی SBR تصوفیه خانه شهر ک صنعتی مورچه خورت اصفهان تهیه شد. پس از کشت و ایزوله باکتری‌های غالب موجود در این واحد، توالی DNA آن‌ها به وسیله تکنیک واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) 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 EC₅₀ آن‌ها با استفاده از آزمون زیستی Resazurin تعیین شد.

یافته‌ها: چهار گونه باکتری‌ای «آتروموناس»، 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 آتروموناس گونه حساسی به فلز سرب بود.

نتیجه‌گیری: می‌توان گفت که سودوموناس و آتروموناس بیاندیکاتورهای باکتری‌ای مناسبی جهت ارزیابی سمیت فاضلاب‌ها و پساب‌های آلووده به فلزات سنگین می‌باشند.

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

ارجاع: زارع محمد رضا، فاتحی‌زاده علی، امین محمد مهدی، ابراهیمی افشن، بینا بینا، رحمانی آیت، عرفانی محمد رضا، ابراهیمی حمیده، حیدری مهناز. تعیین غلظت مؤثر ۵۰ درصد بازدارنده رشد (EC₅₀) فلزات سنگین بر باکتری‌های موجود در راکتور منقطع متوالی. مجله تحقیقات نظام سلامت (۱۲: ۱۳۹۵-۷۷-۸۳).

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 (۱-۶). بررسی میزان رشد موجود برای تعیین اثرات سمی یک ترکیب، یکی از مهم‌ترین فاکتورهایی است که باید مورد بررسی قرار گیرد. بازدارنگی رشد باکتری‌ها را می‌توان به وسیله روش‌های مختلفی از جمله شمارش میکروسکوپی مستقیم، شمارش پلیت، اندازه‌گیری کدورت، وزن خشک، بیولوئیسانس، جذب ... تعیین نمود (۱). هنگامی که چندین گونه باکتری‌ای به صورت همزمان باید در یک آزمایش ارزیابی شوند، می‌توان از میکرولیت‌ها 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) یکی از روش‌های تصوفیه فاضلاب می‌باشد که بر اساس مواجهه دوره‌ای باکتری‌ها با شرایط خاص بهره‌برداری تصوفیه خانه، توسعه یافته است (۳). یکی از مهم‌ترین فاکتورهایی که راندمان تصوفیه واحدهای SBR را تحت تأثیر قرار می‌دهد، فعالیت، زندگی بودن و موجود بودن باکتری‌های تجزیه کننده می‌باشد (۴-۵).

- استادیار، گروه مهندسی بهداشت محيط، دانشکده بهداشت اوز، دانشگاه علوم پزشکی لارستان، لارستان، ایران و مرکز تحقیقات محيط زیست و گروه مهندسی بهداشت محيط، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
- استادیار، مرکز تحقیقات محيط زیست و گروه مهندسی بهداشت محيط، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
- استاد، مرکز تحقیقات محيط زیست و گروه مهندسی بهداشت محيط، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
- دانشیار، مرکز تحقیقات محيط زیست و گروه مهندسی بهداشت محيط، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
- دانشجوی دکتری، گروه مهندسی بهداشت محيط، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران
- استادیار، گروه مهندسی بهداشت محيط، دانشکده بهداشت اوز، دانشگاه علوم پزشکی لارستان، لارستان، ایران
- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه مهندسی بهداشت محيط، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه مهندسی بهداشت محيط، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران

نویسنده مسؤول: بیژن بینا

Email: bbina123@yahoo.com

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 0.01 ± 0.01 صورت گرفت. لوله‌های آزمایش حاوی مواد آزمون‌ها در دمای 30°C انکوبه شدند. پس از ۳۰ دقیقه، ۴ ml از هر لوله برداشت گردید (۱۴). بعد از حذف باکتری‌ها به وسیله سانتریفیوژ (۱۰۰۰ rpm)، کاهش رزازورین به وسیله اسپکتروفتومتر در طول موج 610 nm و بر اساس نمونه شاهد بدون فلز مورد تعیین قرار گرفت. فعالیت آنزیم دهیدروئنаз 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} درصد بود که به صورت \pm میانگین EC_{50} نشان داده شد. آنالیز آماری EC_{50} به وسیله دو آزمون One-way ANOVA و Kruskal-Wallis چهت 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، آتروموناس، 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_{50} برای هر یک از فلزات سنگین نیز در جدول ۲ گزارش شد. تبدیل رزازورین به رزوروفرین 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 0.01 تا $1\text{ }\mu\text{mol/l}$ 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_{50} فلزات سنگین Cd، Hg و Pb وجود داشت ($P < 0.05$).

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

رنگ‌ها بر پایه ترازوبلیوم همچون رزازورین (Resazurin) و رزوروفرین (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 (۱۳، ۱۴). 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.

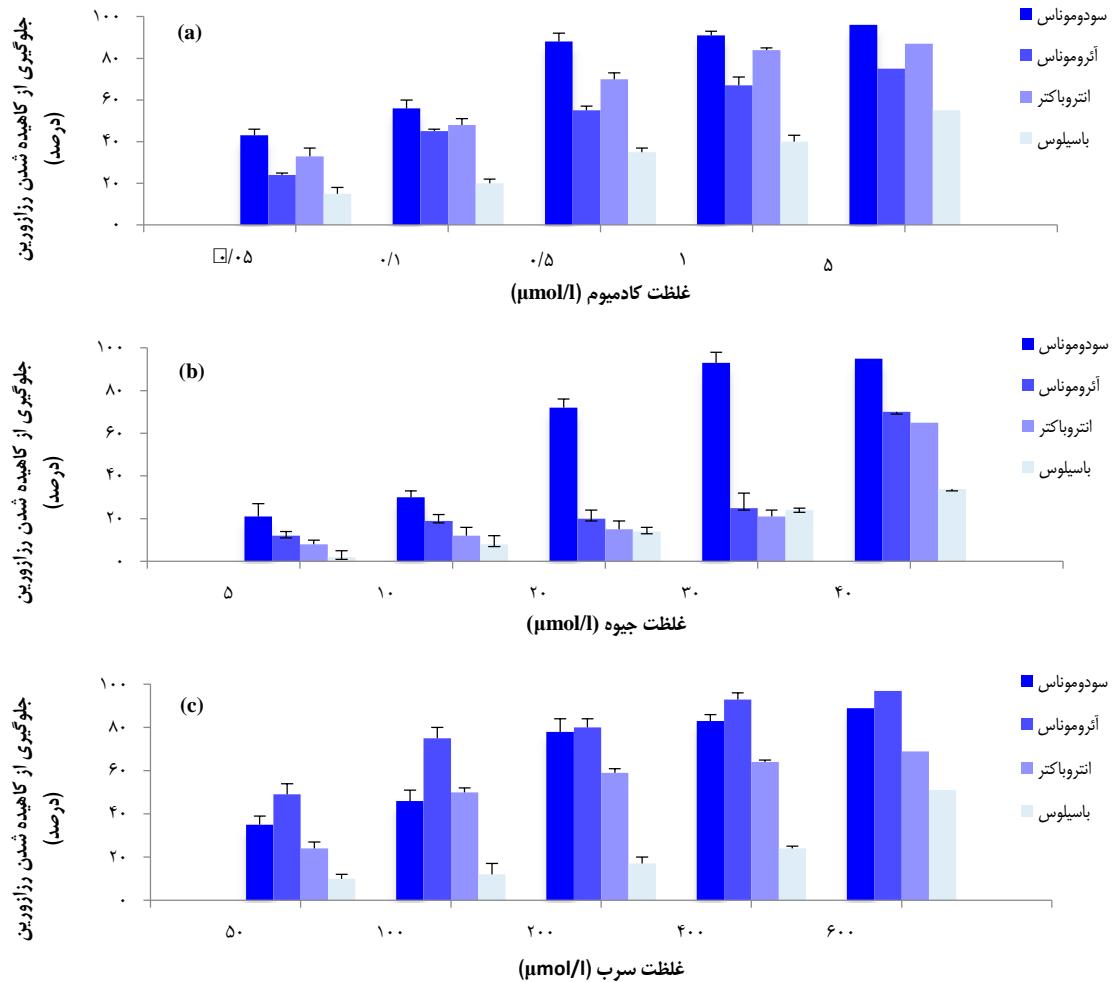
روش‌ها

نمونه‌برداری از زیست توده موجود در SBR: نمونه زیست توده SBR از واحد بیولوژیکی مربوط به تصفیه خانه شهرک صنعتی مورچه خورت شهر اصفهان تهیه گردید. از طریق کشت 0.5 ml از فاصلاب رقیق شده SBR در محیط کشت نوتریت آگار، بیومس موجود در SBR جداسازی و کشت شد. تشخیص مولکولی باکتری‌های جدا شده: کلینی‌های جدا شده از باکتری‌ها در 1 ml آب دیونیزه حل گردید. استخراج DNA این باکتری‌ها با جوشاندن آن‌ها به مدت ۱۵ دقیقه و سانتریفیوژ کردن (۵ دقیقه با دور 14000 rpm) صورت گرفت (۱۶). سوپراناتانت محصول سانتریفیوژ در روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) یا Polymerase chain reaction (PCR) با پرایمرهای Eubac ۲۷F و ۱۴۹۲R استفاده گردید. واکنش PCR در یک ترموسایکلر (MJ Research, USA) تحت شرایط استاندارد انجام شد. خالص‌سازی (Qiagen Inc., CA) QIA quick PCR به وسیله کیت PCR 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) (NCBI آنالیز شد (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) تا نوع

گونه‌های باکتریایی مورد شناسایی قرار گردید. آزمون زیستی چهت 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 16 ml داشت که شامل 2 ml نوتریت براث (با غلظت $10\text{ }\mu\text{g/l}$)، 0.2 ml محلول رزازورین با غلظت 1 g/l ، 2 ml بافر HCl و 4 ml از فلز مورد آزمایش بود که در نهایت به وسیله آب مقدار به حجم 16 ml رسید. غلظت فلز سنگین در این مرحله به

جدول ۱. توزیع گونه‌های باکتریایی در نمونه فاصلاب واحد

نوع باکتری	تعداد کلی با رقیق‌سازی ^{-۷}	توزیع (درصد)
سودوموناس	۲۸	۶۰/۲۲
آتروموناس	۱۲	۱۹/۰۵
انتروباکتر	۸	۱۲/۷۰
باسیلوس	۵	۷/۹۳
کل باکتری‌ها	۶۳	۱۰۰



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

جدول ۲. میانکین EC_50 بر حسب $\mu\text{mol/l}$ برای ۴ باکتری غالب واحد sequencing batch reactors در اثر مواجهه با فلزات سنگین

کونه های باکتریایی			
کادمیوم	جیوه	سرب	
۰.۰۶ (۰/۰۴-۰/۰۹)	۱۱/۷۵ (۷/۱۹-۱۶/۸۱)	۹۱/۹۶ (۷۷/۳۹-۱۱۱/۴۵)	سودomonas
۰/۴۳ (۰/۲۲-۰/۹۷)	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)	۱۵۵/۰۲ (۵۴/۷۴-۳۱۶/۷۲)	انتروباکتر
۲/۷۷ (۱/۵۷-۶/۶۷)	۶۴/۹۷ (۴۹/۸۰-۱/۳۰/۰۷)	۹۶۲/۴۰ (۳۹۰/۸۳-۱۰۲۰/۲۱)	پاسیلوس

سودomonas < آئروموناس < انتروباکتر < پاسیلوس و کادمیوم: سودomonas < انتروباکتر < آئروموناس < پاسیلوس به دست آورد. آزمون Dunnnett تفاوت معنی داری بین EC_{50} هایی به دست آمده به وسیله باکتری های آئروموناس و انتروباکتر و نیز پاسیلوس و انتروباکتر در تعیین سمیت جیوه نشان نداد. تفاوت EC_{50} به دست آمده به وسیله باکتری های

همان گونه که در جدول ۳ نشان داده شد، این نتیجه به وسیله آزمون Kruskal-Wallis نیز مورد تأیید قرار گرفت، معنی دار بودن تفاوت ها از لحاظ آماری در خصوص گونه های مختلف باکتریایی در جدول ۴ قابل مشاهده است. آزمون Dunnnett مورد ازمامايش را برای هر یک از فلزات به صورت سرب: آئروموناس < سودomonas < انتروباکتر < پاسیلوس، جیوه:

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

Kruskal-Wallis آزمون			ANOVA آزمون یک طرفه			فلزات سنگین	
P	درجه آزادی	کل	درون گروه‌ها	بین گروه‌ها			
۰/۰۲۵	۳	۱۶/۷۱۸	۱/۳۵۳	۱۵/۳۶۴	مجموع مربع‌ها	کادمیوم	
		۱۱	۸	۳	درجه آزادی		
			۰/۱۶۹	۵/۱۲۱	مربع میانگین		
				۲۰/۲۷۲	F		
				□ ۰/۰۰۱	P		
۰/۰۲۲	۳	۴۶۸۷/۲۶۲	۲۶۸/۹۱۸	۴۴۱۸/۲۴۴	مجموع مربع‌ها	جیوه	
		۱۱	۸	۳	درجه آزادی		
			۳۲/۶۱۵	۱۴۷۲/۷۸۱	مربع میانگین		
				۸۳/۸۱۳	F		
				□ ۰/۰۰۱	P		
۰/۰۱۶	۳	۱۷۰۷۷۳۴/۰/۸۷	۷۰۲۸/۱۲۰	۱۷۰۰۷۰۵/۹۶۷	مجموع مربع‌ها	سرپ	
		۱۱	۸	۳	درجه آزادی		
			۸۷۸/۵۱۵	۵۶۶۹۰/۱/۹۸۹	مربع میانگین		
				۶۴۵/۲۹۶	F		
				□ ۰/۰۰۱	P		

آتروموناس بودند که در مجموع، ۷۹/۳٪ درصد از کل گلخانه‌ای ایزووله شده را شامل می‌شدند. مطالعه Li و همکاران در این خصوص نشان داد که سودوموناس و آتروموناس 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 آتروموناس بیواندیکاتورهای باکتریایی مناسبی جهت ارزیابی سمیت فاضلاب‌ها و پساب‌های آلوده به فلزات سنگین می‌باشد.

سودوموناس 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 $\mu\text{mol/l}$ 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، سودوموناس و

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

معنی‌داری تفاوت بین مقادیر EC ₅₀			گونه‌های باکتریایی		فلزات سنگین	
باسیلوس	انتروباکتر	آتروموناس	سودوموناس	سودوموناس	آتروموناس	کادمیوم
*	n.s.	*	-	سودوموناس	آتروموناس	
*	*	-	*	آتروموناس	انتروباکتر	
*	-	*	n.s.	انتروباکتر	باسیلوس	
-	*	*	*	باسیلوس	سودوموناس	
*	**	*	-	سودوموناس	آتروموناس	جیوه
*	n.s.	-	*	آتروموناس	آتروموناس	
n.s.	-	n.s.	**	انتروباکتر	باسیلوس	
-	n.s.	*	*	باسیلوس	سودوموناس	
**	*	*	-	سودوموناس	آتروموناس	سرپ
**	**	-	*	آتروموناس	انتروباکتر	
**	-	**	*	انتروباکتر	باسیلوس	
-	**	**	**	باسیلوس		

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

بر کاربرد این باکتری به عنوان یک روش پایشی در تصفیه خانه‌های فاضلاب مطرح شده است. مهم‌ترین دلیل این می‌باشد که چون ویربیو فیشری باکتری محیط‌های دریایی است، حساسیت بیش از اندازه‌ای نسبت به فلزات سنگین و دیگر سومون دارد. در نتیجه، نتایج حاصل از آزمایش‌های تعیین سمیت با استفاده از این باکتری را نمی‌توان به درستی به جمیعت باکتریایی تصفیه خانه‌ها نسبت داد و اغلب حساسیت این گروه‌ها نسبت به هم متفاوت است (۲۰، ۲۱). این در حالی می‌باشد که هنگام استفاده از رزاورین 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. سودomonas، آتروomonas، انتروبکتر و باسیلوس باکتری‌های غالب در SBR مورد مطالعه بودند. بر اساس مقادیر EC₅₀ به دست آمده برای ۴ گونه باکتریایی می‌توان نتیجه گرفت که سودomonas و آتروomonas، بیواندیکاتورهای مناسبی جهت ارزیابی سمیت محیط‌های آبی و فاضلاب‌های آلوده به فلزات سنگین هستند. زمان کوتاه (۳۰ دقیقه) و سادگی آزمون زیستی با رزاورین باعث می‌شود که این آزمون در تصفیه خانه‌های کوچک به راحتی قابل استفاده باشد.

تشکر و قدردانی

مقاله 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 نویسندها، از مسئولان این مرکز تشکر و قدردانی به عمل می‌آورند.

References

- 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.
- Venkata Mohan S, Sharma PN. Pharmaceutical wastewater and treatment technologies. *Pharma Bio World* 2002; 11(1): 93-100.
- 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.
- Irato P, Piccinni E. Effects of cadmium and copper on *Astasia longa*: metal uptake and glutathione levels. *Acta Protozoologica* 1996; 35(4): 281-5.
- 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.
- 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.
- 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.
- Hassen A, Saidi N, Cherif M, Boudabous A. Resistance of environmental bacteria to heavy metals. *Bioresour Technol* 1998; 64(1): 7-15.
- 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.
- Brock TD, Madigan MT, Martinko JM. Biology of microorganisms. 7th ed. Upper Saddle River, NJ: Prentice Hall; 1994.
- 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.
- 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.
- 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.

مقاله حاضر مشخص نمود که گونه‌های غالب در تصفیه خانه مورد بررسی، جزء گونه‌های حساس به فلزات سنگین هستند. بنابراین، نسبت قارج 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 (آتروموناس) بین ۲۷ تا ۸۰۰۰ برابر بیش از مقادیری به دست آمد که در مطالعات گذشته گزارش شد (۱۷-۱۹). چنین تفاوت بسیار زیادی در آزمایش‌های تعیین سمیت و میزان مقاومت به فلزات سنگین ممکن است به دلیل فاکتورهای مختلف، فرایند انتقال بیولوژیکی، غلظت استفاده از میکروارگانیسم‌های مختلف، فرایند انتقال بیولوژیکی، غلظت آنیون‌های معدنی، ترکیب محیط کشت، رقابت دیگر کاتیون‌ها و غلظت عوامل شلاقه کننده باشد (۲۱). همچنین، سمیت فلزات به وسیله روش‌های مختلفی همچون الحقاب باکتریایی، تجمع زیستی و تشکیل کپلکس 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 تهییه شدند، مقاومت بیشتری نسبت به سایر باکتری‌ها از خود نشان می‌دهند. نمونه‌های باکتریایی مطالعه حاضر از تصفیه خانه شهرک صنعتی مورچه خورت شهر اصفهان تهییه گردید و بی‌شك مواجهه با فلزات سنگین در تصفیه خانه شهرک‌های صنعتی بیشتر است. از این‌رو، تفاوت زیاد نتایج این مطالعه با مطالعات قبلی می‌تواند به همین دلیل باشد.

بیشتر مطالعات گذشته از باکتری‌های بیولوژیکاتور استفاده کرددند. مهم‌ترین باکتری بیولوژیکاتور است، باکتری ویربیو فیشری می‌باشد که باکتری محیط‌های دریایی محسوب می‌گردد. در این خصوص باید توجه داشت که به تازگی ایراداتی مبنی

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, Hadjispyprou 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 (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 Moorchehkhort 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