

جداسازی و شناسایی یک سویه مقاوم به تلوریت پتاسیم از پساب صنایع استان قم با هدف کاربرد در پاکسازی

زیستی و بررسی شرایط بهینه رشد باکتری جهت افزایش حذف و احیای تلوریت پتاسیم

محبوبه سلیمانی ساسانی^۱، محمدرضا ذوالفقاری^۲، محمد سلیمانی^۲

^۱ دانشجوی کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قم، قم، ایران،

^۲ عضو هیات علمی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قم، قم، ایران،

چکیده:

استفاده فراوان از اکسی‌آنیون‌های تلوریوم مانند تلوریت در صنایع مختلف مانند نساجی، دباغی و آبکاری آلودگی محیطی را افزایش داده است که برای میکروارگانیزم‌ها و همچنین یوکاریوت‌ها بسیار سمی هستند. بررسی احیاء زیستی اکسی‌آنیون‌های متالوئید تلوریت در باکتری‌های مقاوم در طبیعت می‌تواند ابزار باارزشی در بیوتکنولوژی جهت تشخیص میکروارگانیزم‌ها برای پاکسازی زیستی مناطق آلوده باشد.

تعداد ۸۴ سویه باکتری مقاوم به تلوریت از پساب صنایع جدا شد. تعیین MIC باکتریها از غلظت ۰/۱ تا ۲۶ میلی مولار تلوریت پتاسیم در دمای ۳۴ درجه سانتیگراد بمدت ۷ روز با روش رقت در آگار انجام شد و سویه QWTmb9 جدا شد که قادر به تحمل غلظت بسیار بالای ۲۲ میلی مولار بود که تحمل این غلظت در مقایسه با آستانه تحمل باکتری‌ها نسبت به تلوریت قابل توجه است. به منظور بررسی میزان حذف تلوریت در سویه‌های برتر، روش کالریتریک با استفاده از اسپکتروفوتومتر و معرف DDTc (سدیم دی اتیل دی تیوکاربامات تری هیدرات، جذب ۳۴۰ نانومتر) استفاده شد. اثر فاکتورهای مختلف بر رشد بهینه این سویه و حذف بیشتر اکسی‌آنیون مانند غلظت تلوریت، pH، دما، میزان هوادهی و غلظت‌های مختلف نمک سدیم کلراید بررسی شد. به علت ارتباط مستقیم مقاومت به اکسی‌آنیون و مقاومت به آنتی بیوتیک در سویه‌های مقاوم، تست مقاومت به آنتی بیوتیک‌های مختلف انجام شد. باسیل گرم منفی QWTmb9 جدا شده از پساب نساجی پتو، در غلظت ۰/۴ تلوریت، دمای ۳۵ درجه، pH=۷/۵ و دورشیک ۱۰۰ RPM و میزان ۱۷۰ میلی مولار نمک سدیم کلراید بیشترین میزان حذف را در ۲۴ ساعت نشان داده است. این سویه مقاوم به آنتی بیوتیک‌های پنی‌سیلین، آمپی‌سیلین، ریفامپیسین، تتراسیکلین، کلرآمفنیکل، نئومایسین، کانامایسین و اریترومایسین بود. سویه گرم منفی QWTmb9 می‌تواند کاندیدای مناسبی جهت حذف اکسی‌آنیون سمی تلوریت در بیوتکنولوژی صنعتی مطرح گردد.

کلمات کلیدی:

اکسی‌آنیون، تلوریت، تصفیه‌سازی زیستی، زیست‌پالایی، احیاء زیستی

مقدمه:

امروزه غلظت‌های بالای از فلزات سمی سبب آلودگی خاک‌های کشاورزی، آب‌های سطحی و زیرزمینی و زیستگاه‌های طبیعی شده است

(Hughes et al. 1989). پاکسازی زیستی¹ استفاده از میکروارگانیسم‌ها جهت حذف آلوده‌کنندگان محیط زیست از جمله فلزات سنگین است که آنها را به ترکیبات غیرسمی و یا کمتر سمی تبدیل می‌کند (Tsezos, 2007). استفاده فراوان از اکسی‌آنیون‌های محلول تلوریوم مانند تلوریت در صنایع مختلف از جمله نساجی، رنگرزی، دباغی، آبکاری، صنایع الکترونیک و حشره کش‌ها آلودگی محیطی را افزایش داده است (Taylor 1999, Chasteen et al. 2008). تلوریت [Te(IV), TeO_3^{2-}] و تلورات $[\text{TeO}_4^{2-}]$ برای پروکاریوت‌ها و یوکاریوت‌ها در غلظت‌هایی کمتر از $1\mu\text{g/ml}$ ($4\mu\text{m}$) بسیار سمی می‌باشند (Chasteen et al. 2009). تلوریت (IV) معمولاً در سیستم‌های بیولوژیکی یافت نمی‌شود (Ba et al., 2010). سمیت این ترکیبات برای ارگانیسم‌های زنده خصوصاً باکتری‌های گرم منفی به خوبی به اثبات رسیده است (Dumas et al., 2010). محیط کشت باکتری احیاء کننده تلوریت به علت رسوب آن به شکل تلوریوم عنصری Te^0 سیاه می‌شود (Harrison et al., 2005) این پدیده همچنین در مخمر و اریتروسیت‌ها گزارش شده است (Liangyau et al. 1993). سمیت تلوریت در سلول را می‌توان به عواملی مانند توانایی TeO_3^{2-} به عنوان یک اکسیدانت قوی برای ترکیبات سلولی و تداخل با فرایندهای آنزیمی سلولی، تاثیر برگروه های [Fe-S] در پروتئین‌های اصلی و خاموشی پروسه‌های مختلف سلولی مانند سنتز DNA، پروتئین و بسیاری از ردوکتازها نسبت داد (Kagami et al. 2012, Tantalean et al 2003). احیاء آنزیمی² تلوریت به تلوریوم عنصری غیر سمی (احیاء Te^{IV} به Te^0) در سوبیه‌های مختلف باکتریایی از جمله مکانیسم‌های مقاومت به تلوریت پتاسیم (TeR) است که شاهد آن هم سیاه شدن محیط‌های کشت مایع یا کلنی‌های سیاه رنگ بر روی آگار در پلیت است که مرتبط با رسوب کریستالوئیدهای تلوریوم فلزی سیاه درون سلول‌ها می‌باشد (Harrison et al., 2009). به دنبال افزایش تمایل به سمت درمان‌های بیولوژیکی پساب، پژوهشگران زیادی را برآن داشته تا در مورد میکروارگانیسم‌های با توانایی احیاء اکسی‌آنیون‌های سمی پژوهش انجام دهند (Pearce CI et al. 2011).

¹ bioremediation

² Enzymatic reduction

استان قم از جمله استان‌هایی است که در سال‌های اخیر صنایع زیادی در آن در حال فعالیت هستند، در نتیجه آلودگی زیست محیطی ناشی از پساب این صنایع از جمله صنایع نساجی، ریخته‌گری، دباغی و حتی ساخت ماشین‌آلات مختلف بویژه موتورسیکلت، معدن منگنز و سایر صنایع نیز رو به افزایش است. در این پژوهش میکروارگانیسم‌های مقاوم به تلوریت از پساب صنایع مختلف جداسازی شده و به علت مقاومت به تلوریت با ظرفیت احیای بالای آن، جهت استفاده در بیوتکنولوژی تصفیه پسابها مطرح گردید.

مواد و روش‌ها:

مواد مورد نیاز

اکسی‌آنیون سمی تلوریت پتاسیم و DDTC به کار برده شده در این پژوهش از شرکت Merck تهیه شد. مواد شیمیایی از جمله اسید کلریدریک (HCl)، سود (NaOH)، محلول اکسیداز، کلرید سدیم (NaCl) از شرکت‌های Merck، Sigma و Heimedia و قندهای مورد استفاده از شرکت‌های Merck و Difco خریداری شد.

سویه‌ها و شرایط کشت

پس از نمونه برداری از پساب صنایع رنگرزی، نساجی، آبکاری و گالوانیزه در استان قم نمونه‌ها در شرایط کاملاً استریل به آزمایشگاه منتقل شدند. نمونه‌ها به مدت ۲۴ ساعت در ارلن‌های حاوی محیط غنی کننده مانند BHI برات تحت گرماگذاری و هوادهی قرار گرفتند و پس از این زمان با استفاده از روش رقت در آگار جداسازی باکتری‌ها انجام شد (Rathgeber et al. 2002). برای خالص‌سازی از متد spread method (پخش کردن در سطح پلیت) برای بازیافت جمعیت میکروبی هتروتروف استفاده شد. سپس کلنی‌های ایجاد شده بر روی محیط کشت نوترینت آگار، به محیط‌های کشت نوترینت آگار حاوی ۰/۱ میلی مولار از غلظت تلوریت منتقل شدند (Zolfaghari et. al., 2008). در این مرحله تعداد 60 سویه باکتریایی از صنایع رنگرزی و نساجی و 24 سویه مقاوم از صنایع آبکاری و گالوانیزه جدا شد. سپس ویژگی‌های مورفولوژیک و ریخت‌شناسی تمامی جدایه‌ها بررسی شد.

تعیین حداقل غلظت مهار کننده رشد (MIC)

حداقل غلظت مهار کننده رشد باکتریهای جدا شده از ۰/۱ تا ۲۶ میلی مولار تلوریت پتاسیم در دمای ۳۴ درجه سانتیگراد و به مدت ۷ روز انجام شد و در این زمینه سویه‌هایی جدا شدند که می‌توانستند غلظت‌های ۱۶ تا ۲۶ میلی مولار را تحمل کنند. این نتایج با آخرین یافته‌های جهانی در این زمینه برابری می‌کند. همچنین فاکتورهای مختلف بر رشد بهینه باکتری‌ها مانند PH، دما و دور همزن همچنین اثر غلظت‌های مختلف نمک بر احیاء اکسی‌آنیون و میزان MIC مورد بررسی قرار گرفت Amoozgar et al.

2012)

بررسی حذف غلظت های مختلف تلوریت با استفاده از معرف DDTc

در ابتدا، برای بررسی میزان حذف تلوریت پتاسیم توسط سویه های مورد نظر و بررسی اثر فاکتورهای محیطی مختلف بر حذف اکسی آنیون سمی تلوریت پتاسیم، منحنی استاندارد تلوریت پتاسیم رسم شد. سپس روش کالریمتریک با استفاده از اسپکتروفتومتر و معرف DDTc انجام شد. غلظتهای ۰/۰۴، ۰/۰۸، ۰/۱، ۰/۲، ۰/۳، ۰/۴، ۰/۵، ۰/۶، ۰/۸ و یک میلی مولاری از تلوریت پتاسیم تهیه شد. کشت تازه از باکتری مورد نظر در محیط نوترینت آگار با pH ۷ و در دمای ۳۵ درجه سانتیگراد تهیه شد و پس از ۲۴ ساعت، معادل لوله نیم مک فارلند باکتری به ارلن های حاوی غلظت های مختلف تلوریت پتاسیم شامل غلظت های ۰/۰۴، ۰/۰۸، ۰/۱، ۰/۲، ۰/۳، ۰/۴، ۰/۵، ۰/۶، ۰/۸ و ۱ میلی مولار تلقیح شد. پس از ۲۴ ساعت گرماگذاری در ۳۵ درجه سانتیگراد، در ۱۰۰۰۰ دور سانتریفیوژ شده که با افزودن معرف DDTc به مایع رویی و واکنش تلوریت موجود در سوپرناتانت با معرف، محلول کلونیدی زردرنگی مشاهده شد که در طول موج ۳۴۰ نانومتر بیشترین جذب را دارد، این عمل در زمان های ۲۴، ۴۸، ۷۲، ۹۶، ۱۲۰ و ۱۴۴ ساعت انجام شد (Turner et al. ۱۹۹۲).

نتایج:

ویژگی های مورفولوژیک، فیزیولوژیک، متابولیک و بیوشیمیایی و همچنین الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی سویه QWTmb9 جدا شده از پساب نساجی لاله مهرگان قم - شهرک صنعتی شکوهیه مورد بررسی قرار گرفت که به ترتیب در جداول شماره ۱ و ۲ آورده شده است.

جدول شماره ۱ - ویژگی های مورفولوژیک، فیزیولوژیک، متابولیک و بیوشیمیایی سویه QWTmb9

(Qom Waste Textile Mehregan blanket)

+	حرکت		منفی	واکنش گرم	میکروسکوپی
+	احیاء نیترات به نیتريت		باسیل	شکل	
-	H ₂ S		مدور	شکل	ماکروسکوپی (کلنی)
+	MR		دارای تموج	حاشیه	
-	VP		مسطح	سطح	
+	اندول		کره‌ای	قوام	
-	سیمون سیترات		نیمه شفاف	کدورت	
-	تولید ملانین از تیروزین		-	پیگمان	
+	کاتالاز		+	اندازه کلنی >5mm	
-	اکسیداز		+	5%	
-	ژلاتین	هیدرولیز	-	7/5%	رشد در NaCl
-	اسکولین		+	50	رشد در دماهای مختلف (درجه سانتیگراد)
-	نشاسته		-	55	
-	کازئین		-	4.5	رشد در pHهای مختلف
+	لیزین دکربوکسیلاز		فعالیت آنزیمی	+	5

-	اوره آز		+	10	
-	DNase		-	11	
+	D. گلوکز	مصرف منابع کربن	+	D. گلوکز	تولید اسید از:
+	لاکتوز		+	لاکتوز	
+	D. مانوز		+	D. مانوز	
+	سوکروز		+	سوکروز	
+	فروکتوز		+	فروکتوز	
+	سالیسین		+	مانیتول	
+	گزیلوز		+	گلوکز بیهوازی	
+	آرابینوز		+	مانیتول بیهوازی	
+	ال- تیروزین	مصرف منابع ازتی	+	ال- لیزین	مصرف منابع ازتی
+	ال- آرژنین		+	ال- سیستئین	
+	ال- هیستیدین		+	ال- فنیل آلانین	
+	ال- سیترولین		+	ال- گلابسین	

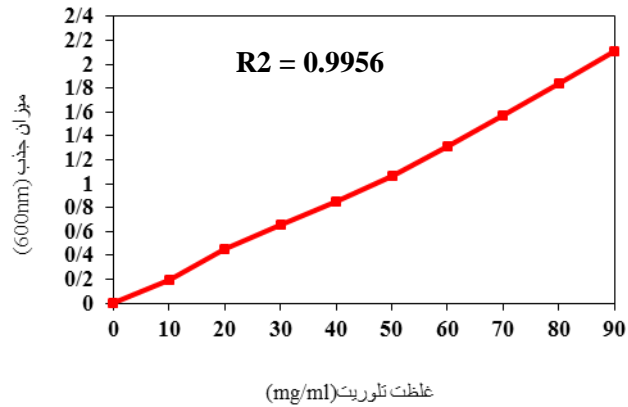
جدول شماره ۲- الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی سویه QWTmb₉

Groups	Antibiotics	Code	QWTmb ₉
Penicillins	Penicillin	P10	R
	Ampicillin	AM10	R
Rifampins	Rifampicin	RA5	R
Cephalosporins	Cefixime	CFM5	I
Tetracyclines	Tetracycline	TE30	R
Phenicols	Chloramphenicol	C30	R
Aminoglycosids	Streptomycine	S10	I
	Neomycin	N30	R
	Gentamycin	GM10	S
	Kanamycin	K30	R
Macrolids	Erythromycin	E15	R
Floroquinolones	Norfloxacin	NOR10	S
	Ciprofloxacin	CP5	S

R: Resistance, I: Intermediate, S: Sensitive

رسم منحنی استاندارد جذب تلوریت پتاسیم

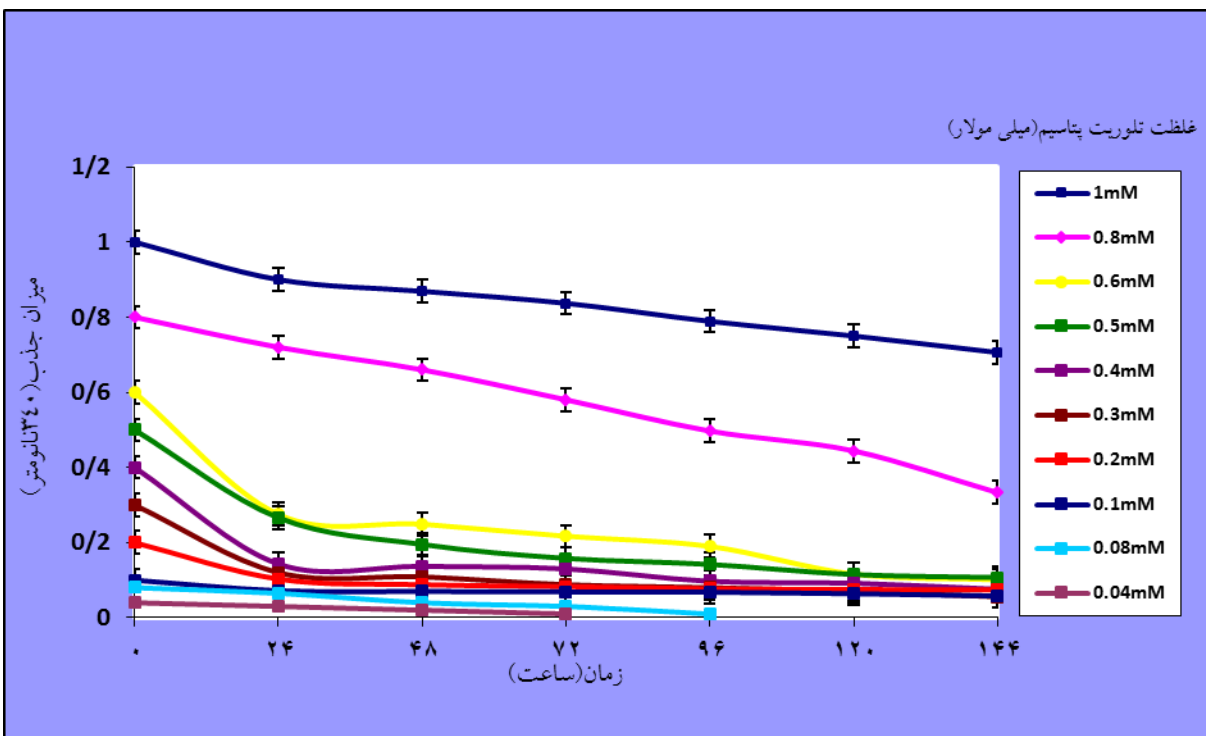
برای بررسی میزان حذف تلوریت پتاسیم توسط سویه مورد نظر، منحنی استاندارد تلوریت پتاسیم رسم شد (نمودار شماره ۱).



نمودار شماره ۱ - منحنی استاندارد سنجش تلوریت با استفاده از معرف شیمیایی DDTC و بافر Tris.HCl (pH=7.3)

اثر غلظت های مختلف تلوریت پتاسیم بر روی حذف آن در سویه QWTmb9

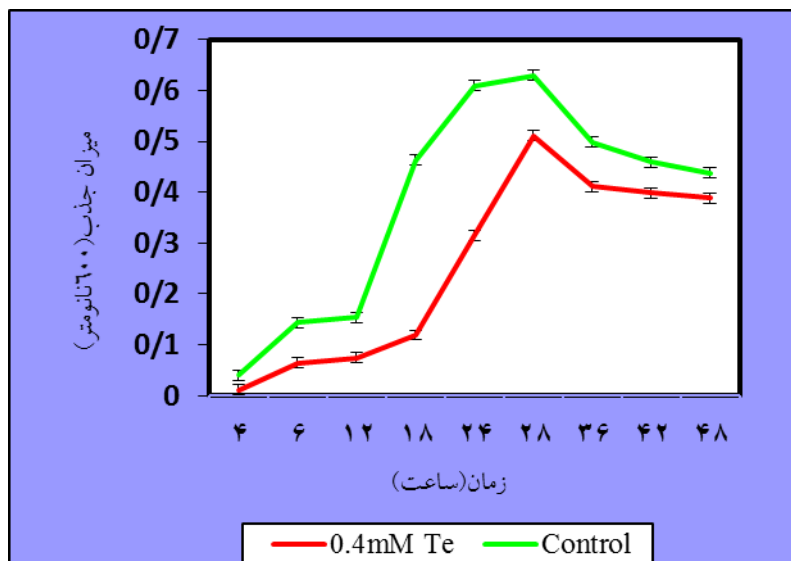
نمودار شماره ۲ اثر غلظت های اولیه ۰/۰۴، ۰/۰۸، ۰/۱، ۰/۲، ۰/۳، ۰/۴، ۰/۵، ۰/۶، ۰/۸ و ۱ میلی مولار تلوریت پتاسیم را بر میزان حذف تلوریت پتاسیم در سویه QWTmb9 در محیط پایه نوترینت براث نشان می دهد. در طی بررسی های انجام شده میزان حذف تلوریت در سویه QWTmb9 در غلظت های ۰/۱، ۰/۲، ۰/۳، ۰/۴، ۰/۵، ۰/۶ در ۲۴ ساعت به ترتیب ۴۷/۹۴٪، ۵۹/۹۱٪، ۶۳/۷۹٪، ۴۵/۹۰٪ و ۴۴/۱۷٪ بوده که با توجه به نتایج، بهترین حذف در این زمان در غلظت ۰/۴ رخ داده است و در غلظت های بالاتر کاهش میزان حذف مشاهده شده است که به علت کاهش فعالیت آنزیماتیک باکتریایی است.



نمودار شماره ۲ - اثر غلظت های اولیه تلوریت پتاسیم بر روی حذف آن در سویه QWTmb9 در محیط پایه نوترینت براث rpm=100 و pH=8

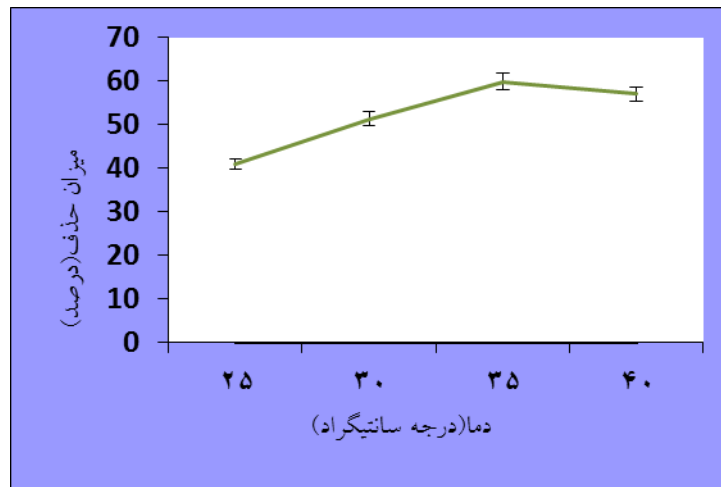
اثر فاکتورهای مختلف روی حذف تلوریت پتاسیم در سویه برتر QWTmb9

در ابتدا منحنی رشد سویه QWTmb9 در محیط نوترینت براث به عنوان محیط کنترل و محیط حاوی تلوریت پتاسیم به میزان ۰/۴ میلی مولار تلوریت پتاسیم ترسیم شد. نتایج بررسی اثر فاکتورها و پارامترهای مختلف بر حذف تلوریت پتاسیم ممکن است در شرایط آزمایشگاهی و یا در پسابهای آلوده به این اکسی آنیون بر حذف موثر این اکسی آنیون سمی کمک شایان توجهی داشته باشد. همان طور که مشاهده می گردد در محیط کنترل به علت عدم حضور اکسی آنیون سمی تلوریت پتاسیم، سرعت رشد بیشتری مشاهده می شود.

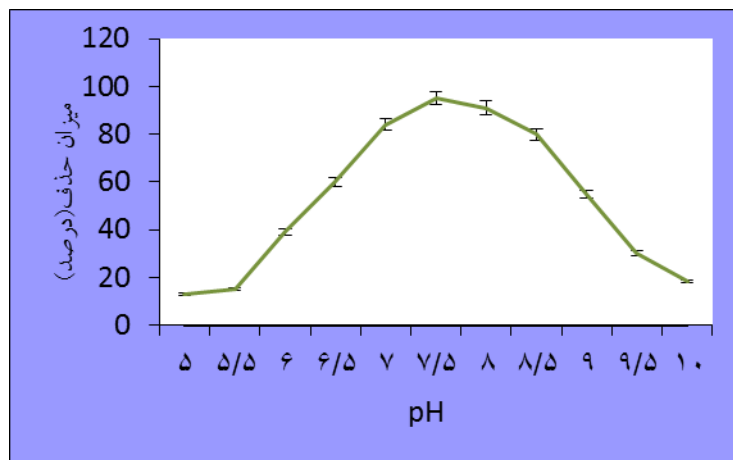


نمودار ۳ - منحنی رشد سویه QWTmb9 در محیط پایه نوترینت براث (کنترل) و محیط دارای ۰/۴ میلی مولار تلوریت پتاسیم، نتایج ارائه شده میانگین سه بار آزمایش می باشد.

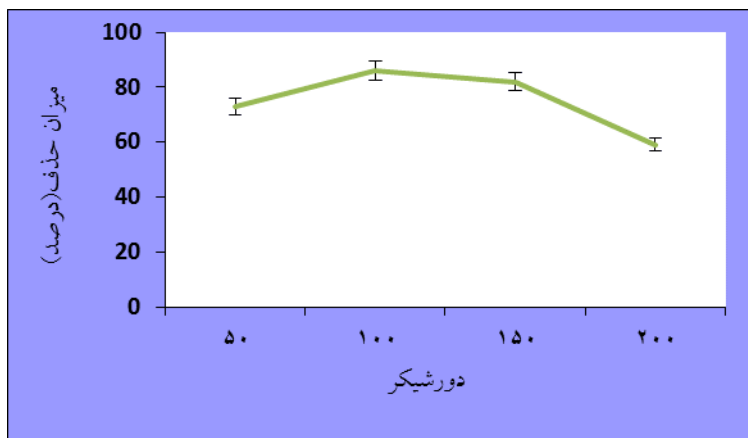
دماهای ۲۵، ۳۰، ۳۵، ۴۰ درجه سانتیگراد بر روی حذف تلوریت پتاسیم در محیط نوترینت براث دارای میزان غلظت مناسب اکسی آنیون مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان می دهد نزدیک ۶۰ درصد تلوریت پتاسیم در دمای ۳۵ درجه سانتیگراد در زمان ۲۴ ساعت حذف شده است (نمودار شماره ۴). در سنجش اثر pH های مختلف (۵ تا ۱۰) بر روی حذف تلوریت پتاسیم در محیط کشت نوترینت براث دارای غلظتی از اکسی آنیون تلوریت پتاسیم نتایج نشان می دهد که سویه QWTmb9 در pH های بین ۷ الی ۸/۵ بیشترین میزان حذف و رشد در حضور تلوریت را داشته که بهینه آن در pH= ۷/۵ مشاهده می شود (نمودار شماره ۵). بررسی میزان هوادهی و اثر آن بر سویه مورد نظر نشان می دهد بیشترین میزان حذف در سویه QWTmb9 در ۱۰۰ RPM در طی ۲۴ ساعت انکوباسیون اتفاق افتاده است (نمودار شماره ۶). بررسی اثر غلظت های مختلف ۵۰، ۱۰۰، ۱۷۰، ۲۵۰، ۳۰۰، ۴۰۰ و ۵۰۰ میلی مولار نمک سدیم کلراید در حذف غلظت بهینه اکسی آنیون نشان می دهد سویه QWTmb9 احیاء و حذف تلوریت در غلظت ۱۷۰ میلی مولار را به میزان ۲۸ درصد انجام داده است (نمودار شماره ۷).



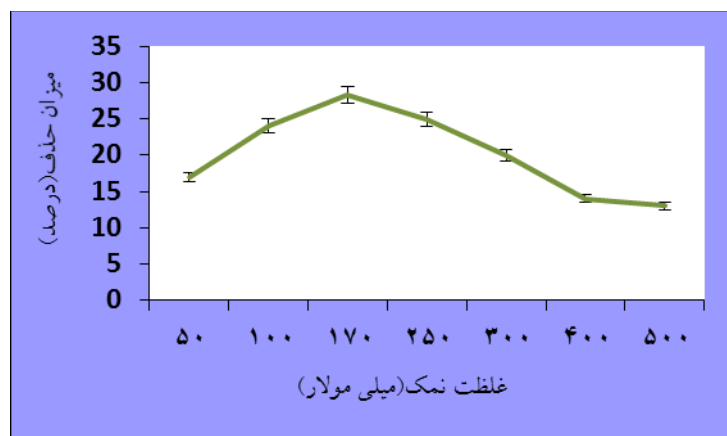
نمودار شماره ۴- اثر دما بر روی حذف تلوریت پتاسیم در سویه QWTmb9 در محیط پایه نوترینت براث دارای ۰/۴ میلی مولار تلوریت پتاسیم پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۵ درجه و $pH=7/5$ ، نتایج ارائه شده میانگین سه بار آزمایش می باشد.



نمودار شماره ۵- اثر pH روی حذف تلوریت پتاسیم در سویه QWTmb9 در محیط پایه نوترینت براث دارای ۰/۴ میلی مولار تلوریت پتاسیم پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۵ درجه و pH= ۷/۵ ، نتایج ارائه شده میانگین سه بار آزمایش می باشد شکل شماره ۱- رشد باکتری QWTmb9 در pHهای مختلف، رشد در محیط پایه نوترینت براث دارای ۰/۴ میلی مولار تلوریت پتاسیم به رنگ سیاه مشاهده می شود.



نمودار شماره ۶- اثر میزان هوادهی بر روی حذف تلوریت پتاسیم در سویه QWTmb9 در محیط پایه نوترینت براث دارای ۰/۴ میلی مولار تلوریت پتاسیم پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۵ درجه و pH= ۷/۵ ، نتایج ارائه شده میانگین سه بار آزمایش می باشد.



نمودار شماره ۷- اثر غلظت های مختلف نمک سدیم کلراید بر روی حذف تلوریت پتاسیم در سویه QWTmb9 در محیط پایه نوترینت براث دارای ۰/۴ میلی مولار تلوریت پتاسیم پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۵ درجه و pH= ۷/۵ ، نتایج ارائه شده میانگین سه بار آزمایش می باشد.

بحث:

پساب ها و مواد زاید که در نتیجه ی فعالیت های صنعتی انسان ایجاد می شوند، یک مشکل جدی محسوب می شوند، از جمله فلزات سنگین که در صنایع مختلف کاربرد داشته و از عوامل مهم آلودگی های محیطی می باشند (Avazeri C, et al 1997). یکی از این عوامل آلودگی فلز سنگین تلوریت است که برای بسیاری از میکروارگانیسم ها در غلظت کمتر از $1 \mu\text{g/ml}$ سمی است. سمیت تلوریت در نتیجه فعالیت اکسیدانته قوی آن است که باعث به هم خوردن ساختار پروتئین های باکتری ها می شود (2000 Alonso G, et al).

تلوریت پتاسیم از املاح فلزی موجود در پساب برخی از صنایع است که سبب مهار رشد طیف وسیعی از باکتریها می گردد (Avazeri C, et al 1997). تلوریت پتاسیم دارای اثرات مزمن و حاد بر روی موجودات زنده می باشد که از اثرات حاد آن تاثیر بر روی سیستم تنفسی، گوارشی، پوست و چشم می باشد (Zolfaghari et al. 2008). جهت ارزیابی مقاومت به تلوریت پتاسیم ۸۴ سویه جدا شده از پساب صنایع استان قم مورد ارزیابی تحمل به تلوریت قرار گرفتند. سویه QWTmb9 (باسیل گرم منفی) با میزان $\text{MIC}=22\text{mM}$ به علت ظرفیت بالای تحمل به تلوریت پتاسیم، به عنوان سویه برتر انتخاب شد. میزان مقاومت باکتری ها نسبت به تلوریت پتاسیم به علت سمیت بالایی که دارد، به طور ذاتی بسیار پایین است که این میزان در پژوهش Turner و همکاران و همچنین Taylor و همکاران (Taylor et. al. 2002, Turner. 2012) $1 \mu\text{g/ml}$ اعلام شده است، اما پژوهش های مختلفی در رابطه با یافتن باکتری های مقاوم انجام شده است. میزان MIC معرفی شده در سویه گرم منفی مشابه MIC گزارش شده توسط دکتر محمد رضا ذوالفقاری (22mM) در سال ۲۰۰۸ بوده است. این میزان $5/5$ تا 8 برابر MIC گزارش شده توسط Moore و Kaplan ($800 - 1200 \mu\text{g/ml}$) در مورد باکتری های *Rhodobacter* و *Rhodobacter sphaeroides* (1992, 1994) *capsulatus* بوده است. همچنین بالاتر از MIC گزارش شده توسط دکتر محمد علی آموزگار و دکتر فریدون ملک زاده (۲۰۰۸) در مورد *Salinicoccus* سویه QW6 بوده است ($\text{MIC } 12\text{mM}=3085 \mu\text{g/ml}$). *Erythromicrobium hydrolyticum* با تحمل 10 mM تلوریت در سال ۱۹۹۶ توسط Yurkov و همکاران اعلام شد.

در بررسی اثر فاکتورهای مختلف هوادهی، دما، pH و غلظت نمک در محیط روی حذف و احیاء اکسی آنیون سمی تلوریت پتاسیم در سویه گرم منفی QWTmb9 دمای 35°C سانتیگراد و pH برابر با $7/5$ بیشترین حذف دیده شد. دمای پایین تر می تواند میزان حذف را ۴۰ الی ۶۰ درصد نسبت به شرایط بهینه کاهش دهد. در محدوده pH کمتر از $6/5$ میزان حذف تلوریت در این سویه کاهش یافته و این میزان در pH های بین ۷ الی ۸ افزایش می یابد، در حالی که با افزایش pH از ۹ به بالا، روند کاهشی دیده می شود. در این مورد می توان نتیجه گرفت که بین دما، pH بهینه رشد و میزان حذف و احیاء اکسی آنیون سمی

ارتباط مستقیمی وجود دارد. در بررسی میزان هوادهی، که بیشترین میزان حذف تلوریت پتاسیم در دورهای ۱۵۰ و ۱۰۰ RPM بود مقدار نمک کلرید سدیم نیز از عوامل موثر در میزان رشد، احیاء و مقاومت باکتری بوده است به طوری که حضور غلظتی از نمک سدیم کلراید در محیط کشت باعث افزایش میزان مقاومت و احیاء باکتری می گردد. در سویه گرم منفی در غلظت ۱۷۰ میلی مولار نمک بیشترین میزان احیاء را داشت.

Rajwade و Paknikar در سال ۲۰۰۳ با مطالعه بر روی سویه ای از *Pseudomonas* نشان دادند که بیشترین میزان احیاء تلوریت در این سویه در دمای ۳۵ درجه سانتیگراد و pH برابر ۷/۵ اتفاق می افتد. ذوالفقاری و همکاران در سال ۲۰۰۶ سویه KWT2 را جداسازی کردند. این سویه در pH ۷/۵، دمای ۳۵ درجه سانتیگراد و دورشیکر ۱۵۰ rpm بیشترین حذف تلوریت را نشان می دهد. Rathgeber و همکاران در سال ۲۰۰۶ نیز باکتری های جداشده از چشمه های هیدروترمال را بررسی و سودوموناس ها را جداسازی کردند. به عنوان مثال این سویه های گرم منفی قادر به رشد در pH 5 نبودند اما در pH بین ۵/۵ تا ۱۱ رشد داشتند در حالیکه برخی در دمای ۴۵ درجه رشد داشتند ولی برخی رشدی نداشتند. اپتیمیم دمای رشد باکتری ۲۸-۳۵ درجه بوده است. همچنین وجود نمک، یکی از عوامل رشد برخی سویه ها بود و تا نمک ۱۰ درصد را تحمل و در آن رشد مناسبی داشتند، اما میزان اپتیمیم نمک در آن ۱/۵ تا ۸ بود. Amoozegar و Malekzadeh در سال ۲۰۰۶ باکتری *Salinicoccus* سویه QW6 را معرفی کردند که مقاوم به تلوریت بود، حداکثر حذف تلوریت در این سویه در pH 7/5 دمای ۳۵ درجه سانتیگراد و غلظت ۱ میلی مولار تلوریت کلراید اعلام شده است. اثرات هوادهی تاثیر افزایش بر سرعت حذف دارد که در غلظت های ۲mM با افزایش مخلوط از ۰ تا ۲۲۰ دور (rpm) سرعت حذف به بالای ۹۴ درصد می رسد. در ۳۴ درجه سانتیگراد و غلظت تلوریت از ۰/۴ و ۲ mM حذف به ترتیب ۶۹ درصد و ۹۲ درصد اعلام شد (Khoshnoodi et. al.2008).

در سال ۲۰۰۹، Etezad و همکاران یک باسیل بی هوازی اختیاری گرم مثبت با عنوان STG-83 را جدا کردند که pH بهینه سویه با فعالیت آنزیمی بالا در ۸ و بیشترین احیاء در دمای ۳۵ درجه سانتیگراد بود.

این سویه از بین ۱۳ آنتی بیوتیک بررسی شده به ۸ آنتی بیوتیک مقاوم بوده. طی پژوهش های گذشته مقاومت همزمان آنتی بیوتیک ها و فلزات سنگین بررسی شده است (Zolfaghary & Soleimani, 2013). در نتیجه با توجه به مطالعات انجام شده، محیط های آلوده به املاح فلزی می توانند نقش بسیار مهمی در بروز، بقا و انتقال مقاومت به آنتی بیوتیک ها در باکتری ها داشته باشند (Pal et al. 2005).

با انجام این پژوهش به سویه گرم منفی دست یافتیم که قادر به تحمل، احیاء و حذف میزان بسیار بالایی از تلوریت بوده است. این سویه را می توان به عنوان کاندیدی مناسب جهت استفاده در پاک سازی زیستی در مجامع علمی بین المللی معرفی کرد.

References:

- 1) Alonso, G.,Gomes. C.,Gonzalez, C., Rodriguez Lemoine, V., 2000, On the mechanism of resistance to channel-forming colicines (PacB) and tellurite, encoded by plasmid Mip233 (IncH13). FEMS Microbiol Lett.. Vol.15, pp. 257-261
- 2) Amoozegar Mohammad Ali , Ashengroph Morahem, Malekzadeh Feridon, Razavi Mohamad Reza, Naddaf Saied and Kabiri Mahboubeh , 2008, Isolation and initial characterization of the tellurite reducing moderately halophilic bacterium, *Salinicoccus* sp. strain QW6 / Publish in ScienceDirect /Microbiological Research , Volume 163, Issue 4, Pages 456-465
- 3) Avazeri C, Turner RJ , Pommier J, Weiner JH, Giordano G, Vermeglio A. ,1997, Tellurite reductase activity of nitrate Reductase is responsible for the basal resistance of *Escherichia coli* to tellurite .Microbiology143:1181–1189
- 4) Ba LA, Döring M, Jamier V, Jacob C. Tellurium: an element with great biological potency and potential. Org Biomol Chem 2010;8:4203–16.
- 5) Chasteen T. G., Fuentes D. E., Tantalean J. C., and Vasquez C. C., 2008, Tellurite: History, Oxidative Stress and Molecular Mechanisms of Resistance, Research in Microbiology, in press.
- 6) Chasteen TG, Fuentes DE, Tantale'an JC, V'asquez CC (2009) Tellurite: history, oxidative stress, and molecular mechanisms of resistance. FEMS Microbiol Rev 33:820–832
- 7) Dumas E, Gao C, Suffern D, Bradforth SE, Dimitrijevic NM, Nadeau JL. Interfacial charge transfer between CdTe quantum dots and Gram negative vs Gram positive bacteria. Environ Sci Technol 2010;44:1464–70.
- 8) Etezad Seyed Masoud, Khajeh Khosro. Soudi Mohammadreza ,Tajer Mohammad Ghazvini Parisa, Dabirmanesh Bahareh,2009, Evidence on the presence of two distinct enzymes responsible for the reduction of selenate and tellurite in *Bacillus* sp. STG-83/ Enzyme and Microbial Technology 45, 1–6

- 9) Harrison JJ, Ceri H, Badry EA, Roper NJ, Tomlin KL, Turner RJ. Effects of the twin-arginine translocase on the structure and antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* biofilms. *Can J Microbiol* 2005; 51:671–83.
- 10) Harrison JJ, Tremaroli V, Stan MA, Chan CS, Vacchi-Suzzi C, Heyne BJ, et al. Chromosomal antioxidant genes have metal ion-specific roles as determinants of bacterial metal tolerance. *Environ Microbiol* 2009;11:2491–509.
- 11) Hughes m. n. & r.k.poole 1989, metal & microorganisms: Chapman and hall. London. Newyork 42-90
- 12) Kagami T, Fudemoto A, Fujimoto N, Notaguchi E, Kanzaki M, Kuroda M, Soda S, Yamashita M, Ike M: Isolation and characterization of bacteria capable of reducing tellurium oxyanions to insoluble elemental tellurium for tellurium recovery from wastewater. *Waste Biomass Valor* 2012, 3:409–418.
- 13) Khoshnoodi M., Amoozegar M.A., Hamed J.,2008, The study of tellurite tolerance and its bioremoval by a halophilic actinobacterial strain, QS-2006, http://www.knowledgica.com/Paper-ICHEC2008-ICHEC2008_039.html,
- 14) Liangyau, Y., Kangming, H., Duanren, C., Cangmin, Y. & Zheng, O. (1993). Evidence for telluroamino acid in biological materials and some rules of assimilation of inorganic tellurium by yeast. *Anal Biochem* 209, 318-322.
- 15) Mohammad Ali Amoozegar & Maryam Khoshnoodi & Maryam Didari & Javad Hamed & Antonio Ventosa & Susan A. Baldwin 2012, Tellurite removal by a tellurium-tolerant halophilic bacterial strain, *Thermoactinomyces* sp. QS-2006, *Ann Microbiol* (2012) 62:1031–1037
- 16) Moore MD, Kaplan S (1992) Identification of intrinsic high-level resistance to rare-earth oxides and oxyanions in members of the class Proteobacteria: characterization of tellurite, selenite, and rhodium sesquioxide reduction in *Rhodobacter sphaeroides*. *J Bacteriol* 174:1505–1514
- 17) Moore MD, Kaplan S (1994) Members of the family Rhodospirillaceae reduce heavy metal oxyanions to maintain redox poise during photosynthetic growth: these metal-reducing bacteria may Help to remediate environmental pollution. *ASM News* 60:17–23
- 18) Pal A, Dutta S, Mukheriee PK, Paul AK. Occurrence of Heavy Metal Resistance in Microflora from Serpentine Soil of Andaman. *J Basic Microbiol* 2005;45(3):207-218.

- 19) Pearce CI, Baesman SM, Blum JS, Fellowes JW, Oremland RS: Nanoparticles formed from microbial oxyanion reduction of toxic group 15 and group 16 metalloids. In *Microbial Metal and Metalloid Metabolism: Advances and Applications*. Edited by Stolz JF, Oremland RS. Washington DC: ASM press; 2011:297–319.
- 20) Rajwade J. M. and Paknikar K. M. 2003, Bioreduction of tellurite to elemental tellurium by *Pseudomonas mendocina* MCM B-180 and its practical application Available online 26 August. 2003 in ScienceDirect
- 21) Rathgeber C, Yurkova N, Stackebrandt E, Beatty JT, Yurkov V (2002) Isolation of tellurite- and selenite- resistant bacteria from hydrothermal vents of the Juan de Fuca Ridge in the Pacific Ocean. *Appl Environ Microbiol* 68:4613–4622
- 22) Rathgeber Christopher, Yurkova Natalia, Stackebrandt Erko, Yurkov Vladimir, 2006, Metalloid Reducing Bacteria Isolated from Deep Ocean Hydrothermal Vents of the Juan de Fuca Ridge, *Pseudoalteromonas telluritireducens* sp. nov. and *Pseudoalteromonas spiralis* sp. nov./ *CURRENT MICROBIOLOGY* Vol. 53, pp. 449–456
- 23) Tantalean JC, Araya MA, Saavedra CP, Fuentes DE, Perez JM, Calderon IL, Youderian P, Va Squez CC, 2003, The *Geobacillus stearothermophilus* *iscS* gene, encoding cysteine desulfurase, confers resistance to potassium tellurite in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* 185:5831–5837 (*JOURNAL OF BACTERIOLOGY*)
- 24) Taylor D.E., 1999, Bacterial tellurite resistance. *Trends Microbiol* 7:111–115
- 25) Taylor DE, Rooker M, Keelan M, Martin I, Perna NT, Burland V, et al. 2002, Genomic variability of O islands encoding tellurite resistance in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7 isolates. *J Bacteriol.*;184:4690-8.
- 26) Tsezos M. Biological removal of ions: principles and applications. *Adv Mater Res* 2007;20/21:589–96.
- 27) Turner RJ, Borghese R, Zannoni D: Microbial processing of tellurium as a tool in biotechnology. *Biotechnol Adv* 2012, 30:954–963.
- 28) Turner RJ, Weiner JH, Taylor DE, 1992, Use of diethyldithiocarbamate for quantitative determination of tellurite uptake by bacteria. *Anal Biochem* 204:292–295
- 29) Yurkov V, Jappe J, Vermeglio A, 1996, Tellurite resistance and reduction by obligately aerobic photosynthetic bacteria. *Appl Environ Microbiol* 62:4195–4198

- 30) Zolfaghary Mohammad Reza, Malekzadeh Feridoon ,Amoozegar Mohammad Ali, Razavi Mohammad Reza, 2008, The isolation of an extremely double-resistant bacterium with specific application in bioremediation against toxic oxyanion of tellurite and chromate existing in industry wastes: KWT2 / J.Env.Sci. TechNo.36 Specail
- 31) Zolfaghary Mohammad Reza, Soleimani Sasani Mahboubeh. 2013. Determination of Abundance of Tellurite-Resistant Bacteria and the Ability of Remove of them from Qom Province Industrial Wastewater, Qom, Iran. Qom University of Medical Sciences Journal. 2013;7(1)11-17

Isolation and identification of a tellurite resistance bacteria from industry's wastewater at Bioremediation and study optimal conditions increasing the Elimination and bioreduction of tellurite

*M. soleimani sasani, M. R. zolfaghari, M. soleimani

Islamic Azad University, Qom branch, Department of microbiology

Abstract:

The extensive use of tellurium oxyanions, such as Tellurite, in various industries such as textile, tanning and plating, which are highly toxic to microorganisms and eukaryotes, has increased environmental pollution. Potential application of Tellurite oxyanions bioreduction in resistant bacteria in surroundings can be a valuable tool in biotechnology for Biological removing of tellurite from contaminated areas by microorganisms.

84 strains of resistant bacteria to tellurite was separated from industry's wastewater. Tellurite resistance activity was evaluated using the minimum inhibitory concentration (MIC) method, concentration 0/1 to 26mM potassium tellurite at 34°C for 7 days by the agar dilution method and QWTmb9 was isolated which able to tolerate and reduction very high concentration of 22 mM. This tolerance to tellurite compared with the threshold concentration of other isolated bacteria is remarkable. In order to evaluate strain's Tellurite removal, colorimetric method using a spectrophotometer and DDTC reagent (sodium diethyldithiocarbamate tri-hydrate, A340 nm) was used.

The effects of various factors on the optimal growth and tellurite removal were investigated conditions Tellurite concentration, pH, temperature, aeration rate and different concentrations of NaCl. Due to the direct connection to oxyanions resistance and resistance to antibiotics, AntibioGram test was conducted.

QWTmb9 isolated from wastewater of blanket textile, which maximum removal rates in 24h is in 0.4 concentrations of Tellurite, temperature 35°C, pH 7.5, 100RPM aeration and 170mM NaCl concentration. This strain is resistant to antibiotics penicillin, ampicillin, rifampin, tetracycline, chloramphenicol, neomycin, kanamycin and erythromycin.

Gram-negative strains QWTmb9 can be a good candidate for elimination of toxic tellurite in industrial biotechnology.

Keywords: oxyanion, Tellurite, biological purification, Bioremediation, bioreduction