علوم و تکنولوژی محیط زیست ، دوره دوازدهم، شماره یک، بهار ۸۹

مقایسهٔ رفتاری باکتری نمک دوست نسبی (*H. elongata* DSM 2581) ، تحمـــل پـــذیر نمک (*E. faecalis* PTCC 1237) و غیـــر نمـــک دوست (*P. aeruginosa* PTCC 1074) در حذف تلوریت در حضـور سلنو اکسی آنیون ها و ارسنات

زینب السادات متشرعی [1*]

محمد علی آموزگار [2]

تاریخ دریافت:۸۷/۱/۲۰ **تاریخ پذیرش:۸۷/۶/۱۰**

چکیده

میکروارگانیسم های نمک دوست، تحمل کننده نمک و غیر نمک دوست نقش مهمی در پاک سازی زیستی و تبدیلات زیستی عناصر فلزی سمی در محیط های آلوده دارند. شناسایی سویه های مقاوم به فلز و الگوهای حذف فلزی، اولین قدم در به کارگیری آن ها در فرایندهای پاک سازی زیستی است. در این مطالعه، حذف تلوریت و اثر اکسی آنیون های سمی سلنو اکسی آنیونی و ارسنات، در باکتری نمک دوست نسبی (H. elongate DSM 2581) ، تحمـــل پذیـــر نمـــک (E. faecalis PTCC 1237) و غیـــر نمـــک دوست (P. aeruginosa PTCC 1074) که دارای MIC نسبت به تلوریت به ترتیب ۰/۲۵ ، ۸ و ۰/۲۵ میلی مولار بودند با استفاده از روش رنگ سنجی با معرف دی اتیل تیو کاربامات تعیین شد. سلنو اکسی آنیون ها در افزایش مقاومت H. elongata به تلوریت اثر مثبت داشتند به طوری که میزان مقاومت را از mM ۰/۲۵ در حضور mM ۲۵ سلنیت یا سلنات به ترتیب به ۱۸ و ۳ میلی مولار افزایش دادند. در مورد E. faecalis نیز سلنیت در غلظت mM ۲۵ و سلنات در غلظت mM ۵ و ارسنات در غلظت mM ۰/۱ موجب افزایش میزان MIC تلوریت به ترتیب به mM ۸۰، mM ۱۶ و mM ۱۶ گردید. اما در گونهٔ غیر نمک دوست P. aeruginosa افزودن هیچ کدام از سلنو اکسی آنیون ها، همین طور ارسنات میزان MIC نسبت به تلوریت را زیاد نکرد. در بررسی حذف تلوریت در محیط کشت مایع حاوی سلنیت یا سلنات و یا ارسنات مشاهده گردید که غلظت mM ۵۰ سلنیت یا ۱mM سلنات همراه با mM ۰/۱ تلوریت در گونهٔ نمک دوست H.elongata سبب افزایش حذف تلوریت به میـــزان ٪۴۸/۲۱ و ٪۲۵/۷۴ در مقایســـــه با محیط فقط دارای تلـــوریت شـــد. در گـــونه

۱- کارشناسی ارشد میکروبیولوژی دانشگاه تهران، پژوهشکده بیوتکنولوژی جهاد دانشگاهی تهران*(مسئول مکاتبات).

۲- استادیار دانشکده زیست شناسی-گروه میکروبیولوژی دانشگاه تهران.

E. faecalis غلظت های ۱ mM سلنیت یا سلنات و یا ۰/۱ mM ارسنات همراه با ۰/۲ mM تلوریت، افزایش ۲/۲٪ ، ۷/۳۳٪ و ۷۵٪ را به ترتیب در حذف تلوریت موجب گردید. بیشترین اثر مثبت سلنیت و سلنات در حذف تلوریت در باکتری Halomonas و کمترین آن در Enterococcus دیده شد. یک ویژگی منحصر به فرد در E. faecalis اثر مثبت ارسنات بر حذف تلوریت به میزان ۷۵٪ بود که در دو باکتری دیگر دیده نشد. در مورد گونهٔ غیر نمک دوست P.aeruginosa نیز ۸ mM سلنیت یا ۱ mM سلنات کارایی حذف تلوریت را در مقایسه با محیط فقط حاوی تلوریت، ۳۴/۳۵ ٪ و ۱۱/۸۲٪ افزایش داد. در سه گونهٔ مورد مطالعه، مقاومت همراه با احیایی تلوریت به تلوریوم عنصری مشاهده گردید و نتایج XRF و تحلیلگر EDS و مشاهدات میکروسکوپ الکترونی TEM نیز تأیید کردند که تلوریت در محیط، توسط گونه ها به تلوریوم عنصری احیای گردیده و به شکل گرانول های متراکم، درون سلول باکتری و معمولاً نزدیک غشای پلاسمای باکتری تجمع یافته است. از مقایسهٔ رفتار سه گونه باکتریایی، از آن جا که تنها در گونه های نمک دوست و تحمل پذیر، نمک حضور اکسی آنیون های دیگر سبب افزایش مقاومت به تلوریت و حذف آن گردید، این گونه ها در مقایسه با گونه غیر نمک دوست P.aeruginosa کاندید بهتری برای حذف آلودگی تلوریت از محیط هستند.

واژه های کلیدی: *H. elongata* DSM 2581، *E. faecalis* PTCC 1237، *P. aeruginosa* PTCC 1074، تلوریت، سلنو اکسی آنیون، ارسنات.

مقدمه

مقاومت باکتری ها به عناصر شبه فلزی سمی، یک پدیدهٔ خوب شناخته شده است (۱). ازترکیبات این شبه فلزات سمی می توان به اکسی آنیون های عنصر تلوریوم یعنی تلوریت پتاسیم و تلورات پتاسیم یا عنصر سلنیوم یعنی سلنیت سدیم و سلنات سدیم ویا عنصر ارسنیک به فرم ارسنات سدیم اشاره کرد. تلوریت پتاسیم به خاطر حلالیت بالایی که دارد در غلظت های بسیار کم ۱ µg/ml برای پروکاریوت ها و هم یوکاریوت ها بسیار سمی است(۲). فرم های محلول و سمی سلنیت و سلنات سبب ایجاد آلودگی و بر جا گذاشتن اثرات سوء جانبی در مناطق مختلفی از دنیا شده است(۱). سمیت اکسی آنیون تلوریوم و سلنیوم به فعالیت اکسندگی قوی آن ها بر می گردد که ممکن است در فرایند های اساسی سلول تداخل ایجاد کند(۳). ارسنیک نیز از جمله عناصر کمیاب است که بنابر استفادهٔ وسیع از ترکیبات ارگانوارسنیک ها به عنوان علف کش ها در مزارع غلات و مرکبات شاهد ورود ترکیبات سمی ارسنیکی به محیط هستیم (۴). باکتری ها که قادر به تغییر فلزات و شبه فلزات اند می توانند در فرآیند سم زدایی و زیست سالم سازی محیط نقش موثری بازی کنند و بدین وسیله توان زیست فن آوری مهمی را در زمینهٔ پاک سازی زیستی که غالباً سازوکار و راه چارهٔ اول برای حذف آلودگی های ترکیبات سمی در مقایسه با روش های فیزیکی و شیمیایی است، فراهم می آورند. از آن جا که پساب های صنعتی مخلوطی از فلزات سمی را داشته و از طرف دیگر دارای تراکم های بالای نمک می باشند، مطالعه اثرات متقابل فلزات سمی بر یکدیگر در چنین پساب های پرشور و نقش سه گروه فیزیولوژیک مختلف از باکتری ها: نمک دوست، تحمل پذیر نمک و غیر نمک دوست در حذف این ترکیبات سمی قابل توجه است تا در یافتن نوع رفتار باکتری ها تحت چنین شرایطی برای ایجاد سیستم های حذف آلاینده های محیطی، مفید واقع گردد. در این مورد در این پژوهش اثر اکسی آنیون های سمی بر مقاومت، حذف و احیایی تلوریت در سه باکتری شاخص از سه گروه فیزیولوژیک نمک دوست، تحمل کننده نمک و غیر نمک دوست مورد مطالعه قرار گرفت. و برای اولین بار مقایسه رفتاری باکتری های مقام به تلوریت در این سه گروه فیزلولوژیک مختلف بررسی گردید.

مواد و روش ها

گونه های باکتریایی و شرایط کشت: ۳ گونهٔ باکتریایی نمک دوست نسبی *(Halomonas elongata* DSM 2581) ، تحمل پذیر نمک *Enterococcus faecalis* 1237) (PTCC و غیر نمک دوست *Pseudomonas aeruginosa)* (PTCC 1074 از بانک میکروبی ایران (مرکز کلکسیون قارچ ها و باکتری های صنعتی ایران) و آلمان (بانک میکروبی DSMZ آلمان) تهیه و بر اساس محیط های پیشنهادی به وسیله مرکز نگه داری میکروارگانیسم ها کشت داده شد.

بررسی مقاومت به اکسی آنیون های سمی: برای بررسی مقاومت گونه ها به اکسی آنیون های مختلف از روش رقت در آگار استفاده گردید(۵). حجم مناسب از غلظت های (۰/۱ تا ۱۶ میلی مولار) تلوریت پتاسیم، (۱ تا ۴۰۰ میلی مولار) سدیم سلنیت، (۱ تا ۴۰۰ میلی مولار) سدیم سلنات و (۱ تا ۴۰۰ میلی مولار) سدیم ارسنات به ۱۰ میلی لیتر محیط کشت استریل نوترینت آگار برای گونه های غیر نمک دوست و نوترینت آگار دارای نمک با ترکیب زیر برای گونهٔ نمک دوست اضافه گردید ; Sea Water10% : NaCl 80.93 g $MgCl_2$ 6.93 g ; $MgSO_4$ 9.6 g ; $CaCl_2$ 0.36 g ; KCl 2 g ; NaBr 0.0025 g ; $NaHCO_3$ 0.06 g و در پلیت پخش شد . ۱۰ میکرو لیتر از سوسپانسیون باکتریایی که تراکم آن معادل لولهٔ ۰/۵ مک فار لند بود بر روی محیط آگار دار قرار گرفت و به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۳۴ درجهٔ سانتی گراد گرماگذاری شد و نتایج به صورت MIC گزارش گردید. MIC به عنوان پایین ترین تراکمی از اکسی آنیون که کاملاً مانع رشد باکتری می شد (حداقل غلظت مهار کنندهٔ رشد) در نظر گرفته شد. جهت بررسی اثر سلنو اکسی آنیون ها و ارسنات در مقاومت به تلوریت نیز غلظت های نهایی از تلوریت پتاسیم که به عنوان حداقل غلظت مهار کنندهٔ رشد (MIC) در نظر گرفته شده بود، هر بار با غلظت مناسبی از سلنات یا سلنیت و یا ارسنات مورد ارزیابی قرار گرفت.

ارزیابی حذف تلوریت: برای سنجش حذف تلوریت در محیط نوترینت براث برای گونه های غیر نمک دوست و نوترینت براث با ۱۰٪ سدیم کلراید(w/v٪) برای گونهٔ نمک دوست از تکنیک کالریمتری و معرف DDTC در طول موج ۳۴۰ نانومتر (۶) استفاده شد. غلظت های ابتدایی ۰/۱ ، ۰/۲ ، ۰/۵ و ۱ میلی مولار تلوریت بر روی حذف آن در گونه های مورد آزمایش بررسی گردید و پس از آن غلظت های ۱ ، ۴ و ۸ میلی مولار (که در صورت نیاز به ۱۰، ۲۵ ، ۵۰ و ۱۰۰ میلی مولار نیز افزایش یافت) از اکسی آنیون ها همراه با غلظت های اولیهٔ ۰/۱ میلی مولار تلوریت برای سویه های *H.elongata* و *P.aeruginosa* و ۰/۲ میلی مولار تلوریت برای سویهٔ *E.faecalis* مورد استفاده قرار گرفت تا رشد و حذف تلوریت به تنهایی و در حضور اکسی آنیون های دیگر ارزیابی گردد.

ارزیابی احیایی تلوریت: از آن جـــا که رشد باکتری ها در محیط، همراه با ایجاد رنگ سیاه در نتیجهٔ احیـــایی تلـوریت به تلوریوم عنصری بود، جهت تایید این نکته که تلوریت احیـــای شده و به صورت فلـــزی درون باکتـــری مجتمع می شوند، تحلیلگر طیف سنجی فلورسانس (XRF) (PW2400,Philips) انجام گرفت. برای این منظور رسوب به دست آمده سویه های *E. faecalis* در محیط نوترینت براث حاوی ۰/۲ میلی مولار تلوریت و *P. aeruginosa* در محیط نوترینت براث حاوی ۰/۱ میلی مولار تلوریت و سویه *H. elongata* درمحیط نوترینت براث دارای ۱۰٪ نمک NaCl حاوی ۰/۱ میلی مولار تلوریت به روش XRF مورد تحلیلگر قرار گرفتند.

مشاهدهٔ کریستال های داخل سلولی تلوریوم با استفاده از میکروسکوپ الکترونی گذاره (TEM): برای مشاهدهٔ ذرات تلوریوم حاصل از احیایی تلوریت در داخل سلول های باکتری، محیط کشت حاوی مقادیر مشخص تلوریت، وقتی که کشت باکتری سیاه شد، در اواسط مرحله رشد لگاریتمی، طبق روش Reynold (۷) به مدت ۳۰ دقیقه در دور ۳۰۰۰ rpm سانتریفوژ شد و رسوب حاصل در گلوتار آلدئید ۲/۵ ٪ تثبیت گردید تا پس از انجام مراحل آماده سازی و تهیهٔ گرید، ذرات

عنصری تشکیل شده در داخل سلول های باکتری با استفاده از میکروسکوپ الکترونی گذاره(CEM, 902A. ZEISS) مشاهده گردند.

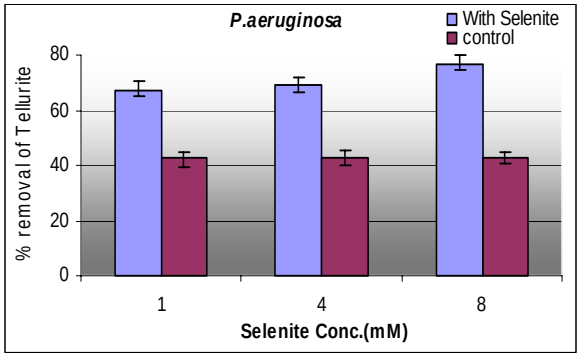
تأیید مشاهدات حاصل از میکروسکوپ الکترونی با استفاده از EDS: برای تأیید ذرات تلوریوم تشکیل شده در داخل سلول باکتری ها، از میکروسکوپ الکترونی نگاره Oxford model (MV2300) مجهز به تحلیلگرEDS طبق همان روش به کار رفته در تحلیلگر XRF استفاده گردید. در این طیف سنجی قابلیت ردیابی عناصر با عدد اتمی شش به بالا وجود دارد.

نتایج

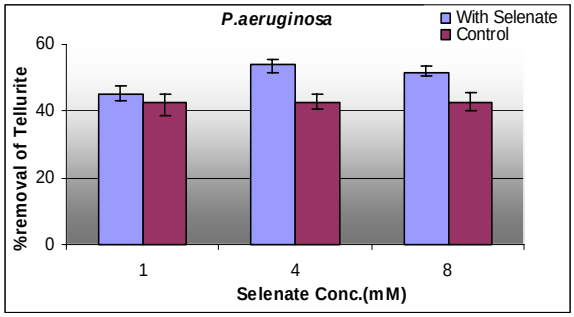
در بررسی مقاومت باکتری های مورد آزمایش به اکسی آنیون های مختلف، سلنو اکسی آنیـــون ها در افزایش مقاومت *H. elongata* به تلوریت اثر مثبت داشتند به طوری که میزان مقاومت را از۰/۲۵ mM در حضور۲۵ mM سلنیت یا سلنات به ترتیب به ۱۸ و ۳ میلی مـــولار افـــزایش دادنـــد. در مـــورد *E. faecalis* نیز سلنیت در غلظت ۲۵ mM و سلنات در غلظت ۵ mM و ارسنات در غلظت ۰/۱ mM موجب افزایش میزان MIC تلوریت از ۸ mM به ترتیب به ۸۰ mM، ۱۶ mM و ۱۶ mM گـــردید. امـــا در گـــونـــهٔ غیـــر نمک دوســـت *P. aeruginosa* افزودن هیچ کدام از سلنو اکسی آنیون ها یا ارسنات میزان MIC ۰/۲۵ میلی مولار نسبت به تلوریت را زیاد نکرد. نکتهٔ قابل توجه، اثر مثبت سلنو اکسی آنیون ها بر افزایش مقاومت سویه نمک دوست و حتی تحمل پذیر نمک نسبت به تلوریت است، که این اثر بیشتر در رابطه با سلنیت است، چنان که این الگو را نمی توان در مورد سلنات و ارسنات مشاهده کرد. این در حالی است که سلنو اکسی آنیون ها و ارسنات در مقاومت به تلوریت در سویه غیر نمک دوست اثر مثبت نداشتند.

اثر غلظت های اولیه ۰/۱ ، ۰/۲ ، ۰/۵ و ۱ میلی مولار پتاسیم تلوریت بر روی حذف آن در محیط مغذی در مورد هر سه گونه باکتری مورد بررسی قرار گرفت. بیشترین میزان حذف برای گونه های *H.elongata* و *P.aeruginosa* که دارای MIC معادل ۰/۲۵ میلی مولار هستند، در غلظت ۰/۱ میلی مولار مشاهده گردید که این میزان در مورد گونهٔ *E. faecalis* با MIC معادل ۸ نسبت به تلوریت ،۰/۲ میلی مولار بود (داده ها نشان داده نشده است).

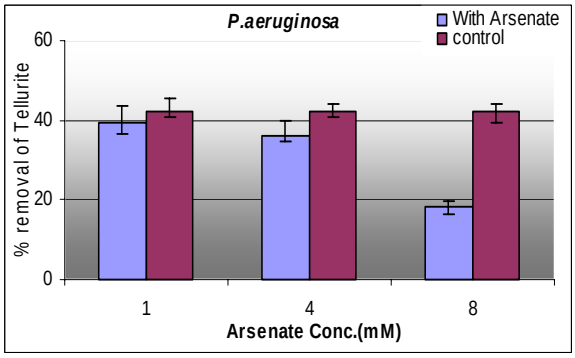
اثر غلظت های مختلف سلنو اکسی آنیون ها و ارسنات بر روی حذف پتاسیم تلوریت در سه باکتری مورد بررسی قرار گرفت. در صد حذف تلوریت درگونه ها متفاوت بود. در گونهٔ *P. aeruginosa* در محیط تنها دارای ۰/۱میلی مولار تلوریت یعنی ۲۵ µg/ml، میزان تلوریت طی ۴ روز گرماگذاری به۱۴/۳۷ µg/mlرسید که ۴۲/۴۰٪ کاهش را نشان می داد در حالی که این میزان در حضور ۸ میلی مولار سلنیت و یا ۴میلی مولار سلنات به ترتیب ۷۶/۷۵٪ و ۵۴/۲۲٪ تغییر کرد (نمودار۱ الف و ب). این نتایج اثر مثبت سلنواکسی آنیون ها به خصوص سلنیت بر حذف تلوریت در این سویه را نشان می دهد با وجود این، ارسنات چنین اثری بر حذف تلوریت ندارد چرا که با افزایش غلظت ارسنات از ۱ به ۴ و ۸ میلی مولار، تلوریت در این محیط(به ترتیب ۳۹/۵۱٪، ۳۶/۱۵٪ و ۱۸/۲۳٪) نسبت به زمانی که به تنهایی (۴۲/۴۰٪) در محیط وجود دارد کمتر حذف گردید (نمودار ۱ج).



نمودار ۱ الف- مربوط به سلنیت



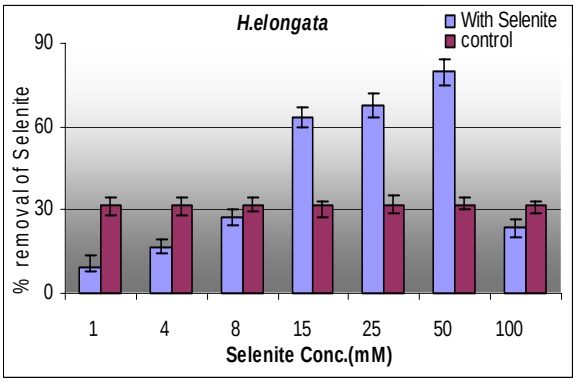
نمودار ۱ ب



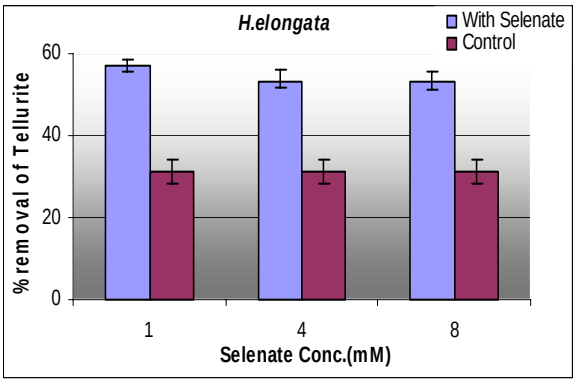
نمودار ۱ ج

نمودار ۱ الف- حذف تلوریت به تنهایی و در حضور سلنیت در گونهٔ *P. aeruginosa*، ب- حذف تلوریت به تنهایی و در حضور سلنات در گونهٔ *P. aeruginosa* ، ج- حذف تلوریت به تنهایی و در حضور ارسنات در گونهٔ *P. aeruginosa*

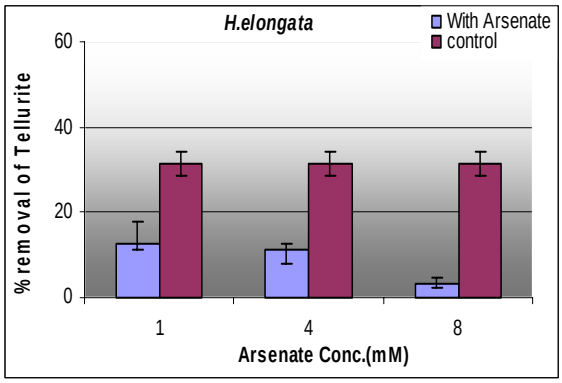
سویهٔ نمک دوست *H.elongata* طی ۴ روز گرماگذاری۲۵ µg/ml تلوریت را به ۱۷/۱۲۵ µg/ml کاهش دادکه این میزان در حضور ۵۰میلی مولار سلنیت به µg/ml ۵/۰۹۶ رسید. سلنات نیز در حذف تلوریت اثر مثبت داشت چنان چه ۵۷/۱۱٪ کاهش تلوریت در محیط حاوی ۰/۱ میلی مولار تلوریت و ۱ میلی مولار سلنات (نسبت به کاهش ۳۱/۳۶٪ حذف تلوریت به تنهایی) مشاهده گردید (نمودار ۲ الف وب). اکسی آنیون های ارسنات در غلظت های ۱، ۴ و ۸ میلی مولار اثر مثبتی بر حذف تلوریت نداشتند چنان چه در مدت ۴ روز گرماگذاری، ۲۵ µg/ml تلوریت در غلظت های ذکر شدهٔ ارسنات به ترتیب به ۲۱/۸ ، ۲۲/۱۸ و ۲۴/۰۷میکروگرم در میلی لیتر رسید (نمودار ۲ج).



نمودار ۲ الف



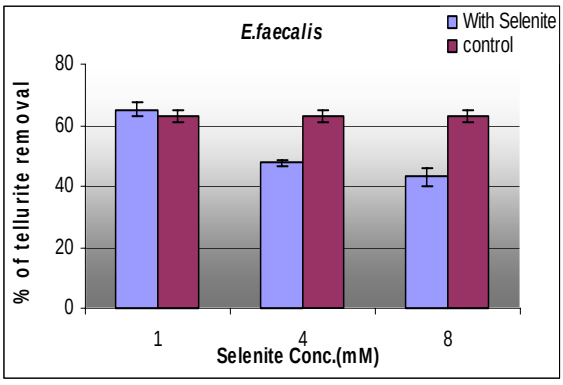
نمودار ۲ ب



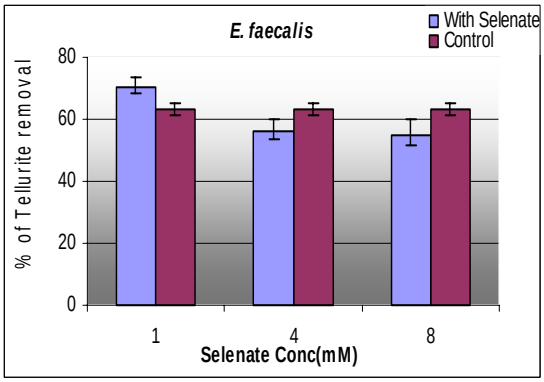
شکل ۲ ج

نمودار۲ الف- حذف تلوریت به تنهایی و در حضور سلنیت در گونهٔ *H.elongata*، ب- حذف تلوریت به تنهایی و در حضور سلنات درگونهٔ *H.elongata*، ج- حذف تلوریت به تنهایی و در حضور ارسنات در گونهٔ *H.elongata*

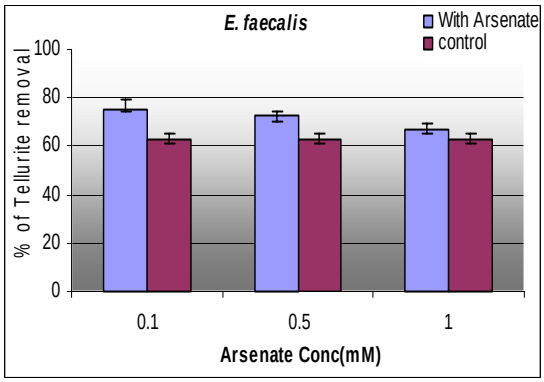
گونهٔ تحمل پذیر نمک *E. faecalis*، ۰/۲ میلی مولار تلوریت (۵۰ میکروگرم در میلی لیتر) را طی ۴ روز ۶۳٪ حذف کرد که این میزان در غلظت های ۱mM سلنیت و یا ۱mM سلنات به ترتیب به ۶۵/۲٪ و ۷۰/۳۳٪ افزایش یافت . این در حالی است که افزایش غلظت این سلنو اکسی آنیون ها سبب افزایش میزان حذف تلوریت از محیط نمی شد، به طوری که رنگ محیط حاصل از حذف تلوریت به واسطهٔ احیایی آن به عنصر تلوریوم در غلظت های ۱mM سلنیت یا سلنات سیاه شد، اما در غلظت های بالاتر ۴ و ۸ میلی مولار رنگ محیط بیشتر به رنگ قرمز که نتیجهٔ احیایی سلنواکسی آنیون ها و رسوب سلنیوم بود تغییر می یافت. در مورد ارسنات در روز اول در هر ۳ غلظت ۰/۱ ، ۰/۵ و ۱ میلی مولار، حذف بیشتر تلوریت نسبت به نمونهٔ شاهد مشاهده گردید؛ به ترتیب تلوریت به ۹/۷۹ ، ۱۰/۷۶ و ۱۳/۱۳ میکروگرم در میلی لیتر کاهش یافته که این میزان طی ۴ روز به تدریج افزایش یافت و به ۲۰/۰۵، ۱۹/۱۶ و ۲۱/۰۹میکروگرم در میلی لیتر رسید (شکل ۳ الف،ب وج).



نمودار ۳ الف



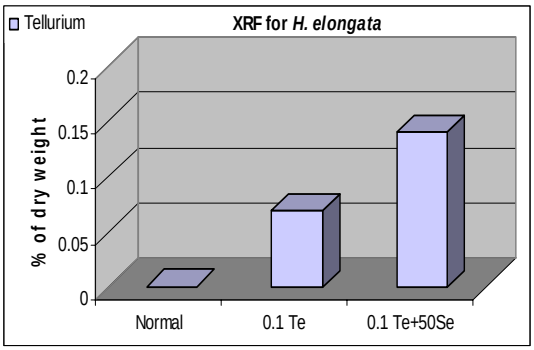
نمودار ۳ ب



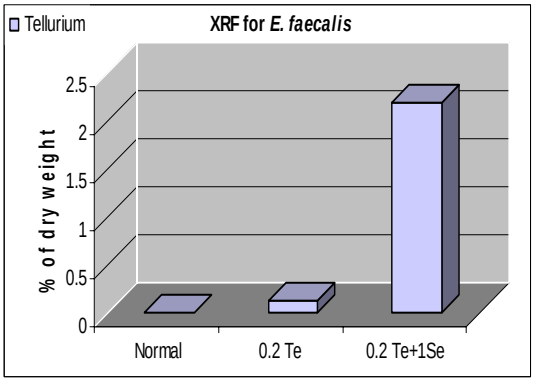
نمودار ۳ ج

نمودار ۳ الف- حذف تلوریت به تنهایی و در حضور سلنیت در گونهٔ *E. faecalis*، ب- حذف تلوریت به تنهایی و در حضور سلنات در گونهٔ *E. faecalis*، ج- حذف تلوریت به تنهایی و در حضور ارسنات در گونهٔ *E. faecalis*

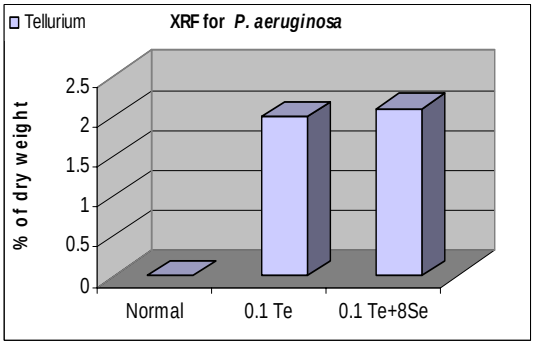
اثر سلنیت بر احیایی تلوریت: در روش XRF با استفاده از پرتویX، میزان و نوع عناصر موجود در نمونه بر حسب درصد وزنی آن ها مشخص می شود. همان طور که در نمودار ۴ الف و ب برای گونه های *H. elongata* و *E. faecalis* به ترتیب مشخص است، در تیمار تلوریت همراه با سلنیت در گونه های مورد مطالعه ، تلوریوم درصد بیشتری از وزن خشک سلول را نسبت به زمانی که در محیط تلوریت به تنهایی وجود داشته تشکیل می دهد، چنان چه طی ۴ روز در گونهٔ *E. faecalis* تلوریوم از ۰/۱۴٪ به ۲/۲۱٪ و در گونهٔ *H. elongate* از ۰/۰۷٪ به ۰/۱۴٪ می رسد، در حالی که در گونهٔ *P.aeruginosa* (نمودار ۴ ج) این چنین نیست. تمام این شواهد حاکی از این نکته است که وجود سلنیت باعث افزایش میزان احیای تلوریت به تلوریوم عنصری در باکتری های نمک دوست و تحمل پذیر نمک می شود اما چنین نتیجه ای در باکتری *Pseudomonas* دیده نمی شود.



نمودار ۴ الف



نمودار ۴ ب

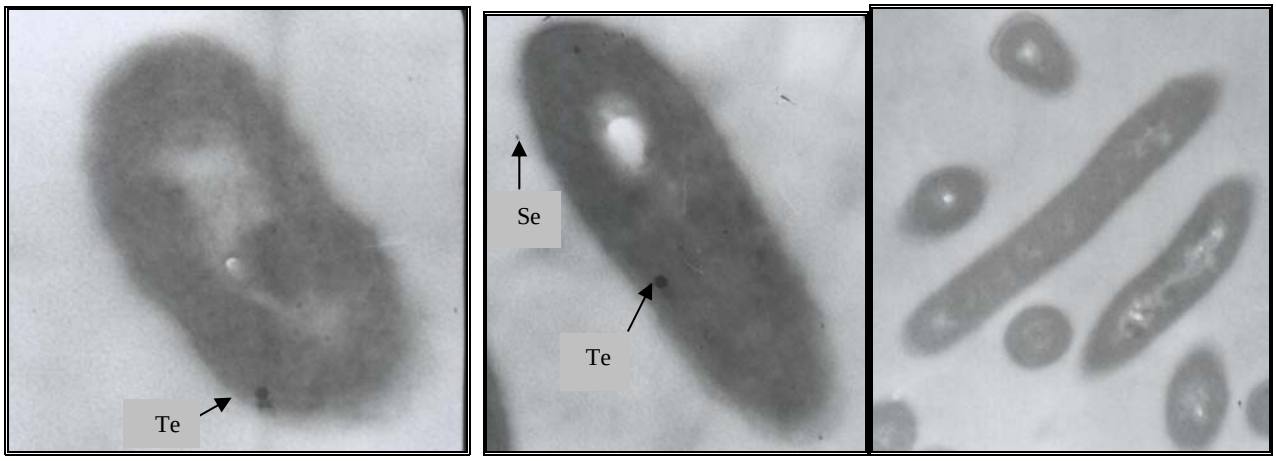


نمودار ۴ ج

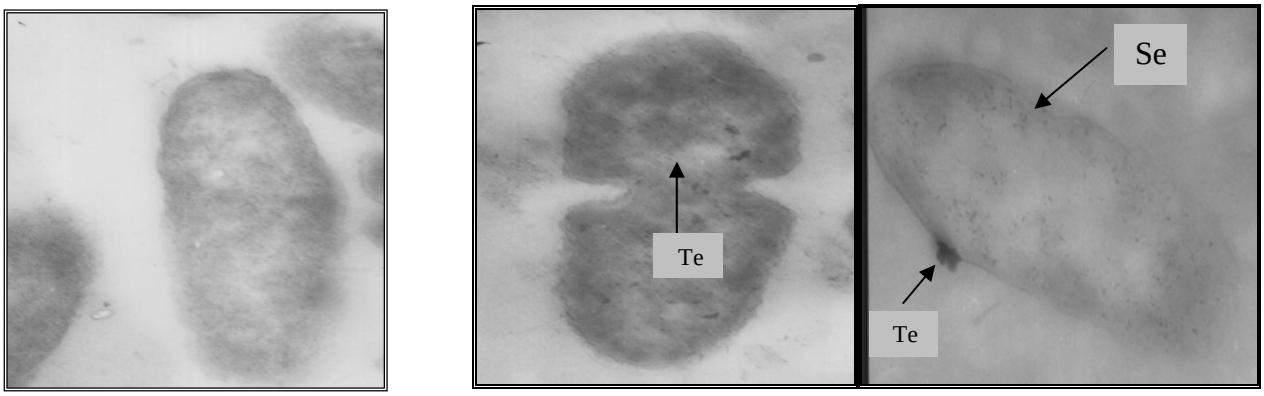
نمودار۴ –میزان تجمع تلوریم پس از ۴ روز مجاورت با اکسی آنیونسلنیت در رسوب گونهٔ H.elongata (الف)، E.faecalis (ب) و P.aeruginosa (ج) با استفاده از XRF

مشاهدات میکروسکوپ الکترونی گذاره (TEM) و نتایج EDS: شکل۱الف، ب و ج میکروگراف های میکروسکوپ الکترونی گذارهٔ سه باکتری مورد آزمایش در شرایط محیط بدون تلوریت، در حضور اکسی آنیون سمی تلوریت به تنهایی و در محیط حاوی تلوریت به همراه اکسی آنیون سمی سلنیت است. در حالی که هیچ دانه رسوبی در باکتری های رشد کرده در محیط کنترل وجود نداشت، چنین ذرات چگال رسوبی، در محیط دارای تلوریت به تنهایی و محیط دارای تلوریت به همراه سلنیت مشاهده شد که همراه با سیاه شدن محیط کشت و ناشی از احیای تلوریت به تلوریوم عنصری است. این ذرات تلوریوم درون سلولی با استفاده از میکروسکوپ الکترونی نگاره ای (Oxford model MV2300) مجهز به دستگاه EDS تعیین هویت و تایید گردید (نمودار ۵ الف، ب وج).

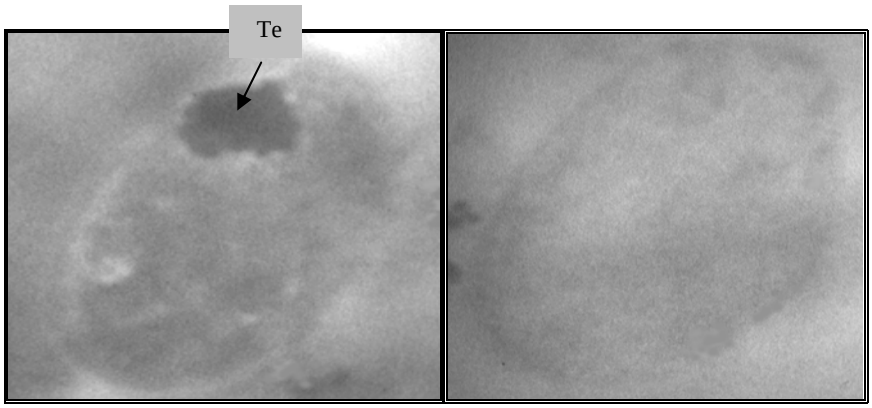
شکل ۱ الف



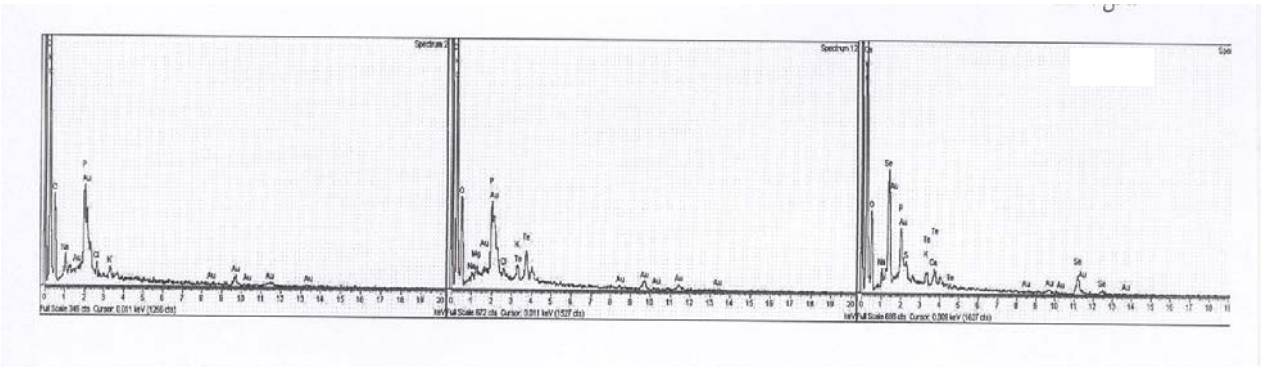
شکل ۱ ب



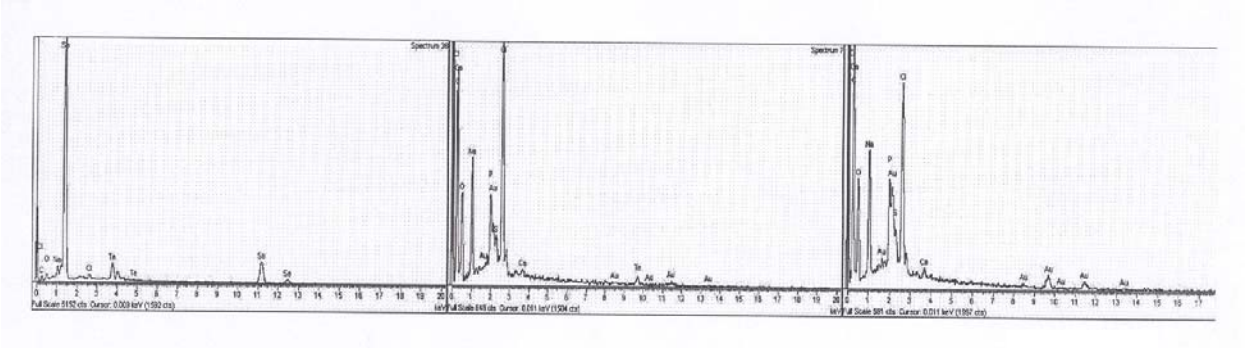
شکل ۱ ج



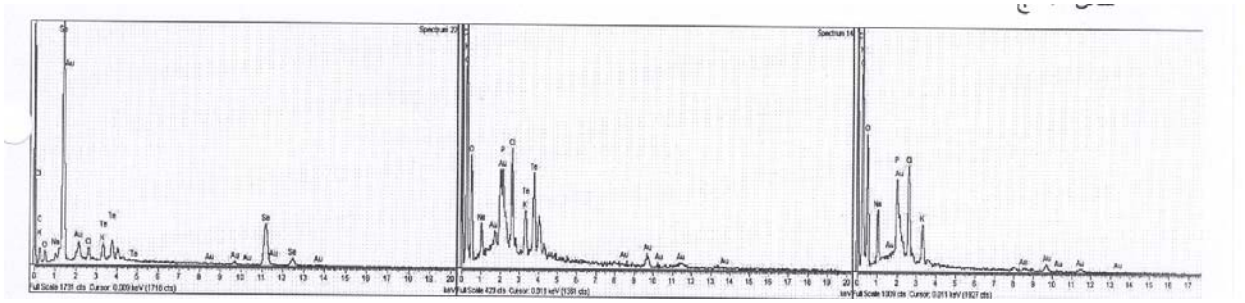
شکل ۱ الف - *H. elongata* نمونهٔ کنترل ،فاقد اکسی آنیون ها(راست)-نمونهٔ حاوی ۰/۱ mM تلوریت و ۵۰ mM سلنیت(وسط)- نمونهٔ حاوی ۰/۱ mM تلوریت(چپ)، ب -*P. aeruginosa* نمونهٔ شاهد فاقد اکسی آنیون ها(چپ)-حاوی 0/1 mM تلوریت(وسط)-حاوی ۰/۱mM تلوریت و ۸ mM سلنیت(راست)، ج- *E. faecalis* نمونهٔ شاهد فاقد اکسی آنیون (راست). حاوی ۰/۲ mM تلوریت(چپ)



نمودار ۵ الف



نمودار ۵ ب



نمودار ۵ ج

نمودار ۵ الف- آنالیز ***P. aeruginosa*** به روش EDS (چپ) آنالیز ***P. aeruginosa*** **(0/1 Te)** به روش EDS (وسط)، آنالیز ***P. aeruginosa*****(0/1 Te+8Se)** به روش EDS (راست)؛ ب آنالیز ***H. elongata*** به روش EDS (راست)، آنالیز ***H. elongata*****(0/1 Te)** به روش EDS (وسط)، آنالیز ***H. elongata*****(0/1 Te+50 Se)** به روش EDS (چپ)؛ ج آنالیز ***E. faecalis*** به روش EDS (راست)، آنالیز ***E. faecalis*****(0/2 Te)** به روش EDS (وسط)، آنالیز ***E. faecalis*****(0/2 Te+1Se)** به روش EDS (چپ)

بحث

به دلیل کاربرد فراوان و روز افزون سلنیوم و تلوریم در صنایع مختلف، چرخه ژئو شیمیایی این عناصر در طبیعت از این واقعیت، متأثر و دستخوش تغییر شده است. به همین دلیل آلودگی به این عناصر و اکسی آنیون های آن ها که در شرایط اکسیک و هوازی ایجاد شده وسمیتی به مراتب بیش از خود فرم فلزی این عناصر دارند، به خصوص در مناطق صنعتی و کشاورزی دیده و گزارش شده است(۸).

باکتری ها که قادر به ترانسفور ماسیون فلزات و شبه فلزات اند، نقش عمده ای در چرخه شیمیایی این عناصر (شبه فلزات) بازی می کنند و بیشترین میزان احیایی این اکسی آنیون ها در خاک توسط باکتری ها انجام می شود(۳).

یافته هایی که در بررسی اثر توأم ترکیبات سمی مانند اکسی آنیون ها تاکنون به دست آمده، بر اثر مثبت دو عامل سمی در میکروارگانیسم ها اشاره نکرده است، چنان چه Basnayake و همکارانش(۹) در مطالعه ای برروی *Pseudomonas fluorescens* K27 مشاهده کردند میزان زی توده در کشت همزمان تلوریت و تلورات نصف میزان زی توده در هر کدام به تنهایی است. این در حالی است که اثر مثبت برهم کنش دو اکسی آنیون سمی بر یکدیگر یعنی اثر هم افزایی سلنیت بر مقاومت به تلوریت برای اولین بار توسط Amoozegar و همکارانش(۱۰)در باکتری *Salinococcus iranensis* گزارش شد.

در این میـــان احتمال می رفت که در مقایسهٔ باکتری های نمک دوست و غیر نمک دوست به دلیل وجود شرایط شور در پساب های آلوده، حذف ترکیبات سمی از جمله تلوریت از روال خاصی پیروی کند چراکه در باکتری های نمک دوست مقاومت به انواع فلزات سنگین و اکسی آنیون ها تا سطوح بالا، به خصوص در جنس هالوموناس قبلا گزارش شده است(۱۱). در این مورد در این پژوهش اثر اکسی آنیون های سمی بر مقاومت، حذف و احیای تلوریت در سه باکتری شاخص از سه گروه فیزیولوژیک نمک دوست، تحمل کننده نمک و غیر نمک دوست مورد مطالعه قرار گرفت.

با بررسی هایی که انجام شد مشخص گردید با افزودن سلنیت یا سلنات مقاومت به تلوریت در گونه نمک دوست نسبی *H. elongata* افزایش می یابد . در مورد گونه تحمل پذیر نمک ، *E. faecalis*، علاوه بر سلنیت و سلنات، ارسنات نیز سبب افزایش مقاومت به تلوریت در این گونه گردید که یکی از دلایل این افزایش، مقاومت می تواند وجود کاتیون سدیم و پتاسیم در ترکیب این اکسی آنیون ها باشد که برای رشد و بقای این باکتری ها در محیط شور و فعالیت آنزیم ها و یا پمپ هایی که در مقاومت نسبت به این ترکیبات در باکتری ها نقش دارنـــد لازم می باشد. با وجود این در مورد گونه غیر نمک دوست *P.aeruginosa* افزودن هیچ کدام از اکسی آنیون های سلنیت، سلنات و یا ارسنات سبب افزایش مقاومت به تلوریت در این گونه نگردید، چرا که افزودن نمک های سلنو اکسی آنیون و ارسنات سبب افزایش غلظت کاتیون هایی می شود که ممکن است منجر به عدم تعادل یونی در داخل و خارج سلول غیر نمک دوست *P. aeruginosa* گردد. Fall و Burton (۱) نیز با بررسی چندین گونهٔ مقاوم به سلنیت از جمله *P.aeruginosa* در یافتند که هیچ ارتباطی بین مقاومت به سلنیت یا سلنات و مقاومت به تلوریت یا ارسنات وجود ندارد.

در بررسی میزان حذف تلوریت در گونه های مورد آزمایش، هر چند سلنو اکسی آنیون ها در افزایش مقاومت به تلوریت در *P.aeruginosa* اثری نداشتند اما در میزان کارایی حذف تلوریت در مدت زمان ۴ روز، اگر کارایی حذف تلوریت به عنوان در صد حذف تلوریت طی ۴ روز تعریف گردد، نقش مثبت ایفا کردند که این نقش در مورد سلنیت به مراتب بیشتر از سلنات تاثیر گذار بود. تفاوت در الگوی مقاومت و حذف در این باکتری شاید به میزان غلظت استفاده شده از اکسی آنیون ها در انجام آزمایش بر گردد؛ به دلیل مقاومت بالاتر باکتری ها در محیط جامد نسبت به محیط مایع، آن هم به علت غنی تر بودن محیط جامد و این که اجزای محیط می توانند با مادهٔ سمی ترکیب شده و تراکم موثر آن را کاهش دهند، غلظت بیشتری از سلنو اکسی آنیون ها در آزمایش تعیین مقاومت به تلوریت در محیط جامد به کار رفت که ممکن است سبب بالا رفتن غلظت کاتیون ها و بر هم

خوردن تعادل یونی شود، در حالی که این غلظت در آزمایش حذف تلوریت در محیط براث به مراتب کمتر بوده و توانست اثر مثبت بر حذف تلوریت داشته باشد. اما در عین حال نتایج حاصل از XRF برای گونه *P. aeruginosa* نشان می دهد که افزودن سلنیت به محیط حاوی تلوریت تغییر زیادی در میزان احیایی تلوریت به تلوریوم عنصری ایجاد نمی کند. لذا با توجه به بوی شدید سیر مانند که نشان دهندهٔ ایجاد ترکیب فرار متیله از تلوریت است، می توان نتیجه گرفت که سازوکار عمده در مقاومت به تلوریت در گونه *P. aeruginosa* علاوه بر احیای، متیلاسیون تلوریت می باشد و اگر آن چه که Basnayake و همکارانش(۹) در یافتند، مبنی بر یک سازوکار ترانس متیلاسیون و انتقال متیل از دی متیل سلنید به دی متیل تلورید برای تولید ترکیب متیله تلورید به گونه*P. aeruginosa* قابل تعمیم باشد، اثر مثبت سلنیت بر حذف تلوریت توجیه پذیر خواهد بود.

در مورد گونه نمک دوست نسبی *H. elongata* نیز فقط سلنو اکسی آنیون ها مخصوصاً سلنیت در غلظت ۵۰ میلی مولار کارایی حذف تلوریت را به شدت افزایش دادند. میزان غلظت بالای سلنو اکسی آنیون به کار رفته در این باکتری و اثر مثبتی که در حذف تلوریت بر جا می گذارد، در مقایسه با غلظت تأثیر گذار سلنو اکسی آنیون در *P. aeruginosa* که بسیارکمتر (۸ میلی مولار) بود، می تواند به خصوصیت نمک دوستی *H. elongata* بر گردد. با توجه به شواهد به دست آمده از میکروسکوپ الکترونی، مبنی بر احیایی برون سلولی سلنیم و درون سلولی تلوریم در این گونه، می توان این طور نتیجه گرفت که سلنیت باعث القای مسیری در موردی تولید آنزیم ردوکتازی می گردد که در نهایت سلنیت را به سلنیم احیایء می کند، و این آنزیم هر چه که باشد و هر کجا که تولید بشود، به صورت غیر اختصاصی باعث حذف و احیایی تلوریت نیز می شود. از آن جا که درکشت همزمان تلوریت با سلنیت میزان حذف تلوریت از تلوریت به تنهایی بیشتر بود، انتظار می رفت که در عکس های TEM در گونه *H. elongata* نیز ذرات چگال درون باکتری، یعنی تلوریم فلزی، به مراتب در این حالت بیشتر از کشت تلوریت به تنهایی باشد. اما برخلاف انتظار در عکس های TEM ذرات ریز و درشت در محیط بیرون سلول مشاهده می شد و ذرات چگال درون باکتری به میزان بسیار کمتری از کشت تلوریت به تنهایی، مشاهده می گردید. پس این فرضیه تقویت می شود که القای مسیر احیایی سلنیت که نتیجه آن القای مسیر ردوکتازی است، باعث احیایی غیر اختصاصی تلوریت توسط همان آنزیم می شود، و احیایی برون سلولی تلوریت نیز توسط سازوکار سلنیت ردوکتازی رخ می دهد. به بیان دیگر از میزان تلوریت وارد شده به سیتوپلاسم که منجر به آسیب زدن و اکسیداسیون گروه های سولفیدریل پروتئین ها و از کار افتادن و در نهایت مرگ سلول می شود، کاسته می شود. این موضوع با عکس TEM که وجود ذرات پراکنده فراوان در محیط و ذرات ریز و کوچک بسیار کم در درون باکتری را نشان می دهد تایید می شود.

در مورد گونه تحمل پذیر نمک *E. faecalis* ،این اثر مثبت را علاوه بر سلنو اکسی آنیو ن ها در مورد غلظت ۰/۱ میلی مولار ارسنات نیز می توان مشاهده کرد. این واقعیت را می توان با یافته های به دست آمده از کار Taylor و همکاران(۱۲) در سال ۱۹۹۲ منطبق دانست، آن جا که وی اظهار داشت سیستم مقاومتی به واسطهٔ پمپ ars علاوه بر ارسنات، ارسنیت و آنتیمونیت، می تواند پذیرای تلوریت بوده و به عنوان یک سازوکار برون ریز برای تلوریت عمل کند، لذا سیستم مقاومت به ارسنات که به واسطه پلاسمید کد می شود می تواند مقاومت به تلوریت را نیز موجب گردد.

همان طور که از تصاویر میکروسکوپ الکترونی TEM پیداست در مورد *P.aeruginosa* احیایی تلوریت و تشکیل کریستال های تلوریوم در ابتدا از سطح خارجی غشای پلاسمایی شروع ودر فضای پری پلاسمایی ادامه می یابد. وجود این کریستال ها در سیتوپلاسم سلول های *سودوموناس* در نتیجهٔ عملکرد یک اکسیدوردوکتاز متصل به سطح درونی غشای پلاسمایی می باشد. در مورد *E. faecalis* نیز گرانول های متراکم تلوریوم درون سیتوپلاسم نزدیک غشای پلاسمایی یعنی محل حضور آنزیم های اکسیدوردوکتاز، قابل رویت هستند. وجود این اجسام پر چگالی که گواه احیایی تلوریت و ایجاد تلوریوم

عنصری درون سلول هست، با نتایج تحلیلگر به روش XRF به طور کمی و دقیق و به طور کیفی از طیف عناصر موجود در نمونه مورد بررسی با میکروسکوپ الکترونی نگاره مجهز به تحلیلگر EDS تأیید گردید. علاوه بر این افزودن آب بروم به تودهٔ سلولی سیاه رشد یافته در محیط دارای تلوریت، منجر به اکسایش سریع ترکیب سیاه به بی رنگ شد؛ همان طور که قبلاً این خصوصیت برای تلوریوم متالیک عنوان شده بود(۱۳).

از مقایسهٔ رفتار سه گونه نمک دوست نسبی ، تحمل پذیر نمک و غیر نمک دوست از آن جا که تنها در گونه های نمک دوست *H. elongata* و تحمل پذیر نمک *E. faecalis* حضور اکسی آنیون های دیگر سبب افزایش مقاومت به تلوریت گردید که این مقاومت عمدتاً از طریق سازوکار احیای و ایجاد فرم عنصری تلوریوم بود، این گونه ها در مقایسه با گونه غیر نمک دوست *P. aeruginosa* کاندید بهتری برای حذف آلودگی تلوریت از محیط هستند.

منابع:

1- Fall,R., and Burton,G.A. 1987. High incidence of selenite-resistant bacteria from a site polluted with selenium. Appl.Environ.Microbiol. 53:185-188.

2- Turner, R.J.2001. Tellurite toxicity and resistance in Gram negative bacteria. Recent. Res. Dev. Microbiol. 5:69-77.

3- Rathgeber, C., and 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.

4- Oremland, R. S. 1994. Biogeochemical transformation of selenium in anoxic environments. Appl.Environ.Microbiol. 73:66-73.

5- Washington,J.A., and Sutter,V.L. 1980. Dilution susceptibility test: agar and macro-broth dilution procedures. In manual of clinical microbiology,3rd edn,ed.Lennette,E.H.,Balows,A.,Hausler,W.J.JR, Truant,J.P. p:453-458, American Society for microbiology,Washington, D.C.ISBN:1555812554.

6- Turner, R. J., and Weiner, J.H. 1992. Use of diethyldithiocarbamate for quantitative determination of tellurite uptake by bacteria. Anal. Biochem. 204: 292-295.

7- Reynolds,E.S. 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. J. Cell. Biol. 17:208-212.

8- Rouch, D. A., and N. L. Brown. 1997. Copper-inducible transcriptional regulation at two promoters in the *Escherichia coli* copper resistance determinant pco. Microbiology 143:1191-1202.

9- Basnayake, R.S. T., Bius, J.H., Akpolat, O. M., and Chasteen, T.G. 2001. Production of dimethyl telluride and elemental tellurium by bacteria amended with tellurite or tellurate. Appl. Organometal. Chem. 15: 499-510.

10- *Amoozegar, M.A., Schumann, P., **Hajighasemi, M., Fatemi, A. Z., and Karbalaei-Heidari, H. R.** 2008.* Salinicoccus iranensis *sp. nov., a*

novel moderate halophile. Int J Syst Evol Microbiol. 58: 178-183.

11- Ventosa, A., Nieto, J. J. and Oren, A. (1998). Biology of moderately halophilic aerobic bcteria. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62: 504-544.

12- Taylor, D. E., Turner, R. J., Hou, Y., Weiner, J. H. 1992. The arsenical ATPase efflux pump mediates tellurite resistance. J. Bacteriol. 174: 3092-3094.

13- Pearion, C. T. and P. E. Jablonski .1999. High level, intrinsic resistance of *Natronococcus occultus* to potassium tellurite. FEMS Microbiol. Lett. 174: 19.