جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

علوم و تکنولوژی محیط زیست ، دوره دهم، شماره یک، بهار ۸۷

جداسازی یک باکتری با مقاومت دو جانبه بسیار بالا نسبت به اکسی آنیون های سمی تلوریت و کرومات از پساب صنایع دارای کاربرد ویژه در پاک سازی زیستی، سویه KWT_2

محمدرضا ذوالفقاری

دانشجوی دکتری تخصصی میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی، بخش میکروبیولوژی

فریدون ملک زاده

استاد ، دانشگاه تهران، پردیس علوم، دانشکده زیست شناسی

محمدعلی آموزگار

استادیار ، دانشگاه تهران، پردیس علوم، دانشکده زیست شناسی

محمدرضا رضوی

استادیار، انستیتو پاستور ایران

تاریخ دریافت: ۸۶/۲/۲۰ تاریخ پذیرش: ۸۶/۶/۱۰

چکیده

اکسی‌آنیون های سمی تلوریت و کرومات به وفور در پساب های صنایعی مانند دباغی، آبه کاری، نساجی و ... دیده می شود که با حلالیت بالا وارد محیط زیست و آب های زیرزمینی می گردد. مواد یاد شده اثرات مخرب بر DNA و گروه های تیولی آنزیم ها داشته و با ایجاد نکروز کبدی، سرطان و ... اثرات زیان آوری بر سلامتی انسان و حیوانات دارد. میکروارگانیسم ها و بالاخص باکتری ها نقش بسیار مهمی در حذف زیستی فلزات داشته و در بیوتکنولوژی کاربرد دارند. هدف این مطالعه جداسازی باکتری های مقاوم از پساب صنایع، تعیین حداقل تراکم متوقف‌کننده رشد (Minimum Inhibitory Concentration = MIC) و بررسی احیای زیستی در سویه‌هایی با MIC بالا بود. از ۱۰۸ سویه جدا شده از پساب های صنعتی ایران، کوکسی گرم مثبت KWT_2 توانایی بالایی در حذف اکسی آنیون های سمی تلوریت و کرومات در محدوده وسیعی از عوامل مانند pH (۵/۵ تا ۱۰/۵)، دما (۲۵ تا ۴۰ درجه سانتی گراد)، دور همزن (rpm ۲۰۰ ـ ۱۵۰ ـ ۱۰۰ ـ ۵۰) و تراکم‌های مختلف اکسی‌آنیون های تلوریت پتاسیم و کرومات پتاسیم (۰/۰۴ تا ۱ میلی مولار) تحت شرایط هوازی نشان داد. بیشینه حذف تلوریت در pH ۷/۵، دمای ۳۵°C و دور ۱۵۰ و بیشینه حذف کرومات در pH ۸، دمای ۳۵°C و دور ۱۰۰ به دست آمد. ویژگی های مرفولوژیک، فیزیولوژیک، بیوشیمیایی و آنالیز فیلوژنتیکی بر مبنای 16S rDNA، نشان داد که سویه KWT_2 جزو

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

جنس میکروکوکاسه می باشد. با استفاده از تکنیک اسپکتروفتومتری با معرف های دی‌اتیل‌دی‌تیوکاربامات (λ_{max} 340) و دی‌فنیل‌کاربازید (λ_{max} 540) این باکتری در مقایسه با سایر باکتری ها در کمترین زمان بیشترین میزان حذف را نشان داد که این مساله با تکنیک XRD و اسپکتروسکوپی جذب اتمی تأیید گردید. سویه KWT_2 می تواند در مجامع بین المللی انتخاب مناسبی برای حذف اکسی آنیون های سمی تلوریت و کرومات از محیط زیست باشد.

واژه های کلیدی: پاک سازی زیستی، احیای کرومات، احیای تلوریت، مقاومت باکتریایی فلز، پساب صنایع

مقدمه

عناصر فلزی دسته‌ای از نعمات خدادادی است که به صورت گنجینه‌هایی در دل زمین به صورت پایدار و با ثبات جای گرفته است و انسان امروزی با استخراج معادن مربوطه و تخلیص فلزات یاد شده، از آن ها به عنوان حلقه‌های مفقود پیشرفت و توسعه استفاده می‌کند. در این میان به هنگام استخراج عناصر مختلف، دریایی از پساب های آلوده به محیط زیست سرازیر می‌شود که موجبات آلودگی زیست محیطی را فراهم می‌سازد. انباشت این عناصر در خاک و نفوذ آن ها به منابع آب های زیرزمینی می‌تواند صدای زنگی مرگبار را در گوشمان بنوازد، از سوی دیگر عناصر استخراج شده در صنایع مختلف به کار می‌رود و ایجاد پساب های سمی در این صنایع اجتناب ناپذیر است. با توجه به مطالب فوق، لزوم حذف این سموم بالقوه از محیط زیست نمایان می‌گردد و میکروارگانیسم ها با سازوکارهای مختلف و متنوعی می‌توانند در پاک سازی زیستی این ترکیبات نقش اصلی را به عهده داشته و آن ها را به ترکیبات غیر سمی و یا کمتر سمی تبدیل کنند که این عمل نه برای خوشایندی ما، بلکه به خاطر حفظ ارگانیسم میکربی از اثرات فلزات سمی صورت می‌گیرد (۱).

حضور این عناصر در غلظت های بیش از حد مجاز عوارض سوء متعددی هم برای انسان و هم برای حیوانات ایجاد کرده و آلودگی زیست محیطی را به همراه دارد (۲). عنصر کروم و ترکیبات حاوی آن به صورت Cr^{3+} معمولا سلامتی را به خطر نمی‌اندازد ولیکن به صورت Cr^{6+} می تواند سمی باشد. کروم از طریق پوستی، گوارشی و تنفسی جذب می‌شود. استنشاق ترکیبات شش ظرفیتی کروم در دراز مدت باعث سرطان ریه می شود. سرطان ریه در کارگرانی که در صنایع مرتبط با کروم مانند تهیه آلیاژهای کرومی، آبه کاری کروم، ترکیبات بازدارنده خوردگی، شیشه سازی، تهیه پیگمان، صنعت نساجی، صنایع چوب، عکاسی و دباغی کار می‌کنند بیشتر است (۳). در یک مطالعه دیگر نشان داده شد که شیوع سرطان ریه، ۱۵ بار در بین کارگرانی که در تماس با غبارهای کرومیت و اکسید کروم هستند، بیشتر است؛ لذا تمام ترکیبات کروم شش ظرفیتی سرطان زا محسوب می‌گردد. تماس مداوم با کروم از طریق پوست منجر به درماتیت، خشک شدن، اگزمای پوستی برگشت ناپذیر و زخم های پوستی می شود. در صورت هضم در مقادیر بالا، باعث زخم معده، التهاب مخاط دستگاه گوارشی، آسیب های کلیوی، نکروز کبدی و نهایتا مرگ می‌شود (۴).

همچنین تلوریت پتاسیم دارای اثرات حاد و مزمن بر روی انسان و حیوانات می باشد که از اثرات حاد آن تاثیر بر روی سیستم تنفسی، سیستم گوارشی، پوست و بیماری‌های چشمی و از اثرات مزمن آن آنورکسیا و درماتیتیس را می‌توان نام برد. از اثرات سمی حایز اهمیت تلوریت پتاسیم بر روی سلول ها، توقف سنتز آنزیم Squalene monooxygenase می‌باشد که مرحله دوم بیوسنتز کلسترول را کاتالیز می نماید که در نتیجه توقف سنتز این آنزیم، غلاف میلین سلول های عصبی شوان از بین می‌رود (۵). اگر چه کروم می‌تواند در چندین حالت اکسیداسیونی (۲ـ تا ۶+) وجود داشته باشد ولی پایدارترین و معمول ترین شکل های موجود در محیط، کروم شش ظرفیتی (Cr VI) و سه ظرفیتی (Cr III) می باشد که کروم شش ظرفیتی سمی‌ترین شکل کروم بوده و با اکسیژن به صورت کرومات (CrO_4^{2-})، دی‌کرومات ($Cr_2O_7^{2-}$) و بی‌کرومات ($HCrO_4^-$) در می‌آید (۶). عنصر تلوریوم نیز دارای

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

دو اکسی‌آنیون سمی تلوریت (TeO_3^{2-}) و تلورات (TeO_4^{2-}) می باشد، به نحوی که سمیت تلوریت نسبت به تلورات به مراتب بالاتر می باشد که این امر به دلیل حلالیت بسیار بالای تلوریت است (۸،۷). اکسی‌آنیون های سمی کرومات و تلوریت با اکسیداسیون گروه های تیولی آنزیم‌های مختلف سلولی، جانشینی با گروه های سولفورآمینواسیدها، القای موتاسیون و غیره اثرات زیان باری را به دنبال دارد (۹).

با توجه به این که اکسی‌آنیون های سمی کرومات و تلوریت اثرات زیست محیطی فراوانی دارد، لذا وجود باکتری های مقاوم به این اکسی‌آنیون ها که قادر به حذف آن ها از محیط باشند، می‌تواند کمک شایانی در سم زدایی محیط زیست از این ترکیبات سمی و جلوگیری از اثرات سمی شدید آن ها بر موجودات زنده داشته باشد. احیای آنزیماتیک، افزایش دفع و کاهش جذب اکسی‌آنیون و رسوبدهی خارج سلولی از جمله ساز و کار های مقاومت باکتری ها در مقابل این اکسی‌آنیون های سمی می‌باشد که احیای آنزیماتیک Cr^{6+} به Cr^{3+} و تلوریت به تلوریوم عنصری (Te^{o}) از جمله مهم ترین ساز و کار ها است (۱۰، ۱۱و ۱۲).

مواد و روش کار

جداسازی و کشت

در این پژوهش، ۱۰۸ باکتری مقاوم از پساب های صنعتی نساجی کاشان، آهن‌گالوانیزه‌کاشان، ایران مرینوس قم، آبه کاری قم، خرمشهر، مشهد و ورامین جدا گردید. نمونه برداری از پساب های صنعتی با استفاده از ظروف مخصوص نمونه برداری شیشه‌ای ۲۵۰ میلی لیتری استریل صورت گرفت و دقت شد که حدود ۳ سانتی متر از بالای بطری خالی بماند تا در هنگام شروع آزمایش بتوان به راحتی نمونه را کاملا به هم زد تا نمونه یکنواخت شود. جهت هر نمونه تاریخ برداشت، دمای محل، pH محل نمونه برداری و نوع نمونه روی برچسبی که بر سطح شیشه نصب گردیده بود نوشته شد. نمونه‌های جمع آوری شده فورا به آزمایشگاه منتقل گردید تا مراحل مختلف کار روی آن ها انجام گیرد. از هر نمونه پساب صنعتی هموژن شده ۱ میلی لیتر در شرایط کاملا استریل برداشته شد و رقت های متوالی 10^{-1}تا 10^{-6} در لوله های آزمایش حاوی ۹ میلی لیتر بافر P.B.S (Phosphate Buffer Saline) استریل با ۷/۲pH تهیه گردید. از روش Spread plate جهت بازیافت جمعیت میکروبی استفاده شد و برای تفکیک انواع کلنی های موجود در پلیت ها، از یک روش خالص سازی تحت عنوان Streak plate method استفاده شد. در این روش، از کلنی تشکیل شده در سطح محیط نوترینت اگار برداشت شده و در لوله کوچک حاوی ۱ میلی لیتر سرم فیزیولـــوژی استـریل سوسپانسیون می گردد. سپس لوپ را داخل سوسپانسیون نموده و از آن بر روی پلیت به صورت مارپیچ کشت داده می شود، به طوری که مارپیچ های نزدیک به هم نصف پلیت را گرفته و سپس از طرف دیگر پلیت، لوپ را با مارپیچ با فاصله به وسط پلیت حرکت می‌دهیم. در این روش در حین عبور لوپ، همراه با رقیق شدن سوسپانسیون، کلنی‌های مختلف به طور مداوم از یکدیگر جدا می‌شوند و سپس کلنی‌های به دست آمده، جداگانه بر روی پلیت های جدید کشت داده می شود (۱۳).

بررسی ویژگی های فیزیولوژیک و ریخت شناسی

مورفولوژی کلنی بر روی محیط نوترینت اگار در دمای°C ۳۴ (pH ۷/۲) بعد از ۴۸ ساعت مشاهده شد. واکنش گرم، حرکت، شکل و رنگ کلنی، کاتالاز، اوره آز، اکسیداز، احیای نیترات، ئیدرولیز اسکولین، توئین ۲۰ و توئین ۸۰ و متیل رد، وژرپروسکوئر و تولید اندول بر اساس روش های Smibert و Krieg (۱۹۹۴) انجام گرفت(۱۴). تولید اسید از کربوهیدرات ها، بررسی مصرف منابع کربنی و منابع نیتروژنی بر اساس روش و محیط توصیه شده Ventosa و همکاران (۱۹۸۲) تعیین گردید(۱۵). تحمل نمک سدیم کلراید در حضور تراکم صفر تا ۳۰٪ در دمای ۳۴ درجه سانتی گراد و pH ۷/۲ و rpm ۱۴۰ در محیط نوترینت براث مورد سنجش قرار گرفت. رشد در دماهای ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵، ۳۰، ۳۵، ۴۰، ۴۵ و ۵۰ در محیط نوترینت براث با pH ۷/۲ مورد بررسی قرار گرفت. محدوده pH برای رشد با تنظیم pH نهایی محیط بین ۵ تا ۱۱ در دمای ۳۴ درجه سانتی گراد و rpm ۱۴۰ تعیین شد. برای تنظیم pH محیط از بافر Mixed استفاده گردید.

تعیین توالی 16S rRNA سویه برتر KWT_2

جهت تعیین هویت دقیق سویه برتر KWT_2 جدا شده از پساب نساجی کاشان، روش تعیین توالی 16S rRNA انجام پذیرفت. برای تخلیص DNA ژنومی باکتری جدا شده از پساب نساجی کاشان از کیت شرکت Amersham Biosciences (Genomic Prep™ Cells and Tissue DNA Isolation Kit) کشور انگلستان استفاده شد. تکثیر ژن 16S rRNA سویهKWT_2 با استفاده از پرایمرهای یونیورسال 8F (5' AGAGTTTGATCATGGC3') و 1492R (5' TACCTTTTGTTACGACTT3') صورت گرفت. دناتوراسیون آغازی در دمای°C ۹۴ ، مدت ۴ دقیقه برای یک سیکل، دناتوراسیون در دمای°C ۹۴، مدت ۴۵ ثانیه برای ۳۰ سیکل، Annealing در دمای °C ۵۲، مدت ۱ دقیقه برای ۳۰ سیکل، Extension در دمای°C ۷۲ ، مدت ۲ دقیقه برای ۳۰ سیکل، Final extension در دمای°C ۷۲ ، مدت ۱۰ دقیقه برای یک سیکل و Final hold در دمای °C ۱۰ در برنامه PCR گنجانده شد. جهت اطمینان از تکثیر قطعه مورد نظر که اندازه تقریبی آن حدود ۱۴۵۰bp می باشد، µl ۵ از محصول PCR با استفاده از ژل اگاروز ۱٪ و در کنار استاندارد وزن مولکولی (مارکر XIV) الکتروفورز گردید. بعد از خاتمه الکتروفورز ژل را روی دستگاه ترانس‌لومیناتور قرار داده و قسمتی که حاوی باند مورد نظر است با تیغ جدا می کنیم و جهت تعیین توالی (Sequencing) به آزمایشگاه Seq lab در کشور آلمان ارسال گردید.

بررسی مقاومت به اکسی‌آنیون های سمی تلوریت و کرومات

برای سنجش مقاومت سویه‌های باکتریایی جدا شده از پساب های صنعتی، الگوی مقاومت بر اساس MIC با غلظت های ۰/۱ تا ۲۶ میلی‌مولار تلوریت پتاسیم و ۵ تا ۷۶۰ میلی مولار کرومات پتاسیم با روش رقت در اگار (Agar Dilution method) در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد، زمان یک هفته در محیط نوترینت اگار با pH ۷/۲ صورت گرفت. پایین‌ترین تراکم از اکسی‌آنیون که کاملا مانع رشد باکتری می‌گردید MIC نامیده شد(۱۶).

ارزیابی میزان حذف تلوریت پتاسیم و کرومات پتاسیم

به منظور تعیین میزان حذف تلوریت و کرومات از محیط کشت سویه برتر KWT_2 از روش کالریمتریک (Spectrophotometric measurements) به کمک معرف های اختصاصی DDTC و DPC استفاده شد. تلوریت موجود در محیط کشت با معرف DDTC واکنش داده و محلول کلوئیدی زردرنگ تشکیل می شود که جذب (Absorbance) این محلول کلوئیدی در طول موج ۳۴۰ نانومتر قابل اندازه‌گیری است در حالی که کروم VI موجود در محیط کشت با معرف DPC در محلول اسیدی واحد اسیدسولفوریک ۳ مولار، واکنش داده و رنگ بنفش ظاهر می شود که جذب این محلول در طول موج ۵۴۰ نانومتر قابل اندازه‌گیری است(۱۷).

اثر عواملی مختلف برحذف تلوریت پتاسیم و کرومات پتاسیم

به منظور بهینه سازی شرایط جهت رشد و حذف موثر تلوریت پتاسیم و کرومات پتاسیم در شرایط هوازی از محیط کشت سویه برترKWT_2، تاثیر دماهای مختلف (۴۰ ـ ۳۵ ـ ۳۰ ـ ۲۵ درجه سانتی گراد)، pHهای مختلف (۵/۵ تا ۱۰/۵) و دورهمزن مختلف (۲۰۰rpm ـ ۱۵۰ ـ ۱۰۰ ـ ۵۰) مورد بررسی قرار گرفت.

سنجش احیای کرومات و تلوریت با استفاده از تکنیک جذب اتمی (AAS، Atomic Absorption Spectroscopy) و پراش اشعه X (XRD ، X-Ray Diffraction)

به منظور سنجش احیای کروم VI به کروم III و تلوریت به تلوریوم عنصری توسط سویه برتر KWT_2 ، از محیط کشت نوترینت براث با ترکیب زیر استفاده شد.

Nutrient Broth 8g ; NaCl 10g ; K_2CrO_4 0.3 mM; K_2TeO_3 0.3 mM, D.W 1000ml

pH محیط کشت در زمان سنجش احیای کروم VI، ۸ و در زمان سنجش احیای تلوریت ۷/۵ تنظیم گردید. تکنیک AAS جهت سنجش احیای کرومات و پراش اشعه X جهت تجزیه کیفی احیای تلوریت مورد استفاده قرار گرفت.

نتایج

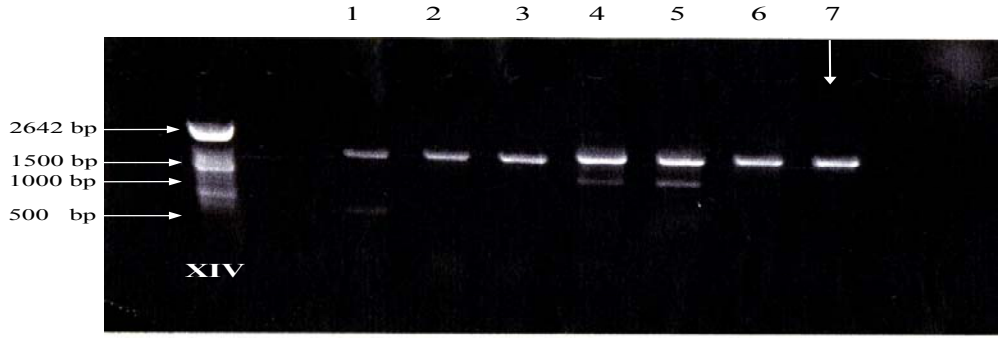
از مجموع ۱۰۸ باکتری مقاوم جدا شده از پساب های صنعتی، سویه KWT_2 جدا شده از پساب نساجی کاشان به دلیل مقاومت بسیار بالای ۲۶ میلی‌مولاری به تلوریت پتاسیم و ۷۶۰ میلی‌مولاری به کرومات پتاسیم که همراه با احیای Cr(VI) به Cr(III) و تلوریت به تلوریوم عنصری و ایجاد کریستال‌های عنصری سیاه در داخل سلول باکتری بود به عنوان سویه برتر انتخاب شد و از نظر صفات فنوتیپی، بیوشیمیایی و متابولیسمی مورد بررسی قرار گرفت که نتایج به طور خلاصه در جدول شماره ۱ آورده شده است.

جدول ۱ ـ صفات فنوتیپی، بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی سویه KWT_2

Characteristic	Strain KWT_2	Characteristic	Strain KWT_2	Characteristic	Strain KWT_2
Diameter of cells (µm)	0.8 – 1.0	Phenylalanine deaminase	-	Fructose	+
Cell type	Coccus	Lysine decarboxylase	-	Xylose	-
Gram staining	+	Urease	+	L – Arabinose	+
KOH test	-	Lecithinase	-	Mannitol	-
Form	Circular	DNase	-	Maltose	+
Margin	Entire	Acid production from:		D – Sorbitol	+
Elevation	Convex	D – Glucose	+	Trehalose	-
Texture	Butyrus	Galactose	-	Inositol	+
Opacity	Opaque	Lactose	-	Rafinose	-
Pigmentation	Yellow	D – Manose	+	L – Rhamnose	+
Diameter > 5 mm	-	Ribose	-	Cellubiose	+
Gatalase	+	Salicin	-	Esculin	+
Oxidase	-	Sucrose	+	Inulin	+
Motility	-	Fructose	+	Succinate	-
Nitrate reduction	-	Xylose	-	Use of Aminoacid:	
H_2S production	-	L – Arabinose	-	L – Methionin	+
Mr	-	Mannitol	-	L – Arginin	-
Vp	-	Maltose	+	L – Histidin	+
Indole	+	D – Sorbitol	-	L – Threonin	+
NaCl for growth (%):		Trehalose	+	L – Asparagine	+
Range	% 0 – 3	Inositol	-	L – Valin	-
Optimum	% 1	Rafinose	-	L – Phenylalanine	+
pH for growth:		L – Rhamnose	-	L – Prolin	+
Range	5 – 11	Cellubiose	-	L – Glysin	+
Optimum	7 – 8	Melibiose	-	L – Leucin	-
Temperature for growth(°C):		Rebitol	-	L – Alanin	-
Range	20 – 40	Inulin	-	L – Glutamic acid	-
Optimum	30 – 37	Use of carbohydrate:		L – Isoleucin	-
Hydrolysis of:		D – Glucose	+	L – Aspartat	-
Tween 80	+	Galactose	+	L – Tryptophan	-
Gelatin	-	Lactose	+	L – Serin	-
Esculin	+	D – Manose	+	L – Lysine	-
Starch	-	Ribose	-	L – Tyrosin	+
Casein	+	Salicin	-		
Enzymatic activity :		Sucrose	+		

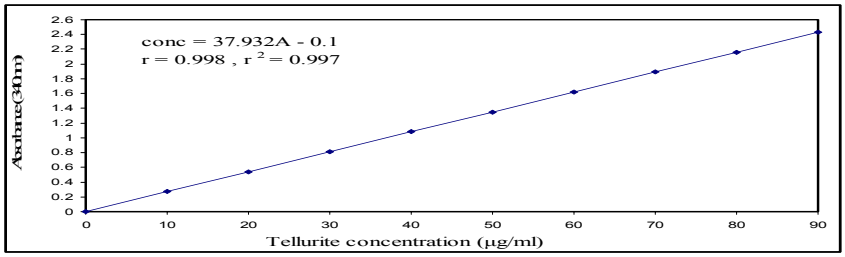
+ positive , - negative

در ادامه جهت شناسایی و تعیین هویت دقیق‌تر سویه KWT_2، اقدام به تعیین توالی ژن 16S rRNA باکتری فوق نمودیم. همان طور که در شکل ۱ مشاهده می شود محصول PCR مناسب در منطقه 1.5 kb ظهور کرده است که نشان دهنده میزان خلوص نمونه DNA مورد استفاده جهت تعیین توالی است. بعد از مشخص شدن توالی ژن rDNA سویه مورد نظر، آن را در برنامه کامپیوتری BLAST قرار داده و سپس با استفاده از سایت اینترنتی NCBI، باکتری مورد نظر تعیین هویت گردید و در جنس Kocuria قرار گرفت.

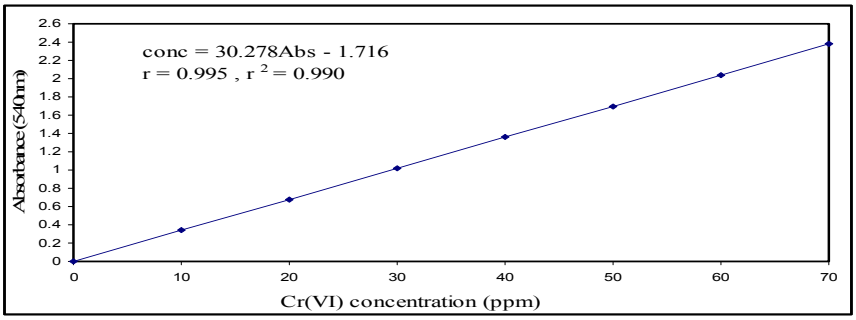


شکل ۱ ـ ظهور باند منـفرد در منـطـقه 1.5 kb مارکر شـماره XIV

به منظور بررسی میزان حذف تلوریت و کرومات از محیط کشت سویهKWT_2 و اثر عوامل محیطی مختلف بر حذف آن ها، ابتدا منحنی استاندارد تلوریت پتاسیم و کرومات پتاسیم ترسیم گردید که نتایج در شکل های ۲ و ۳ نشان داده شده است.

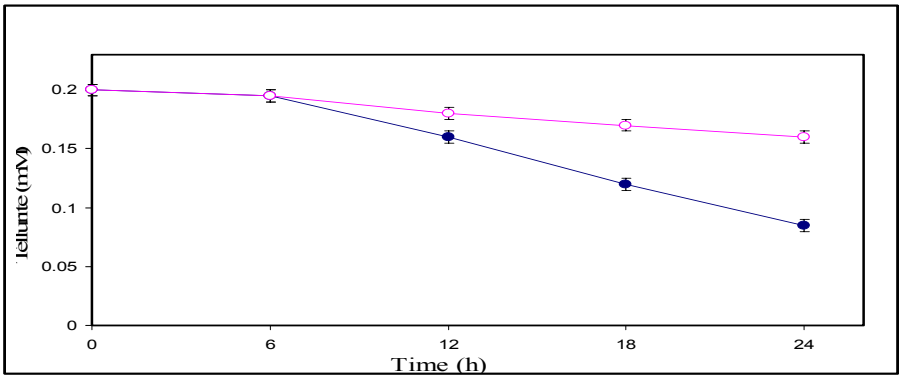


شکل ۲ ـ منحنی استاندارد سنجش تلوریت با استفاده از معرف شیمیایی DDTC و بافر Tris. HCl (pH 7.3)

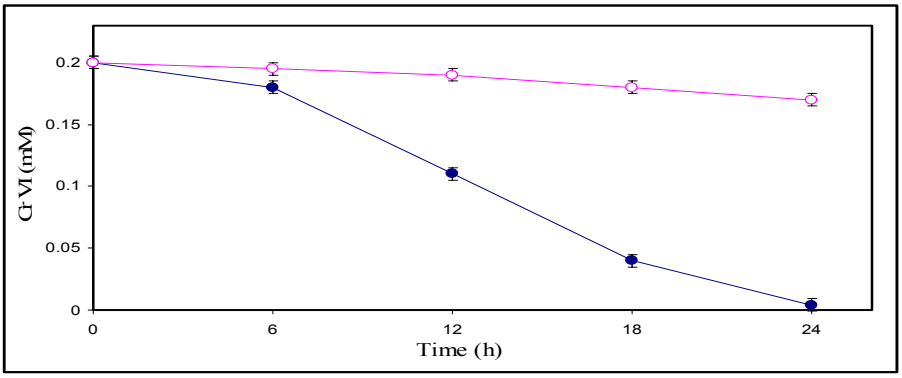


شکل ۳ـ منحنـی استـاندارد سنجش کـرومات با استفاده از معرف شیمیایی DPC و بافر Mops – NaOH (pH 7.3)

بعد از گذشت ۲۴ ساعت درصد حذف تلوریت و کرومات در سویه های جدا شده از پساب صنایع متفاوت بود به طوری که سویه برتر KWT_2 قادر بود ۵۷/۵۱ ٪ تلوریت موجود در محیط را در ۲۴ ساعت حذف کند و غلظت تلوریت را از ۰/۲ میلی مولار به ۰/۰۸۵ میلی مولار برساند (شکل ۴) و همچنین ۹۷/۸۷٪ کروم VI موجود در محیط را در ۲۴ ساعت حذف کند و غلظت کروم VI را از ۰/۲ میلی مولار به ۰/۰۰۴ میلی مولار برساند (شکل ۵).

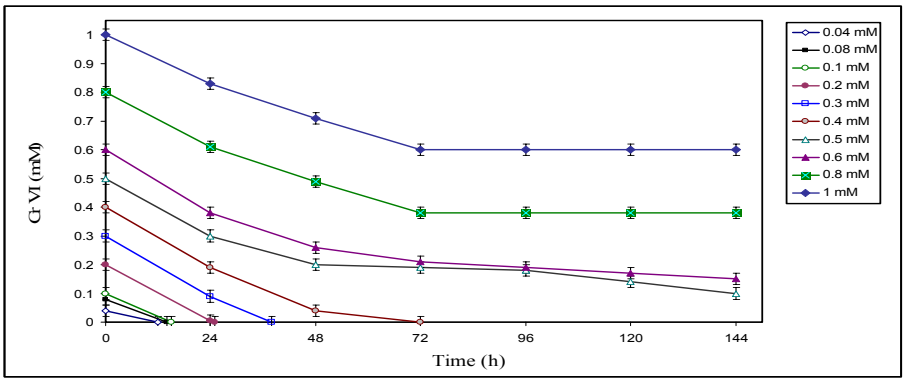


شکل ۴ ـ کاهش تلوریت در مایع رویی کشت سویه KWT_2 در محیط نوترینت براث دارای ۱٪ سدیم کلراید و ۰/۲ میلی‌مولار تلوریت پتاسیم (دایره‌های پر).کاهش تلوریت در مایع رویی محیط نوترینت براث دارای ۱٪ سدیم کلراید و ۰/۲ میلی‌مولار تلوریت پتاسیم و فاقد باکتری (دایره‌های خالی). (rpm = 150, pH 7.5) نتایج ارایه شده میانگین سه بارآزمایش بوده و بار معرف ۱± انحراف معیار می‌باشد.

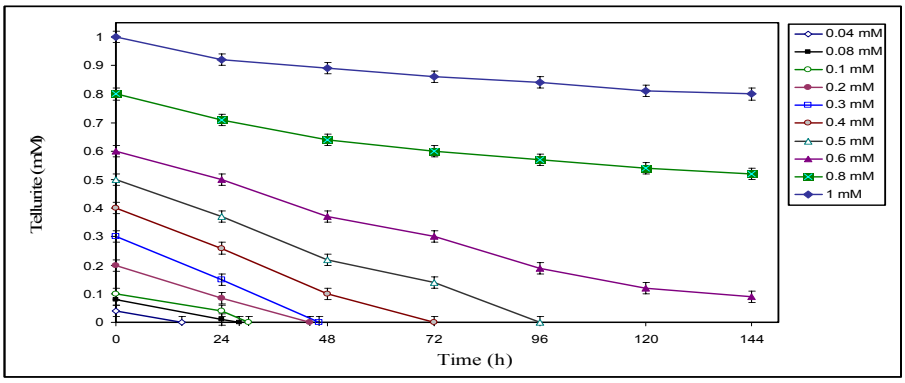


شکل ۵ ـ کاهش کروم VI در مایع رویی کشت سویه KWT_2 در محیط نوترینت براث دارای ۱٪ سدیم کلراید و ۰/۲ میلی‌مولار کرومات پتاسیم (دایره‌های پر). کاهش کروم VI در مایع رویی محیط نوترینت براث دارای ۱٪ سدیم کلراید و ۰/۲ میلی‌مولار کرومات پتاسیم و فاقد باکتری (دایره‌های خالی). (rpm = 100, pH 8) نتایج ارایه شده میانگین سه بار آزمایش بوده و بار معرف ۱± انحراف معیار می‌باشد.

شکل های ۶ و ۷ 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 کرومات پتاسیم و تلوریت پتاسیم را بر میزان حذف آن ها توسط سویه برترKWT_2 در محیط پایه نوترینت براث دارای ۱٪ نمک کلرید سدیم نشان می‌دهد.



شکل ۶ ـ اثر غلظت‌های اولیه کرومات پتاسیم بر روی حذف آن توسط سویه KWT_2 در محیط پایه نوترینت براث دارای ۱٪ سدیم کلراید (rpm = 100, pH 8). نتایج ارایه شده میانگین سه بار آزمایش بوده و بار معرف ۱± انحراف معیار می‌باشد.



شکل ۷ ـ اثر غلظت‌های اولیه تلوریت پتاسیم بر روی حذف آن توسط سویه KWT_2 در محیط پایه نوترینت براث دارای ۱٪ سدیم کلراید (rpm = 150, pH 7.5). نتایج ارایه شده میانگین سه بار آزمایش بوده و بار معرف ۱± انحراف معیار می‌باشد.

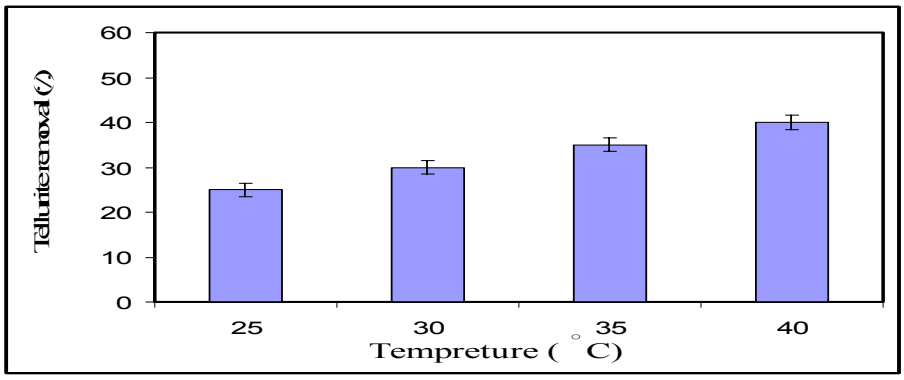
حذف کامل کرومات در غلظت های پایین‌تر از ۰/۴ میلی‌مولار بعد از ۷۲ ساعت رخ داد که سرعت حذف بستگی به غلظت اولیه کروم VI داشت، به طوری که حذف کامل ۰/۰۴ میلی‌مولار بعد از ۱۲ ساعت، حذف کامل ۰/۰۸ میلی‌مولار بعد از ۱۴ ساعت، حذف کامل ۰/۱ میلی‌مولار بعد از ۱۵ ساعت، حذف کامل ۰/۲ میلی‌مولار بعد از ۲۵ ساعت، حذف کامل ۰/۳ میلی‌مولار بعد از۳۸ ساعت و حذف کامل ۰/۴ میلی‌مولار بعد از ۷۲ ساعت اتفاق افتاد. میزان حذف کرومات در غلظت های بالاتر از ۰/۴ میلی‌مولار کم شده به طوری که بعد از ۱۴۴ ساعت، غلظت ۰/۶ میلی‌مولار به ۰/۱۵ میلی‌مولار (۷۵٪ حذف شده)، غلظت ۰/۸ میلی‌مولار به ۰/۳۸ میلی‌مولار (۵۲/۵٪ حذف شده) و غلظت ۱ میلی‌مولار به ۰/۶۰ میلی‌مولار (۴۰٪ حذف شده) کاهش یافت.

حذف کامل تلوریت در غلظت های مختلف متفاوت بود به نحوی که سویه KWT_2 غلظت ۰/۵ میلی‌مولار را بعد از ۹۶ ساعت به صفر رساند. میزان حذف تلوریت در غلظت های بالاتر کم شده به طوری که بعد از ۱۴۴ ساعت توسط سویه KWT_2 غلظت ۰/۶ میلی‌مولار به ۰/۰۹ میلی‌مولار (۸۵٪ حذف شده)، غلظت ۰/۸ میلی‌مولار به ۰/۵۲ میلی‌مولار (۳۵٪ حذف شده) و غلظت ۱ میلی‌مولار به ۰/۸۰ میلی‌مولار (۲۰٪ حذف شده) کاهش یافت.

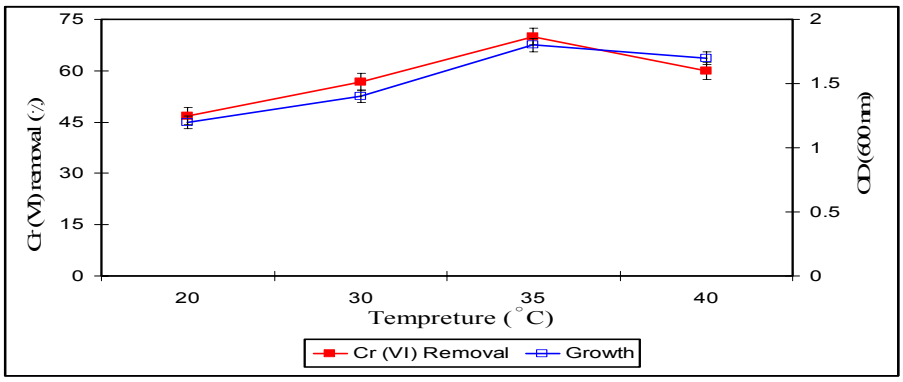
با هدف یک روش بیولوژیکی مناسب جهت حذف موثر تلوریت و کرومات از محیط کشت باکتریایی، اثر پارامترهای مختلف (دما ـ pH ـ هوادهی) که ممکن است در شرایط آزمایشگاهی و یا در پساب های آلوده به این اکسی‌آنیون ها و

مناطق دیگر بر حذف آن ها تاثیرگذار باشند روی سویه برتر KWT_2 مورد ارزیابی قرار گرفت.

همان طور که در شکل ۸ مشاهده می شود بیشترین میزان حذف تلوریت پتاسیم در دمای $35\ ^{\circ}C$ بود به گونه‌ای که با افزایش و یا کاهش دما نسبت به دمای بهینه، میزان حذف تلوریت نیز کاهش یافته است. حذف کامل تلوریت در دمای بهینه فوق بعد از ۴۶ ساعت اتفاق افتاد. همچنین با بررسی شکل ۹ مشخص می شود بیشترین میزان حذف کرومات پتاسیم در دمای $35\ ^{\circ}C$ بوده است، به نحوی که حذف کامل کرومات در دمای فوق بعد از ۳۸ ساعت تحقق یافت که بـــه نظر می رسد تحت این شرایط، دمای بهینه برای حذف کرومات و رشد سلولی باشد.

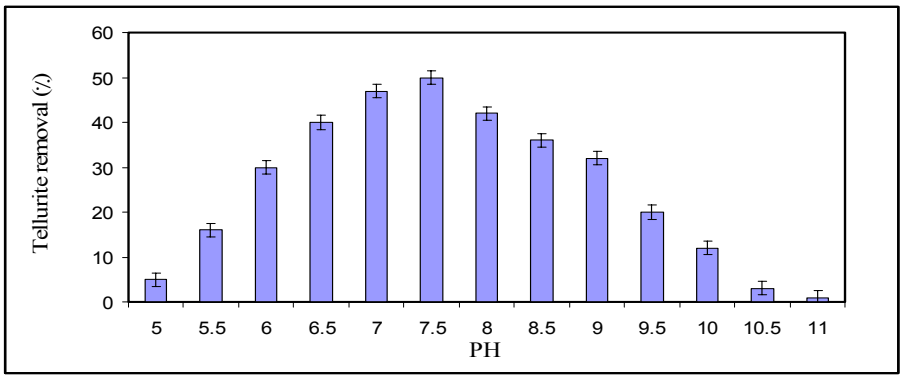


شکل ۸ ـ اثر دما در حذف تلوریت پتاسیم توسط سویه KWT_2 در محیط پایه نوترینت براث دارای ۱٪ سدیم کلراید و ۰/۳ میلی‌مولار تلوریت پتاسیم بعد از ۲۴ ساعت (rpm = 150, pH 7.5). نتایج ارایه شده میانگین سه بار آزمایش بوده و بار معرف ±۱ انحراف معیار می‌باشد.

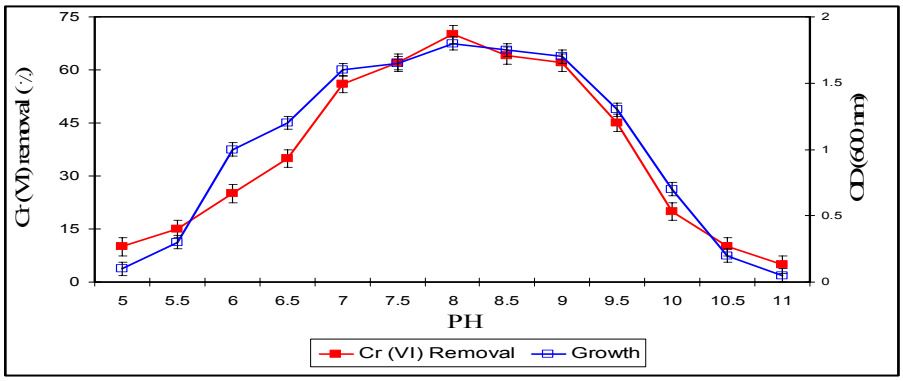


شکل ۹ـ اثر دما روی رشد (مربع‌های سفید) و حذف (مربع‌های تیره) کرومات پتاسیم توسط سویه KWT_2 در محیط پایه نوترینت براث دارای ۱٪ سدیم کلراید و ۰/۳ میلی‌مولار تلوریت پتاسیم بعد از ۲۴ ساعت (rpm = 100, pH 8). نتایج ارایه شده میانگین سه بار آزمایش بوده و بار معرف ±۱ انحراف معیار می‌باشد.

همان طور که در شکل های ۱۰ و ۱۱ مشاهده می‌شود سویه KWT_2 قادر به رشد در محدوده وسیعی از pH بین ۵ تا ۱۱ بوده و اثر pH در درصد حذف اکسی‌آنیون های سمی تلوریت و کرومات بسیار موثر می‌باشد. بیشترین میزان حذف تلوریت در pH برابر ۷/۵ و همچنین بیشینه رشد و حذف کرومات در pH برابر ۸ مشاهده گردید.

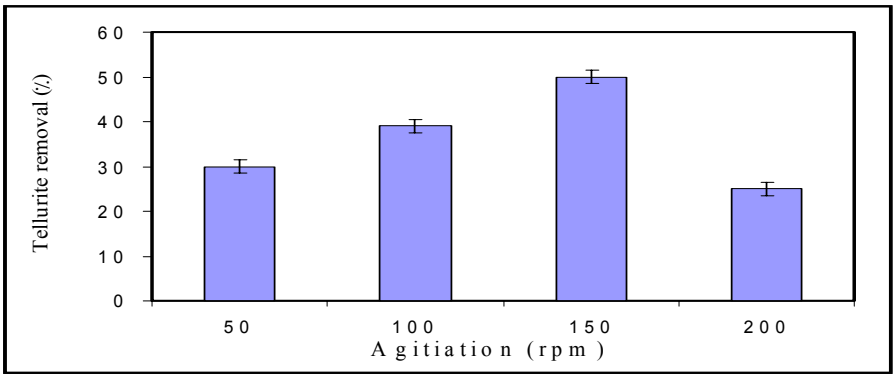


شکل ۱۰ـ اثر pH روی حذف تلوریت پتاسیم توسط سویه KWT_2 در محیط پایه نوترینت براث دارای ۱٪ سدیم کلراید و ۰/۳ میلی‌مولار تلوریت پتاسیم بعد از ۲۴ ساعت (rpm = 150, T = 35 °C). نتایج ارایه شده میانگین سه بار آزمایش بوده و بار معرف ±۱ انحراف معیار می‌باشد.

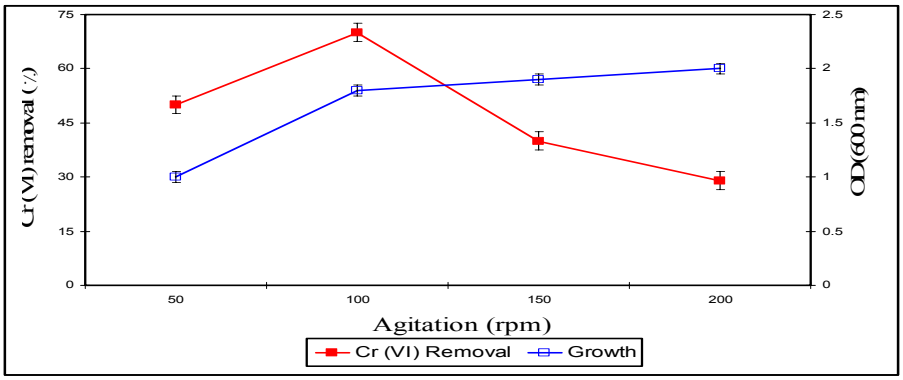


شکل ۱۱ـ اثر pH روی رشد (مربع‌های سفید) و حذف (مربع‌های تیره) کرومات پتاسیم توسط سویه KWT_2 در محیط پایه نوترینت براث دارای ۱٪ سدیم کلراید و ۰/۳ میلی‌مولار کرومات پتاسیم بعد از ۲۴ ساعت(rpm=100, T=35°C). نتایج ارایه شده میانگین سه بار آزمایش بوده و بار معرف ±۱ انحراف معیار می‌باشد.

برای بررسی میزان هوادهی از دورهای ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ rpm استفاده گردید. همان طور که در شکل ۱۲ مشاهده می‌شود بیشترین میزان حذف تلوریت در ۱۵۰ rpm مشاهده می‌شود که ۵۰٪ تلوریت در طی ۲۴ ساعت انکوباسیون حذف شده است. همچنین با بررسی شکل ۱۳ مشخص می شود با افزایش دورهمزن، رشد باکتری افزایش یافته ولی بیشترین میزان حذف کرومات پتاسیم در ۱۰۰ rpm مشاهده شد.



شکل ۱۲ـ اثرات دور همزن بر حذف تلوریت پتاسیم توسط سویه KWT_2 در محیط پایه نوترینت براث دارای ۱٪ سدیم کلراید و ۰/۳ میلی‌مولار تلوریت پتاسیم بعد از ۲۴ ساعت ($T = 35\ ^oC$, pH 7.5). نتایج ارایه شده میانگین سه بار آزمایش بوده و بار معرف ۱± انحراف معیار می‌باشد.



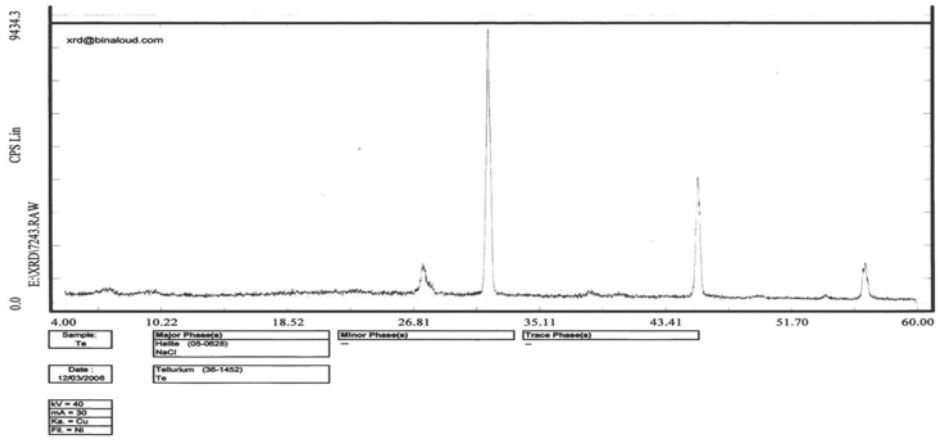
شکل ۱۳ـ اثرات دورهمزن بر رشد (مربع‌های سفید) و حذف (مربع‌های تیره) کرومات پتاسیم توسط سویه KWT_2 در محیط پایه نوترینت براث دارای ۱٪ سدیم کلراید و ۰/۳ میلی‌مولار کرومات پتاسیم بعد از ۲۴ ساعت ($T = 35^oC$, pH 8). نتایج ارایه شده میانگین سه بار آزمایش بوده و بار معرف ۱± انحراف معیار می‌باشد.

در ادامه با استفاده از تکنیک جذب اتمی، کل کروم (Cr VI + Cr III) موجود در محیط کشت سویه KWT_2 را که حاوی غلظت های ۰/۱۵ ، ۰/۲، ۰/۲۵ و ۰/۳ میلی‌مولار کروم شش ظرفیتی بود، به طور جداگانه به دست آوردیم که نتایج در جدول ۲ آورده شده است.

جدول ۲ ـ ارزیابی میزان کروم III حاصل از احیای کروم VI با استفاده از روش اسپکتروفتومتری با معرف DPC و اسپکتروسکپی جذب اتمی (A.A.S)

مقدار کروم III حاصل از احیای کروم VI (Cr III = Total Cr – Cr VI) (mM)	مقدار کل کروم مشخص شده با تکنیک جذب اتمی بعد از هضم اسیدی و ۲۴ ساعت انکوباسیون (mM)	مقدار کروم VI باقیمانده مشخص شده با معرف DPC بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون (mM)	نمونه (mM)
۰/۱۳	**۰/۱۳**	۰	۰/۱۵
۰۰/۱۶۶	**۰/۱۷**	**۰/۰۰۴**	۰/۲۰
۰/۱۸	**۰/۲۱**	**۰/۰۳**	۰/۲۵
۰/۱۶	۰/۲۵	۰/۰۹	۰/۳۰

همچنین از آنالیز به روش XRD، به منظور تشخیص و تایید ذرات تلوریوم عنصری حاصل از احیای ۰/۳ میلی‌مولار تلوریت پتاسیم توسط سویه برتر KWT_2 درمحیط پایه نوترینت براث (pH ۷/۵) بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون (۱۵۰ = rpm ، T= ۳۵ °C) استفاده گردیده که نتایج در شکل ۱۴ نشان داده شده است.



شکل ۱۴ـ تأیید ذرات عنصری تلوریوم با استفاده از آنالیز به روش XRD در نمونه حاوی ۰/۳ میلی‌مولار تلوریت پتاسیم

بحث

عصر تکنولوژی با همه ره‌آوردهایی که برای زندگی داشته، در عین حال انواع آلودگی های فیزیکی، شیمیایی، بیولوژیکی و رادیو اکتیویته ناشی از فلزات سنگین را به طور گسترده به همراه آورده است. تکنولوژی های صنعتی مانند تعویض یون (Ion exchange)، رسوب دهی شیمیایی (Chemical precipitation)، اسمز معکوس (Reverse osmosis)، فرآیند تبخیر (Volatilization) و غیره اغلب نامناسب و خیلی پرهزینه است، لذا توسعه روش های جدید ارزان مانند احیای بیولوژیک فلزات سنگین احساس می‌شود (۱۸). توانایی جذب فلزات سنگین و سمی توسط میکروارگانیسم ها منجر به توجه خاص پژوهشگران به مطالعه انواع قارچ ها، مخمرها، جلبک ها و باکتری های مختلف درجهت جذب آن ها و به دنبال آن حذف این فلزات از محیط زیست به خصوص پساب کارخانجات صنعتی، رودخانه‌ها و فاضلاب های آلوده به

این گونه فلزات گردیده است که به آن پاک سازی زیستی (Bioremediation) می گویند. اکسی‌آنیون های سمی تلوریت و کرومات از عناصر سمی است که به طرق مختلف وارد محیط زیست شده و سیستم های بیولوژیکی، بالاخص انسان، حیوانات و گیاهان زیان آور است، لذا حذف آن ها از محیط زیست حایز اهمیت و ضروری است (۱۹).

در این پژوهش ما برای اولین بار مقاومت بسیار بالای ۲۶ میلی مولاری نسبت به تلوریت و ۷۶۰ میلی مولاری نسبت به کرومات را در kocuria sp. strain KWT_2 جدا شده از پساب نساجی کاشان را گزارش کردیم. MIC ۲۶ میلی مولاری (۶۶۸۴ μg/ml) نسبت به تلوریت، ۵/۵ تا ۸ برابر MIC گزارش شده توسط Moore و Kaplan (۱۲۰۰ μg/ml ـ ۸۰۰) در مورد Rhodobacter sphaeroides، Rhodobacter capsulatus و ۲/۱۵ برابر MIC گزارش شده توسط Amoozegar و Malekzadeh (۱۲ mM & ۳۰۸۵μg/ml) در مورد Salinococcus sp . strain QW_6 است و همچنین MIC ۷۶۰ میلی مولاری نسبت به کرومات، ۳۴/۵ برابر MIC گزارش شده توسط Viti و همکاران (۲۲ mM) در مورد Corynebacterium hoagii و ۱/۲۶ برابر MIC گزارش شده توسط Amoozegar (۶۰۰ mM) در مورد کوکوس گرم مثبت MF_2 می باشد. بنابراین می توان ادعا کرد که MIC ۲۶ میلی‌مولاری به تلوریت و ۷۶۰ میلی‌مولاری به کرومات بالاترین MIC است که تا به حال گزارش شده است. به همین جهت نظر به ظرفیت بسیار بالایی که سویه KWT_2 در احیای اکسی‌آنیون های سمی تلوریت و کرومات نشان داد به عنوان سویه برتر انتخاب گردیده و به منظور تعیین هویت دقیق روش تعیین توالی 16S rRNA در مورد آن اجرا شد (۲۰).

در ادامه میزان حذف اکسی‌آنیون های سمی تلوریت پتاسیم و کرومات پتاسیم در محیط کشت باکتریایی KWT_2 با استفاده از روش کالریمتریک و معرف‌های اختصاصی DDTC و DPC مورد ارزیابی قرار گرفت که در مقایسه با روش هایی چون ایزوتوپ رادیواکتیوتلوریوم و معرف‌های شیمیایی تیوگلیکولیک اسید، دی تیوزون، تیواستامید و بیسموتیولII به دلیل ارزان بودن، سریع جواب دادن، دقت بالا و عدم نیاز به استخراج معرف پس از واکنش، به عنوان روش برتر معرفی گردید.

در بررسی تاثیر غلظت های اولیه ۰/۰۴ تا ۱ میلی مولار کرومات پتاسیم و تلوریت پتاسیم بر میزان حذف آن ها توسط سویه برتر KWT_2 مشخص شد که با افزایش غلظت کرومات و تلوریت میزان حذف کاهش می یابد که این نتایج قویا نشان می دهد که حذف و احیای فرآیندی آنزیماتیک است که با نظریه Horitsu و همکاران در سال ۱۹۸۷ مطابقت دارد.

مطالعات زیادی نشان داده است که سمیت تلوریت و کرومات به شدت تحت تاثیر عوامل محیطی همچون pH، دما و هوادهی می باشد. لذا در ادامه تحقیق اثر عوامل فوق در حذف تلوریت و کرومات توسط سویه برتر KWT_2 مورد بررسی قرار گرفت. اثر دما و pH در درصد حذف اکسی آنیون های سمی توسط سویه KWT_2 بسیار موثر می باشد به نحوی که بیشترین میزان حذف تلوریت در دمای $35\ ^{\circ}C$ و pH برابر ۷/۵ و همچنین بیشینه رشد و حذف کرومات در دمای$35\ ^{\circ}C$ و pH برابر ۸ مشاهده گردید. دمای بالای $40\ ^{\circ}C$ به شدت رشد سلولی و میزان حذف اکسی‌آنیون ها را کاهش داد که این امر می تواند به علت از دست دادن فعالیت متابولیکی سلول یا از بین رفتن باکتری در این دما باشد. در بررسی میزان هوادهی مشخص شد که بیشترین میزان حذف تلوریت و کرومات به ترتیب در ۱۵۰ rpm و ۱۰۰ rpm مشاهده می شود که موید فعالیت بیشتر آنزیم مربوطه در این میزان هوادهی است.

اسپکتروسکوپی جذب اتمی (AAS) نشان داد که بعد از حذف کامل کروم VI، هنوز در محیط کروم وجود دارد و از آنجا که اشکال پایدار کروم، کروم III و یا کروم VI می باشد و قبل از انجام جذب اتمی، کروم VI موجود در محیط ها را با معرف DPC اندازه گرفته‌ایم، بنابراین کروم حاصل نشان دهنده کروم III می باشد، یعنی باکتری با استفاده از ساز و کار احیا کروم VI را به III تبدیل کرده است و همچنین مورد ساز و کار حذف تلوریت پتاسیم توسط سویه KWT_2 ، با توجه به نتایج حاصل از XRD می‌توان گفت که تقریبا بیش از ۹۵٪

تلوریت از طریق احیا به تلوریوم، از محیط کشت باکتریایی حذف گردیده است.

با توجه به مقاومت بسیار بالا همراه با احیای اکسی‌آنیون های سمی می‌توان امیدوار بود که سویه KWT_2 انتخاب بسیار مناسبی جهت پاک سازی زیستی پساب های صنعتی از اکسی آنیون ها و فلزات سنگین باشد. در آینده امید است جدا سازی باکتری های احیای کننده تلوریت و کرومات از سایر منابع میکربی، کاربردی نمودن استفاده از باکتری های احیای کننده اکسی‌آنیون های سمی در صنایع کشور، استفاده از تجربیات سایر کشورها در زمینه حذف میکربی اکسی‌آنیون های سمی، شناسایی ساز و کار مولکولی فرآیند احیای میکربی فلزات و بررسی امکان کلونینگ آن ها و به کار بردن کنسرسیوم میکروارگانیسم ها در حذف اکسی‌آنیون های سمی عملی گردد.

منابع

1. Camargo. F. A. O, Okeke. B. C, Bento. F. M, Frankenberger. W. T. (2005). Diversity of chromium resistant bacteria isolated from soils contaminated with dichromate. Applied Soil Ecology. 29, 193 – 202.
2. Howard. H. (2002). Human health and heavy metals exposure. The Environment and Human Health. Chapter 4, 235 – 255.
3. Snow. E. (1994). Effects of Cr on DNA replication invitro. Environ. Health. Perspect. 102, 41 – 44.
4. Lioyd. J. R. (2003). Microbial reduction of metals and radionuclides. FEMS Microbiology Reviews. 27, 411 – 425.
5. Groudeva. V. I, Doycheva. A. S. (2001). Bioremediation of waters contaminated with crude oil and toxic heavy metals. Int. J. Miner. Process. 62, 293 – 299.
6. Nies. D. H. (1999). Microbial heavy metal resistance. Appl Microbial Biotechnol. 51, 730 – 750.
7. Ji. G, Silver. S. (1995). Bacterial resistance mechanism for heavy metals of environmental concern. J. Ind. Microbial. 14, 61 – 75.
8. Taylor. D. E. (1999). Bacterial tellurite resistance. Trends Microbiol. 7, 111 – 115.
9. Cervantes. C, Garcia. J. C, Devars. S, Corona. F. G, Sanchez. R. M. (2001). Interaction of chromium with microorganisms and plants. FEMS Microbiology Reviews. 25, 335 – 347.
10. Brilley. A, Goyak. G. M. (1989). A new wastewater treatment and metal recovery technology. Appl . Biohydro. 16, 291-298.
11. Bruins. M. R, Kapil. S, Oehme. F. W. (2000). Microbial resistance to metals in the environment. Ecotoxicology and Environmental Safety. 45, 198 – 207.
12. Yamada. A, Miyagishima. N, Matsunaga. T. (1997). Tellurite removal by marine photosynthetic bacteria. J. Mar. Biotechnol. 5, 46 – 49.
13. Rehm. H. J, Reed. G. (1988). Biotechnology, Volume 4, Sources of microorganisms for Industry (General Approaches).
14. Smibert. R. M, Krieg. N. R. (1994). Phenotypic characterization. In: Gerhardt. P, Murray. R. G. E, Wood. W. A, Krieg. N. R. (Eds.). Methods for General and Molecular Bacteriology. American Society for Microbiology, Washington. DC, pp. 607 – 654.
15. Ventosa. A. (2004). Halophilic microorganisms. Springer, Berlin, Heidelberg, New york, ISBN: 3540009264.

16. Washington. J. A, Sutter. V. L. (1980). Dilution susceptibility test: agar and macro – broth dilution procedures In: Lennette. E. H, Balows. A, Hausler J, Truant. J. (Eds.) , Manual of Clinical Microbiology, 3rd ed. American Society for Microbiology, Washington, DC, pp. 453 – 458. ISBN: 1555812554.
17. Turner. R. J, Weiner. J. H, Taylor. D. E. (1992). Use of diethyldithiocarbamate for quantitative determination of tellurite uptake by bacteria. Annal Biochem. 204, 292 – 295.
18. Gavrilescu. M. (2004). Removal of heavy metals from the environment by biosorption. Eng. Life. Sci. 3, 219 – 232.
19. Benyehuda. G, Coombs. J, Ward. P. L, Barkay. T. (2003). Metal resistance among aerobic chemoheterotrophic bacteria from the deep terrestrial subsurface. Can. J. Microbiol. 49, 151 – 156.
20. Harmsen. O, Karch. H. (2004). 16S rDNA diagnosing pathogens: aliving tree, Feature, 7: 19 – 24.