

فصلنامه علمی- پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها
سال پنجم، شماره ۱۷، بهار ۱۳۹۵، صفحه ۱۹۸-۱۸۵
تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۱۲/۲۱ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۱۰/۱۰

غربال‌سازی و شناسایی سویه کارا در جذب اکسی‌آنیون‌های سلنیوم به منظور تصفیه زیستی فاضلاب

فاطمه یعقوبی زاده*: کارشناس ارشد میکروبیولوژی، دانشگاه شهید چمران اهواز، ایران، f_yaghoobizadeh@yahoo.com
محمد رعایایی اردکانی: استاد میکروبیولوژی، دانشگاه شهید چمران اهواز، ایران، roayaei_m@yahoo.com
حسین ذوالقرنین: استادیار بیوتکنولوژی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، ایران، zolgharnein@kmsu.ac.ir

چکیده

مقدمه: سلنیوم، عنصری با فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی است که در هموستاز هورمون تیروئید، ایمنی و باروری نقش دارد. با وجود این، مسمومیت با سلنیوم (سلنوز) موجب ایجاد مشکلاتی برای انسان از جمله اختلالات سیستم عصبی، مشکلات معدی- رودای و ریزش مو می‌شود. از این رو، این مطالعه با هدف غربال‌سازی جاذب زیستی باکتریایی مناسب به منظور حذف آلاینده سلنیوم از فاضلاب انجام شد.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش، در ابتدا با استفاده از محیط کشت لوریا برتانی آگار تغییر یافته (mLBA) با غلظت معینی از نمک سلنات سدیم، جداسازی جدایه‌های باکتریایی از سه نمونه پساب و لجن جمع‌آوری شده از کارخانجات صنعتی خوزستان، انجام شد. پس از تعیین حداقل غلظت مهار (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC)، میزان جذب و درصد کارایی پاکسازی فلز (RE%) با استفاده از نمونه‌های فعال و غیر فعال متابولیسمی یکی از جدایه‌های کارا و توسط دستگاه اسپکتروفتومتر جذب اتمی بررسی شد. شناسایی، با روش‌های ریخت‌شناختی، بیوشیمیایی و مولکولی انجام شد.

نتایج: از میان ۷۳ جدایه باکتریایی به‌دست آمده در مرحله اول، ۸ جدایه مقاوم به اکسی‌آنیون سلنات به‌دست آمد. در این میان جدایه AMS1-S8 به‌ترتیب با MIC و MBC معادل با ۶۰۰ و ۱۲۰۰ میلی‌مولار برای مطالعات بیشتر انتخاب شد. نتایج به‌دست آمده در مرحله تعیین مکانیسم جذب نشان داد که میزان جذب در نمونه فعال متابولیسمی از نمونه‌های غیر فعال بیشتر است. بر اساس نتایج شناسایی مشخص شد که این جدایه، به جنس *Enterobacter* تعلق دارد. این جدایه با شماره ثبت JQ818822 در بانک جهانی ژن، ثبت شده است.

بحث و نتیجه‌گیری: نتایج نشان داد که زیست توده فعال جدایه منتخب، بیش‌ترین میزان جذب و RE% را داشته و در میان سایر جدایه‌ها، مقاومت نسبی بالایی در برابر سلنات دارد. بنابراین، می‌تواند گزینه‌ای کمابیش ایده‌آل برای اصلاح زیستی محیط‌های آلوده باشد.

واژه‌های کلیدی: سلنیوم، مسمومیت، غربال‌گری، جاذب زیستی

* نویسنده مسؤل مکاتبات

مقدمه

آب به‌عنوان ارزشمندترین منبع طبیعی موجود، حدود ۷۰ درصد از سطح زمین را پوشانده است (۱). آلاینده‌های آب به دو گروه آلی و غیر آلی تقسیم می‌شوند. از میان آلاینده‌های غیر آلی، فلزات به‌علت رشد روز افزون کاربرد صنعتی‌شان، موجب آلودگی پایدار محیط زیست می‌شوند (۲). در این میان، سلنیوم به چهار شکل: اکسی‌آنیون سلنات، سلنیت، سلنید و سلنیوم عنصری در طبیعت یافت می‌شود که سلنات و سلنیت به‌علت حلالیت بالا در آب، بیش‌ترین دسترسی زیستی و بنابراین، بیش‌ترین سمیت را برای سیستم‌های زیستی دارند (۳). گذشته از منابع طبیعی (بیشتر مواد معدنی فلزی - گوگردی، برای مثال ناشی از فعالیت آتشفشان‌ها)، ترکیبات سلنیومی به شکل گسترده در نتیجه فعالیت‌های انسانی مانند سوخت‌های فسیلی، کشاورزی (کودهای سلنیومی) و غیره در محیط پراکنده می‌شوند (۴). مقادیر مازاد بر نیاز این عنصر (در حد میکرومول) اتصالات دی‌سولفیدی پروتئین‌ها را هدف قرار داده و به این ترتیب، مشکلات پوستی یا عصبی از جمله ریزش مو، آسیب‌پذیری ناخن‌ها، اختلالات عصبی و خستگی را در انسان ایجاد می‌کند. از طرفی، میزان مازاد بر نیاز این عنصر، با تولید رادیکال‌های آزاد موجب آسیب به DNA می‌شود (۴). اگرچه روش‌های فیزیکی - شیمیایی مرسوم، برای برداشت آلودگی‌های فلزی از پساب‌های صنعتی استفاده می‌شوند، اما این روش‌ها گران بوده، با محیط زیست سازگار نیستند و بیشتر به غلظت مواد زاید وابسته هستند (۵ و ۶). به‌همین علت امروزه روش‌های زیستی با استفاده از میکروارگانیسم‌هایی مانند مخمر و باکتری با هدف احیا، حذف یا تغییر شکل فلزات سمی مورد توجه ویژه‌ای

قرار گرفته‌اند (۷).

با توجه به تنوع متابولیکی میکروارگانیسم‌ها و توان استفاده آن‌ها از آلاینده‌های محیطی به‌عنوان منابع غذایی یا تبدیل آن‌ها به شکلی با پایداری بیشتر و سمیت کمتر (۸)، هدف اصلی از انجام پژوهش حاضر جداسازی و معرفی جدایه‌ای است که قادر به تبدیل اکسی‌آنیون سلنات به سلنیوم عنصری است.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری: نمونه‌برداری از پساب و لجن سه کارخانه کربن بلک و فارسیت اهواز و توسعه نیشکر امیر کبیر خوزستان انجام شد. نمونه‌های تهیه شده در ظروف استریل بلافاصله در کنار یخ به آزمایشگاه انتقال یافته و بررسی شد (۹).

غربال‌گری اولیه باکتری‌های مقاوم به فلز:

جداسازی باکتری‌های مقاوم از طریق کشت مستقیم در محیط جامد انجام شد. به این منظور نمونه‌های آب و رسوب با سرم فیزیولوژی استریل تا رقت 10^{-5} رقیق شد. سپس، در محیط کشت لوریا برتانی آگار تغییر یافته^۱ (mLBA) (متشکل از ۰/۵ درصد عصاره مخمر، ۱ درصد تریپتون و ۱/۵ درصد آگار) با غلظت ۰/۲ میلی‌مولار نمک سلنات سدیم کشت داده و گرماگذاری در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۷۲ ساعت انجام شد. شایان ذکر است که اسیدیته این محیط بر روی ۷/۵ تنظیم شد (۱۰).

انتخاب جدایه‌های بهینه باکتریایی مقاوم به

اکسی‌آنیون سلنات: در این مرحله، روش تعیین حداقل غلظت مهارتی^۲ (MIC) و حداقل غلظت کشندگی^۳ (MBC) به‌منظور انتخاب جدایه‌هایی با بالاترین مقاومت نسبی، استفاده شد. به‌منظور تعیین MIC با روش

تعادل بین محلول فلزی و توده باکتریایی ادامه یافت (۱۳) و (۱۵).

میزان محتوی فلز در فاز رویی حاصل از سانتریفیوژ توسط دستگاه اسپکتروفتومتر جذب اتمی، مدل SAVANtAA A7104 ساخت کشور استرالیا، سنجیده شد. میزان فلز جذب شده به زیست توده با کسر میزان فلز مایع رویی از میزان اولیه محاسبه شد. تمام آزمایشات در ۳ تکرار انجام و میانگین آن‌ها به شکل عدد نهایی جذب گزارش شد (۱۶ و ۱۷).

رسم منحنی استاندارد غلظت سلنات: قبل از خواندن میزان جذب فلز توسط نمونه‌ها، ابتدا به کمک محلول‌های با غلظت‌های ۸۰، ۲۰۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر از آنیون سلنات، منحنی استاندارد جذب فلز توسط دستگاه اسپکتروفتومتر جذب اتمی در طول موج ۲۰۴/۰۰ نانومتر رسم شد. دقت دستگاه در حد میلی‌گرم در لیتر و نوع سوخت آن air/acetylene بود. میزان جذب هر یک از محلول‌های استاندارد با ۳ تکرار خوانده و نتیجه به شکل میانگین گزارش شد (۹).

محاسبه میزان جذب فلز: پس از رسم منحنی استاندارد و تعیین غلظت فلز در فاز رویی هر نمونه، برای محاسبه میزان جذب فلز توسط زیست توده‌های موجود، از فرمول زیر استفاده شد:

$$q = V (C_i - C_f) / S$$

که در آن شاخص q معرف میزان جذب فلز توسط زیست توده است که با واحد میلی‌گرم فلز جذب شده در هر گرم وزن خشک باکتری^۴ گزارش می‌شود. شاخص V معرف حجم محلول مجاورسازی بر حسب لیتر، C_i غلظت اولیه محلول فلزی بر حسب میلی‌گرم در لیتر، C_f غلظت فلز پس از مجاورسازی بر حسب میلی‌گرم در لیتر و شاخص S وزن خشک زیست توده

رقت‌سازی در محیط مایع، سوسپانسیون باکتریایی (با کدورت معادل ۰/۵ مک فارلند) در محیط کشت brothmLB حاوی غلظت ۳۲/۵ تا ۱۲۰۰ میلی‌مولار نمک سلنات سدیم تلقیح شد. نمونه شاهد نیز با تلقیح سوسپانسیون باکتریایی در محیط کشت فلز، تهیه شد. گرماگذاری به مدت ۴۸ تا ۷۲ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و دور ۱۵۰ دور در دقیقه انجام شد. در پایان، میزان MIC و MBC هر جدایه تعیین شد (۱۱) و (۱۲).

رسم منحنی رشد جدایه منتخب: به این منظور سوسپانسیون باکتریایی به محیط brothmLB، در دو گروه واجد ۱۰۰ میلی‌مولار سلنات سدیم و فاقد نمک، تلقیح و در ۳۰ درجه سانتی‌گراد و ۱۵۰ دور در دقیقه، گرماگذاری شد. در فواصل ۴ ساعته، جذب نوری توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۶۰۰ نانومتر اندازه‌گیری و منحنی رسم شد (۱۳).

روش به‌دست آوردن میزان کمی جذب فلز: برای

دستیابی به این مهم، ابتدا زیست توده جدایه منتخب در محیط mLb broth تهیه شد. به این شکل که پس از کشت باکتری در این محیط، تا رسیدن مرحله رشد جدایه به اواسط فاز نمایی، گرماگذاری در ۳۰ درجه سانتی‌گراد و ۱۵۰ دور در دقیقه انجام شد. سپس، سوسپانسیون باکتریایی در دور ۶۰۰۰ دور در دقیقه و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. رسوب حاصل در شرایط یاد شده ۲ بار با آب ۲ بار تقطیر استریل شستشو داده و سانتریفیوژ شد (۱۴). حدود ۰/۴ گرم از وزن تر زیست توده با ۴۰ میلی‌لیتر محلول فلزی محتوی ۷۸۹۶ میلی‌گرم در لیتر (ppm) اکسی‌آنیون سلنات با اسیدیته ۸ در ۳۰ درجه سانتی‌گراد و ۱۵۰ دور در دقیقه مجاور شد. مجاورسازی تا رسیدن

شد. C_i و C_f به ترتیب معرف غلظت اولیه محلول فلزی و غلظت فلز پس از مجاورسازی بر حسب میلی گرم در لیتر هستند. نمونه‌ای که حداکثر کاهش درصد غلظت فلز را در محلول رویی حاصل از سانتریفیوژ داراست، معرف حداکثر میزان جذب فلز توسط باکتری است (۱۹).

تحلیل آماری: میزان تفاوت و سطح معناداری نمونه‌ها در مرحله تعیین جذب نوری، توسط آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه (آنوآ^۱)، نسخه ۱۹ نرم افزار اس. پی. اس. اس^۲ تعیین شد. نتایج به‌دست آمده از آزمون‌های MIC، MBC، تعیین درصد کارایی پاک‌سازی و تعیین نوع فرآیند جذب فلز با استفاده از آزمون مربع کای^۳ (سطح اطمینان ۰/۹۵) بررسی شد.

شناسایی جدایه منتخب: پس از بررسی‌های انجام شده، جدایه‌ای که در تمام مراحل، نسبت به سایر جدایه‌های این پژوهش، کارایی بهتری را نشان داد و در مقایسه با سایر مطالعات انجام شده در این زمینه، میزان MIC، MBC و کارایی بالاتری داشت، بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناسی کلونی، رنگ‌آمیزی گرم، انجام آزمون‌های مختلف بیوشیمیایی و در نهایت، شناسایی مولکولی و تعیین توالی *16 SrRNA* شناسایی شد. شایان ذکر است که در مرحله شناسایی مولکولی، پس از استخراج ژنوم با ۲ روش جوشاندن و استخراج با کیت، با توجه به منابع معتبر موجود، جفت پرایمری انتخاب شد که قابلیت تکثیر ناحیه ژنوم *16 SrRNA* یوبا کتر را داشت. توالی این جفت پرایمر در زیر آورده شده است (۲۰).

با واحد گرم است. به‌منظور محاسبه وزن خشک، زیست توده باکتری به‌مدت یک‌شب در فور ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد (۹ و ۱۸).

بررسی مکانیسم جذب اکسی‌آنیون سلنات: برای تعیین نوع فرآیند جذب توسط باکتری (وابسته و یا مستقل از متابولیسم) از دو روش برای غیر فعال کردن باکتری استفاده و همزمان مقایسه‌ای میان میزان جذب این نمونه‌ها با نمونه فعال متابولیسمی (شاهد) انجام شد (۹).

در این مرحله نیز به‌منظور تهیه زیست توده، مطابق با مرحله تعیین میزان جذب فلز عمل شد. سپس، از دو روش زیر به‌منظور غیر فعال کردن زیست توده استفاده شد: ۱- سلول‌ها به‌مدت ۱۵ دقیقه، در فشار ۱ اتمسفر و دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد اتوکلاو شد. ۲- زیست توده به‌دست آمده به‌مدت یک‌شب در فور ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. پس از کشت روی محیط نوترینت آگار و اطمینان از کشته‌شدن زیست توده‌ها، میزان ۰/۴ گرم از وزن تر هر نمونه با ۴۰ میلی‌لیتر محلول فلزی با غلظت سلنات معادل ۷۸۹۶ میلی‌گرم در لیتر مجاور شد. گرماگذاری در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و ۱۵۰ دور در دقیقه انجام گرفت و پس از گذشت زمان لازم برای مجاورسازی، نمونه‌ها در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و ۶۰۰۰ دور در دقیقه، به‌مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. فاز رویی نمونه‌ها برای تعیین غلظت فلز تحلیل شد (۹).

محاسبه درصد کارایی پاکسازی فلز^۴ (%RE): پس از تعیین غلظت فلز در فاز رویی هر نمونه، برای محاسبه %RE، از فرمول $RE = (C_i - C_f) \times 100 / C_i$ استفاده

5'-CCGAATTCGTCGACAACAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'	توالی پرایمر رفت ^۴ (۳۷ باز)
5'-CCC GGATCCAAGCTTACGGTTACCTTGTTACGACTT-3'	توالی پرایمر برگشت ^۴ (۳۷ باز)

نتایج

رسم منحنی رشد: پس از کشت جدایه در محیط brothmLB و تلقیح به محیط مشابه، گرماگذاری در شرایط ۱۵۰ دور در دقیقه، ۳۰ درجه سانتی‌گراد انجام شد. نمونه‌برداری برای خواندن میزان جذب نوری انجام شد. نتایج نشان داد منحنی رشد در محیط فاقد سلنات از حدود ساعت ۲۴ وارد فاز سکون می‌شود و در محیط دارای سلنات، از ساعت ۱۶ به‌علت تولید سلنیوم عنصری، جذب نوری^{۱۱} افزایش در خور توجهی می‌یابد (شکل ۱). زمان مناسب تهیه زیست توده در مرحله تعیین میزان جذب، با توجه به این منحنی انتخاب شد.

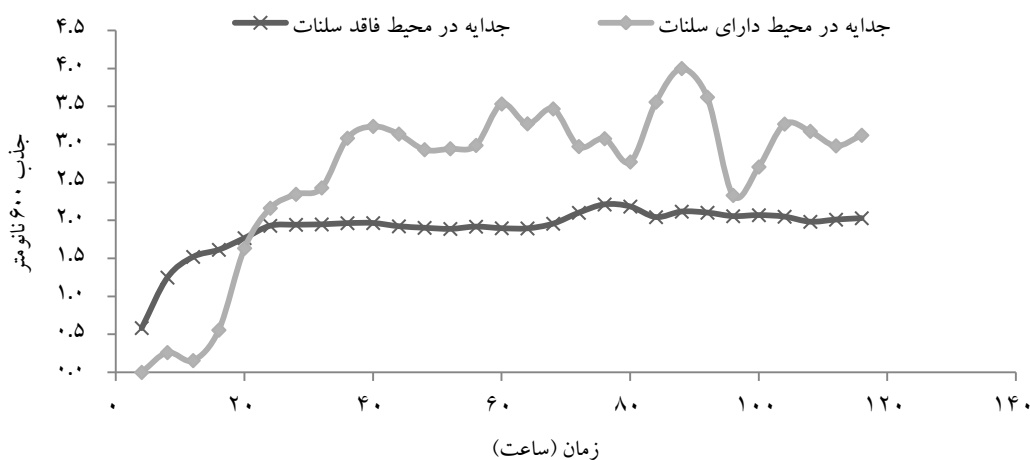
جدول ۱- تعیین MIC و MBC جدایه‌های سلنات

MBC (میلی‌مولار)	MIC (میلی‌مولار)	جدایه آزمون
۳۰۰	۳۰۰	AMW2-S2
۶۰۰	۶۰۰	CBW-S3
۶۰۰	۶۰۰	CBW-S4
۳۰۰	۳۰۰	AMW2-S5
۶۰۰	۶۰۰	AMW2-S6
۱۵۰	۱۵۰	AMS1-S7
۱۲۰۰	۶۰۰	AMS1-S8
۳۰۰	۳۰۰	CBS-S9

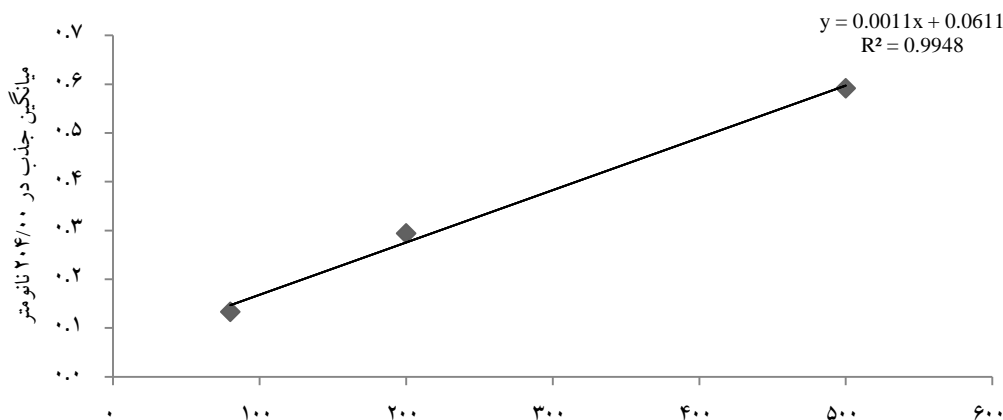
پس از کشت نمونه‌ها در محیط mLBA با غلظت ۰/۲ میلی‌مولار نمک سلنات سدیم و ۷۲ ساعت گرماگذاری در ۳۰ درجه سانتی‌گراد، از میان ۷۳ جدایه اولیه، تنها ۸ جدایه قادر به تولید کلونی‌هایی با رنگ قرمز بر روی پلیت بودند. با توجه به اینکه ظهور این رنگ به‌عنوان مکانیسم احتمالی سم‌زدایی سلنات شناخته می‌شود، این ۸ جدایه برای مطالعات بیشتر انتخاب شدند. در ادامه، خالص‌سازی با استفاده از محیط نوترینت آگار انجام و کلونی‌های خالص شده بررسی شد.

انتخاب جدایه‌های بهینه باکتریایی مقاوم به

اکسی‌آنیون سلنات: در این مرحله جدایه‌های مورد بررسی به شکل جداگانه در گستره غلظتی ۳۲/۵ تا ۱۲۰۰ میلی‌مولار سلنات سدیم کشت داده شدند. همان‌گونه که در جدول ۱ مشخص است و نتایج تحلیل آماری توسط آزمون مربع کای نیز نشان داد، از این میان، تنها جدایه AMS1-S8 با MIC=۶۰۰ میلی‌مولار و MBC=۱۲۰۰ میلی‌مولار، بیش‌ترین اختلاف معنادار را با سایر جدایه‌ها دارد ($X^2_{0.05,2} < 5/991$). از این‌رو این جدایه برای مطالعات بعدی انتخاب شد.



شکل ۱- منحنی رشد جدایه AMS1-S8

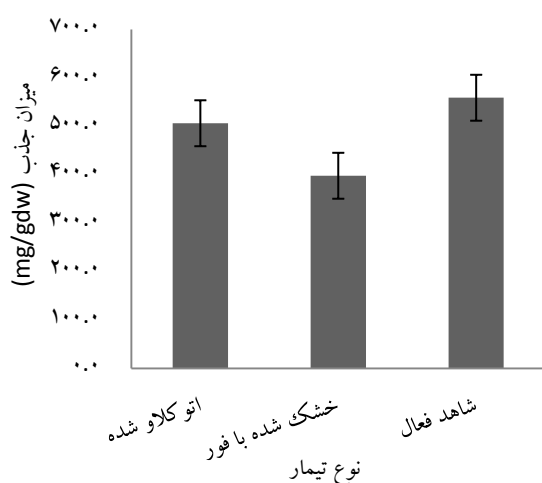


شکل ۲- منحنی و معادله خط استاندارد جذب سلنات
(غلظت محلول استاندارد (میلی گرم در لیتر)

جدول ۲- میزان جذب و RE% سلنات در نمونه‌های فعال و غیر

فعال متابولیسمی

غیر فعال متابولیسمی		فعال متابولیسمی	نوع تیمار شاخص
اتوکلاو	خشک در ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد	شاهد	
۵۰۶/۲	۳۹۷/۷	۵۵۸/۹	میزان جذب سلنیوم (سلنات) (mg/gdw)
۱۰/۵۸	۹/۴۴	۱۱/۶۸	RE%
درصد	درصد	درصد	



شکل ۳- میزان جذب سلنات توسط زیست توده فعال و غیر فعال

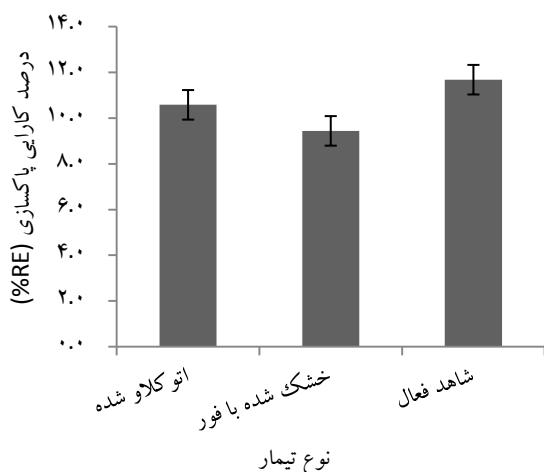
نتایج حاصل از به‌دست آوردن میزان کمی جذب

فلز: پس از رسم منحنی استاندارد جذب و محاسبه معادله خط (شکل ۲)، غلظت نمونه مجهول (C_f) توسط دستگاه اسپکتروفتومتر جذب اتمی تعیین شد. سپس، میزان جذب اکسی‌آنیون سلنات (q) توسط جدایه مورد مطالعه، محاسبه شد.

نتایج حاصل از تعیین نوع فرآیند جذب فلز: در این

بررسی که برای تعیین مکانیسم جذب جدایه انجام شد، از دو روش خشک کردن و اتوکلاو به‌منظور غیر فعال کردن (حذف فرآیندهای متابولیسمی و حیاتی) میکروارگانیسم استفاده شد. جدول ۲ و شکل‌های ۳ و ۴ نشان می‌دهد که میزان جذب و RE% نمونه فعال از نمونه‌های غیر فعال بیشتر است که نشان می‌دهد نمونه فعال متابولیسمی علاوه بر اینکه از همان مکانیسم جذب در نمونه‌های غیر فعال (جذب زیستی) برخوردار است، از روش تجمع زیستی نیز به‌منظور ذخیره فلز در درون خود استفاده می‌کند. با وجود این، با توجه به اعداد به‌دست آمده جذب فعال بازده بالایی نداشته و به‌عبارت دیگر این جدایه قسمت زیادی از جذب را به‌روش مستقل از متابولیسم انجام می‌دهد.

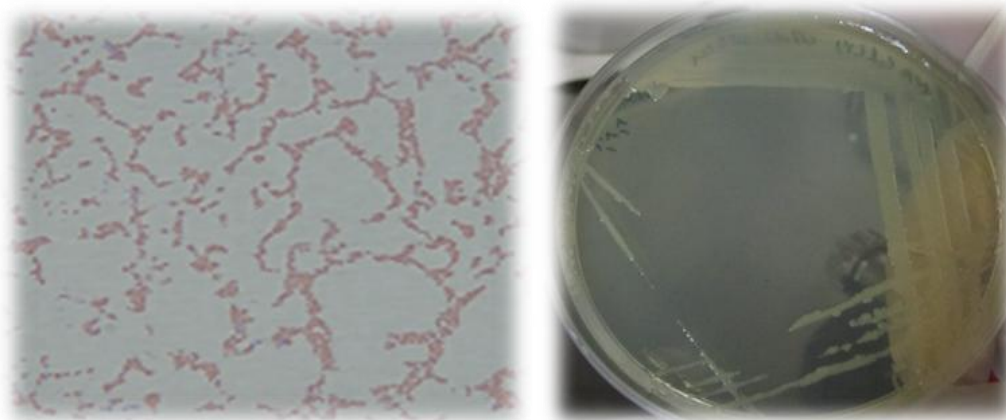
نتایج شناسایی جدایه باکتریایی: با توجه به مطالب ذکر شده، در این مرحله جدایه AMS1-S8 مورد شناسایی دقیق بیوشیمیایی و مولکولی قرار گرفت (شکل ۵ و ۶ و جدول ۳). در نهایت، پس از انجام PCR و الکتروفورز و انجام تعیین توالی، این جدایه به‌عنوان باکتری *Enterobacter ludwigii* معرفی شد و درخت فیلوژنتیکی مربوط به آن، با استفاده از نرم‌افزار Mega4.0 رسم شد (شکل ۷). این جدایه، با شماره ثبت JQ818822 در بانک جهانی ژن، ثبت شده است.



شکل ۴- درصد RE سلنات توسط زیست توده فعال و غیر فعال

به‌منظور بررسی آماری، تمام آزمایش‌ها در ۳ تکرار انجام و نتایج به‌دست آمده با استفاده از آزمون مربع کای با سطح اطمینان ۰/۹۵ بررسی شد. در مورد میزان جذب، این نتایج اختلاف معناداری را بین نتایج روش تیماری اتوکلاو و شاهد فعال ($X^2_{0.05,2}=10.19/85$)، که بیانگر کارایی بیشتر نمونه شاهد فعال است)، خشک‌شده با فور و شاهد فعال ($X^2_{0.05,2}=10.2/39$)، که بیانگر کارایی بیشتر نمونه شاهد فعال است) و اتوکلاو و خشک‌شده با فور ($X^2_{0.05,2}=14.4/41$)، که نشان‌دهنده کارایی بیشتر نمونه تیمار شده با اتوکلاو است) نشان داد.

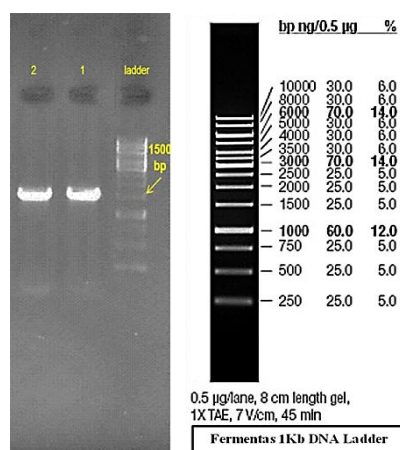
نتایج تحلیل آماری %RE نشان داد که اختلاف معناداری بین نمونه شاهد فعال و خشک‌شده با فور ($X^2_{0.05,2}=11/8281$) وجود دارد که به معنای کارایی بیشتر نمونه شاهد است. از این گذشته مقایسه دو روش تیماری اتوکلاو و خشک‌سازی با فور، نشان‌دهنده اختلاف معنادار این دو تیمار و کارایی بیشتر نمونه تیمار شده با اتوکلاو بود ($X^2_{0.05,2}=15/6689$).



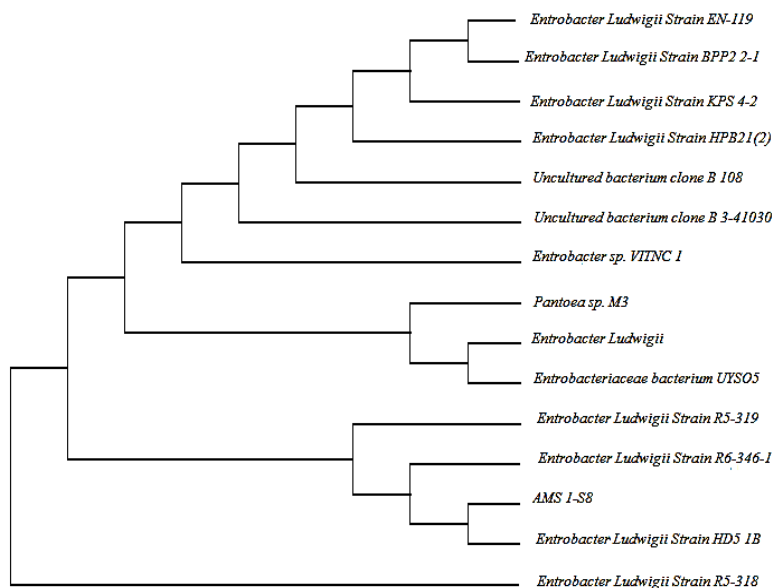
شکل ۵- تصویر میکروسکوپی و پلیت جدایه AMS1-S

جدول ۲- نتایج آزمون‌های بیوشیمیایی

شکل	واکنش گرم	تست اسنات	کاتالاز	اکسیداز	OF (oxidative/Fermentative)	اوره‌آز	هیدرولیز نشاسته	استفاده از سیترات	واکنش بر محیط مک کانکی	MR/VP	نیترات	SIM	تولید اسید از:	گلوکز	زایلوز	لاکتوز	آرابینوز	سوربیتول	مالٹوز
کوباسیل	-	+	+	-	+/+ آئورژن	-	-	-	لاکتوز +	-/-	-	حرکت +، اندول -، H ₂ S -		+	+	-	-	+	+



شکل ۶- الکتروفورز محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمرز؛ ۱: کنترل مثبت، ۲: جدایه AMS1-S8



شکل ۷- درخت فیلوژنی رسم شده به روش Neighbor-Joining برای جدایه AMS1-S8

بحث و نتیجه گیری

در جداسازی باکتری‌های مقاوم به فلزات سنگین دو روش کشت مستقیم و کشت با غنی‌سازی اولیه^{۱۲} وجود دارد. در این پژوهش، به دو علت از روش مستقیم استفاده شد: اول اینکه یک محیط کشت غنی دارای ترکیباتی است که باعث به‌دام انداختن یون‌های فلزی شده و بدین ترتیب موجب کاهش دسترسی زیستی می‌شود؛ دوم اینکه محیط غنی موجب افزایش توان جذب فلز توسط باکتری شده و یک جذب غیر واقعی مشاهده می‌شود (۲۱).

بررسی مقاومت با روش MIC و MBC: MIC به‌عنوان کم‌ترین غلظت فلز در محیط است که از رشد میکروارگانسیم جلوگیری می‌کند. در مطالعه این شاخص، از دو روش استفاده می‌شود: ۱- رقت‌سازی فلز در آگار و ۲- رقت‌سازی در محیط مایع (۲۲). از آنجا که در مرحله غربال‌گری باکتری‌های مقاوم، مشاهده شد که جدایه‌های مورد بررسی توان رشد در تراکم‌های بالای فلز را دارند، گستره غلظتی مربوط به مرحله MIC در مقایسه با سایر مطالعات بسیار بالاتر بود. بنابراین، در این پژوهش به‌منظور تعیین میزان رشد جدایه‌ها از روش رقت‌سازی در محیط مایع استفاده شد (۲۳). در این مطالعه MIC جدایه AMS1-S8 در مقایسه با سایر مطالعات انجام شده قابل ملاحظه است. تنها در مطالعه انجام شده توسط گُش^{۱۳} و همکاران، با به‌کارگیری غلظت‌های ۱۰ تا ۱۰۰۰ میلی‌مولار، این مقدار در گستره ۶۵۰ تا ۷۵۰ میلی‌مولار به دست آمد (۲۴). کمپیس^{۱۴} نیز جدایه‌هایی با میزان MIC حدود ۲۰۰ میلی‌مولار را گزارش کرده است (۲۵). در سال ۲۰۰۱، سَباتی^{۱۵} و همکاران در مطالعه‌ای که به منظور جداسازی جدایه‌های مقاوم به تلوریت و سلنات انجام دادند، موفق به

جداسازی جدایه‌هایی با MIC در حد ppm شدند (۲۶).
روش به‌دست آوردن میزان کمی جذب فلز: در مطالعات جداگانه عبدالنبی^{۱۶} و همکاران، صدیق^{۱۷} و همکاران، ایلماز^{۱۸} و همکاران، امین^{۱۹}، تلی‌دلیر^{۲۰} و مطالعات متعدد دیگر، به منظور بررسی میزان حذف فلزات مختلف از زیست توده باکتریایی استفاده شده است که این زیست توده، پیش از مجاورسازی با فلز به‌دست آمده است (۲۷، ۲۸-۳۰). با وجود این، در برخی مطالعات از جمله مطالعه ایلماز و همکاران و آندرثونی^{۲۱} و همکاران، از سلول‌های در حال رشد به منظور برداشت فلز از محلول استفاده شده است (۲۸) و (۳۱). در این راستا، چنین بیان شده است که حذف فلز با استفاده از سلول‌های در حال رشد، نیازمند صرف زمانی است که به منظور رشد میکروارگانسیم در محیط تحت تنش فلزی مورد نیاز است. با وجود این، مایرز^{۲۲} بیش‌ترین مقدار کاهش سلنات را همزمان با فاز نمایی رشد جدایه‌هایش (۲ تا ۴ روز) مشاهده کرده است (۳۲). از طرف دیگر در مطالعه هالتونن^{۲۳} بیان شده است که چگالی سطحی و ثابت دیپروتونه شدن گروه‌های عملکردی سطحی *Bacillus subtilis* بسته به فاز رشد تغییر می‌کند. به‌طوری‌که این پژوهشگر به نقل از دافنی^{۲۴} و همکاران اظهار داشته است که با ورود زیست توده از فاز نمایی به فاز سکون رشد، چگالی سطحی و ثابت دیپروتونه شدن گروه‌های کربوکسیل، فسفوریل و آمین کاهش می‌یابد. همچنین، هالتونن در تایید این نتایج گفته است که استفاده از سلول‌های پیرتر *Pseudomonas aeruginosa* موجب کاهش حذف کادمیوم می‌شود (۵). از این‌رو در پژوهش حاضر، از سلول‌های رشد کرده‌ای استفاده شد که پیش از مجاورسازی با فلز، در محیطی کشت داده شده و با رسیدن به اواسط مرحله

با اتوکلاو بر رفتار جذبی زیست توده هستند. برای مثال، افزایش جذب منگنز توسط زیست توده دو جلبک *Nostoc commune* و *Spirogyra sp.* پس از تیمار با اتوکلاو مشاهده شده است (۳۷). در مقابل، ابراهیمی‌پور^{۲۹} و همکاران بیان داشتند که علت کاهش جذب سرب در حالت اتوکلاو کردن، احتمالاً به دو علت است: ۱- در این حالت جذب فقط به شکل سطحی خواهد بود و جذب درونی وجود نخواهد داشت. ۲- در حین اتوکلاو، برخی از سایت‌های اتصال Pb^{2+} در اثر شوک ناشی از دمای بالا، دنا توره می‌شوند (۱).

همان‌طور که بیان شد، نمونه فعال متابولیسمی جدایه معرفی شده بیش‌ترین میزان جذب و RE% را دارد. بزرگ‌ترین مزیت استفاده از کشت زنده میکروبی برای تولید زیست توده، عدم نیاز به مراحل جداگانه‌ای مثل کشت، جمع‌آوری، خشک کردن، آماده‌سازی و ذخیره است. از طرفی با توجه به این نتایج و نتایج به‌دست آمده از مرحله تعیین MIC و MBC، و با یادآوری مروری بر مطالعات انجام‌شده، می‌توان اینگونه استنباط کرد که این جدایه، گزینه کمابیش ایده آل برای کاربردهای صنعتی در راستای پاکسازی محیط زیست است.

References

- (1) Ebrahimipour Gh., Foladi J., Telly Dalir S., Tafakori V. Screening and selecting a lead absorbing bacterium. *Environmental Sciences* 2005; 7: 1- 12.
- (2) Nayeri R., Ghaemi N., Noohi AS. Evaluation of isolated bacteria from industrial wastewater in removal of lead pollutant. *Qom University of Medical Sciences Journal* 2011; 5 (1):75- 82.

لگاریتمی رشدشان، سانتی‌فیوژ و برای مجاورسازی استفاده شدند.

همچنین، بیان این موضوع دارای اهمیت است که استفاده از سلول‌های مرحله لگاریتمی با فرض این علت بود که در این حالت، جدایه‌ها در برابر استرس فلزی و برداشت فلزات کارا تر می‌باشند و این حالت مشابه با مطالعاتی است که توسط ترانجینی^{۲۵}، سرت^{۲۶} و همکاران، مرتضوی^{۲۷} و همکاران و بسیاری از مطالعات دیگر، گزارش شده است (۳۳-۳۵).

تعیین نوع فرآیند جذب: به طور کلی جذب فلزات سنگین توسط زیست توده غیر زنده میکروارگانیسم‌ها، به روش جذب زیستی انجام می‌شود. در عوض همان زیست توده، در شرایط فعال متابولیسمی علاوه بر جذب یاد شده، ممکن است بتواند فلزات را به روش تجمع زیستی نیز در خود ذخیره سازد.

نتایج مربوط به جدایه AMS1-S8 نشان داد که کارایی نمونه شاهد فعال در جذب فلز بالاتر است؛ پس از آن نمونه غیر فعال شده با اتوکلاو بیش‌ترین کارایی را نشان می‌دهد و نمونه‌ای تیمار شده با حرارت ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد، کم‌ترین بازده جذب را داراست. با توجه به مقالات مختلف، میکروارگانیسم‌ها رفتارهای متناقضی را در رابطه با مکانیسم جذب فلز نشان می‌دهند. جان‌لیان^{۲۸} و همکاران بیان داشتند که تخریب شدید ساختار سطحی سلول می‌تواند بر ظرفیت جذب زیست توده، موثر باشد. مقایسه‌هایی که این پژوهشگر با استفاده از میکروسکوپ TEM انجام داد، نشان داد که عوامل تیماری قوی، به‌علت تجزیه پپتیدو گلیکان، لپیدها و پروتئین‌ها، ساختار سطح سلول را تخریب کرده و به طور معمول موجب کاهش ظرفیت جذب زیستی فلزات می‌شوند (۳۶). از سویی برخی از مطالعات، نشان‌دهنده آثار متفاوت تیمار

- (3) Burra R. Determination of selenium and tellurium oxyanion toxicity, detection of metalloids-containing headspace compounds, and quantification of metalloids oxyanions in bacterial culture media [dissertation]. Huntsville, Alabama: Sam Houston State University; 2009.
- (4) Lenz M., Lens PNL. The essential toxin: The changing perception of selenium in environmental sciences. *Science of the Total Environment* 2009; 407:3620- 33.
- (5) Halttunen T. Removal of cadmium, lead and arsenic from water by lactic acid bacteria [dissertation] Turku: Finland University; 2007.
- (6) Khanaferi A., Shirdam R., Tabatabaee A. Isolation and identification of capable bacteria to reduction of cadmium, vanadium and nickel. *Scientific Journal of Life Environment* 2007; 44: 33- 43.
- (7) Geets J., Vangronsveld J., Diels L., Taghavi S., Lelie D. Microbial activities, monitoring and application as part of a management strategy for heavy metal-contaminated soil and ground water. *Developments in Soil Science* 2008; 32: 521- 59.
- (8) Ashengroph M. Isolation and characterization of a native strain of *Aspergillus niger* ZRS14 with capability of high resistance to zinc and its supernatant application towards extracellular synthesis of zinc oxide nanoparticles. *Biological Journal of Microorganism* 2013; 2(7): 29- 44.
- (9) Pre´ve´ral S., Gayet L., Moldes C., Hoffmann J., Mounicou S., Gruet A., et al. A common highly conserved cadmium detoxification mechanism from bacteria to humans. *Journal of Biological Chemistry* 2009; 284 (8): 4936- 43.
- (10) Choudhary S., Sar P. Characterization of a metal resistant *Pseudomonas* sp. isolated from uranium mine for its potential in heavy metal (Ni^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , and Cd^{2+}) sequestration. *Bioresource Technology* 2009; 100: 2482- 92.
- (11) Ruanchaiman S., Kumsopa A., Boontanonand N., Prapagdee B. Dispersion of cadmium-resistant bacteria in cadmium-contaminated soils at Mae Sot district, Tak province. *Journal of Environmental Research* 2009; 31 (2): 35- 48.
- (12) Leedjarv A., Ivask A., Virta M. Interplay of different transporters in the mediation of divalent heavy metal resistance in *Pseudomonas putida* KT2440. *Journal of Bacteriology* 2008; 190 (8): 2680- 9.
- (13) Abdelatey L.M., Khalil WKB., Ali TH., Mahrous KF. Heavy metal resistance and gene expression analysis of metal resistance genes in gram-positive and gram-negative bacteria present in Egyptian soils. *Journal of Applied Sciences in Environmental Sanitation* 2011; 6 (2): 201- 11.
- (14) Nasrazadani A., Tahmourespour A., Hoodaji M. Determination of bacteria resistance threshold to lead, zinc and cadmium in three industrial wastewater samples. *Journal of Environmental Studies* 2011; 36 (56): 25- 7.
- (15) Al- Garni SM., Ghanem KM., Ibrahim AS. Biosorption of mercury by capsulated and slime layer-forming Gram-ve bacilli from an aqueous solution. *African Journal of Biotechnology* 2010; 9 (38): 6413- 21.
- (16) Hussein H., Ibrahim SF., Kandeel K., Moawad H. Biosorption of heavy metals from waste water using *Pseudomonas* sp. . *Electronic Journal of Biotechnology* 2004; 7 (1): 38- 46.
- (17) Bai HJ., Zhang ZM., Yang GE., Li BZ. Bioremediation of cadmium by growing *Rhodobacter sphaeroides*: Kinetic characteristic and mechanism studies. *Bioresource Technology* 2008; 99: 7716- 22.
- (18) Narasimhulu K., Rao PS. Studies on removal of toxic metals from wastewater using *Pseudomonas* species. *ARPN Journal of Engineering and Applied Sciences* 2009; 4 (7): 58- 63.

- (19) Rao KS., Mohapatra M., Venkateswarlu P. Review on cadmium removal from aqueous solutions. *International Journal of Engineering, Science and Technology* 2010; 2 (7): 81- 103.
- (20) Abd-Elnaby H., Abou-Elela GM., El-Sersy NA. Cadmium resisting bacteria in Alexandria Eastern Harbor (Egypt) and optimization of cadmium bioaccumulation by *Vibrio harveyi*. *African Journal of Biotechnology* 2011; 10 (17): 3412- 23.
- (21) Giri S. Isolation and biochemical characterization of mercury resistant bacteria (mrb) from soil samples [dissertation]. Rourkela: National institute of Technology Rourkela, Orissa; 2011.
- (22) Sarin C., Sarin S. Removal of cadmium and zinc from soil using immobilized cell of biosurfactant producing bacteria. *EnvironmentAsia* 2010; 3 (2): 49- 53.
- (23) Chihching C., Yumei K., Changchieh C., Chunwei H., Chihwei Y., Weijen Y. Microbial diversity of soil bacteria in agricultural field contaminated with heavy metals. *Journal of Environmental Sciences* 2008; 20: 359- 63.
- (24) Ghosh A., Mohod AM., Paknikar KM., Jain RK. Isolation and characterization of selenite- and selenate-tolerant microorganisms from selenium-contaminated sites. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 2008; 24: 1607- 11.
- (25) Lampis S. New insights in microbial transformation of selenium: a biotechnological perspective. [dissertation]. University of Degli Studi Di Verona. 2005.
- (26) Sabaty M., Avazeri C., Pignol D., Vermiglio A. Characterization of the reduction of selenate and tellurite by nitrate reductases. *Applied and Environmental Microbiology* 2001; 67 (11): 5122- 6.
- (27) Siddique T., Arocena JM., Thring RW., Zhang Y. Bacterial reduction of selenium in coal mine tailings pond sediment. *Journal of Environmental Quality* 2007; 36: 622- 7.
- (28) Yilmaz EI., Ensari NY. Cadmium biosorption by *Bacillus circulans* strain EB1. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 2005; 21: 777- 9.
- (29) Amin P. Microbial adsorption and accumulation of cadmium. [dissertation]. Tehran, Iran: Al-Zahra University, 2000
- (30) Telly Dalir S. Screening, isolation and identification of a lead sorbing bacterium from industrial effluent and optimization of its biosorption conditions. [dissertation]. Tehran, Iran: Al-Zahra University, 2003.
- (31) Andreoni V., Colombo M., Colombo A., Vecchio A., Finoli C. Cadmium and zinc removal by growing cells of *Pseudomonas putida* strain B14 isolated from a metal-impacted soil. *Annals of Microbiology* 2003; 53: 135- 48.
- (32) Maiers DT., Wichlacz PL., Thompson D.L., Bruhn DF. Selenate reduction by bacteria from a selenium-rich environment. *Applied and Environmental Microbiology* 1988; 54 (10): 2591- 3.
- (33) Tarangini K. Biosorption of heavy metals using individual and mixed cultures of *Pseudomonas aeruginosa* and *Bacillus subtilis*. [dissertation]. Rourkela, Orissa, India: National Institute of Technology, 2009
- (34) Sarret G., Avoscan L., Carrie`re M., Collins R., Geoffroy N., Carrot F., et al. Chemical forms of selenium in the metal-resistant bacterium *Ralstonia metallidurans* CH34 exposed to selenite and selenate. *Applied and Environmental Microbiology* 2005; 71 (5): 2331- 7.
- (35) Mortazavi S., Rezaee A., Khavanin A., Varmazyar S., Jafarzadeh M. Removal of mercuric chloride by a mercury resistant *Pseudomonas putida* strain. *Journal of Biological Sciences* 2005; 5 (3): 269- 73.
- (36) Junlian Q., Lei W., XiaoHua F., GuangHong Z. Comparative study on the Ni²⁺ biosorption capacity and properties of living and dead *Pseudomonas putida* cells. *Iranian Journal of Chemistry & Chemical*

Engineering-International English Edition
2010; 28 (1): 159- 67.

- (37) Mane PC., Bhosle AB., Vishwakarma CV., Tupkar LG. Effect of pretreatment of algal biomass on bioadsorption of manganese. *International Journal of Engineering Science and Technology* 2010; 2 (12): 7550- 4.

-
- 1- Modified Luria-bertani agar
 - 2- Minimum Inhibitory Concentration
 - 3- Minimum Bactericidal Concentration
 - 4- mg/ gdw
 - 5- Metal Removal Efficiency
 - 6- ANOVA
 - 7- SPSS
 - 8- Chi-Square
 - 9- Forward
 - 10- Reverse
 - 11- OD
 - 12- Primary enrichment culture method
 - 13- Ghosh
 - 14- Lampis
 - 15- Sabaty
 - 16- Abd-Elnaby
 - 17- Siddique
 - 18- Yilmaz
 - 19- Amin
 - 20- Telly Dalir
 - 21- Andreoni
 - 22- Maiers
 - 23- Halttunen
 - 24- Doughney
 - 25- Tarangini
 - 26- Sarret
 - 27- Mortazavi
 - 28- Junlian
 - 29- Ebrahimipour

Screening and identification of efficient strain in selenium oxyanions sorption in order to biological wastewater treatment

Fatemeh Yaghoobizadeh *

M.Sc. of Microbiology, Shahid Chamran University of Ahwaz, Iran, f_yaghoobizadeh@yahoo.com

Mohammad Roayaei Ardekani

Professor of Microbiology, Shahid Chamran University of Ahwaz, Iran, roayaei_m@yahoo.com

Hossein Zolgharnein

Assistant Professor of Biotechnology, Khurramshahr University of Marine Science and Technology, Khurramshahr, Iran, zolgharnein@kmsu.ac.ir

Abstract

Introduction: Selenium is an element with antioxidant activities that plays roles in thyroid hormone homeostasis, immunity and also fertility. Nevertheless, selenium toxicity (selenosis) causes problems for humans such as abnormalities of the nervous system, gastrointestinal problems and hair loss. Thus, this study was performed with the aim of bacterial biosorbent isolation in order to remove selenium contaminant from wastewater.

Materials and methods: In this research, at first using modified Luria- Bertani agar (mLBA) medium with certain concentration of sodium selenate salt, isolation of bacterial isolates was done from three collected wastewater and sludge samples from Khuzestan industrial factories. After determination of minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC), the sorption capacity and the percentage of metal removal efficiency (%RE) were investigated by atomic absorption spectrophotometer using metabolically active and inactive samples belonging to an efficient isolate. Identification was performed by morphological, biochemical and molecular methods.

Results: Among 73 attained bacterial isolates at the first stage, 8 selenate oxyanion resistant isolates were gathered. Among these, AMS1-S8 isolate with MIC= 600mM and MBC= 1200 mM were selected for more studies. Attained results in sorption mechanism determination stage showed that the sorption capacity in metabolically active sample is more than the inactive samples. Based on the identification results, it is revealed that this isolate belongs to the *Enterobacter* genus. This isolate is deposited as accession JQ965667 in the GeneBank database.

Discussion and conclusion: The results showed that active biomass of selected isolate, have most sorption capacity and %RE and among the other isolates, have high partial resistance against selenate. Therefore, it can be a relatively ideal option for the bioremediation of polluted environments.

Key words: Selenium, Toxicity, Screening, Biosorbent

* Corresponding author

Received: March 12, 2014 / **Accepted:** December 31, 2014