محیط‌شناسی، سال سی و سوم، شماره ۴۱، بهار ۱۳۸۶، صفحه ۳۲-۱۷

جداسازی باکتری‌های نمک دوست نسبی مقاوم به تلوریت از مناطق مختلف ایران و اثر شوری و نمک‌های سلنیوم بر روی این مقاومت

محمد علی آموزگار[۱]*

مراحم آشنگرف[۲]، فریدون ملک‌زاده[۳]

۱- استادیار بخش میکروبیولوژی پردیس علوم دانشگاه تهران

۲- دانشجوی کارشناسی ارشد زیست‌شناسی پردیس علوم

۳- استادیار زیست‌شناسی پردیس علوم دانشگاه تهران

(تاریخ دریافت: ۱۳۸٤/۰۳/۰۳، تاریخ تصویب: ۱۳۸۵/۰۲/۰۵)

چکیده

میکروارگانیسم‌های نمک دوست نقش مهمی در تبدیل زیستی و یا پاکسازی زیستی ترکیبات سمی فلزی در محیط‌های طبیعی ایفاء می‌کنند و شناسایی سویه‌های تحمل‌پذیر به غلظت‌های بالای این ترکیبات مرحله نخست در استفاده از این میکروارگانیسم‌ها در فرآیندهای پاکسازی زیستی است. در این راستا در یکسری آزمایش‌های غربالگری تعداد ۹۰ سویه باکتریایی از محیط‌های مختلف (خاک‌های شور یا پرشور، آب‌های شور یا پرشور و پساب کارخانه‌ها) در ایران جدا گردید. در میان این سویه‌ها ۴۹ سویه نمک دوست نسبی و ۴۱ سویه تحمل‌کننده نمک بودند. مقاومت ذاتی این سویه‌ها نسبت به اکسی‌آنیون سمی پتاسیم تلوریت تعیین شد. میزان مقاومت این سویه‌ها بین ۰/۱ تا ۱۶ میلی مولار بود. روش رقت در آگار برای تعیین تحمل‌پذیری این باکتری‌ها نسبت به آکسی آنیون سمی مورد استفاده قرار گرفت. حداقل غلظت مهار کننده رشد (MIC) برای این اکسی‌آنیون سمی در دمای ۳۴ درجه سانتیگراد و زمان گرماگذاری ۷ روز تعیین شد. براساس تعیین MIC، سویه CHW1 (تحمل‌کننده نمک) و دو سویه QW5 و QW6 (نمک دوست نسبی) بالاترین مقاومت را نسبت به پتاسیم تلوریت نشان دادند که به ترتیب ۱۶، ۱۰ و ۱۲ میلی مولار بود. آثار شوری (۱/۵ w/v NaCl، ۱۰ و ۱۵ درصد) و غلظت‌های مختلف نمک‌های سلنیوم (۵، ۱۰، ۲۰، ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ میلی مولار) روی سمیت تلوریت تعیین شد. با افزایش غلظت نمک سدیم کلراید از ۱ به ۱۰ درصد، میزان MIC تلوریت در سویه‌های نمک دوست نسبی QW5 و QW6 افزایش یافت در حالی که در سویه تحمل‌کننده CHW1 میزان MIC کاهش یافت. هنگامی که پتاسیم تلوریت در ترکیب با سدیم سلنیت استفاده شد، در سویه‌های نمک دوست نسبی QW5 و QW6 میزان MIC تلوریت افزایش یافته در حالی که در سویه تحمل‌کننده CHW1 میزان MIC تلوریت به شدت کاهش پیدا کرد.

کلید واژه

آکسی‌آنیون، پاکسازی زیستی، تلوریت، سلنیت، نمک دوست.

سرآغاز

مسئله آلودگی محیط‌زیست به وسیله فلزات و اکسی‌آنیون‌های سمی از معضلات توسعه صنایع در سال‌های اخیر به شمار می‌رود، از جمله چنین اکسی‌آنیون‌های سمی مخاطره‌آمیز ترکیبات تلوریوم بالاخص تلوریت می‌باشد.

اکسی‌آنیون سمی تلوریت در محیط‌های طبیعی بندرت یافت می‌شود اما به دلیل استفاده بی‌رویه از این ترکیبات در صنایع مختلف از جمله صنایع پتروشیمی، متالوژی، الکترونیک و صنایع دیگر این ترکیب سمی در خاک‌ها و آب‌های آلوده به پساب‌های این کارخانه‌ها به وفور یافت می‌شود (Jobling & Ritchie, 1987).

تلوریت پتاسیم از اکسیدانت‌های قوی بوده و دارای آثار زیست‌محیطی فراوانی می‌باشد. این اکسی‌آنیون سمی هم برای سلول‌های پستانداران (Wagner et al., 1995) و هم برای میکروارگانیسم‌ها (Turner, 2001) در غلظت‌های بسیار پایین حدود ۴ میکرو مولار به شدت سمی می‌باشد.

سمیت تلورِیت پتاسیم بر روی سلول‌های باکتریایی، در باکتری‌های مختلف مطالعه گردیده و مشخص شده که این اکسی‌آنیون باعث اکسیداسیون گروه‌های تیولی موجود در سلول، توقف سنتز DNA، توقف سنتز پروتئین، توقف سنتز آنزیم‌های ردوکتازی سلولی و درنهایت، منجر به مرگ سلول باکتری می‌شود.

تلوریت دارای آثار حاد و مزمن فراوانی بر روی انسان و سایر پستانداران می‌باشد. از آثار سمی حائز اهمیت تلوریت بر روی انسان می‌توان به توقف سنتز آنزیم مهم و کلیدی در چرخه بیوسنتز کلسترول (Squalene monooxygenase) اشاره نمود. در نتیجه توقف این

* نویسندهٔ مسئول، تلفن: ۶۱۱۱۲۶۲۲-۰۲۱

e-mail: alampze@yahoo.com

آنزیم، غلاف میلین سلول‌های عصبی از بین می‌رود.

شناسایی میکروارگانیسم‌های مقاوم و تحمل آنها به غلظت‌های بالاتر اکسی‌آنیون‌های سمی قدم اول در جهت شناسایی توان میکروارگانیسم‌هایی است که قادر به پاکسازی محیط‌زیست می‌باشند و می‌توانند ما را به انتخاب سویه برتر جهت حذف این ترکیبات سمی کمک کنند (Trvors et al., 1985; Burton et al., 1987).

در این میان میکروارگانیسم‌های نمک دوست گزینه‌های مناسبی هست چون این میکروارگانیسم‌ها به طور طبیعی به غلظت‌های بالای آنیونی و کاتیونی برای رشد نیاز دارند در حالی که میکروارگانیسم‌های معمولی این توانایی را ندارند و نه تنها اثر سمی این ترکیبات در این میکروارگانیسم‌ها لحاظ می‌باشد بلکه بالا رفتن غلظت نمک این ترکیبات سمی نیز اثر مهاری بر رشد این میکروارگانیسم‌ها دارد در حالی که این مورد را در باکتری‌های نمک دوست مشاهده نمی‌کنیم.

در سال‌های گذشته مقاومت به فلزات سنگین در میکروارگانیسم‌های نمک دوست به ویژه در جنس هالوموناس مورد مطالعه قرار گرفته است (Ventosa et al., 1998; Nieto et al., 1989)، اما مطالعات نسبتاً کمی در زمینه مقاومت به اکسی‌آنیون‌های فلزی و شبه فلزی در باکتری‌های نمک دوست صورت گرفته که می‌توان از مطالعه Souza و همکارانش (۲۰۰۱)، در رابطه با شناسایی سویه‌های متعلق به جنس هالوموناس دارای مقاومت بالا نسبت به اکسی‌آنیون سمی سلنات، مطالعه Chad و همکارانش (۱۹۹۹) در رابطه با مقاومت بالا نسبت به اکسی‌آنیون سمی تلوریت در آرکی Natronococcus occultus و مطالعه Rathgeber و همکارانش (۲۰۰۲) در رابطه با سویه‌های متحمل‌کننده نمک مقاوم به اکسی‌آنیون‌های سمی تلوریت و سلنیت نام برد.

در این مطالعه برای اولین بار تحمل‌پذیری نسبت به اکسی‌آنیون سمی تلوریت در ۹۰ سویه باکتری جدا شده از مناطق مختلف ایران، اثر غلظت‌های مختلف سدیم کلراید و اثر نمک‌های سلنیوم بر روی مقاومت این سویه‌ها نسبت به اکسی‌آنیون سمی پتاسیم تلوریت (K_2TeO_3) مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

سویه‌ها و شرایط کشت

۴۹ سویه باکتری نمک دوست نسبی و ۴۱ سویه باکتری متحمل‌کننده نمک از مناطق مختلف (خاک‌های شور یا پرشور، آب‌های شور یا پرشور و پساب کارخانه‌ها) در ایران جدا گردید. این نمونه‌ها از قم، قشم، جزیره خارک، گرمسار، چرمشهر – ورامین، دریاچه حوض سلطان قم، دریاچه مهارلو فارس، دریاچه بختگان فارس، پساب کارخانه‌های چرمشهر – ورامین و پساب کارخانه نساجی مرینوس قم جمع‌آوری شده بودند.

تمام سویه‌ها در یک نوترینت برات نمکی (مرک) که غلظت نهایی نمک آن ۱۰۰ گرم در لیتر بود، رشد داده شدند. ترکیب محلول نمکی به صورت زیر بود (گرم در لیتر):

NaCl,81; MgCl2,7; CaCl2,0.36; KCl,2; NaHCO3,0.06; NaBr,0.026 (Nieto et al.,1989).

در موارد لزوم برای جامد کردن محیط کشت به آن ۱۵ گرم در لیتر آگار اضافه شد. PH محیط کشت قبل از اتوکلاو کردن به وسیله NaOH یک نرمال به ۷/۳ رسانده شد.

تشخیص سویه‌های جدا شده

ویژگی‌های مورفولوژیکی و فیزیولوژی در نوترینت برات یا آگار حاوی ۱۰ درصد سدیم کلراید مورد بررسی قرار گرفت. رنگ‌آمیزی گرم با استفاده از روش Burke انجام شد و به وسیله تست KOH تأیید شد (Baron&Fingold, 1990). تست حرکت با استفاده از روش قطره معلق و رنگ‌آمیزی فلاژل انجام شد (Murray et al., 1994). تست‌های کاتالاز، فعالیت اوره آز، احیای نیترات، هیدرولیز اسکولین، متیل رد، وژپروسکوئر و تولید اندول به وسیله روش Simbert,Krieg (1994) انجام شد.

هیدرولیز توئین ۲۰ و ۸۰ به وسیله روش Harrigan,McCance (1976) انجام شد. تولید اسید از کربوهیدرات‌ها، مصرف منابع کربنی و نیتروژنی با استفاده از روش پیشنهادی Ventosa و همکارانش (۱۹۸۲) انجام گرفت.

تست‌های حساسیت به آنتی‌بیوتیک‌ها بر روی محیط مولر هینتون آگار حاوی ۱۰ درصد NaCl که به وسیله سوسپانسیون باکتری تلقیح شده بود انجام شد. پلیت‌ها در دمای ۳۴ درجه سانتیگراد برای ۴۸ ساعت گرماگذاری شدند و قطر هاله‌ها با توجه به جدول کارخانه سازنده دیسک‌ها مورد تفسیر قرار گرفت.

رشد در دماهای مختلف (۵ تا ۵۵ درجه سانتیگراد) و pH های مختلف (۵ تا ۱۱) تعیین گردید. برای pH بالاتر از ۶ از بافر تریس و برای pH پایین‌تر از ۶ از بافر استات سدیم استفاده شد. سایر تست‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی انجام شده به وسیله روش‌های پیشنهادی قبلی انجام شد (Mata et al., 2002, Quasada et al., 1984, Vantosa et al., 1982).

مواد شیمیایی

برای آزمایش‌های انجام شده در این پژوهش از انواع ترکیبات شیمیایی به ویژه اکسی‌آنیون‌های سمی استفاده شده است. اکسی‌آنیون سمی تلوریت پتاسیم و سلنیت سدیم از شرکت مرک (E.Merck,AG,

جدول شمارهٔ ۱– مناطق جداسازی باکتری‌های نمک دوست و تحمل‌کننده نمک و مقاومت آنها به تلوریت

محل جداسازی	تعداد سویه‌های جدا شده	تعداد سویه‌های نمک دوست نسبی	تعداد سویه‌های تحمل‌پذیر نمک	ماکزیمم و مینیمم مقاومت نسبت به تلورِیت (برحسب میلی مولار)
قم (۲۳ درصد، نمک اشباع)	۱۱	۶	۵	۰/۱ تا ۶
گرمسار (۲۵ درصد، خاک پرشور)	۸	۵	۳	۰/۵ تا ۷
قشم (۱۷ درصد، خاک شور)	۶	۴	۲	۰/۴ تا ۳
خارک (۱۶ درصد، خاک شور)	۷	۵	۲	۱ تا ۶
چرمشهر (۲۳ درصد، خاک پرشور)	۸	۲	۶	۰/۱ تا ۶
کرج (۵ درصد، خاک شور)	۷	۲	۵	۰/۱ تا ۰/۵
دریاچه قم (۲۷ درصد، نمک اشباع)	۶	۴	۲	۱ تا ۶
دریاچه بختگان (۲۵ درصد، نمک اشباع)	۵	۳	۲	۰/۵ تا ۴
دریاچه مهارلو (۱۷ درصد، نمک)	۵	۲	۳	۱ تا ۲
پساب – مرینوس قم	۱۲	۸	۴	۲ تا ۱۲
پساب ورامین (۱/۶ درصد نمک)	۱۵	۸	۷	۰/۲ تا ۱۶

Darmstadt,Germany) و اکسی‌آنیون سمی سلنات سدیم از شرکت سیگما تهیه شد (St.Louis,Mo.U.S.A).

محلول‌های استوک در آب مقطر تهیه شد و با پالایش از طریق پالایه‌های غشایی (میلی‌پور) با قطر سوراخ ۰/۲۲ میکرونی استریل شده، محلول‌های اکسی‌آنیونی برای ۵ روز در یخچال ۴ درجه سانتیگراد قرار داده شد.

آزمایش تعیین مقاومت به اکسی‌آنیون سمی تلوریت پتاسیم

برای آزمایش تعیین میزان مقاومت به اکسی‌آنیون سمی تلوریت از روش رقت در آگار استفاده شد (Washington et al., 1980). به ارلن‌های ۱۰۰ میلی‌لیتری حاوی ۲۰ میلیمتر از نوترینت آگار ذوب شده دارای نمک سدیم کلراید، تراکم خاصی از اکسی‌آنیون سمی تلوریت اضافه شده و سپس داخل پلیت‌های شیشه‌ای به قطر ۸ سانتیمتر ریخته شد. میزان تراکم استفاده شده برای اکسی‌آنیون سمی پتاسیم تلوریت بر حسب میلی مولار عبارت بود از: ۰/۱، ۴/۲، ۵/۰، ۰/۰، ۱، ۲، ۳، ۴، ۵، ۶، ۷، ۸، ۹، ۱۰، ۱۱، ۱۲، ۱۳، ۱۴، ۱۵، ۱۶، ۱۷، ۱۸، ۱۹ و ۲۰.

پلیت‌های آگاردار در دمای ۴۰ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ دقیقه قرار گرفتند تا سطح مرطوب آنها خشک شود و سپس به وسیله سمپلر، ۱۰ میکرو لیتر از محیط مایع که میکروب مورد نظر در آن رشد کرده (رشد لگاریتمی) بود و تراکم آن برابر ۰/۵ مک‌فارلند بود بر روی محیط آگاردار قرار گرفت (میکروب تلقیح شده $۱/۵\times۱۰^{۸}$) پلیت‌ها پس از گرماگذاری در ۳۴ درجه سانتیگراد در ساعت‌های ۲۴، ۴۸، ۹۶، ۱۲۰، ۱۴۶ و ۱۷۰ مورد مطالعه قرار گرفتند. پایین‌ترین تراکمی از اکسی‌آنیون که کاملاً مانع از رشد باکتری می‌گشت MIC نامیده شد. MIC برای همه سویه‌ها سه بار متوالی مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج

جداسازی سویه‌های باکتریایی نمک دوست با مقاومت بالا به اکسی‌آنیون سمی پتاسیم تلوریت

در یکسری آزمایشات غربالگری ۹۰ سویه باکتری از مناطق مختلف (خاک‌های شور، آب‌های شور یا پرشور و پساب کارخانه‌ها) در ایران جدا شد که براساس واکنش گرم ۳۹ سویه کروی شکل گرم مثبت، ۳۲ سویه میله‌ای شکل گرم منفی و ۱۹ سویه جزء باکتری‌های میله‌ای شکل گرم مثبت بودند.

از میان این سویه‌ها، ۴۹ سویه نمک دوست نسبی و ۴۱ سویه متحمل‌کننده نمک بودند. میزان تحمل‌پذیری به نمک سدیم کلراید در این سویه‌های جدا شده بین ۰ تا ۳۰ درصد تعیین شد.

مقاومت ذاتی تمام این سویه‌ها نسبت به اکسی‌آنیون سمی پتاسیم تلوریت در محیط کشت حاوی (w/v) ۱۰ درصد سدیم کلراید مورد بررسی قرار گرفت. میزان مقاومت این سویه‌ها بین ۰/۱ تا ۱۶ میلی مولار بود (نتایج به طور خلاصه در جدول شمارهٔ ۱ آورده شده است).

در بین سویه‌های جدا شده سه سویه CHW1 (جدا شده از پساب کارخانه‌های چرمشهر – ورامین)، QW5 و QW6 (جدا شده از پساب کارخانه نساجی مرینوس قم) بالاترین مقاومت را نسبت به اکسی‌آنیون تلوریت نشان دادند که به ترتیب ۱۶، ۱۰ و ۱۲ میلی مولار بود.

جدول شمارهٔ ۲– ویژگی‌های اصلی باکتری‌های نمک دوست نسبی و یا متحمل‌کننده نمک بومی ایران

ویژگی	سویهٔ CHW1	سویهٔ QW5	سویهٔ QW6
شکل ظاهری	کوکوس گرم مثبت	باسیل گرم منفی	کوکوس گرم مثبت
تولید رنگدانه	سفید رنگ	کرم رنگ	نارنجی رنگ
حرکت	–	+	–
اکسیداز	–	+	+
بی‌هوازی اختیاری	+	+	–
احیای نیترات	+	+	+
رشد در ۰ درصد نمک	+	–	–
رشد در ۱ درصد نمک	+	+	+
رشد در ۲۵ درصد نمک	+	–	+
بهینهٔ رشد در نمک	۱ ٪	۵ ٪	۵ تا ۱۰ ٪
محدوده pH	۵ تا ۱۱	۶ تا ۱۱	۵/۵ تا ۱۰/۵
بهینهٔ رشد در pH	۶	۷	۷ تا ۸
محدوده دما	۱۰ تا ۴۵ درجه	۱۰ تا ۴۵ درجه	۱۰ تا ۵۰ درجه
تولید اسید از:			
گلوکز	+	+	+
مانوز	–	+	+
آرابینوز	–	+	+ضعیف
سوکروز	–	+	+
هیدرولیز:			
کازئین	–	+	–
توئین ۲۰	–	+	+ضعیف
ژلاتین	–	+	–

مطالعات فنوتیپی گسترده بر روی این سه سویه انجام شده که نتایج به طور خلاصه در (جدول شمارهٔ ۲) آورده شده است.

براســاس مطالعات فنوتیپی و مقایســه ویژگی‌های این باکتری‌ها با سایر باکتری‌های نمک دوست شناخته شده می‌توان به طور موقت سویه CHW1 را در جنس Staphylococcus، ســویه QW5 را در جنس Halomonas و سویه QW6 را در جنس سالینی کوکوس طبقه‌بندی کرد.

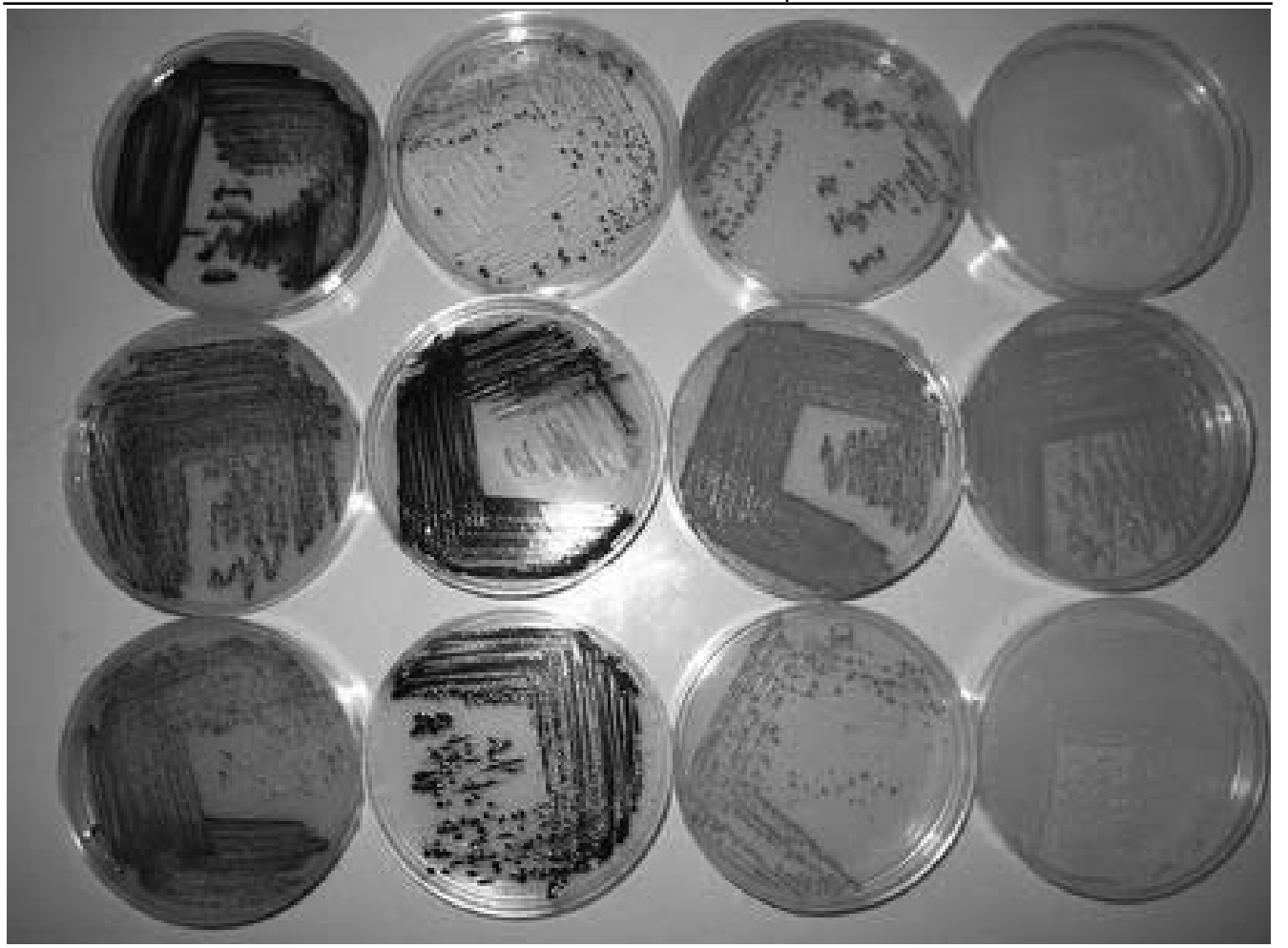
تأکید می‌شــود که این ســه ســویه نه فقط توانایی تحمل تلورِیت، ســلنیت و ســلنات را داشــتند بلکه توانایی احیای این اکســی‌آنیون‌ها را هم دارا بودند. احیای تلوریت و ســلنیت به وسیله این باکتری‌ها با ایجاد کلنی‌های ســیاه و قرمز روی پلیت‌های آگاردار قابل تشــخیص است که دلیل آن تجمع کریستال‌های داخل سلولی تلوریوم عنصری سیاه رنگ و ســلنیوم عنصری قرمز رنگ است (Rathgeber et al., 2002). نتایج در شکل شمارهٔ ۱ نشان داده شده است.

شکل شمارهٔ ۱: A کلنی سویه CHW1، B کلنی سویه QW6، C کلنی سویه QW5، به ترتیب از راست به چپ محیط نوترینت آگار دارای ۱۰ درصد سدیم کلراید محیط نوترینت آگار نمکی دارای ۴۰ میلی مولار ســدیم ســلنیت، محیط نوترینت آگار نمکی دارای ۵ میلی مولار پتاسیم تلوریت، محیط نوترینت آگار نمکی دارای ۲۰ میلی مولار ســدیم سلنیت و ۱۰ میلی مولار پتاسیم تلوریت.

اثر غلظت‌های سدیم کلراید روی MIC پتاسیم تلوریت

اثر غلظت‌های مختلف سدیم کلراید (w/v ۱، ۵، ۱۰و ۱۵ درصد) روی مقاومت به اکســی‌آنیون ســمی تلوریت در سویه‌های CHW1،QW5 و QW6 مورد بررســی قرار گرفت (نتایج در شــکل شمارهٔ ۲ نشان داده شده است).

در سویه CHW1 با افزایش غلظت سدیم کلراید از ۱ به ۱۰ درصد میــزان MIC تلوریت از ۲۲ به ۱۶ میلی مولار کاهش یافته در حالی که در سویه QW5 با افزایش غلظت سدیم کلراید از ۱ به ۱۰ درصد میزان MIC تلوریت از ۴ به ۱۰ میلی مولار افزایش می‌یابد. در ســویه QW6 با افزایش غلظت سدیم کلراید از ۱ به ۱۰ درصد میزان MIC تلوریت از ۶ به ۱۲ میلی مولار افزایش می‌یابد.



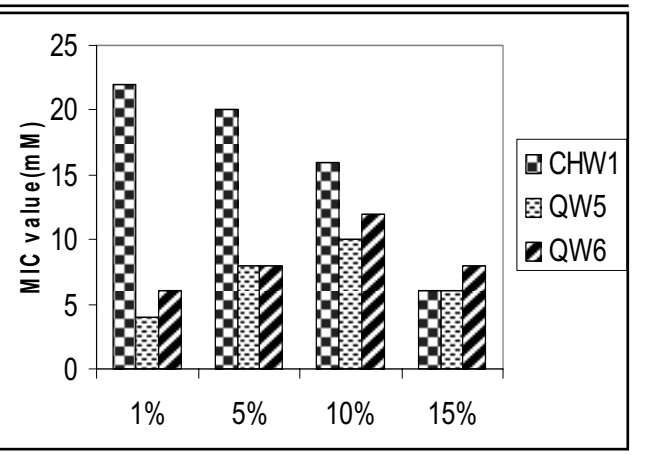
شکل شمارهٔ ۱– A کلنی سویه CHW1، B کلنی سویه QW6، C کلنی سویه QW5، به ترتیب از راست به چپ محیط نوترینت آگار دارای ۱۰ درصد سدیم کلراید محیط نوترینت آگار نمکی دارای ۴۰ میلی مولار سدیم سلنیت، محیط نوترینت آگار نمکی دارای ۵ میلی مولار پتاسیم تلوریت، محیط نوترینت آگار نمکی دارای ۲۰ میلی مولار سدیم سلنیت و ۱۰ میلی مولار پتاسیم تلوریت

اثر غلظت‌های نمک‌های سلنیوم روی MIC پتاسیم تلوریت

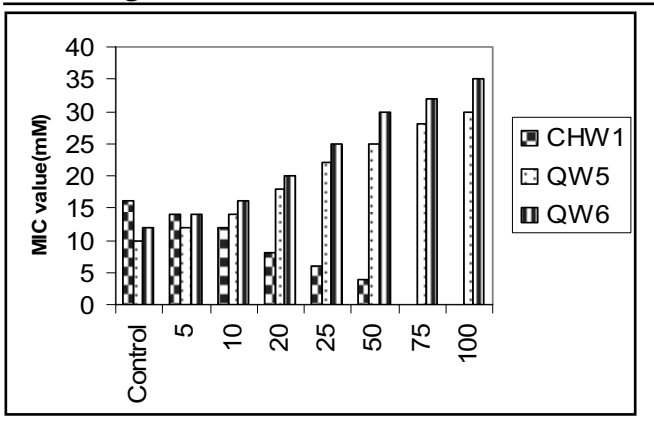
اثر غلظت‌های مختلف اکسی‌آنیون‌های سمی سدیم سلنیت و سدیم سلنات (۵، ۱۰، ۲۰، ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ میلی مولار) روی مقاومت به اکسی‌آنیون سمی تلوریت در سویه‌های CHW1،QW5 و QW6 در محیط کشت دارای ۱۰ درصد سدیم کلراید مورد بررسی قرار گرفت (نتایج در شکل‌های شمارهٔ ۳ و ۴ نشان داده شده است). در سویه‌های QW5 و QW6 با افزایش غلظت سدیم سلنیت به ۱۰۰ میلی مولار میزان MIC تلوریت از ۱۰ به ۳۰ میلی مولار در سویه QW5 و از ۱۲ به ۳۵ میلی مولار در سویه QW6 افزایش می‌یابد. این در حالی است که در سویه CHW1 با افزایش غلظت سدیم سلنیت به ۱۰۰ میلی مولار میزان MIC از ۱۶ میلی مولار به صفر کاهش می‌یابد. در مورد آثار غلظت‌های مختلف سدیم سلنات، در سویه CHW1، با افزایش غلظت سدیم سلنات به ۱۰۰ میلی مولار میزان MIC تلوریت از ۱۶ به ۴۰ میلی مولار افزایش می‌یابد. این در حالی است که در سویه QW5 با افزایش غلظت سدیم سلنات به ۱۰۰ میلی مولار میزان MIC تلوریت از ۱۰ میلی مولار به صفر کاهش می‌یابد و در سویه QW6 با افزایش غلظت سدیم سلنات به ۱۰۰ میلی مولار MIC تلوریت از ۱۲ به ۶ میلی مولار کاهش پیدا می‌کند.

بحث و نتیجه‌گیری

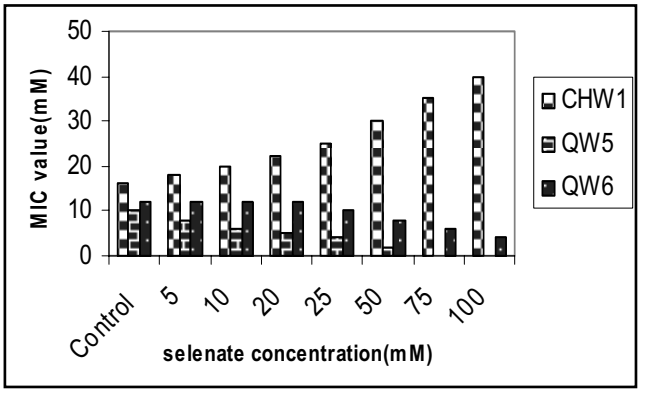
باکتری‌های نمک دوست نسبی و متحمل‌کننده نمک گروه متنوعی را متشکل از جنس‌های مختلف تشکیل داده‌اند که در محدوده وسیعی از غلظت‌های نمک می‌توانند رشد کنند (Ventosa et al., 1998) و در مناطق بسیار شور یا شور در خاک و آب وجود دارند. امروزه اطلاعات در زمینه اکولوژی و فیزیولوژی نمک دوست‌های نسبی تا حدی در دسترس است. به منظور بررسی نقش اکولوژیکی این گروه از باکتری‌ها در پاکسازی زیستی فلزات سمی از محیط، برای اولین بار مطالعه روی مقاومت به اکسی‌آنیون سمی تلوریت در این گروه از میکروارگانیسم‌ها صورت گرفت.



شکل شمارهٔ ۲– الگوی مقاومت به اکسی‌آنیون سمی پتاسیم تلوریت (برحسب MIC) در سه سویه باکتری نمک دوست نسبی در محیط کشت شامل NaCl ۱، ۵، ۱۰ و ۱۵ درصد



شکل شمارهٔ ۳– الگوی مقاومت به اکسی‌آنیون سمی پتاسیم تلوریت (برحسب MIC) در سه سویه باکتری نمک دوست نسبی در محیط کشت شامل ۵، ۱۰، ۲۰، ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ میلی مولار سدیم سلنیت



شکل شمارهٔ ۴– الگوی مقاومت به اکسی‌آنیون سمی پتاسیم تلوریت (برحسب MIC) در سه سویه باکتری نمک دوست نسبی در محیط کشت شامل ۵، ۱۰، ۲۰، ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ میلی مولار سدیم سلنات

در طی مطالعه بر روی ۹۰ باکتری (۴۹ سویه نمک دوست نسبی و ۴۱ سویه متحمل‌کننده نمک) بومی ایران و ارزیابی مقاومت این باکتری‌ها به اکسی‌آنیون سمی تلوریت، دو سویه نمک دوست نسبی QW5 و QW6 جدا شده از پساب کارخانه نساجی مرینوس قم و سویه متحمل‌کننده نمک CHW1 جدا شده از پساب کارخانه‌های چرمشهر ورامین مقاومت بسیار بالایی را نسبت به اکسی‌آنیون سمی تلوریت نشان دادند که به ترتیب برای سویه QW6، QW5 و CHW1 ۱۰، ۱۲ و ۱۶ میلی مولار بود. براساس مطالعات فنوتیپی انجام شده، سویه CHW1 در جنس Staphylococcus، سویه QW5 در جنس Halomonas و سویه QW6 در جنس Salinicoccus قرار داده شدند.

تنها مطالعه‌ای که بر روی میکروارگانیسم‌های نمک دوست انجام شده توسط Chad و همکارانش (۱۹۹۹)، در یک آرکی نمک دوست به نام Natronococcus occultus است که مقاومت ۱۰ میلی مولار را گزارش دادند. در قسمت دیگری از این کار پژوهشی اثر غلظت‌های مختلف سدیم کلراید (w/v ۱، ۵، ۱۰و ۱۵ درصد) روی مقاومت به پتاسیم تلوریت در این سویه‌ها مورد بررسی قرار گرفت (شکل شمارهٔ ۲).

هنگامی که غلظت سدیم کلراید از ۱ به ۱۰ درصد افزایش یافت تحمل سویه‌های نمک دوست نسبی QW5 و QW6 به اکسی‌آنیون سمی تلوریت افزایش یافت در حالی که در سویه تحمل‌کننده نمک CHW1 این مقاومت کاهش یافت.در قسمت دیگری از این کار پژوهشی برای اولین بار اثر توأم دو اکسی‌آنیون سمی در رشد و تحمل‌پذیری این باکتری‌ها مورد مطالعه قرار گرفته است.

زمانی که سدیم سلنیت همراه پتاسیم تلوریت استفاده می‌شود تحمل‌پذیری سویه‌های QW5 و QW6 به شدت افزایش می‌یابد و مقاومت به پتاسیم تلوریت به ۳۰ و ۳۵ میلی مولار به ترتیب برای سویه‌های QW5 و QW6 می‌رسد در حالی که مقاومت در سویه CHW1 به صفر میلی مولار کاهش می‌یابد.

زمانی که سدیم سلنات همراه پتاسیم تلوریت استفاده می‌شود تحمل‌پذیری سویه‌های QW5 و QW6 به شدت کاهش می‌یابد و مقاومت به پتاسیم تلوریت به ۰ و ۶ میلی مولار به ترتیب برای سویه‌های QW5 و QW6 می‌رسد در حالی که مقاومت در سویه CHW1 به ۴۰ میلی مولار افزایش می‌یابد. با توجه به اینکه مقاومت به اکسی‌آنیون‌های سمی تلوریت، سلنیت و سلنات در سویه‌های مورد مطالعه همراه با احیای این ترکیبات بوده است تصور می‌رود همان آنزیم ردوکتازی که برای احیای تلوریت به کار می‌رود برای احیای سلنیت و سلنات هم مورد استفاده قرار گیرد و سلنیت و سلنات می‌توانند اثر القایی بر روی فعالیت آنزیم داشته باشند.

افزایش فعالیت‌های صنعتی به طور روزافزون سبب افزایش فلزات و اکسی‌آنیون‌های سمی در محیط‌های آبی، خاکی و اتمسفر شده است که

سبب آلایندگی شـدید در محیطزیست شده است. بر این اساس مطالعه بر روی میکروارگانیســم‌هایی که در پاکسازی زیستی این ترکیبات نقش دارند اهمیت فراوانی پیدا کرده است و در این میان گزینه اول در پاکسازی زیستی انتخاب میکروارگانیسم‌های مقاوم به این ترکیبات سمی است.

باکتری‌های نمک دوســت با توجه به انتشار فراوان، پایداری زیاد در شرایط سخت محیطی و با توجه به مقاومت بالا همراه با احیاء نسبت به برخی اکسی‌آنیون‌های ســمی مانند تلوریت، سلنیت و سلنات که در این مطالعه نشــان دادند، میکروارگانیسم‌هایی مناسب برای مطالعه بیشتر در زمینه پاکسازی زیستی هستند.

منابع مورد استفاده

Baron, E. J. , Finegold, S. M. 1990. Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology.8th edn, St. Louis: Mosby.

Burton, G., A. , et al.1987. High incidence of selenite-resistant bacteria from a site polluted with selenium. Applied and Environmental Microbiology 53, 185-188.

Chad,T.P., jablonski, P.E. 1999.High-level intrinsic resistance of Natronococcus occultus to potassium tellurite .FEMS Microbiology.Lett.174:19-23.

Harrigan,W. F., McCance, M. E. 1976. Laboratory methods in Food and Dairy Microbiology. London: Academic press.

Jobling, M.G., Ritchie D.A. 1987. Genetic and physical analysis of plasmid genes expressing inducible resistance of tellurite in Escerichia coli .Mol Gen Genet .208:288-293.

Mata,j.A., et al. 2002. A dtailed phenotypic characterization of the type strains of Halomonas species. System.Appl.Microbiol.25:360-375.

Murray, R. G. E., Doetsch, R. N. , Robinow, C. F. 1994. Determinative and cytological light microscopy. In Methods for General and Molecular Bacteriology, pp. 21-41. Edited by P. Gerhardt, R. G. E. Murray, W. A. Wood & N. R. Krieg. Washington, DC: American Society for Microbiology.

Nieto, J. J., et al. 1989. Survey of metal tolerance in moderately halophilic eubacteria. Applied and Environmental Microbiology 55, 2385-2390

Quesada, E., et al. 1984. Deleya halophila, a new species of moderately halophilic bacteria. Int J Syst Bacteriol 40, 261-267.

Rathgeber, C., et al. 2002. Isolation of tellurite- and selenite-resistant bacteria from hydrotermal vents of the Juan de Fuca Ridge in the pacific ocean. Applied and Environmental Microbiology 68, 4613-4622.

Smibert, R. M. Krieg, N. R. 1994. Phenotypic characterization. In Methods for general and Molecular Bacteriology, pp. 607-654. Edited by P. Gerhardt, R. G. E. Murray, W. A. Wood & N. R. Krieg. Washington, DC: American Society for Microbiology.

Souza, M. P., et al. 2001. Identification and characterization of bacteria in a selenium contaminated hypersaline evaporation pond Applied and Environmental Microbiology 67, 3785-3794.

Trevors, J. T., Oddie, K. M. , Belliveau, B. H. 1985. Metal resistance in bacteria. FEMS Microbiology Review 32, 39-54.

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

Ventosa, A., Nieto, J. J. , Oren, A. 1998. Biology of moderately halophilic aerobic bacteria. Microbiology and Molecular Biology Review 62, 504-544.

Ventosa, A., et al.1982. Numerical taxonomy of moderately halophilic Gram-negative rods. J Gen Microbiol 128, 1959-1968.

Wagner,M.,Towes,A.D., Morell,p. 1995.Tellurium blocks cholesterol synthesis by inhibiting seualene metabolism:preferential vulanerability to this metabolic block leads to peripheral nerous system demyelination .J.Neurochem.57:1891-1901

Washington, J. A. , 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.