ORIGINAL ARTICLE

Study of Selenate- resistant Bacteria Isolated from Industrial Wastewaters

Mohaddeseh Khalilian[1],
MohammadReza Zolfaghari[2],
Mohammad Soleimani[2]

[1] MSc in Microbiology, Department of Microbiology, Faculty of basic Sciences, Qom Branch, Islamic Azad University, Qom Branch, Qom, Iran
[2] Assistant Professor, Department of Microbiology, Faculty of basic Sciences, Qom Branch, Islamic Azad University, Qom Branch, Qom, Iran

(Received February 25, 2013 ; Accepted Jul 26 , 2014)

Abstract

Background and purpose: Selenium is important as a key trace element which is required by most organisms in biology. Despite its importance in cellular functions, high concentrations of selenium, particularly in the forms of selenate and selenite are highly toxic. Therefore, it is necessary to perform biogeochemical studies and develop strategies for the effective control of toxic oxyanion of selenate in the environment.

Material and Methods: In this study, 30 strains were isolated from industrial wastewater in Qom Province using the enrichment culture technique and direct plating on agar. MIC of sodium selenite was measured by agar dilution method and also, antibiogram test was performed for resistant strains

Results: Bacterial strains designated QW_4 and QW_{184} (Qom Wastewater Number 4 and 184) exhibited very high MIC values (760 and 700, respectively) for toxic oxyanion of selenate. Conventional biochemical tests and 16S rRNA studies identified QW_4 and QW_{184} as *Proteus hauseri* (FR733709-1) and *Escherichia coli* (AJ567606). These two bacterial strains were resistant to some antibiotics.

Conclusion: Enrichment culture technique was found to be more useful than direct plating on agar for isolation of selenate resistant bacteria. QW_4 and QW_{184} could be used for bioremediation of contaminated sites.

Keywords: MIC, selenium, selenate, resistant bacteria.

J Mazandaran Univ Med Sci 2014; 24(116): 132-140 (Persian).

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و چهارم شماره ۱۱۶ شهریور سال ۱۳۹۳ (۱۴۰-۱۳۲)

بررسی مقاومت به سلنات توسط باکتری های جدا شده از پساب‌های صنعتی

محدثه خلیلیان[۱]
محمدرضا ذوالفقاری[۲]
محمد سلیمانی[۲]

چکیده

سابقه و هدف: سلنیوم در بیولوژی به عنوان یک عنصر کمیاب اصلی و مورد نیاز برای بیش‌تر ارگانیسم‌ها با اهمیت می‌باشد اما برخلاف اهمیت آن در عملکرد سلولی، غلظت‌های بالای سلنیوم به ویژه در فرم‌های سلنات و سلنیت به طور حاد سمی است. بنابراین، یک نیاز را برای مطالعه بیوژئوشیمی و گسترش استراتژی‌ها جهت کنترل مؤثر اکسی آنیون سمی سلنات در محیط برانگیخته است.

مواد و روش ها: در این مطالعه، ۳۰ سویه باکتری از نمونه‌های پساب صنایع در استان قم با استفاده از روش غنی‌سازی و نیز کشت مستقیم در محیط جامد جداسازی شد. MIC سلنات سدیم با استفاده از روش رقت در آگارو نیز آزمایش آنتی‌بیوگرام در سویه‌های مقاوم انجام شد.

یافته ها: سویه های باکتریایی جدا شده با عنوان QW_4 و QW_{184} (Qom Wastewater Number 4 and 184) به ترتیب سویه QW_4 و QW_{184} به عنوان *Proteus hauseri*(FR733709-1) و *Escherichia* coli(AJ567606) شناسایی گردیدند. هم چنین، این دو سویه نسبت به برخی از آنتی‌بیوتیک‌ها مقاومت نشان دادند.

استنتاج: نتایج این پژوهش نشان داد که به منظورجداسازی باکتری های مقاوم به سلنات،روش غنی سازی در مقایسه با روش کشت مستقیم، بهتر است. دو سویه QW_4 و QW_{184} می‌توانند کاندیدی برای پالایش زیستی مکان‌های آلوده باشند.

واژه های کلیدی: سلنیوم، سلنات، باکتری های مقاوم

مقدمه

رشد سریع صنعت و فناوری‌های جدید، تنوع وسیعی از آلودگی‌های فیزیکی، شیمیایی، بیولوژیکی و رادیواکتیویته را در ارتباط با فلزات سنگین دربرداشته است. زمانی که مقدار فلزات سنگین از حد معینی در محیط افزایش یابد، اثرات زیان آور را به طرق مختلف روی سیستم‌های بیولوژیک اعمال می‌کند. از جمله اثرات مضر این نوع فلزات، اثر روی متابولیسم میکروبی است که در نهایت منجر به اختلال و کاهش فعالیت جمعیت میکروبی در سیستم‌های آبی و خاکی می‌گردد. با توجه به این که میکروارگانیسم‌ها در فرآیندهای

مولف مسئول: محمدرضا ذوالفقاری، استادیار، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قم، گروه میکروبیولوژی، قم، ایران
E-mail: mreza.zolfaghary@gmail.com
۱. کارشناسی ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قم،گروه میکروبیولوژی، قم، ایران
۲. استادیار، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قم، گروه میکروبیولوژی، قم، ایران
تاریخ دریافت :۱۳۹۲/۱۲/۶ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۱۳۹۳/۲/۱۰ تاریخ تصویب : ۱۳۹۳/۵/۴

اکولوژیکی نقش دارند، بنابراین آن‌چه اهمیت دارد، هشدار مجامع علمی و تحقیقاتی نسبت به اثرات سوء این فلزات برای انسان و سایر موجودات است(۱).

سلنیوم در سال ۱۸۱۷ میلادی توسط JonsJakob Berzelius کشف شد که در صنعت، کاربردهای فراوانی نظیر براق کننده در آب‌کاری فلزات، افزایش چکش خواری، فرآیندهای استخراج وفرآوری نفت دارد. هم چنین، این عنصر در تولید رنگ، شیشه های رنگی، نساجی و رنگرزی به کار می رود(۲، ۳). غلظت سلنیوم در آب ها به طور طبیعی ۰/۰۱ mg/l است اما غلظت آن در آب‌های زه کشی شده کشاورزی اغلب ۱۴۰µg/l- ۱۴۰۰ می‌باشد و حتی در برخی از مکان‌ها تا ۴۲۰۰µg/l هم می رسد(۴). غلظت ماکزیمم سلنیوم در ایران (استان سیستان و بلوچستان) ۹/۹ µg/l گزارش شد که پایین‌تر از حد استاندارد WHO (۱۰µg/l) بود(۵). کمبود سلنیوم در انسان و جانوران بیماری هایی از قبیل تحلیل عضلات، کاهش لوکوسیت‌ها و نکروز کبدی ایجاد می‌کند(۴). در سال های اخیر مشخص شده است که آنتی اکسیدانت هایی نظیر ویتامین E و سلنیوم دارای خصوصیات ضد سرطانی و حفاظت در برابر پرتوهای یون زا می‌باشند(۶). در واقع، سلنیوم در بیولوژی به عنوان یک عنصر کمیاب اصلی و مورد نیاز برای بیش‌تر ارگانیسم ها با اهمیت است اما برخلاف اهمیت آن در عملکرد سلولی، غلظت‌های بالای سلنیوم، سلنات و سلنیت به طور حاد سمی می‌باشد(۷).

روش‌های فیزیکوشیمیایی مثل پرسیپتاسیون شیمیایی، احیای کاتالیتیک و تبادل یونی برای حذف سلنات از پساب های صنعتی مؤثرنیستند. هم چنین، این روش‌ها پرهزینه بوده و حذف این ترکیبات سمی توسط باکتری‌ها به عنوان یک راه حل بیولوژیک، ارزان قیمت می‌باشد(۸). پالایش زیستی(Bioremediation) به عنوان فرآیندی تعریف می‌شود که پساب‌های آلی به طور بیولوژیکی تحت شرایط کنترل شده، تجزیه می‌شوند که به طور طبیعی توسط باکتری‌ها، قارچ ها و گیاهان انجام می گیرد(۹). کنترل و بهینه‌سازی فرآیندهای پالایش زیستی، یک سیستم کمپلکسی از تعدادی فاکتورها نظیروجود توانایی جمعیت میکروبی در تجزیه آلوده‌کننده‌ها، دسترسی آلوده کننده ها برای جمعیت میکروبی و فاکتورهای محیطی است(۹، ۱۰).

امروزه چهار تغییر زیستی برای سلنیوم شناخته شده است که شامل احیا، اکسیداسیون، متیلاسیون و دمتیلاسیون می‌باشد. برای مثال میکروارگانیسم ها قادرند سلنات را به عنوان پذیرنده نهایی الکترون در چرخه متابولیسم انرژی خود احیا کنند (احیای تجزیه‌ای) یا این که سلنات را احیا کرده و سلنیوم را وارد ترکیبات آلی خود نمایند (احیای جذبی)(۴). احیای آنزیماتیک، افزایش دفع و کاهش جذب اکسی آنیون و رسوب دهی خارج سلولی از جمله روش‌های مقاومت باکتری ها در مقابل این اکسی آنیون سمی می‌باشد که احیای آنزیماتیک سلنات به سلنیوم عنصری مهم‌ترین روش مقاومت است(۱۱، ۱۲). بنابراین هدف از انجام این مطالعه، جداسازی و شناسایی سویه‌های مقاوم به اکسی آنیون سمی سلنات سدیم از پساب‌های صنعتی، تعیین حداقل غلظت مهار کننده رشد این اکسی‌آنیون (MIC) و نیز مطالعه آنتی‌بیوگرام روی سویه‌های برتر جدا شده به دلیل ارتباط بین مقاومت فلزی با مقاومت آنتی‌بیوتیکی بوده است.

مواد و روش ها

موادشیمیایی: محیط های کشت مصرفی از شرکت Merck و اکسی آنیون سمی سلنات سدیم از شرکت Alfaesar آلمان خریداری شدند. محلول‌های استوک تهیه شده درآب مقطر بااستفاده از فیلترهای غشایی (میلی پور) با قطر منفذ ۰/۲۲ µm استریل گشت. محلول‌های فلزی حداکثر برای ۵ روز در یخچال (۴ درجه سانتی‌گراد) نگهداری شدند.

نمونه‌گیری از پساب کارخانه‌های رنگرزی ماهرنگ، خوشرنگ، ایران مرینوس، رنگ‌سازی عارف، نساجی الیاف گلریز و پتوی لاله مهرگان در استان قم توسط ظروف شیشه ای دهانه گشاد استریل ۲۵۰میلی لیتری انجام شد (سر ظروف نمونه‌گیری باید تا ۳ سانتی‌متر خالی بماند). بعد از یادداشت دما، اسیدیته، تاریخ و محل نمونه‌گیری، نمونه ها در فلاسک یخ گذاشته شده و در کم‌ترین زمان ممکن، به آزمایشگاه منتقل شدند.

جداسازی باکتری های مقاوم به سلنات: در این مطالعه، ۳۰ سویه باکتری با استفاده از روش غنی‌سازی و نیز کشت مستقیم در محیط جامد (Direct plating on agar) در شرایط هوازی از تیرتا آبان سال ۱۳۹۰ جداسازی شد. در روش غنی‌سازی ۱ میلی‌لیتراز هر نمونه پساب صنعتی در شرایط استریل برداشته و به ۹ میلی‌لیتر محیط کشت لوریا برتانی براث (Luria Bertani broth) واجد ۱۰ میلی‌مولار سلنات سدیم اضافه شد. محیط ها به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۴ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شدند. سپس ۰/۱ میلی‌لیتر از محیط فوق را برداشته و در محیط کشت LB آگار به صورت سطحی کشت داده و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۴ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شد. در نهایت از کلنی‌های تشکیل شده، کشت خالص تهیه گشت. در روش کشت مستقیم از هر نمونه پساب صنعتی ۱ میلی‌لیتر در شرایط استریل برداشت نموده و رقت‌های متوالی 10^{-1} تا 10^{-6} در لوله‌های آزمایش حاوی ۹ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی استریل تهیه شد. ۱ میلی لیتر ازنمونه های رقیق شده از لوله‌های با رقت 10^{-4} تا 10^{-6} برداشته و در محیط LB آگار حاوی ۱۰ میلی مولار سلنات سدیم کشت سطحی داده و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۴ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شد. سپس از کلنی‌های حاصل، کشت خالص تهیه گردید. اسیدیته محیط قبل از اتوکلاو در ۰/۲ ± ۷/۲ تنظیم شد(۱۱، ۱۳). ویژگی‌های مورفولوژیکی و فیزیولوژیک (واکنش گرم، تست حرکت، تولیداندول، کاتالاز، اکسیداز، فعالیت اوره آز، وجود آنزیم فنیل آلانین دآمیناز و لیزین دکربوکسیلاز، احیای نیترات، متیل رد ووژزپروسکوئر) دو سویه برتر براساس مقاومت بالا نسبت به سلنات سدیم روی محیط نوترینت آگار مطالعه شد(۱۴، ۱۵). هیدرولیز DNA روی محیط Deoxyribonuclease Test Agar با استفاده از کلریدریک اسید ۱/۰درصد، تولید اسید از کربوهیدرات ها، مصرف منابع کربنی و منابع نیتروژنی نیز مورد بررسی قرار گرفت(۱۶).

رشد در محیط کشت نوترینت براث در دماهای مختلف ۱۵، ۲۰، ۲۵، ۳۰، ۳۵، ۴۰، ۴۵، ۵۰ درجه سانتی‌گراد،اسیدیته ۰/۲ ± ۷/۲ و سرعت تکان ۱۵۰ دور در دقیقه بررسی شد. رشد درمحدوده اسیدیته بین ۵تا۱۰/۵ در دمای ۳۴ درجه سانتی‌گراد و سرعت تکان ۱۵۰ دور در دقیقه مطالعه شد. تنظیم اسیدیته با استفاده از بافر تریس و بافر استات سدیم صورت گرفت. رشد در محیط کشت نوترینت براث با درصدهای مختلف نمک کلرید سدیم (۰-۳۰ درصد) در دمای ۳۴ درجه سانتی‌گراد، اسیدیته ۰/۲ ± ۷/۲ و سرعت تکان ۱۵۰ دور در دقیقه نیز مورد مطالعه قرار گرفت. رشد باکتری‌ها از طریق تراکم نوری (OD) و با استفاده از اسپکتروفتومتر Jenway 6505 UV/Vis در طول موج ۶۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شد(۱۷). برای تعیین هویت دقیق سویه‌های برتر براساس مقاومت بالا نسبت به سلنات سدیم، تعیین توالی 16S rRNA انجام شد. پس از استخراج DNA ژنومی با استفاده از کیت استخراج DNA شرکت سیناژن (ایران)، ژن 16S rRNA سویه ها با کمک پرایمرهای یونی ورسال باکتریایی-'5) AGAGTTTGATYMTGGCTCAG- 3')8Forwardو 1541 Reverse (5'-AAGGA GGTGA TCCA GCCG CA-3') تکثیر شد. واکنش PCR به همراه کنترل منفی با برنامه حرارتی شامل دناتوراسیون آغازی در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه برای یک سیکل، دناتوراسیون در دمای ۹۵درجه سانتی‌گراد به مدت ۱

دقیقه، اتصال پرایمرها در دمای ۶۶/۶ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه، تکثیر در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد، در مدت ۱ دقیقه به تعداد ۴۰ سیکل و تکثیر نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. در مرحله بعد، محصول PCR روی ژل آگارز ۲درصد الکتروفورز و پس از رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید، در دستگاه ژل داک بررسی گردید. محصول PCR مربوط به دو سویه جدا شده با استفاده از کیت شرکت بایونیر خالص‌سازی و سپس برای تعیین ترادف ارسال شد. پس از دریافت فایل مربوطه، ابتدا سکانس ها توسط نرم‌افزار CLC sequence viewer version 6.5.1 اصلاح گردید و با استفاده از پایگاه Ribosomal database project موقعیت فیلوژنتیک سویه های جدا شده تعیین شد.

مطالعه مقاومت آنتی‌بیوتیکی: دیسک های آنتی‌بیوتیکی پنی‌سیلین (P_{10})، آمپی سیلین (AM_{10})، سفالوتین (CF_{30})، سفازولین (CZ_{30})، استرپتومایسین (S_{10})، جنتامایسین (GM_{10})، کلرامفنیکل (C_{30})، تتراسایکلین (T_{30})، اریترومایسین(E_{15})،تری متوپریم سولفامتوکسازول (SXT)، نالیدیکسیک اسید (NA_{30})، سیپروفلوکساسین (CP_5)، ونکومایسین (V_{30}) و پلی میگزین B استفاده شد. برای آزمایش آنتی‌بیوگرام، با استفاده از سواب استریل از سوسپانسیون باکتری (برابر با ۰/۵ مک فارلند) برداشته وبر روی محیط مولر هینتون آگار کشت انبوه داده شد. پس از گذاشتن دیسک های آنتی‌بیوتیکی در فواصل مشخص، پلیت‌ها در دمای ۳۴ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت گرماگذاری شدند و قطر هاله‌ها با توجه به جدول کارخانه سازنده دیسک‌ها (شرکت پادتن طب) مورد تفسیر قرار گرفت(۱۷).

آزمایش تعیین مقاومت به اکسی‌آنیون سمی سلنات: به منظور سنجش مقاومت سویه های باکتریایی جدا شده از روش رقت در آگار استفاده شد(۱۸). به ارلن‌های ۱۰۰ میلی‌لیتری حاوی ۲۵ میلی‌لیتر از محیط لوریا برتانی آگار ذوب شده، غلظت خاصی از فلز (۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰، ۴۰۰، ۵۰۰، ۶۰۰، ۷۰۰ و ۷۶۰ میلی‌مولار) اضافه شد. سپس ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری مورد نظر (کدورتی برابر با کدورت لوله ۰/۵ مک فارلند) برداشت نموده و بر روی محیط کشت LB آگار حاوی فلز، کشت سطحی داده شد. پلیت‌ها در دمای۳۴ درجه سانتی گرادگرما گذاری شده و درساعت‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ مورد مطالعه قرار گرفتند. پایین‌ترین غلظتی از فلز که کاملاً مانع رشد باکتری می‌گردد، MIC (حداقل غلظت مهار کننده رشد) نامیده شد. MIC برای تمام سویه ها در سه بار متوالی صورت گرفت(۱۱، ۱۹).

یافته ها

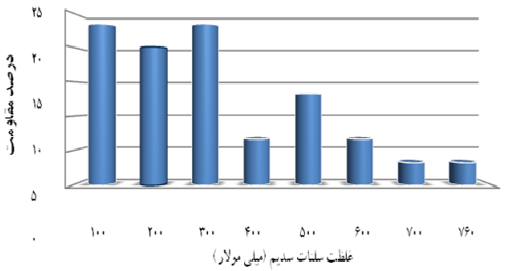
۳۰ سویه باکتری مقاوم به سلنات سدیم از پساب کارخانه‌های صنعتی استان قم جدا شد. محدوده مقاومت سویه‌ها نسبت به سلنات سدیم بین ۱۰۰ تا ۷۶۰ میلی‌مولار بود که سویه‌های جدا شده با عنوان QW_4[1] و QW_{184}[2] به ترتیب در محیط لوریا برتانی آگار حاوی ۷۶۰ و ۷۰۰ میلی‌مولار سلنات سدیم، بالاترین میزان مقاومت را نشان دادند. از بین ۳۰ سویه ی جدا شده ۲۳/۳، ۲۰، ۲۳/۳، ۶/۷، ۱۳/۳، ۶/۷، ۳/۳ و ۳/۳ درصد سویه‌ها به ترتیب در محیط کشت لوریا برتانی آگار حاوی غلظت‌های ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰، ۴۰۰، ۵۰۰، ۶۰۰، ۷۰۰ و ۷۶۰ میلی‌مولار سلنات سدیم قادر به رشد بودند (نمودار شماره ۱).

هم چنین، سویه های جدا شده علاوه بر تحمل اکسی آنیون سمی سلنات، توانایی احیای آن را نیز داشتند که نتیجه آن ایجاد کلنی قرمز رنگ حاصل از احیای سلنات به سلنیوم عنصری در محیط لوریا برتانی آگار بود(۱۹).

بنابراین، دو سویه QW_4 و QW_{184} به عنوان سویه‌های برتر انتخاب شدند که جدول شماره ۱

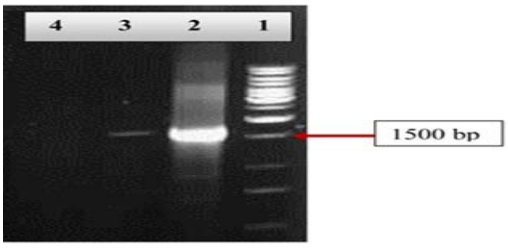
1- QW4: Qom Wastewater Number 4
2- QW184: Qom Wastewater Number 184

ویژگی‌های مورفولوژیک، فیزیولوژیک، بیوشیمیایی و متابولیسمی این سویه ها را نشان می‌دهد. در کنار مطالعات فنوتیپی، بر اساس مطالعات 16S rRNA به ترتیب سویه QW_4 و QW_{184} به عنوان *Proteus hauseri* (FR733709-1) و *Escherichia coli* (AJ567606) شناسایی شدند



نمودار شماره ۱: درصد مقاومت ۳۰ سویه جدا شده از پساب های صنعتی نسبت به غلظت های مختلف سلنات سدیم در محیط لوریا برتانی آگار

در تصویر شماره۱، ظهور باند منفرد در منطقه 1.5 Kb تأیید کننده خلوص محصولات PCR نمونه ژنوم مورد نظر برای تعیین توالی است. نمونه تعیین توالی شده توسط سرویس BLAST و سایت اینترنتی NCBI آنالیز گردید که تصاویر شماره۲ و ۳ درخت فیلوژنتیکی ترسیم شده با استفاده از ترادف ژن 16S rRNA سویه‌های برتر و ۱۵ سویه به دست آمده از Genebank رانشان می دهند. همان طور که جدول شماره۲ نشان می‌دهد، سویه‌های QW_4و QW_{184}نسبت به برخی از آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم و برخی دیگر نیمه حساس و حساس هستند.



تصویر شماره ۱: ظهور باند منفرد در منطقه 1.5 Kb

1. Marker 1kb DNA ladder
2. Sample QW_{184}
3. Sample QW_4
4. Negative control

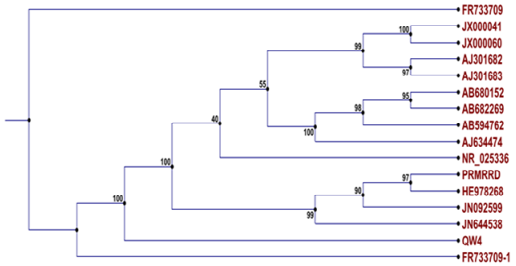
جدول شماره ۱: ویژگی های مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و متابولیسمی سویه های برتر

ویژگی / سویه جدا شده	QW_4	QW_{184}
شکل ظاهری	باسیل	باسیل
واکنش گرم	-	-
پیگمان	کرم	کرم
کاتالاز	+	+
اکسیداز	-	-
حرکت	+	+
تولیداندول	+	+
تولید H_2S	+	-
تست VP	-	-
متیل رد	+	+
سیمون سیترات	-	-
TSI	K/A	A/A+ G
تست OF(برای گلوگز)	+	+
محدوده رشددر درصدNaCl	۳۰-۰	۳۰-۰
بهینه رشد در نمک	۳	۳
محدوده دمایی رشد	۵۰-۱۵	۵۰-۱۵
بهینه رشد در دما	۳۵	۴۰
محدوده اسیدیته رشد	۱۰/۵-۵	۱۰-۵
بهینه رشد در اسیدیته	۷	۶/۵
هیدرولیز:		
ژلاتین	+	-
نشاسته	-	-
کازئین	-	-
فعالیت آنزیمی:		
DNase	-	
اوره آز	+	-
فنیل آلانین دآمیناز	+	-
لیزین دکربوکسیلاز	+	+
احیای نیترات	+	+
تولید اسید از:		
مانیتول	-	+
D- گلوکز	+	+
لاکتوز	-	+
سالیسین	-	-
سوکروز	+	+
گزیلوز	+	+
گلوکز بی هوازی	-	+
مانیتول بی هوازی	-	+
مصرف منابع کربنی:		
مانیتول	-	+
D- گلوکز	+	+
لاکتوز	+	+
مصرف منابع ازتی:		
L- متیونین	+	-
L- آرژینین	-	+
L- تریپتوفان	-	+
L- لیزین	-	+
L- تیروزین	-	-

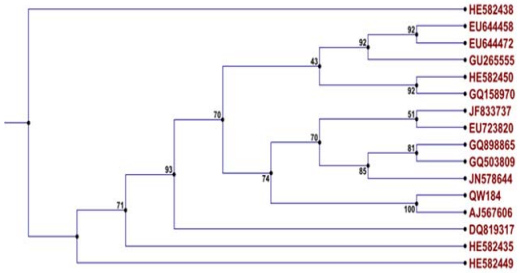
جدول شماره۲: الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی سویه های برتر

Group	Antibiotics	Code	QW_4	QW_{184}
Penicillins	Penicillin Ampicillin	AM_{10} P_{10}	S R	S R
Cephalosporins	Cephalothin Cefazolin	CZ_{30} CF_{30}	R R	I S
Aminoglycosides	Streptomycin Gentamicin	GM_{10} S_{10}	S I	R I
Phenicols	Chloramphenical	C_{30}	I	S
Tetracyclines	Tetracycline	T_{10}	R	S
Macrolides	Erythromycin	E_{15}	R	R
Sulfonamides	Trimethoprim sulfamethoxazol	SXT	S	S
Quinolones	NAlidixic acid Ciprofloxacin	CP_5 NA_{30}	S S	S S
Glycopeptides	Vancomycin	V_{30}	R	R
Others	polymyxin B	PB_{300}	R	R

R: Resistance,**I**: Intermediate,**S**: Sensitive



تصویر شماره ۲: درخت فیلوژنتیکی ترسیم شده با استفاده از ترادف ژن 16S rRNA سویه ی جدا شده ی QW_4 و۱۵ سویه ی بدست آمده از Genebank



تصویر شماره ۳: درخت فیلوژنتیکی ترسیم شده با استفاده از ترادف ژن 16S rRNA سویه جدا شده QW_{184} و۱۵ سویه ی به دست آمده از Genebank

بحث

فلزات سنگین در مقادیر بسیار کم در آب های طبیعی و در غلظت‌های بالا در پساب صنایع وجود دارند. بنابراین مطالعه بر روی میکروارگانیسم هایی که در پاک‌سازی زیستی این ترکیبات نقش دارند، اهمیت فراوانی پیدا کرده است ودر این میان گزینه اول در پاک‌سازی زیستی، انتخاب میکروارگانیسم های مقاوم به این ترکیبات سمی می باشد(۱۱، ۲۰). در سال ۲۰۱۳ ذوالفقاری و همکاران نشان دادند که روش غنی‌سازی موجب جداسازی بهتر باکتری‌های مقاوم می گردد(۱۱). نتایج این تحقیق نیز اثبات نمود که به منظور جداسازی باکتری‌های مقاوم به سلنات، روش غنی‌سازی در مقایسه با روش کشت مستقیم به دلیل بیان ژن‌های مقاومت و سازگاری آن‌ها با شرایط استرس‌زای ناشی از وجود این اکسی آنیون سمی بهتر می باشد. در این مطالعه ۳۰ سویه جدا شده از نظر مقاومت به اکسی‌آنیون سمی سلنات بررسی شدند که محدوده مقاومت آن‌ها نسبت به سلنات سدیم بین ۱۰۰ تا ۷۶۰ میلی مولار گزارش شد. میزان مقاومت دو سویه ی QW_4 و QW_{184} نسبت به سلنات بسیار بالاتر از سویه‌های *Bacillus* sp. SF-1 (۲۰ میلی مولار) (۸)، *Enterobacter cloacae* SLD1a-1 (۱۰ میلی‌مولار) (۲۱)، *Bacillus* sp. STG-83 (۳۲۰ میلی‌مولار)(۲۲)، *Enterobacter cowanii* (۵۵۰ میلی مولار) (۲۳) و *Pseudomonas* sp. CA_5 (۶۴ میلی‌مولار)(۲۴) بود.در این پژوهش برای اولین بار مقاومت بسیار بالای ۷۶۰ میلی مولاری نسبت به سلنات سدیم در Proteus hauseri strain QW_4 جدا شده از پساب کارخانه رنگ سازی عارف گزارش داده شد. MIC ۷۶۰ میلی مولاری نسبت به سلنات سدیم، ۱/۹ برابر MIC گزارش شده توسط آموزگار (منبع) و همکاران (۲۰۰۸) (۴۰۰ میلی مولار) در رابطه با باکتری *Halomonas* sp. strain MAM (۱۷)و ۱/۰۱ برابر

MIC گزارش شده توسط قوش و همکاران (۲۰۰۸) (۷۵۰ میلی مولار) در رابطه با باکتری *Pseudomonas* sp. بود(۲۳). هم چنین، در این تحقیق مشخص شد که باکتری های QW_4 strain *Proteus hauseri* و *Escherichia coli* strain QW_{184} توانایی احیای سلنات سمی را به سلنیوم غیر سمی دارند.

در پایان می‌توان نتیجه‌گیری کرد که سویه‌های QW_4 و QW_{184} به دلیل مقاومت بسیار بالا همراه با احیای اکسی آنیون سمی سلنات می توانند کاندید مناسبی برای پاک‌سازی زیستی پساب‌های صنعتی باشند و در آینده‌ای نزدیک می‌توان با بررسی میزان حذف سلنات توسط این سویه ها و نیز ردیابی ژن‌های مقاوم، گامی مؤثر برای حفظ سلامت محیط زیست برداشت.

References

1. Hu H. Human health and heavy metals exposure. Life support: the environment and human health MIT Press, Cambridge 2002; 65-82.
2. Montes RA. The Bacterial Toxicity of Selenocyanate and the Incorporation of Tellurium and Selenium in Bacterial Cells, and the Synthesis and Biosynthesis of Cadmium Telluride Nanoparticles and Their Elemental Quantification Via ICP-AES: Sam Houston State University 2012; 1-26.
3. Klonowska A, Heulin T, Vermeglio A. Selenite and tellurite reduction by *Shewanella oneidensis*. Appl environ microbiol 2005; 71(9): 5607-9.
4. Dungan RS, Jr WTF. Microbial Transformations of Selenium and the Bioremediation of Seleniferous Environments. Bioremediation J 1999;3(3):171-188.
5. Rajaei Q, Jahantigh H, Mir A, Motlagh SH, Hasanpour M. Evaluation of Concentration of Heavy Metals in Chahnimeh Water Reservoirs of Sistan- va- Baloochestan Province in 2010. J Mazand Uni Med Sci 2012; 22(90): 102-12 (Persian).
6. Abdulah R, Miyazaki K, Nakazawa M, Koyama H. Chemical forms of selenium for cancer prevention. J Trace Elem Med Biol 2005; 19(2): 141-50.
7. He Q, Yao K. Impact of alternative electron acceptors on selenium (IV) reduction by *Anaeromyxobacter dehalogenans*. Bioresour technol 2011; 102(3): 3578-80.
8. Kashiwa M, Nishimoto S, Takahashi K, Ike M, Fujita M. Factors affecting soluble selenium removal by a selenate-reducing bacterium *Bacillus* sp. SF-1. J bioscience and bioengineering 2000;89(6):528-33.
9. Vidali M. Bioremediation. An overview. Pure and Appl Chemistry 2001; 73(7): 1163-72.
10. Gadd GM. Metals, minerals and microbes: geomicrobiology and bioremediation. Microbiology 2010; 156(3):609-43.
11. Zolfaghari MR, Khalilian M. Isolation and Characterization of Selenite Resistant Microorganisms from Industrial Wastewaters. JIlam Uni of Med Sci 2013;21(7): 142-52 (Persian).
12. Zolfaghari MR, Malekzadeh F, Amoozegar MA, Razavi MR. Isolation of a bacterium with a very high resistance to tellurite and chromate from Industrial Wastewater with Special Application in bioremediation, strain KWT2. J Environ Sci Techno 2008;10(1):59-73(Persian).

13. Kafilzadeh F, Mirzaei N, Kargar M. Isolation and identification of mercury resistant bacteria from water and sediments of Kor River, Iran. J microbial world 2009; 1(1):43-50 (Persian).
14. Smibert R, Krieg NR, Gerhardt P, Murray R, Wood WA. Phenotypic Characterization. In: Methods for general and molecular bacteriology, 2th ed. Washington: Philipp Gerhardt, 1994;607-654.
15. Harley JP. Laboratory exercises in microbiology,9th ed. McGraw-Hill Science/ Engineering/ Math, 2004; 38-124.
16. Ventosa A. Halophilic microorganisms. Springer: Verlag Berlin Heidelberg, 2004
17. Amozegar MA, Soudi MR, Malekzadeh F. A highly resistant to toxic oxyanions, *Halomonas* sp. strain MAM. J Sci Uni Tehran 2008;33(1): 5-12(Persian).
18. Washington JA, Sutter VL. Dilution Susceptibility Test: Agar and Macro-Broth Dilution Procedures,3rd ed. American Socfor Microbiol, Washington, DC1980;453-458.
19. Rathgeber C, Yurkova N, Stackebrandt E, Beatty JT, Yurkov V. Isolation of tellurite- and selenite-resistant bacteria from hydrothermal vents of the Juan de Fuca Ridge in the Pacific Ocean. Appl environ microbiol 2002; 68(9): 4613-22.
20. Zazouli MA, Yousefi ZA, Cherati JY, Tabarinia H, Tabarinia F, Adergani BA. Evaluation of L-Cysteine Functionalized Single-Walled Carbon Nanotubes On Mercury Removal from Aqueous Solutions. J Mazand Uni Med Sci 2014; 24(109): 10-21 (Persian).
21. Watts CA, Ridley H, Condie KL, Leaver JT, Richardson DJ, Butler CS. Selenate reduction by *Enterobacter cloacae* SLD1a1 is catalysed by a molybdenumdependent membranebound enzyme that is distinct from the membranebound nitrate reductase. FEMS microbiology letters 2003; 228(2): 273-9.
22. Soudi MR, Ghazvini PTM, Khajeh K, Gharavi S. Bioprocessing of seleno-oxyanions and tellurite in a novel *Bacillus* sp. strain STG-83: A solution to removal of toxic oxyanions in presence of nitrate. J hazard mater 2009;165(1):71-7.
23. Ghosh A, Mohod AM, Paknikar KM, Jain RK. Isolation and characterization of selenite- and selenate- tolerant microorganisms from selenium-contaminated sites. World J Microbiol Biotechnol 2008; 24(8): 1607-11.
24. Hunter WJ, Manter DK. Reduction of selenite to elemental red selenium by *Pseudomonas* sp. strain CA5. Curr microbiol 2009; 58(5): 493-8.