جداسازی و ارزیابی میکروارگانیسم های مقاوم به سلنیت از پساب های صنعتی

محمدرضا ذوالفقاری[1*]، محدثه خلیلیان[1]

۱) گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قم

تاریخ دریافت: ۹۲/٤/۲٤ تاریخ پذیرش: ۹۲/۸/۱۲

چکیده

مقدمه: غلظت های بالای سلنیوم محلول، سلنیت و سلنات برای ارگانیسم های زنده سمی می باشند. تجمع سلنیوم در محیط های معین سبب بیماری های پوست، ریزش مو، دفرمه شدن ناخن ها، پوسیدگی دندان ها، اختلالات روانی، نکروز کبد، کلیه و مرگ سلول در انسان می گردد. بنا بر این، پالایش زیستی به عنوان یک روش موثر پاکسازی مکان های آلوده به سلنیوم مورد مطالعه قرار گرفته است.

مواد و روش ها: در این مطالعه، ۲۶۳ سویه باکتری از نمونه های پساب جمع آوری شده از مکان های آلوده به سلنیوم در استان قم با استفاده از روش غنی سازی و نیز کشت مستقیم در محیط جامد جداسازی گردید. MIC با استفاده از روش رقت در آگار در سویه های مقاوم سنجیده شد و روش دیسک دیفیوژن جهت تعیین مقاومت یا حساسیت این باکتری ها انجام گرفت.

یافته های پژوهش: سویه های باکتریایی QW_{90} و QW_{243} به ترتیب رنج بالایی از MIC ۵۵۰ و۵۰۰ میلی مولاری را نسبت به اکسی آنیون سمی سلنیت نشان دادند. بر اساس تست های متداول بیوشیمیایی و مطالعات 16S rRNA به ترتیب سویه QW_{90} و QW_{243} به عنوان Bacillus sp. AB315f (FRB21125) و Pseudomonas marincola (AF326382) شناسایی گردیدند. هم چنین، این دو سویه نسبت به برخی از آنتی بیوتیک ها مقاومت نشان دادند.

بحث و نتیجه گیری: نتایج این پژوهش نشان داد که استفاده از روش غنی سازی در مقایسه با روش کشت مستقیم، موجب جداسازی بهتر باکتری های مقاوم به سلنیت می گردد. هم چنین، Bacillus sp. strain QW_{90} می تواند کاندیدی برای پالایش زیستی مکان های آلوده باشد.

واژه های کلیدی: MIC، سلنیت، مقاومت، پاکسازی زیستی

*__نویسنده مسئول:__ گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قم

Email: mreza.zolfaghary@gmail.com

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-04]

مقدمه

پیشرفت روز افزون صنایع در دهه اخیر، مهم ترین عامل آلودگی محیط زیست محسوب می شود. پساب های آلوده به فلزات سنگین حتی در حد مجاز زمانی که وارد محیط زیست شوند، تحت تاثیر عوامل مختلف فیزیکی، شیمیایی و میکروبی متراکم شده و آب های سطحی و زیرزمینی را آلوده کرده و اثرات جبران ناپذیری بر محیط زیست وارد می کنند. از این رو مطالعه راه های حذف این آلاینده ها بسیار ضروری می باشد.(۱)

سلنیوم در سال ۱۸۱۷ میلادی توسط Jöns Jakob Berzelius کشف شد. سلنیوم برگرفته از نام Selenon (الهه ماه) می باشد که به دلیل سرخ رنگ بودن و شباهت زیاد به تلوریوم، سلنیوم نامیده شد،(۲،۳). از نظر تغذیه ای، وجود این عنصر در انواع پروتئین های محتوی سلنیوم به نام سلنوسیستئین ضروری می باشد،(۴). سلنیوم در بیولوژی به عنوان عنصر کمیاب، اصلی و مورد نیاز برای بیشتر ارگانیسم ها با اهمیت می باشد اما برخلاف اهمیت آن در عملکرد سلولی، غلظت های بالای سلنیوم به ویژه در فرم های سلنات و سلنیت به طور حاد سمی می باشد و یک نیاز را برای مطالعه بیوژئوشیمی و گسترش استراتژی ها جهت کنترل مؤثر سلنیوم در محیط برانگیخته است.(۵،۶)

وجود سطوح سمی سلنیوم در محیط می تواند هم به منابع طبیعی و هم به منابع مصنوعی نسبت داده شود،(۵). در واقع، فعالیت های انسانی در بیش از ۲۰۰ سال گذشته، محیط زیست را با فلزات سنگین سمی و متالوئیدها آلوده کرده است. پساب های صنعتی، رسوبات فاضلاب و زه کشی کشاورزی، منابع اصلی فرم های سمی مختلف سلنیوم(سلنات Se^{6+}، سلنیت Se^{4+}، سلنید Se^{2-}) می باشند،(۷). تجمع سلنیوم در محیط زیست سبب بیماری های پوستی، ریزش مو، دفرمه شدن ناخن ها، پوسیدگی دندان ها، اختلالات روانی، نکروز کبد، کلیه و مرگ سلول در انسان می گردد،(۲،۸). اگر چه مکانیسم سمیت سلنیت و سلنات شناخته نشده است ولی شواهد زیادی وجود دارد که سمیت را توضیح می دهد. سلنیت به طور مخصوص با گلوتاتیون واکنش داده و تولید سلنودی گلوتاتیون و ترکیبات به شدت سمی H_2O_2 و O_2^- می نماید.(۹)

تاکنون روش های فیزیکی و شیمیایی مثل پرسیپتاسیون شیمیایی، احیای کاتالیتیک و تبادل یونی برای حذف سلنیوم محلول از پساب های صنعتی استفاده شده اند، در حالی که این روش ها برای حذف سلنیت مناسب هستند اما در حذف سلنات مؤثر نمی باشند. علاوه بر این، روش های فیزیکی و شیمیایی، پرهزینه اند و حذف این ترکیبات سمی توسط باکتری ها به عنوان راه حل بیولوژیک، ارزان قیمت می باشد.(۱۰،۱۱)

برخی از سیستم های پاکسازی بیولوژیکی از جمله سیستم حذفی سلنیوم باکتریایی-جلبک، سیستم راکتور با بستری روان همراه با باکتری های احیاکننده سلنات تا به حال گزارش شده اند. این سیستم ها جهت پاکسازی پساب محتوی غلظت های کم سلنیوم محلول(0.3-0.5 mg/l) توسعه یافته اند،(۱۰). بنا بر این، پالایش زیستی(Bioremediation) به عنوان یک روش مؤثر پالایش آب و رسوبات آلوده به سلنیوم مورد مطالعه قرار گرفته است. تعداد کمی از میکروارگانیسم های گزارش شده، این اکسی آنیون های سمی سلنیوم را تحمل و یا احیا می کنند،(۷). پالایش زیستی، کاربردی از سیستم های بیولوژیکی به منظور پاکسازی آلودگی ارگانیک و غیرارگانیک توسط باکتری ها و قارچ ها است و تغییرات میکروبی می توانند پیامد مفید و یا مضر برای جامعه انسانی داشته باشند. در نتیجه، پالایش زیستی به عنوان فرایندی تعریف می شود که پساب های آلی به طور بیولوژیکی تحت شرایط کنترل شده، تجزیه می شوند. کنترل و بهینه سازی فرایندهای پالایش زیستی، یک سیستم کمپلکسی از تعدادی فاکتورها است. این فاکتورها شامل وجود توانایی جمعیت میکروبی در تجزیه آلوده کننده ها، دسترسی آلوده کنندها برای جمعیت میکروبی، فاکتورهای محیطی نظیر نوع خاک، دما، pH، حضور اکسیژن یا سایر پذیرندهای الکترونی و مواد غذایی می باشد.(۱۲)

احیای آنزیماتیک، افزایش دفع و کاهش جذب اکسی آنیون و رسوب دهی خارج سلولی از جمله روش های

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-04]

مقاومت باکتری ها در مقابل این اکسی آنیون سمی می باشد که احیای آنزیماتیک سلنیت به سلنیوم عنصری از جمله مهم ترین روش مقاومت است،(۱۳). در واقع، احیای باکتریایی اکسی آنیون های سمی سلنیوم به سلنیوم عنصری، یکی از پروسه های بیوژئوشیمیایی حذف سلنیوم از پساب و رسوبات می باشد.(۱۴)

بنا بر این، جداسازی و شناسایی سویه های مقاوم به اکسی آنیون سمی سلنیت سدیم، تعیین حداقل غلظت مهار کننده رشد این اکسی آنیون(MIC) و نیز مطالعه آنتی بیوگرام روی سویه های برتر جدا شده به دلیل ارتباط بین مقاومت فلزی با مقاومت آنتی بیوتیکی، هدف از انجام این مطالعه بوده است.

مواد و روش ها

جداسازی باکتری های مقاوم به سلنیت: در این مطالعه، ۲۶۳ سویه باکتری از نمونه های پساب جمع آوری شده از مکان های آلوده به سلنیوم در استان قم با استفاده از روش غنی سازی و نیز کشت مستقیم در محیط جامد(Direct plating on agar) در شرایط هوازی از تیرماه تا آبان ماه سال ۱۳۹۰ جداسازی شد. در روش غنی سازی، ابتدا ۱ میلی لیتر از هر نمونه پساب صنعتی به ۹ میلی لیتر محیط کشت لوریا برتانی براث(Luria–Bertani broth) واجد ۱۰ میلی مولار سلنیت سدیم اضافه گردید و محیط ها به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۴ درجه سانتی گراد گرماگذاری شد. سپس ۰/۱ میلی لیتر از محیط فوق برداشت نموده و در محیط کشت LB آگار به صورت سطحی کشت و گرماگذاری شد. در نهایت، از کلنی های تشکیل شده، کشت خالص تهیه گشت.(۱۵،۱۶)

در روش کشت مستقیم، از هر نمونه پساب صنعتی، ۱ میلی لیتر در شرایط استریل برداشت نموده و رقت های متوالی 10^{-1} تا 10^{-6} در لوله های آزمایش حاوی ۹ میلی لیتر سرم فیزیولوژی استریل تهیه شد. ۱ میلی لیتر از نمونه های رقیق شده از لوله های با رقت 10^{-4} تا 10^{-6} برداشت کرده و در محیط LB آگار حاوی ۱۰ میلی مولار سلنیت سدیم کشت سطحی داده و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۴ درجه سانتی گراد گرماگذاری شد. سپس از کلنی های حاصل، کشت خالص تهیه گردید. pH محیط قبل از اتوکلاو در ۷/۲±۰/۲ تنظیم گردید.(۱۵)

شناسایی سویه های منتخب: ویژگی های مورفولوژیکی و فیزیولوژیک دو سویه منتخب بر اساس مقاومت بالا نسبت به سلنیت سدیم روی محیط نوترینت آگار تعیین شد. واکنش گرم(Burke method)، تست حرکت، کاتالاز، اکسیداز و فعالیت اوره آز، وجود آنزیم فنیل آلانین دآمیناز و لیزین دکربوکسیلاز، احیای نیترات، متیل رد، وژزپروسکوئر و تولید اندول بر اساس روش پیشنهادی (1994) Smibert & Krieg مطالعه گشت. اندوسپورها با رنگ فوشین بازی بر اساس روش Schaeffer-Fulton or Wirtz-Conklin رنگ آمیزی شد،(۱۷،۱۸). هیدرولیز DNA در روی محیط Deoxyribonuclease Test Agar با استفاده از کلریدریک اسید ۰/۱ درصد مورد بررسی قرار گرفت. تولید اسید از کربوهیدرات ها، مصرف منابع کربنی و منابع نیتروژنی توسط دو سویه منتخب مورد بررسی قرار گرفت.(۱۹)

رشد در محیط کشت نوترینت براث در دماهای مختلف ۵۰،۴۵،۴۰،۳۵،۳۰،۲۵،۲۰،۱۵ درجه سانتی گراد، pH=7.2±0.2 و rpm=150 مورد بررسی قرار گرفت. هم چنین، رشد در محدوده pH بین ۵ تا ۱۰/۵ در دمای ۳۴ درجه سانتی گراد و rpm=150 بررسی شد. برای pH بالاتر از ۶ از بافر تریس و pH پایین تر از ۶ از بافر استات سدیم استفاده گشت. رشد در محیط کشت نوترینت براث با درصدهای مختلف نمک کلرید سدیم(NaCl % 30 -0) در دمای ۳۴ درجه سانتی گراد، pH=7.2±0.2 و rpm=150 نیز مورد مطالعه قرار گرفت. رشد باکتری ها از طریق تراکم نوری(OD) و با استفاده از اسپکتروفتومتر Jenway 6505 UV/Vis در طول موج ۶۰۰ نانومتر اندازه گیری شد.(۲۰)

جهت تعیین هویت دقیق سویه های منتخب بر اساس مقاومت بالا نسبت به سلنیت سدیم، تعیین توالی 16S rRNA انجام شد. پس از استخراج DNA ژنومی با استفاده از کیت استخراج DNA شرکت سیناژن، ژن 16S rRNA سویه ها با کمک پرایمرهای یونیورسال باکتریایی تکثیر گشت. توالی پرایمرها به قرار ذیل می باشد:

primer	Nucleotide sequence (5' to 3')
8Forward	(5'-AGAGTTTGATYMTGGCTCAG- 3')
1541Reverse	(5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3')

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-04]

واکنش PCR به همراه کنترل منفی با برنامه حرارتی شامل دناتوراسیون آغازی در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه برای یک سیکل، دناتوراسیون در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد، مدت ۱ دقیقه، اتصال پرایمرها در دمای ۶۶/۶ درجه سانتی گراد، مدت ۱ دقیقه، تکثیر در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد، مدت ۱ دقیقه به تعداد ۴۰ سیکل انجام شد. در نهایت، تکثیر نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه صورت گرفت. در مرحله بعد، محصول PCR روی ژل آگارز ۲ درصد الکتروفورز و پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید، در دستگاه ژل داک بررسی گردید. محصول PCR مربوط به دو سویه جدا شده با استفاده از کیت شرکت بایونیر خالص سازی و سپس برای تعیین ترادف ارسال شد. پس از دریافت فایل مربوطه، ابتدا سکانس ها توسط نرم افزار CLC sequence viewer 6.5.1 version اصلاح گردید و با استفاده از پایگاه Ribosomal database project موقعیت فیلوژنتیک سویه های جدا شده تعیین گردید.

بررسی مقاومت آنتی بیوتیکی: آزمایش آنتی بیوگرام با استفاده از روش استاندارد Kirby-Bauer انجام شد. تست ها بر روی محیط مولر هینتون آگار که به وسیله سوسپانسیون باکتری(برابر با ۰/۵ مک فارلند) تلقیح شده بود، انجام گرفت. پلیت ها در دمای ۳۴ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت گرماگذاری شدند و قطر هاله ها با توجه به جدول کارخانه سازنده دیسک ها مورد تفسیر قرار گرفت.(۲۰،۲۱)

مواد شیمیایی: اکسی آنیون سمی سلنیت سدیم از شرکت Aplichem آلمان تهیه شد. محلول های استوک در آب مقطر تهیه گشته و با فیلتراسیون از طریق فیلترهای غشایی(میلی پور) با قطر منفذ 0.22 µm استریل گشت. محلول های فلزی حداکثر برای ۵ روز در یخچال(۴ درجه سانتی گراد) قرار داده شد.

آزمایش تعیین مقاومت به سلنیت سدیم: برای تعیین مقاومت به اکسی آنیون سمی سلنیت از روش رقت در آگار استفاده شد،(۲۲). به ارلن های ۱۰۰ میلی لیتری حاوی ۲۵ میلی لیتر از محیط لوریا برتانی آگار ذوب شده، غلظت خاصی از فلز(۲۰،۵۰،۸۰،۱۰۰،۲۰۰،۳۰۰،۴۰۰،۵۰۰،۶۰۰ میلی مولار) اضافه گشته و سپس داخل پلیت های شیشه ای به قطر ۸ سانتی متر ریخته شد. پلیت های آگاردار در دمای ۴۰ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ دقیقه قرار گرفت تا سطح مرطوب آن ها خشک شود. سپس به وسیله سمپلر، ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری مورد نظر که کدورتی برابر با کدورت لوله ۰/۵ مک فارلند داشت، برداشت نموده و بر روی محیط کشت LB آگار حاوی فلز، کشت سطحی داده شد. پلیت ها پس از گرماگذاری در دمای ۳۴ درجه سانتی گراد در ساعت های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ مورد مطالعه قرار گرفتند. پایین ترین غلظتی از فلز که کاملاً مانع رشد باکتری می گشت، MIC(حداقل غلظت مهار کننده رشد) نامیده شد. MIC برای تمام سویه ها در سه بار متوالی مورد بررسی قرار گرفت.(۲۳)

یافته های پژوهش

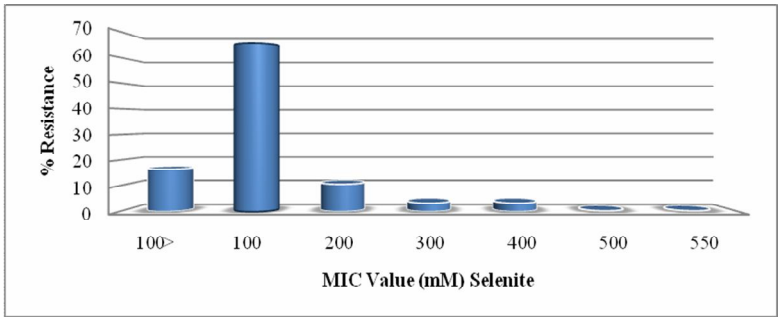
۲۶۳ سویه باکتری مقاوم به سلنیت سدیم از پساب های صنعتی استان قم جدا گردیدند. محدوده مقاومت سویه ها نسبت به سلنیت سدیم بین ۱۰۰< تا ۵۵۰ میلی مولار بود که سویه های QW_{90} و QW_{243} به ترتیب در محیط لوریا برتانی آگار حاوی ۵۵۰ و ۵۰۰ میلی مولار سلنیت سدیم، بالاترین میزان مقاومت را نشان دادند. همان طور که نمودار شماره ۱ نشان می دهد، از بین ۲۶۳ سویه جدا شده، ۱۶/۳۵، ۶۵/۴، ۱۰/۶۵، ۳/۴۲، ۳/۴۲، ۰/۳۸ و ۰/۳۸ درصد سویه ها به ترتیب در محیط کشت لوریا برتانی آگار حاوی غلظت های ۱۰۰<، ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰، ۴۰۰، ۵۰۰ و ۵۵۰ میلی مولار سلنیت سدیم قادر به رشد بودند. هم چنین، سویه های جدا شده علاوه بر تحمل اکسی آنیون سمی سلنیت، توانایی احیای آن را نیز داشتند که نتیجه آن ایجاد رنگ قرمز حاصل از احیای سلنیت به سلنیوم عنصری در محیط لوریا برتانی براث بود،(شکل شماره ۱)(۲۳). بنا بر این، دو سویه QW_{90} و QW_{243} به عنوان سویه های برتر انتخاب شدند که جدول شماره ۱ ویژگی های مورفولوژیک، فیزیولوژیک، بیوشیمیایی و متابولیسمی این سویه ها را نشان می دهد. در کنار مطالعات فنوتیپی و بر اساس مطالعات 16S rRNA به ترتیب سویه QW_{90} و QW_{243} به عنوان *Bacillus sp. AB315f (FRB21125)* و *Pseudomonas marincola (AF326382)* شناسایی شدند. در شکل شماره ۲، ظهور باند منفرد در منطقه ۱/۵ Kb تایید کننده خلوص محصولات PCR نمونه ژنوم مورد نظر برای تعیین توالی می باشد. نمونه

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-04]

تعیین توالی شده توسط سرویس BLAST و سایت اینترنتی NCBI آنالیز گردید که شکل های ۳ و ۴ درخت فیلوژنتیکی ترسیم شده با استفاده از ترادف ژن 16S rRNA سویه های منتخب و ۱۵ سویه به دست آمده از Genebank را نشان می دهند.

مقاومت و یا حساسیت سویه های QW_{90} و W_{243} نسبت به ۱۵ آنتی بیوتیک خریداری شده از شرکت پادتن طب مورد بررسی قرار گرفت و نشان داده شد که این سویه ها نسبت به برخی از آنتی بیوتیک ها مقاوم و برخی دیگر نیمه حساس و حساس می باشند. الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی سویه های منتخب در جدول شماره ۲ نشان داده شده است.

نمودار شماره ۱. درصد مقاومت ۲۶۳ سویه جدا شده از پساب های صنعتی نسبت به غلظت های مختلف سلنیت سدیم در محیط لوریا برتانی آگار



شکل شماره ۱. رشد هوازی سویه های جدا شده در محیط کشت لوریا برتانی براث.
A: محیط LB براث حاوی 100 mM سلنیت سدیم
B: محیط LB براث فاقد سلنیت سدیم.



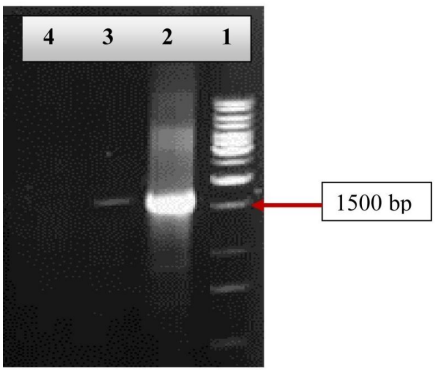
[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-04]

جدول شماره ۱. ویژگی های مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و متابولیسمی سویه های منتخب

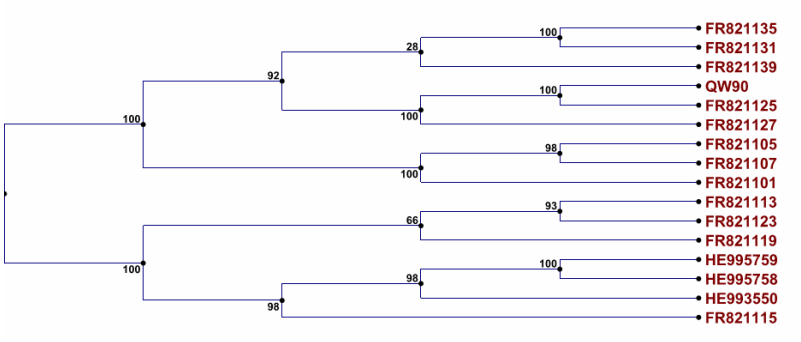
سویه جدا شده ویژگی	QW_{90}	QW_{243}
شکل ظاهری	باسیل	باسیل
واکنش گرم	+	–
شکل	نامنظم	کروی
حاشیه	موج دار	کامل
سطح	صاف	محدب
قوام	لزج	لزج
کدورت	مات	مات
پیگمان	سفید	کرم
تولید اسپور	+	-
اندازه >5mm	+	–
کاتالاز	+	-
اکسیداز	-	+
حرکت	–	+
تولید اندول	-	-
تولید H_2S	-	+
تست VP	-	-
متیل رد	+	-
سیمون سیترات	-	+
TSI	-	K/K
تست OF(برای گلوگز)	+	+
محدوده رشد در NaCl %	۳۰-۰	۳۰-۰
بهینه رشد در نمک	۳	۳
محدوده ی دمایی رشد	۵۰-۲۵	۵۰-۱۵
بهینه رشد در دما	۳۰	۳۰
محدوده ی pH رشد	۱۰/۵-۵	۱۰/۵-۵
بهینه رشد در pH	۷	۶/۵
هیدرولیز:		
ژلاتین	+	-
نشاسته	+	–
کازئین	+	–
فعالیت آنزیمی:		
DNase	+	–
اوره آز	–	–
فنیل آلانین دآمیناز	–	–
لیزین دکربوکسیلاز	+	+
احیای نیترات	+	+
همولیزین	+	-
تولید اسید از:		
مانیتول	–	–
D- گلوکز	–	–
لاکتوز	+	–
سالیسین	+	–
سوکروز	–	–
گزیلوز	–	–
گلوکز بی هوازی	–	–
مانیتول بی هوازی	–	–
مصرف منابع کربن:		
مانیتول	–	–
D- گلوکز	+	–
لاکتوز	–	–
مصرف منابع ازتی:		
L- متیونین	–	–
L- آرژنین	–	+
L- تریپتوفان	–	–
L- لیزین	+	+
L- تیروزین	–	–

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-04]

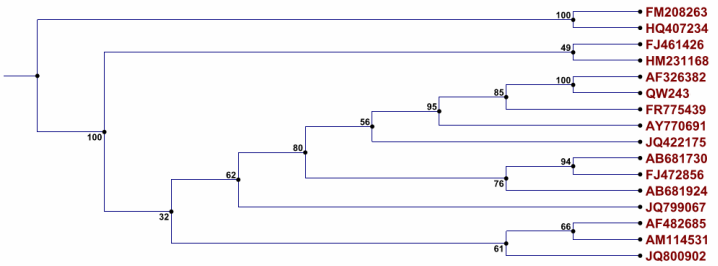
VP: Voges-Proskauer; **TSI:**Triple Sugar Iron; **OF:**Oxidative-fermentative.



شکل شماره ۲. ظهور باند منفرد در منطقه 1.5 Kb لاین ۱ مربوط به DNA مارکر است. لاین ۲ نمونه QW90، لاین ۳ نمونه QW243 و لاین ٤ مربوط به کنترل منفی است.



شکل شماره ۳. درخت فیلوژنتیکی ترسیم شده با استفاده از ترادف ژن 16S rRNA سویه جدا شده QW90 و ۱۵ سویه به دست آمده از Genebank



شکل شماره ٤. درخت فیلوژنتیکی ترسیم شده با استفاده از ترادف ژن 16S rRNA سویه جدا شده QW243 و ۱۵ سویه به دست آمده از Genebank

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-04]

جدول شماره ۲. الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی سویه های منتخب

Group	Antibiotics	Code	QW_{90}	QW_{243}
Penicillins	Penicillin	P_{10}	R	R
	Ampicillin	AM_{10}	S	I
Cephalosporins	Cephalothin	CF_{30}	S	R
	Cefazolin	CZ_{30}	S	R
Aminoglycosides	Streptomycin	S_{10}	I	R
	Gentamicin	GM_{10}	S	S
Phenicols	Chloramphenical	C_{30}	S	R
Tetracyclines	Tetracycline	T_{10}	S	I
Macrolides	Erythromycin	E_{15}	S	R
Sulfonamides	Trimethoprim sulfamethoxazol	SXT	S	I
Quinolones	NAlidixic acid	NA_{30}	I	S
	Ciprofloxacin	CP_5	S	S
Glycopeptides	Vancomycin	V_{30}	S	R
Others	polymyxin B	PB_{300}	-	R

R: Resistance, I: Intermediate, S: Sensitive

بحث و نتیجه گیری

افزایش فعالیت های صنعتی به طور روز افزون سبب ورود بیش از حد فلزات سنگین و اکسی آنیون های سمی در محیط های آبی، خاکی و اتمسفر شده و در نتیجه سبب آلایندگی شدید در محیط زیست می گردد. بنا بر این، مطالعه بر روی میکروارگانیسم هایی که در پاکسازی زیستی این ترکیبات نقش دارند، اهمیت فراوانی پیدا کرده است و در این میان، گزینه اول در پاکسازی زیستی، انتخاب میکروارگانیسم های مقاوم به این ترکیبات سمی می باشد. میکروارگانیسم ها توانایی بالایی در سمیت زدایی اکسی آنیون سمی سلنیت دارند و تنوع زیستی آن ها نیز توجه محققین را در پیدا کردن میکروارگانیسم های جدید با قابلیت های ویژه جلب می کند،(۲۴،۲۵). بنا بر این، معرفی سویه های باکتریایی جدید و شناسایی توانایی آن ها در حذف اکسی آنیون سمی سلنیت هدف این تحقیق بوده است. از آن جایی که مکان های آلوده، منابع اصلی میکروارگانیسم های کارآمد می باشند، بررسی جمعیت میکروبی سازگار شده در چنین زیستگاه هایی از اهمیت به سزایی برخوردار می باشد.(۷،۲۶)

در سال ۲۰۰۹، کفیل زاده و همکاران گزارش نمودند که روش غنی سازی موجب جداسازی بهتر باکتری های مقاوم می شود. هم چنین، باکتری های جداسازی شده با این روش در مراحل بعد، رشد بهتری در حضور فلز نشان می دهند. بنا بر این، غنی سازی موجب بیان ژن های مقاومت به فلز در باکتری ها و سازگاری آن ها با شرایط موجود می گردد. نتایج این پژوهش نیز نشان داد که استفاده از روش غنی سازی در مقایسه با روش کشت مستقیم به دلیل بیان ژن های مقاومت و سازگاری آن ها با شرایط استرس زای ناشی از وجود سلنیت موجب جداسازی بهتر باکتری های مقاوم به این اکسی آنیون می گردد.

در این مطالعه، ۲۶۳ سویه جدا شده از نظر مقاومت به اکسی آنیون سمی سلنیت مورد بررسی قرار گرفت. محدوده مقاومت سویه های جدا شده از پساب های صنعتی نسبت به سلنیت سدیم بین ۱۰۰< تا ۵۵۰ میلی مولار بود که دو سویه QW_{90} و QW_{243} بالاترین میزان مقاومت را نشان دادند. میزان مقاومت سویه های QW_{90} و QW_{243} نسبت به سلنیت بسیار بالاتر از سویه های *Stenotrophomonas maltophilia* SeITE02،(۲۷) *Aeromonas salmonicida* C278،(۲۸) *Halomonas* sp. strain MAM،(۲۰) *Rhizobium* sp. B_1،(۲۹) *Tetrathiobacter*

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-04]

kashmirensis(۳۰)، *Bacillus fusiformis*(۷)، و *Pseudomonas* sp. CA_5(۳۱)، و به ترتیب ۵۵ و ۵۰ برابر بیشتر از *Bacillus cereus* strain CM100B(۳۲)، می باشد. هم چنین، در این تحقیق مشخص شد که باکتری های *Bacillus* sp. *marincola* strain QW_{243} توانایی احیای سلنیت سمی را به سلنیوم غیر سمی دارند.

بسیاری از محققین معتقدند که ژن های مقاومت نسبت به فلزات سنگین و برخی آنتی بیوتیک ها در فواصل نزدیک، بر روی یک پلاسمید حمل می شوند. بنا بر این، احتمال مقاومت هم زمان بین آن ها وجود دارد. به علت شیوع باکتری های پاتوژن مقاوم به آنتی بیوتیک، بیماری های عفونی متفاوتی وجود داشته و درمان نیز بسیار مشکل به نظر می رسد. بنا بر این، نه تنها دقت بیشتری در مصرف آنتی بیوتیک ها باید صورت گیرد، بلکه نیاز است که به سایر آنتی میکروب ها نظیر فلزات سنگین موجود در محیط نیز توجه بیشتری شود.(۱۱)

سویه QW_{243} از بین ۱۵ آنتی بیوتیک بررسی شده، نسبت به ۸ آنتی بیوتیک مقاوم بود. در نتیجه، با توجه به مطالعات انجام شده، محیط های آلوده به املاح فلزی می توانند نقش بسیار مهمی در بروز، بقا و انتقال مقاومت به آنتی بیوتیک ها در باکتری ها داشته باشند.(۳۳)

با توجه به مقاومت بسیار بالا همراه با احیای اکسی آنیون سمی سلنیت می توان امیدوار بود که سویه QW_{90} کاندید مناسبی جهت پاکسازی زیستی پساب های صنعتی باشد و در آینده ای نزدیک، با بررسی و ردیابی ژن های مقاوم در سویه معرفی شده، گامی موثر در جهت حفظ سلامت محیط زیست برداشت.

References

1-Zolfaghary MR, Soleimani M, Maso-udikhah M. Study of chromate resistance and reduction by bacterial isolates of Qom industrial wastewater with potential use in green remediation. J Microb Biotechnol 2011;3:13-22.

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.

3-Lenz M. Biological selenium removal from wastewaters. Wageningen Univer--siteit; 2008.

4-Kuroda M, Yamashita M, Miwa E, Imao K, Fujimoto N, Ono H, et al. Molecular cloning and characterization of the srdBCA operon, encoding the respiratory selenate reductase complex, from the selenate-reducing bacterium Bacillus selenatarsenatis SF-1. J Bacteriol 2011;193:2141-8.

5-He Q, Yao K. Impact of alternative electron acceptors on selenium (IV) reduction by Anaeromyxobacter dehalogenans. Bioresource Technol 2011;102:3578-80.

6-Higashi RM, Cassel TA, Skorupa JP, Fan TWM. Remediation and bioremediation of selenium-contaminated waters. Water Encyclopedia; 2005.

7-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;24:1607-11.

8-Ikram M, Faisal M. Comparative assessment of selenite (SeIV) detoxification to elemental selenium (Se0) by Bacillus sp. Biotechnol lett 2010;32:1255-9.

9-Antonioli P, Lampis S, Chesini I, Vallini G, Rinalducci S, Zolla L, et al. Stenotrophomonas maltophilia SeITE02, a new bacterial strain suitable for bioremediation of selenite-contaminated environmental matrices. Appl Environ Microbiol 2007; 73:6854-63.

10-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 Biosci Bioengin 2000;89:528-33.

11-Zolfaghari M-R, Sasani MS. Determination of abundance of tellurite-resistant

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-04]

bacteria and the ability of remove of them from Qom province industrial wastewater, Qom, Iran. Qom Uni Med Sci J 2011;7:42-8.
12-Gadd GM. Metals, minerals and microbes: geomicrobiology and bioremediation. Microbiology 2010;156:609-43.
13-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 Technol 2008;10:59-73.
14-Siddique T, Zhang Y, Okeke BC, Frankenberger Jr WT. Characterization of sediment bacteria involved in selenium reduction. Bioresource Technol 2006;97: 1041-9.
15-Kafilzadeh F, Mirzaei N, Kargar M. Isolation and identification of mercury resistant bacteria from water and sediments of Kor River, Iran. J Microb World 2009;1:43-50.
16-Thacker U, Parikh R, Shouche Y, Madamwar D. Hexavalent chromium reduction by Providencia sp. Proc Biochem 2006; 41:1332-7.
17-Harley JP. Laboratory exercises in microbiology: McGraw-Hill Science/Engineering/Math; 2004.
18- Smibert R, Krieg NR, Gerhardt P, Murray R, Wood WA. Methods for general and molecular bacteriology. Meth Gen Mol Bacteriol 1994;2:43-9.
19-Ventosa A. Halophilic microorganisms. Springer Berlin; 2004.
20-Amozegar MA, Soudi MR, Malekzadeh F. [A highly resistant to toxic oxyanions, Halomonas sp. strain MAM]. J Sci Uni Tehran 2008;33:5-12.(Persian)
21-Bauer A, Kirby W, Sherris JC, turck, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. Am J Clin Pathol 1966;45:493-8.
22- Washington J. II, and VL Sutter. Dilution susceptibility test: agar and macrobroth dilution procedures. Manual of clinical microbiology. 3rd ed. American Society for Microbiology:Washington, DC;1980.-P.453-8.
23-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;68:4613-22.
24-Zolfaghari MR, Dorjagh MS, Masodikhah M, Motlagh MK, Heidarpor A. The frequency and antibiotic resistance of chromate tolerating microorganisms in Qom industrial wastewater. Qom Uni Med Sci J 2012;6:15-23.
25-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 Mat 2009;165:71-7.
26-Ellis R, Morgan P, Weightman A, Fry J. Cultivation dependent and -independent approaches for determining bacterial diversity in heavy-metal-contaminated soil. Appl Environ Microbiol. 2003;69:3223-30.
27-Di Gregorio S, Lampis S, Vallini G. Selenite precipitation by a rhizospheric strain of Stenotrophomonas sp. isolated from the root system of Astragalus bisulcatus: a biotechnological perspective. Environ Internat 2005;31:233-41.
28-Hunter WJ, Kuykendall LD. Identification and characterization of an Aeromonas salmonicida (syn Haemophilus piscium) strain that reduces selenite to elemental red selenium. Curr Microbiol 2006;52:305-9.
29-Hunter WJ, Kuykendall LD. Reduction of selenite to elemental red selenium by Rhizobium sp. strain B1. Curr Microbiol 2007;55:344-9.
30-Hunter WJ, Manter DK. Bio-reduction of selenite to elemental red selenium by Tetrathiobacter kashmirensis. Curr Microbiol 2008;57:83-8.
31-Hunter WJ, Manter DK. Reduction of selenite to elemental red selenium by Pseudomonas sp. strain CA5. Curr Microbiol 2009;58:493-8.
32-Dhanjal S, Cameotra SS. Aerobic biogenesis of selenium nanospheres by Bacillus cereus isolated from coalmine soil. Microbial Cell Factor 2010;9:52-7.
33-Pal A, Dutta S, Mukherjee P, Paul A. Occurrence of heavy metal-resistance in microflora from serpentine soil of Andaman. J Basic Microbiol 2005;45:207-18.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-04]

Isolation and Characterization of Selenite Resistant Microorganisms from Industrial Wastewaters

*Zolfaghari MR[1] *, Khalilian M[1]*

(Recived: 15 July, 2013 Accepted: 3November, 2013)

Abstract

*Introduction:*High concentrations of soluble selenium, selenite and sele-nate are toxic to living organisms. The accumulation of selenium in ce-rtain environments results in discol-oration of skin, hair loss, deformation of nails, tooth decay, psychological disturbances, liver and kidney ne-crosis and cell death. Thus, biorem-ediation of the element has been co-nsidered as an effective means of cleaning up of selenium-contamin-ated sites.

Materials & Methods: In this study, 263 bacterial strains were isolated from wastewater samples collected from selenium-contaminated sites in Qom province using the enrichment culture technique and direct plating on agar. MIC was measured among resistant strains by agar dilution met-hod and disk diffusion method was performed to determine resistance or sensitivity to these bacteria.

Findings: Bacterial strains desig-nated QW_{90} and QW_{243} exhibited very high MIC values ranging 550 and 500 for toxic oxyanion of sele-nite, respectively. Strains QW_{90} and QW_{243} were identified as *Bacillus sp. AB315f* (FRB21125) and *Pseudom-onas marincola* (AF326382) with conventional biochemical tests and 16S rRNA studies. Furthermore, the-se two bacterial strains were resistant to some antibiotics.

Discussion & Conclusion: Our study showed that the utilization of enric-hment culture technique in compa-rison to the direct plating on agar leads to better isolation of selenite resistant bacteria. Also, Bacillus sp. strain QW_{90} can be used for biorem-ediation of contaminated sites.

Keywords: MIC, selenite, resistance, bioremediation.

1.Dept of Microbiology, Faculty of Sciences, Qom Branch, Islamic Azad University, Qom, Iran.
*(*Corresponding author)*

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-04]