

بررسی و خالص‌سازی نسبی آنزیم (های) مؤثر در احیای تلوریت از باکتری نمک دوست *Salinicoccus iranensis*

ننا علوی: کارشناس ارشد میکروبیولوژی، دانشگاه تهران، ایران، sana_alavi@ut.ac.ir
محمد علی آموزگار*: دانشیار میکروبیولوژی، دانشگاه تهران، ایران، amoozegar@ut.ac.ir
خسرو خواجه: استناد بیوشیمی، دانشگاه تربیت مدرس، ایران، khajeh@modares.ac.ir

چکیده

مقدمه: امروزه استفاده بیش از حد از تلوریت، محیط را متحمل اثرات سمی ناشی از این اکسی‌آنیون کرده است. از این رو تیمار زیستی مناطق آلوده، به عنوان روشی ارزان و سازگار با محیط زیست، مطرح است. اگرچه اثرات سمی تلوریت برای بیشتر میکروارگانیسم‌ها گزارش شده ولی گونه‌های مختلفی از باکتری‌ها، از جمله باکتری نمک دوست مورد استفاده در این پروژه می‌تواند بر سمیت آن با احیای این اکسی‌آنیون به شکل عنصریش غلبه کند. هدف این مطالعه، شناسایی مسیر آنزیمی به سم‌زدایی تلوریت بود.

مواد و روش‌ها: در ابتدا به منظور بالا بردن فعالیت آنزیمی و از دست ندادن آن طی فرآیند خالص‌سازی، بهینه‌سازی آزمون مناسب برای بررسی فعالیت آنزیمی و شرایط تولید آن انجام شد. بهینه‌سازی با "روش یک عامل در هر زمان" انجام شد. عامل‌های مختلفی از جمله: زمان، درصدهای مختلف مایه تلقیح، اسیدیته، غلظت‌های مختلف تلوریت و نمک‌های مختلف بهینه شد. به منظور اطمینان در طی پژوهش میزان حذف تلوریت نیز بررسی شد. خالص‌سازی آنزیم مورد نظر با روش‌های مختلف مانند، رسوب با آمونیوم سولفات^۱ و کروماتوگرافی ستونی میان‌کنش هیدروفوب^۲ با غلظت ۱/۴ مولار اشباع آمونیوم سولفات انجام شد. خلوص آنزیم در طی هر مرحله با SDS-PAGE بررسی شد.

نتایج: شرایط بهینه به دست آمده نشان داد که در زمان ۳۰ ساعت، ۳ درصد مایه تلقیح، اسیدیته ۷/۵، بدون حضور تلوریت و در ۵ درصد نمک NaCl، بالاترین میزان فعالیت آنزیم و حذف تلوریت مشاهده می‌شود. خالص‌سازی آنزیم به میزان زیادی پروتئین‌های غیرمرتبط را کاهش داد و تغلیظ یکی از باندها که زیرواحدی از آنزیم مورد هدف بود، را باعث شد. در بخش پروتئینی به طور نسبی خالص‌شده، نشان داده شد که علاوه بر فعالیت تلوریت ردوکتازی، فعالیت سلنیت و نترات ردوکتازی نیز در این بخش وجود دارد.

بحث و نتیجه‌گیری: این پژوهش، در مسیر شناسایی بیشتر فیزیولوژی میکروارگانیسم‌های هالوفیل و بررسی آنزیم دخیل در احیای تلوریت گام برداشته و آنزیم مسوول را در باکتری مربوطه بهینه و تا حدی خالص‌سازی کرده است.

واژه‌های کلیدی: تلوریت، نمک دوست، *Salinicoccus*، خالص‌سازی آنزیم

* نویسنده مسوول مکاتبات، آزمایشگاه اکسترموفیل‌ها، بخش میکروبیولوژی، دانشکده زیست‌شناسی و قطب تبارزایی، پردیس علوم، دانشگاه تهران، ایران

مقدمه

در دهه‌های اخیر کاربردهای زیاد تلوریت در کارخانه‌های باتری‌سازی، الکترونیک، فیبرنوری و معادن افزایش یافته و به آلودگی‌های زیاد زیست‌محیطی تلوریت منجر شده است. تلوریوم و سلنیوم نسبت به آنالوگ خود، سولفور، ترکیبات مشابهی ایجاد می‌کنند ولی خواص و واکنش‌های متفاوتی را از خود بروز می‌دهند و به طور در خور توجهی سمیت بیشتری دارند (۱). عامل‌های مقاومت به تلوریت زیادی در کروموزوم یا پلاسمید برخی گونه‌های باکتریایی مشاهده شده است (۲ و ۳). در کل این عامل‌ها، عامل مقاومت به تلوریت با مکانیسمی ناشناخته هستند.

میکروارگانیسم‌ها راهکارهای مختلفی برای سمیت‌زدایی فلزات و شبه‌فلزات دارند ولی همگی آن‌ها در دو فرآیند کلی جای می‌گیرند:

۱. میکروارگانیسم‌ها غلظت آن‌ها را در محیط با اتصال سلولی که به آن تجمع زیستی^۳ هم می‌گویند، کاهش می‌دهد.

۲. مکانیسم دوم وابسته به متابولیسم سلولی برای تغییر فلز سمی از شکل محلول به نامحلول است.

فرآیند تجمع زیستی غیرفعال است زیرا این فرآیند به تمایل به اتصال بستگی دارد. این در حالی است که فعالیت‌های متابولیکی فعال و وابسته به انرژی سلول است (۴).

تاکنون در زمینه شناسایی عوامل مؤثر در احیای تلوریت کوشش‌های اندکی انجام شده است که می‌توان از فعالیت تلوریت ردوکتازی نیترات ردوکتازها (۵)، مشارکت گلوکوتایون احیا در تشکیل Se^0 و Te^0 (۶)، سطوح بالای فعالیت تلوریت وابسته به $FADH_2$ در

بخش غشایی (۷)، سیتوکروم‌های c در غشای خارجی (۸) و گزارشی از خالص‌سازی پروتئینی با فعالیت تلوریت ردوکتازی نام برد (۹).

نمک دوست‌ها، میکروارگانیسم‌های نیازمند به نمک هستند که در محیط‌های با نمک بالا زندگی می‌کنند. آن‌ها به طور کلی شامل میکروارگانیسم‌های پروکاریوتی و یوکاریوتی با توانایی متعادل‌سازی فشار اسمزی با محیط بیرون و مقاومت در برابر اثرات واسرشت‌کننده نمک‌ها مانند تجمع با هم پروتئین‌ها هستند. این گروه میکروارگانیسم‌ها، از تنوع بالایی برخوردارند. بسته به غلظت نمک مورد نیاز برای رشد، آن‌ها را به تحمل‌کننده نمک (صفر تا ۵ درصد سدیم کلرید)، نمک دوست ضعیف (۲ تا ۵ درصد سدیم کلرید)، نمک دوست نسبی (۵ تا ۲۰ درصد سدیم کلرید)، و نمک دوست افراطی (۲۰ تا ۳۰ درصد سدیم کلرید)، تقسیم‌بندی می‌کنند. میکروارگانیسم‌های نمک‌دوست نسبی از نظر فیزیولوژی متنوع و دارای جنس‌های مختلفی هستند (۱۰).

در مقایسه با دیگر گروه‌های اکستریموفیل (ترموفیل‌ها و آلوکالوفیل‌ها) که به طور گسترده در صنعت استفاده می‌شوند، کاربردهای بیوتکنولوژیک زیاد میکروارگانیسم‌های نمک دوست نسبی و افراطی، معمولاً نادیده گرفته شده است. این نادیده گرفته شدن به ویژه وقتی تنوع گسترده نمک دوست‌ها را در نظر بگیریم، بیش‌تر مشهود است. این دسته از موجودات در هر سه قلمرو آرکیا، باکتری‌ها و یوکاریوت‌ها یافت می‌شوند. آن‌ها شامل اعضای با فیزیولوژی متنوع‌اند که آن‌ها را قادر می‌سازد با گستره وسیعی از غلظت‌های

نمک تا حد اشباع، سازش پیدا کنند. از دیگر مزایای احیا توسط میکروارگانیسم‌ها این است که احیای اکسی آنیون‌های به دست آمده به شکل نانوذره بوده و اهمیت این نانوذرات رو به افزایش است. ترکیبات در مقیاس نانو تلوریوم (Te^0) مثل CdTe پتانسیل بالایی در استفاده به عنوان مواد اولیه سلول‌های خورشیدی دارند و امروزه مطالعه و بررسی‌های زیادی روی آن‌ها انجام می‌شود (۱۱).

از آنجا که بعضی ارگانیسم‌های نمک دوست در درون سلول نیز با استرس اسمزی مقابله می‌کنند، مقایسه آنزیم‌های مشابه در ارگانیسم‌های غیرنمک دوست و نمک دوست، اهمیت زیادی دارد. به هر حال عامل این تفاوت هر چه هست به طور آشکارا اهمیت بنیادی در درک نوع زندگی نمک دوست‌ها دارد. پروتئین‌های نمک دوست برای فعال، پایدار و محلول بودن در نمک بالا با چالش‌های بسیاری روبه‌رو هستند. غلظت‌های در حد مولار نمک معمولاً برای پروتئین‌ها و دیگر ماکرومولکول‌ها مخرب است. این امر باعث تخریب ساختار سوم و تجمع آن‌ها به خاطر افزایش میان‌کنش‌های هیدروفوب می‌شود و با میان‌کنش‌های الکتروستاتیک تداخل ایجاد می‌کند. اگرچه برخی اوقات این سازگاری‌ها باعث می‌شود تا ماکرومولکول‌ها به طور مطلق برای حفظ یکپارچگی ساختار خود وابسته به نمک بالا باشند (۱۲).

از آنجا که سم‌زدایی شیمیایی مناطق آلوده به فلزات سمی، گران است و محیط را متحمل اثرات جانبی ناشی از مصرف این مواد می‌کند، تیمار زیستی این مناطق به عنوان روشی سازگار با محیط زیست و کاهش‌دهنده

هزینه‌ها، مطرح است. نیاز ذاتی میکروارگانیسم‌های نمک دوست به نمک و از سوی دیگر همراهی اکسی آنیون‌ها با کاتیون‌هایی که نیاز میکروارگانیسم نمک دوست را مرتفع می‌کند، این میکروارگانیسم‌ها را نسبت به همتایان غیرنمک دوست خود در زمینه تحمل و حذف تلوریت تواناتر می‌سازد. پتانسیل بالای میکروارگانیسم‌های نمک دوست در تحمل غلظت‌های بالای فلزات سمی چون سلینیوم و تلوریوم و توانایی تیمار زیستی این عناصر در محیط‌های نمکی و پساب‌های پرنمک، این میکروارگانیسم‌ها را به عنوان کاندیدی مناسب بدین منظور مطرح می‌کند (۱۳).

Salinicoccus iranensis QW6 یک باکتری کوکوس گرم مثبت، غیراسپورزا، فاقد حرکت و هوازی با توانایی تولید اکسیداز و کاتالاز است. کلونی‌های آن گرد و صاف بوده و پیگمان قرمز- نارنجی تولید می‌کند. شرایط بهینه رشد برای این میکروارگانیسم بدین شکل به دست آمده است (۱۴ و ۱۷):

محدوده نمک (NaCl): ۱ تا ۲۵ درصد / بهینه: ۷/۵ تا ۱۰ درصد
 محدوده اسیدیته: ۵/۶ تا ۱۰ / بهینه: ۷/۵
 محدوده دما: ۵ تا ۴۵ / بهینه: ۳۴ درجه سانتی‌گراد
 MIC برای تلوریت: ۱۲ میلی‌مولار

احیای نیترات: مثبت

با توجه به اطلاعات به دست آمده تا کنون هیچ گزارشی از بررسی مکانیسم‌های دخیل در احیای تلوریت توسط باکتری‌های نمک دوست انجام نشده است. هدف از این پژوهش، بررسی مسیر یا مسیرهایی است که میکروارگانیسم در راستای مقابله با این اکسی آنیون سمی اتخاذ می‌کند. آنزیم به طور نسبی خالص شده در این تحقیق قادر به احیای تلوریت، سلنیت و نیترات بود.

مواد و روش‌ها

مواد شیمیایی

پتاسیم تلوریت، سدیم سلنیت ۵آبه، سدیم کلراید، پتاسیم کلراید، منیزیم کلراید، آمونیوم سولفات، تریپتون، عصاره مخمر و بتا-مرکاپتواتانول از شرکت مرک (درمشتات، آلمان)^۴؛ سفادکس G-100، لیزوزیم، PMSF، Tris-HCl (فنیل متیل سولفونیل فلوراید)^۵، NADH 4 آبه، کوماسی برلیانت بلو، دکستران بلو و دی‌اتیل دی‌تیوکربامات^۶ از شرکت سیگما (سنت لویس، آمریکا)^۷؛ فنیل سفارز و Q- سفارز از شرکت بیوتکنولوژی فارمیشیا^۸ و سدیم کلراید از شرکت ایرانی دکتر مجلی^۹ تهیه شد.

کشت و رشد میکروارگانیسم

سویه *Salinicoccus iranensis* QW6 پیش‌تر توسط آموزگار و همکاران^{۱۰} از قم جداسازی و شناسایی شده بود (۱۴). این باکتری کوکوس گرم مثبت، هوازی و فاقد تحرک بوده و قابلیت احیای تلوریت و سلنیت را داراست. این باکتری از مرکز ملی ذخایر ژنتیک ایران^{۱۱} با شماره‌ی سویه IBRC-10198 دریافت و با دو روش کشت در محیط شیب‌دار، با گلیسرول و نیز به شکل لیوفیلیزه نگهداری شد.

برای کشت باکتری *Salinicoccus* از محیط لوریا برتانی (LB) با غلظت سدیم کلراید ۵ درصد واسیدیته ۷/۵ به عنوان محیط پایه استفاده شد. محیط‌های مایع در انکوباتور شیکردار با دور ۱۵۰ rpm و در دمای ۳۴ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شدند. محیط‌های کشت پایه پس از تهیه، با حجم ۲۰ میلی‌لیتر در در فلاسک‌های ارلن مایر ۱۰۰ توزیع و اتوکلاو شدند. محلول‌های اکسی‌آنیون‌ها به شکل جداگانه با فیلتر استریل و به محیط پایه پیش از تلقیح افزوده شدند. در

این روش میزان جذب نوری سوسپانسیون باکتری در طول موج ۶۲۰ نانومتر در برابر محیط کشت تلقیح نشده به عنوان شاهد در دستگاه UV-vis اسپکتروفوتومتر^{۱۲} خوانده شد. در مواردی که وجود عامل تداخل‌کننده مانع این نوع سنجش می‌شد، از غلظت پروتئین به منظور بررسی میزان بیوماس استفاده شد.

بررسی میزان رشد باکتری

برای این منظور از تک کلونی خالص باکتری که روی محیط کشت جامد LB حاوی ۵ درصد نمک طعام رشد کرده بود (کشت ۴۸ ساعته)، سوسپانسیون میکروبی معادل کدورت ۰/۵ مک فارلند تهیه شد و به میزان یک درصد حجم محیط پایه به آن تلقیح و گرماگذاری شد. منحنی رشد مربوط به میکروارگانیسم ترسیم شد تا زمان مناسب (فاز سکون) برای تلقیح از این محیط به محیط پیش کشت تعیین شود. سپس، از باکتری‌هایی که به فاز سکون رسیده‌اند به منظور تلقیح به محیط پیش کشت به میزان ۵ درصد حجمی استفاده شد. پس از رسیدن به دانسیته نوری برابر با ۱/۵^{۱۳} از این محیط به عنوان پیش کشت برای تلقیح به محیط‌های اصلی استفاده شد. با رسم منحنی رشد، از آن برای تعیین ساعت مناسب برای تلقیح محیط پیش کشت به محیط پایه تولید، در هنگام بررسی اثر عامل‌های مختلف روی رشد سویه، فعالیت آنزیم و حذف تلوریت استفاده شد (۱۳). تمام آزمایش‌ها در سه بار تکرار به طور هم‌زمان انجام شدند.

سنجش مقدار پروتئین و تلوریت

برای سنجش مقدار پروتئین از روش برادفورد و با استفاده از آلبومین سرم گاوی^{۱۴} به عنوان استاندارد، استفاده شد (۱۴). برای بررسی میزان حذف اکسی‌آنیون تلوریت از معرف دی‌اتیل دی‌تیوکربامات استفاده شد.

آماده سازی عصاره سلولی

برای این منظور ابتدا کشت های میکربی طبق شرایط بهینه کشت داده شده و سپس، برای حذف سلول ها و دیگر مواد جامد محیط، در دور $4000 \times g$ در دمای $4^\circ C$ درجه سانتی گراد به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. رسوب حاصل ۲ بار با آب نمک ۵ درصد شستشو داده شده و در بافر لیز (Tris-HCl ۵۰ میلی مولار، ۱mM PMSF) به حالت سوسپانسیون در آمدند. عمل سونیکاسیون در ۱۰ مرحله ۳۰ ثانیه ای با ۱ دقیقه فاصله بین مراحل انجام شد. باکتری سونیکت شده با دور $14000 \times g$ در دمای $4^\circ C$ درجه سانتی گراد به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. خروجی ۰/۵ و شدت ۶۰ درصد برای دستگاه سونیکاتور تنظیم شد. محلول رویی به عنوان عصاره سلول با دور $13500 \times g$ و به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ و از بقایای سلولی و سلول های شکسته نشده جدا شد (۱۸).

سنجش فعالیت آنزیمی

فعالیت آنزیمی به روش سینتیکی و از طریق بررسی کاهش میزان جذب NADH در طول موج ۳۴۰ نانومتر تعیین شد. بدین منظور دستگاه اسپکتروفوتومتر در حالت $^{16} \text{Rate (Kinetic)}$ ، ۳۴۰ نانومتر و زمان ۱ دقیقه تنظیم شد. برای تعیین فعالیت تلوریت ردوکتازی، ۴۷۰ میکرولیتر بافر ۵۰ میلی مولار (Tris-HCl, pH 8) حاوی تلوریت سدیم و سلنیت سدیم هریک ۶ میلی مولار، ۲۵ میکرولیتر نمونه حاوی آنزیم و ۵ میکرولیتر NADH (۱۰ میلی مولار) در کووت ریخته شد. تمامی مواد در بافر ۵۰ میلی مولار (Tris-HCl, pH 8) حل شد. تعیین فعالیت در دمای محیط انجام شد. به محض افزودن NADH به محتویات سل، تغییرات جذب بررسی شد (۱۹).

روش کار بدین طریق بود که ۳۰۰ میکرولیتر از بافر ۵۰۰ میلی مولار Tris-HCl, pH 7 و ۱۰۰ میکرولیتر از معرف دی اتیل دی تیو کر بامات (۱۰ میلی مولار) و ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه مورد سنجش با یکدیگر مخلوط شده و جذب آن در طول موج ۳۴۰ نانومتر توسط اسپکتروفوتومتر سنجیده شد. شاهد شامل: ۳۰۰ میکرولیتر بافر، ۱۰۰ میکرولیتر معرف، ۱۰۰ میکرولیتر از محیط کشت بدون تلوریت بود (۱۵).

رسم منحنی رشد و بررسی میزان حذف تلوریت *Salinicoccus iranensis* در حضور غلظت های مختلف تلوریت

از محیط پیش کشت تهیه شده به منظور تلقیح به محیط های حاوی اکسی آنیون با غلظت های مختلف تلوریت استفاده شد. میزان رشد میکروارگانیسم با سنجش غلظت پروتئین بررسی شد. علت استفاده از این روش پراکنش نور توسط اسپکتروفوتومتر برای تولید ذرات تلوریوم طی رشد میکروارگانیسم بود. بدین منظور در طول مراحل رشد باکتری به میزان ۰/۵ میلی لیتر از محیط کشت در شرایط استریل برداشت شده و در دور $11000 \times g$ به مدت ۱۰ دقیقه در دمای $4^\circ C$ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ شد. محلول رویی به منظور بررسی میزان حذف تلوریت، بررسی شد. رسوب باکتریایی یک بار با آب نمک ۵ درصد شستشو داده شده و سپس، ۵۰۰ میکرولیتر از سود ۰/۱ نرمال به آن اضافه شده، ۱ ساعت در دمای $96^\circ C$ درجه قرار گرفت. بار دیگر نمونه ها با دور $13000 \times g$ اسپین شده و غلظت پروتئین در مایع رویی با استفاده از روش برادفورد^{۱۵} سنجیده شد (۱۶ و ۱۷).

بهبود روش‌های کشت و شرایط رشد برای حذف بیش‌تر تلوریت و تولید بیش‌تر آنزیم

برای بهبود تولید آنزیم، اثر عوامل مختلف روی رشد سویه QW6، تولید آنزیم و میزان حذف، بررسی و گزارش شد. از روش یک عامل در هر زمان^{۱۷} به منظور بهینه‌سازی استفاده شد. به این شکل که در هر مرحله فقط اثر یک عامل بررسی شده و تمام عوامل دیگر به شکل ثابت در نظر گرفته شدند. مقدار بهینه به دست آمده برای هر عامل، به منظور بررسی عامل بعدی اعمال شد. اسیدیت به همه محیط‌های کشت قبل از سترون‌سازی تنظیم شد.

اثر زمان

برای بررسی اثر زمان روی رشد، تولید آنزیم و میزان حذف، از محیط پیش کشت، به محیط‌های پایه آماده با شرایط بهینه تلقیح انجام شد و در شیکر انکوباتور ۳۴ درجه سانتی‌گراد با دور ۱۵۰ rpm گرم‌گذاری شد. در طی ۸۴ ساعت، هر ۶ ساعت سه ارلن به شکل جدا، برای بررسی رشد، تولید آنزیم و میزان حذف تحلیل شد. مقدار بهینه به دست آمده در این مرحله، در مراحل بعدی اعمال شد.

اثر حجم مایه تلقیح

برای بررسی اثر مایه تلقیح رشد، تولید آنزیم و میزان حذف، از محیط پیش کشت با مقادیر ۱، ۲، ۴، ۶، ۸ و ۱۰ درصد به محیط‌های پایه آماده با شرایط بهینه، تلقیح انجام شد و در شیکر انکوباتور در ۳۴ درجه سانتی‌گراد با دور ۱۵۰ rpm گرم‌گذاری شد. مقدار بهینه به دست آمده در این مرحله، در مراحل بعدی اعمال شد.

اثر غلظت‌های مختلف تلوریت

برای بررسی اثر غلظت‌های مختلف تلوریت بر رشد، تولید آنزیم و میزان حذف، از محیط پیش کشت به محیط‌های پایه آماده با شرایط بهینه حاوی ۰/۱، ۰/۲۵،

۰/۵، ۰/۷۵ و ۱ میلی‌مولار تلوریت، تلقیح انجام شد و در شیکر انکوباتور در ۳۴ درجه سانتی‌گراد با دور ۱۵۰ rpm گرم‌گذاری شد. مقدار بهینه به دست آمده در این مرحله، در مراحل بعدی اعمال شد.

اثر اسیدیت

برای دستیابی به اسیدیت بهینه برای رشد، تولید آنزیم و میزان حذف، از محیط پیش کشت به میزان مناسب به محیط‌های پایه آماده شده با شرایط بهینه و با اسیدیت‌های ۷/۵، ۸، ۸/۵، ۹، ۹/۵ و ۱۰ تلقیح انجام شد و در شیکر انکوباتور در ۳۴ درجه سانتی‌گراد با دور ۱۵۰ rpm گرم‌گذاری شد. برای تأمین شرایط ثابت اسیدیت در محیط کشت، از بافرهای استاندارد فسفات، تریس و گلاپسین با غلظت ۵۰ میلی‌مولار به شکل مخلوط استفاده شد. به این شکل که بافرها جایگزین آب مقطر در ترکیب محیط کشت پایه شدند. مقدار بهینه به دست آمده در این مرحله، در مراحل بعدی اعمال شد.

از آنجا که میکروارگانیسم مورد آزمون یک نمک‌دوست بوده و این میکروارگانیسم‌ها بیشتر وابستگی به یون سدیمی و در برخی موارد یون کلرایدی از خود نشان می‌دهند، تأثیر این یون‌ها بر حذف تلوریت و فعالیت آنزیمی بررسی شد.

اثر نمک‌های کلرایدی

برای بررسی اثر نمک‌های سدیم کلراید، پتاسیم کلراید و منیزیم کلراید بر روی رشد، تولید آنزیم و میزان حذف، از محیط پیش کشت به میزان مناسب به محیط‌های پایه آماده با شرایط بهینه و غلظت‌های ۱، ۵، ۱۰ و ۱۵ درصد از نمک که جایگزین نمک اصلی در محیط کشت شده بود، تلقیح انجام شد و در شیکر انکوباتور در ۳۴ درجه سانتی‌گراد با دور ۱۵۰ rpm گرم‌گذاری شد. مقدار بهینه به دست آمده نمک‌ها در این آزمایش در آزمایشی مجزا با یکدیگر مقایسه شدند.

اثر نمک‌های سدیمی

برای بررسی این عوامل بر رشد، تولید آنزیم و میزان حذف، از محیط پیش کشت به میزان مناسب به محیط‌های پایه دارای نمک‌های سدیم نترات، دی‌سدیم سولفات و سدیم‌استات با غلظت‌های ۱ تا ۲۵ درصد تلقیح انجام شد و در شیکر انکوباتور در ۳۴ درجه سانتی‌گراد با دور ۱۵۰ rpm گرماگذاری شد.

خالص سازی نسبی آنزیم

به منظور خالص سازی پروتئین در نخستین مرحله از آمونیوم سولفات برای بخش‌بندی^{۱۸} پروتئین‌ها استفاده شد. به عصاره سلولی تا ۶۰ درصد اشباع آمونیوم سولفات اضافه شد. بدین وسیله بخشی از پروتئین‌ها از رسوب به وسیله سانتریفیوژ ×g ۱۱۵۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه جدا شدند. رسوب حاصل در حداقل مقدار بافر Tris- HCl pH 8 (۵۰ میلی‌مولار، حاوی ۱/۴ مولار آمونیوم سولفات (بافر A) حل شده و علیه همین بافر به مدت ۱۲ ساعت و با تعویض بافر هر ۴ ساعت دیالیز شد. نمونه‌ی دیالیز شده بر روی ستون فنیل سفارزی که از قبل با بافر ۵۰ میلی-مولار Tris- HCl pH 8 حاوی ۱/۴ مولار آمونیوم سولفات به تعادل رسیده و به دستگاه^{۱۹} (AKTA) FPLC (Prime, Amersham) متصل بود، بارگذاری شد. پس از شستشوی ستون، پروتئین‌های متصل شده با گرادیان خطی صفر تا ۲ مولار آمونیوم سولفات تهیه شده در بافر Tris- HCl pH 8 (۵۰ میلی‌مولار (بافر B) شسته شدند. در هنگام کروماتوگرافی جریان ۱ میلی‌لیتر در دقیقه برقرار بود. تنها در هنگام تزریق نمونه به ۰/۵ میلی‌لیتر در دقیقه کاهش داده می‌شد. بخش‌های ۲ میلی‌لیتری از ستون جمع‌آوری و آزمون آنزیمی بر روی آن‌ها انجام می‌شد. به منظور اطمینان نمونه‌های مربوط به هر پیک جمع‌آوری و با سیستم اولترافیلتراسیون دارای منافذ ۱۰ کیلو دالتونی (آمیکون^{۲۰}، میلی‌پور^{۲۱}) تغلیظ و سپس، فعالیت آنزیمی مربوطه بررسی شد.

الکتروفورز سدیم دو دسیل سولفات- پلی‌اکریل آمید ژل^{۲۲}

الکتروفورز پروتئین‌ها با روش تغییر یافته‌ی لاملی انجام شد. بدین شکل که از غلظت ۵ درصد اکریل آمید برای ژل توده‌کننده و از ۱۲/۵ درصد اکریل آمید برای ژل جداکننده استفاده شد. نمونه‌ها با جوشانده شدن در ۱(w/v) درصد SDS در حضور ۲- مرکاپتواتانول آماده شدند (۲۰).

تجزیه و تحلیل داده‌ها

برای مقایسه بین شرایط بهینه مختلف و نیز تعیین اختلاف معنی‌دار بین آن‌ها در سطح احتمال ($P \text{ value} < 0.05$) از تحلیل واریانس یک طرفه ANOVA^{۲۳} و آزمون چند دامنه‌ای دانکن^{۲۴} استفاده شد. تمام تحلیل‌های آماری با استفاده از نرم افزار SPSS (ویرایش ۱۹)^{۲۵} و ترسیم نمودارها با استفاده از نرم افزار Excel 2010 در محیط ویندوز انجام شد.

نتایج

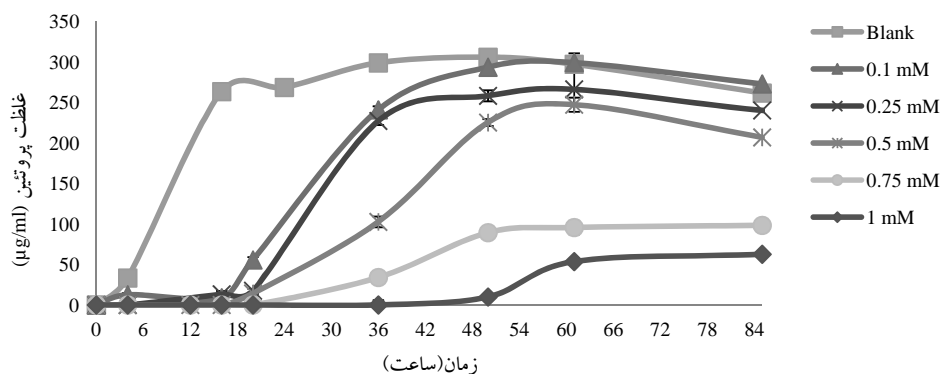
رسم منحنی رشد و حذف تلوریت

شکل ۱ و ۲ منحنی‌های رشد سوبیه و حذف اکسی‌آنیون تلوریت در طی ۸۴ ساعت گرماگذاری را نشان می‌دهد. میانگین غلظت‌های پروتئین و حذف اکسی‌آنیون به دست آمده از سه تکرار برای هر بار سنجش نشان‌دهنده حذف بیش‌تر و رشد بالاتر میکروارگانیزم در غلظت‌های پایین‌تر تلوریت بود. سریع‌ترین حذف در غلظت ۰/۵ میلی‌مولار تلوریت مشاهده شد.

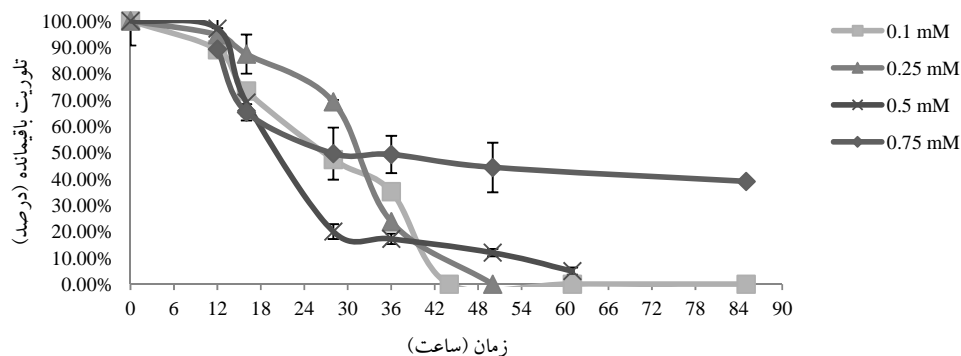
اثر عوامل فیزیکی شیمیایی بر رشد و فعالیت آنزیم

اثر زمان بر روی رشد و فعالیت آنزیم

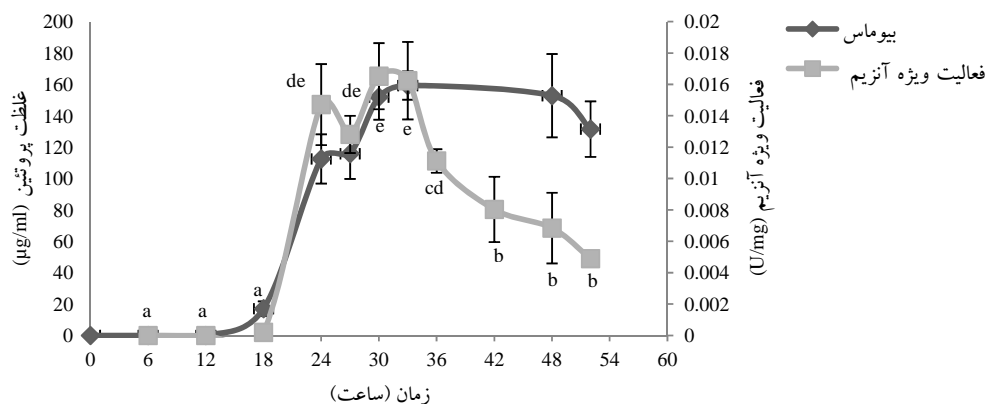
شکل ۳ و ۴ نشان‌گر رشد و تولید آنزیم در زمان‌های مختلف است. بیش‌ترین تولید در زمان ۳۰ ساعت معادل ۰/۰۱۶۵ U/mg دیده شد. نتایج حاصل بیانگر آن است که بین میزان تولید آنزیم در زمان‌های ۲۴ تا ۳۳ ساعت تفاوت معنی‌داری وجود نداشت. تولید آنزیم و حذف تلوریت نیز با میزان بیوماس هم‌خوانی دارد.



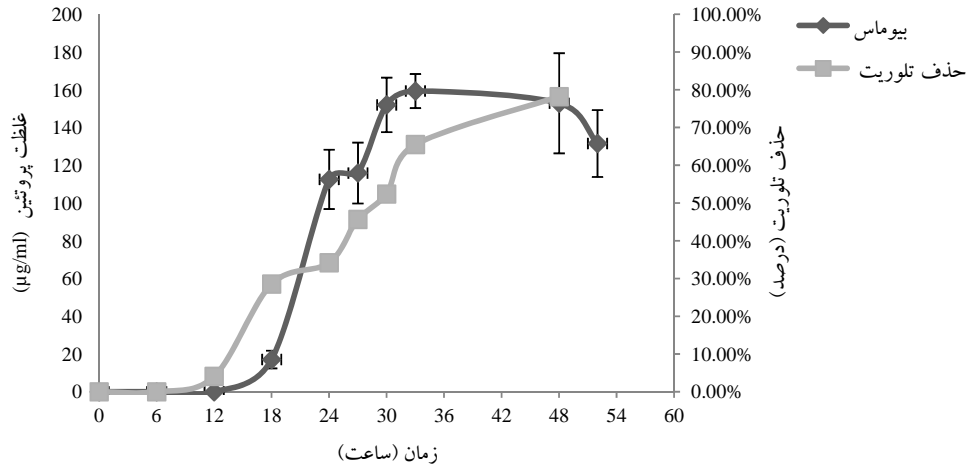
شکل ۱- منحنی‌های رشد در حضور غلظت‌های مختلف تلوریت. تلقیح در محیط پایه حاوی ۵ درصد نمک سدیم کلراید (اسیدیته ۷/۵) انجام شد. نتایج میانگین سه تکرار جداگانه بوده و میله خطا برای آن نشان داده شده است.



شکل ۲- منحنی‌های حذف تلوریت در حضور غلظت‌های مختلف تلوریت. تلقیح در محیط پایه حاوی ۵ درصد نمک سدیم کلراید (اسیدیته ۷/۵) انجام شد. نتایج میانگین سه تکرار جداگانه بوده و میله خطا برای آن نشان داده شده است.



شکل ۳- اثر زمان بر فعالیت آنزیمو رشد در محیط پایه حاوی ۵ درصد نمک سدیم کلراید حاوی ۰/۵ میلی‌مولار تلوریت (اسیدیته ۷/۵). نتایج میانگین سه تکرار جداگانه بوده و میله خطا برای آن نشان داده شده است. مقادیر نشان‌گذاری شده با حروف لاتین مختلف دارای اختلاف معنی‌دار ($P < 0.05$) هستند.

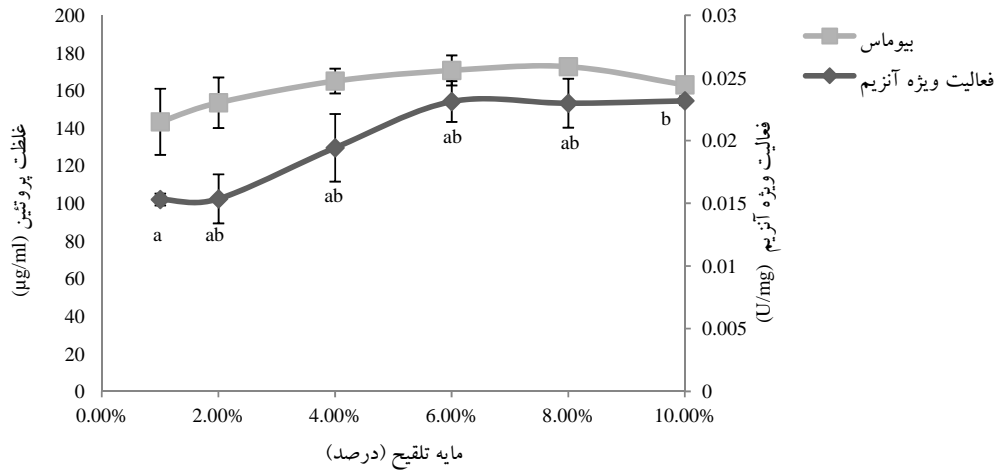


شکل ۴- اثر زمان بر حذف تلوریت و رشد در محیط پایه حاوی ۵ درصد نمک سدیم کلراید حاوی ۰/۵ میلی مولار تلوریت (اسیدیته ۷/۵). نتایج میانگین سه تکرار جداگانه بوده و میله خطا برای آن نشان داده شده است.

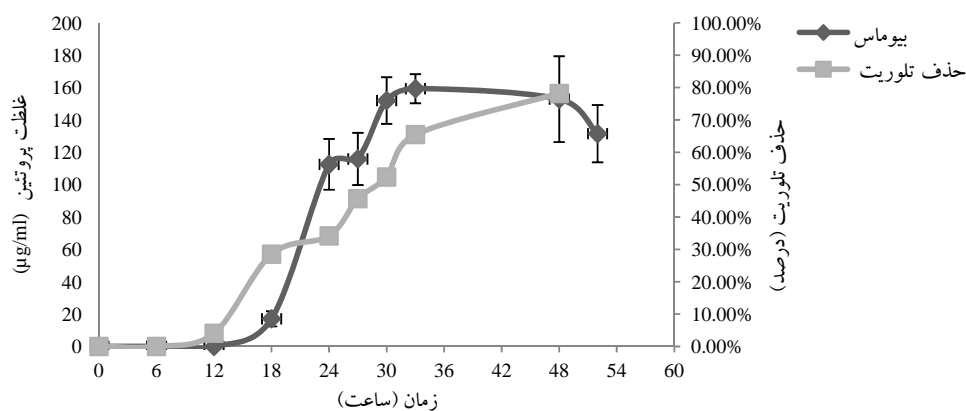
محیط‌های با درصدهای متفاوت مایه تلقیح تفاوت معنی داری دیده نشد (بین ۱ و ۱۰ درصد تفاوت معنی دار بود). فعالیت آنزیمی و حذف تلوریت در این محیط‌ها نیز با میزان بیوماس هم‌خوانی دارد.

اثر حجم مایه تلقیح^{۲۶} بر فعالیت آنزیم، رشد و حذف تلوریت

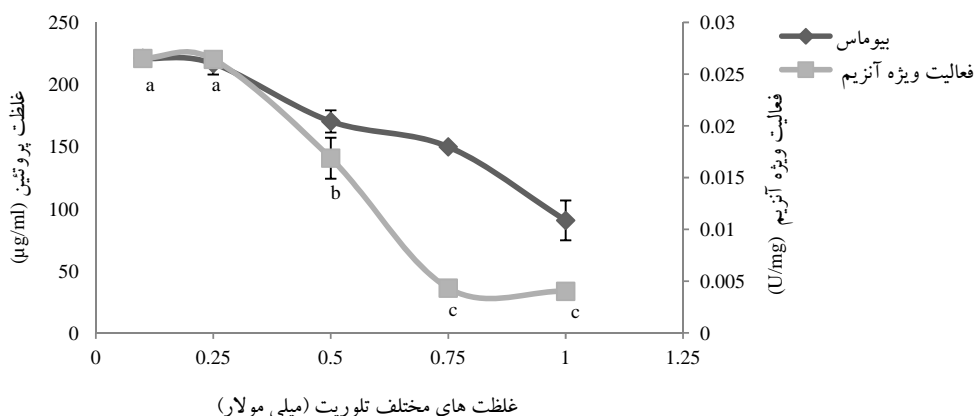
میزان رشد و فعالیت آنزیم و حذف تلوریت با مقادیر مایه تلقیح متفاوت در شکل‌های ۵ و ۶ نشان داده شده‌است. بین فعالیت آنزیمی مشاهده شده در



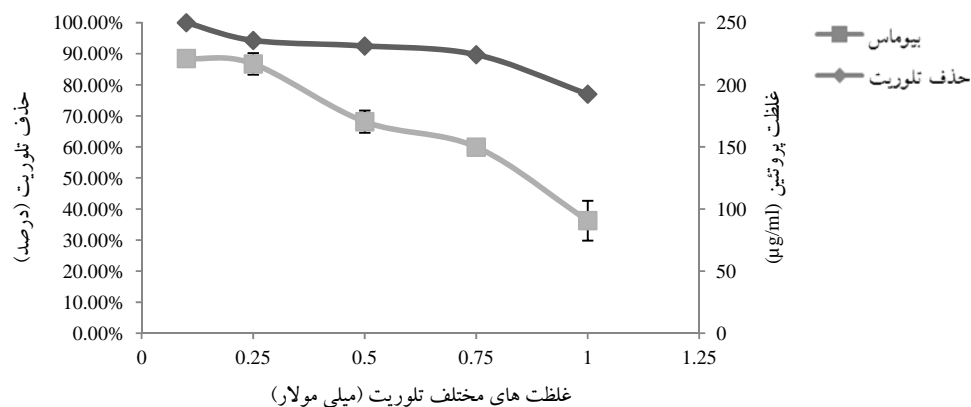
شکل ۵- اثر حجم مایه تلقیح بر فعالیت آنزیم و رشد سویه QW6 در زمان ۳۰ ساعت در محیط پایه حاوی ۵ درصد نمک سدیم کلراید حاوی ۰/۵ میلی مولار تلوریت (اسیدیته ۷/۵). نتایج میانگین سه تکرار جداگانه بوده و میله خطا برای آن نشان داده شده است. مقادیر نشان‌گذاری شده با حروف لاتین مختلف دارای اختلاف معنی دار ($P \text{ value} < 0.05$) هستند.



شکل ۶- اثر حجم مایه تلقیح بر حذف تلوریت و رشد سویه QW6 در زمان ۳۰ ساعت در محیط پایه حاوی ۵ درصد نمک سدیم کلراید حاوی ۰/۵ میلی مولار تلوریت (اسیدیته ۷/۵) نتایج میانگین سه تکرار جداگانه بوده و میله خطا برای آن نشان داده شده است. مقادیر نشان‌گذاری شده با حروف لاتین مختلف دارای اختلاف معنی‌دار ($P \text{ value} < 0.05$) هستند.



شکل ۷- اثر غلظت‌های مختلف تلوریت بر رشد و فعالیت آنزیم‌در زمان ۳۰ ساعت در محیط پایه حاوی ۵ درصد نمک سدیم کلراید حاوی ۰/۵ میلی مولار تلوریت با ۲ درصد مایه تلقیح (اسیدیته ۷/۵) نتایج میانگین سه تکرار جداگانه بوده و میله خطا برای آن نشان داده شده است. مقادیر نشان‌گذاری شده با حروف لاتین مختلف دارای اختلاف معنی‌دار ($P \text{ value} < 0.05$) هستند.



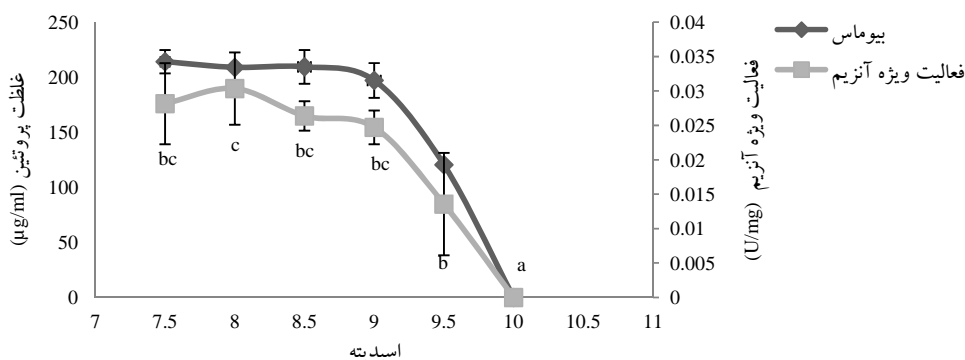
شکل ۸- اثر غلظت‌های مختلف تلوریت بر حذف تلوریت و رشد در زمان ۳۰ ساعت در محیط پایه حاوی ۵ درصد نمک سدیم کلراید حاوی ۰/۵ میلی مولار تلوریت با ۲ درصد مایه تلقیح (اسیدیته ۷/۵) نتایج میانگین سه تکرار جداگانه بوده و میله خطا برای آن نشان داده شده است.

اثر غلظت‌های مختلف تلوریت بر رشد، تولید آنزیم و حذف تلوریت

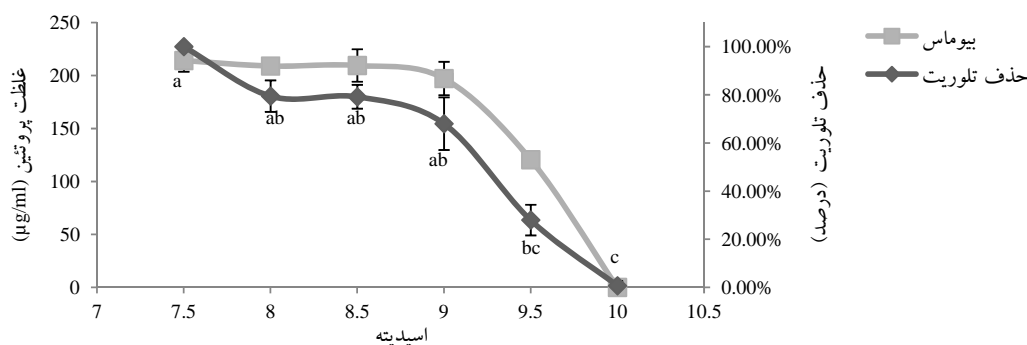
نتایج رشد و فعالیت آنزیم و حذف تلوریت در حضور غلظت‌های مختلف تلوریت محلول در شکل‌های ۷ و ۸ نشان داده شده است. بیش‌ترین فعالیت آنزیم U/mg ۰/۰۲۶۵ در غلظت ۰/۱ میلی‌مولار تلوریت به دست آمد. با افزایش غلظت میزان تولید بیوماس و فعالیت آنزیم کاهش نشان می‌دهد. میزان فعالیت آنزیم در ۰/۱ میلی‌مولار و ۰/۲۵ تلوریت تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. حذف تلوریت نیز با میزان بیوماس هم‌خوانی دارد.

اثر اسیدیته بر فعالیت آنزیم، رشد و حذف تلوریت
نتایج حاصل از اثرات اسیدیته اولیه محیط کشت تولید، بر میزان رشد، حذف تلوریت و فعالیت آنزیم در

شکل ۹ و ۱۰ نشان داده شده است. طبق شکل، بیش‌ترین فعالیت ردوکتنازی معادل U/mg ۰/۰۳۰۳ در pH 8 مشاهده شد. بررسی فعالیت آنزیم در اسیدیته‌های مختلف گویای آن است که تفاوت معنی‌داری بین اسیدیته‌های ۷/۵ تا ۹ وجود نداشته و در اسیدیته ۱۰ فاقد رشد قابل ملاحظه به منظور بررسی فعالیت آنزیم بود. همچنین، سوبه در اسیدیته‌های اسیدی ۶ نیز رشد ضعیفی را نشان می‌داد ولی به این علت که تلوریت در اسیدیته کمتر از ۷/۵ در بافر مخلوط مورد استفاده حلالیت کمی داشت، رشد و فعالیت در اسیدیته‌های اسیدی بررسی نشد. در اسیدیته ۷/۵ حذف تلوریت به شکل معنی‌دار از اسیدیته‌های دیگر بالاتر بود.



شکل ۹- اثر اسیدیته بر فعالیت آنزیم و میزان رشد در زمان ۳۰ ساعت در محیط پایه حاوی ۵ درصد نمک سدیم کلراید حاوی ۰/۱ میلی‌مولار تلوریت با ۲ درصد مایه تلقیح (اسیدیته ۷/۵). نتایج میانگین سه تکرار جداگانه بوده و میله خط برای آن نشان داده شده است. مقادیر نشان‌گذاری شده با حروف لاتین مختلف دارای اختلاف معنی‌دار ($P \text{ value} < 0.05$) هستند.

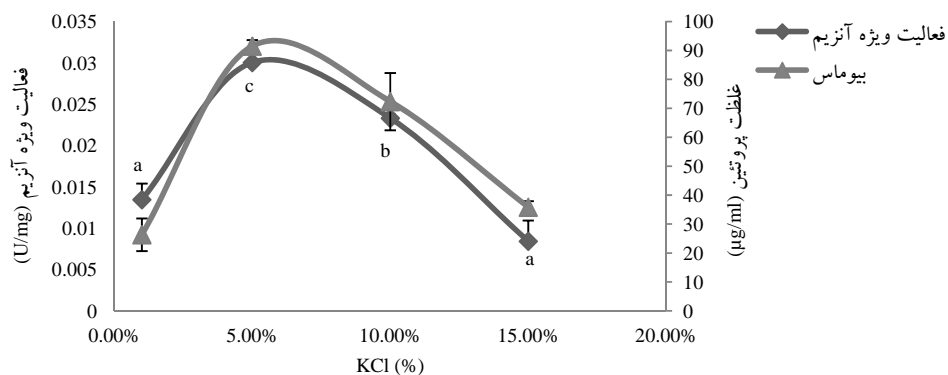
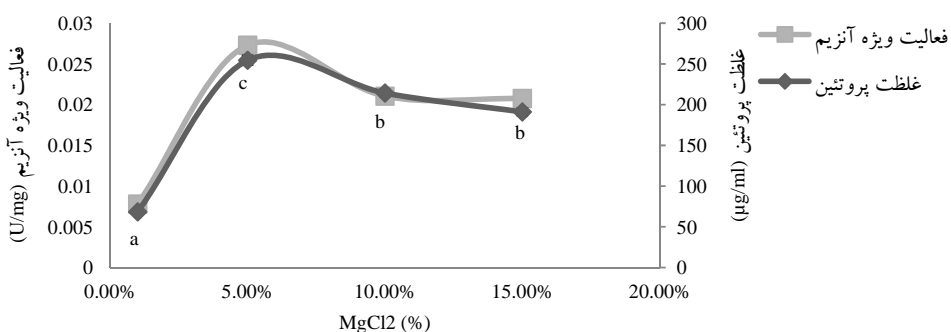
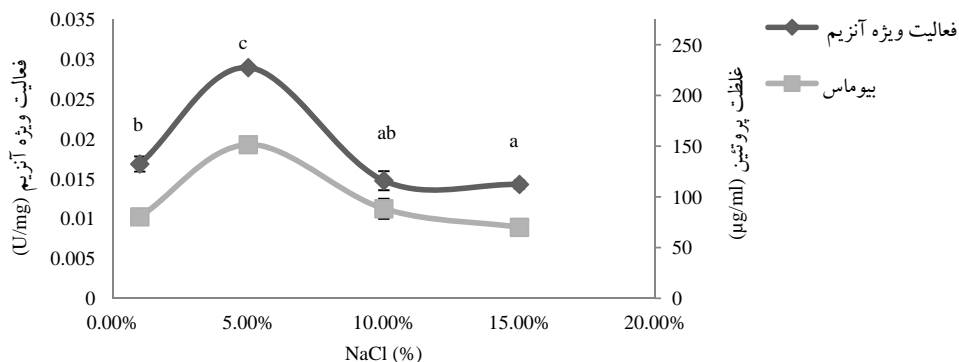


شکل ۱۰- اثر اسیدیته بر حذف تلوریت و میزان رشد در زمان ۳۰ ساعت در محیط پایه حاوی ۵ درصد نمک سدیم کلراید حاوی ۰/۱ میلی‌مولار تلوریت با ۲ درصد مایه تلقیح (اسیدیته ۷/۵). نتایج میانگین سه تکرار جداگانه بوده و میله خط برای آن نشان داده شده است. مقادیر نشان‌گذاری شده با حروف لاتین مختلف دارای اختلاف معنی‌دار ($P \text{ value} < 0.05$) هستند.

اثر نمک‌های کلرایدی

و در غلظت ۵ درصد KCl و معادل ۰/۰۳۰ U/mg و سنجیده شده است. میزان تولید بیوماس نیز با میزان فعالیت آنزیم هم‌خوانی دارد.

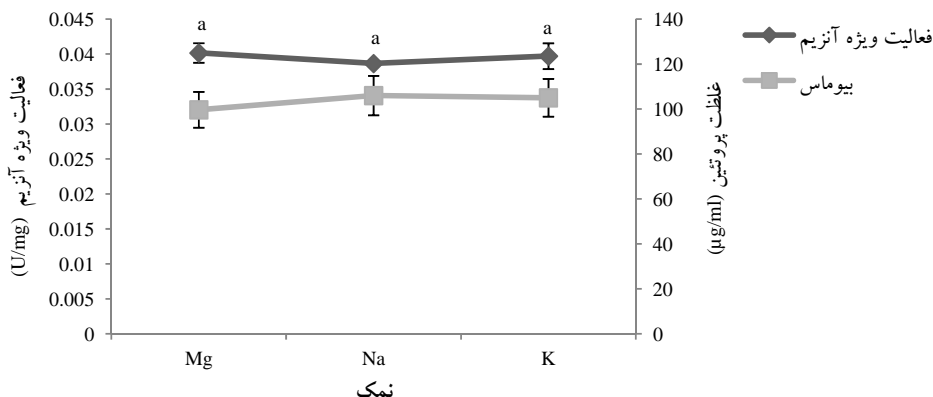
شکل ۱۱ نتایج تاثیر غلظت‌های مختلف نمک جایگزین بر روی رشد و فعالیت آنزیم را نشان می‌دهد. بیش‌ترین میزان تولید در غلظت ۵ درصد NaCl و معادل ۰/۰۲۹ U/mg، ۵ درصد $MgCl_2$ و معادل ۰/۰۵۴ U/mg



شکل ۱۱- اثر غلظت‌های مختلف سدیم کلراید، منیزیم کلراید، پتاسیم کلراید بر تولید آنزیم و رشد در محیط پایه حاوی ۵ درصد نمک سدیم کلراید حاوی ۰/۱ میلی‌مولار تلوریت با ۲ درصد مایه تلقیح (اسیدیته ۷/۵). مقادیر نشان‌گذاری شده با حروف لاتین مختلف دارای اختلاف معنی‌دار ($P \text{ value} < 0.05$) هستند.

همان طور که مشاهده می شود، بیش ترین میزان فعالیت آنزیم 0.039 ، 0.038 ، 0.04 U/mg به ترتیب در غلظت های 5 درصد $MgCl_2$ ، 5 درصد NaCl و 5 درصد KCl مشاهده می شود. حذف تلوریت در این نمک ها به شکل 100 درصد انجام شد.

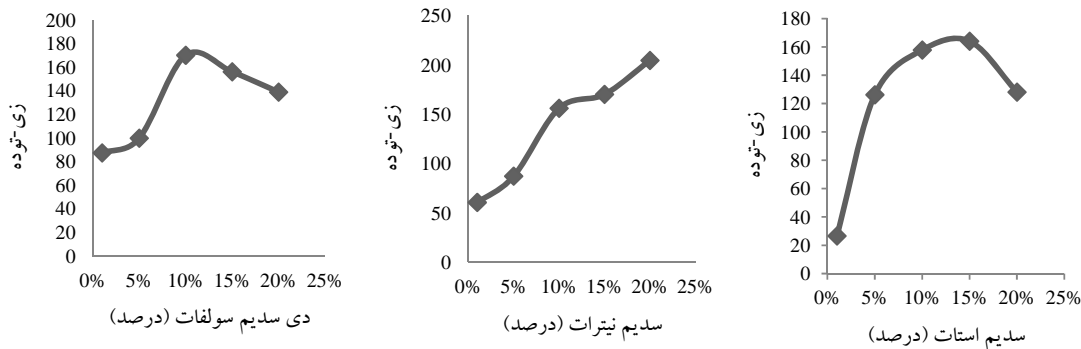
مقایسه اثر سدیم کلراید، پتاسیم کلراید، منیزیم کلراید بهینه باکتری *Salinicoccus iranensis* QW6 در نبود یون سدیم نیز به خوبی قادر به رشد است. نتایج اثر غلظت های مختلف $MgCl_2$ ، NaCl و KCl روی رشد و فعالیت آنزیم در شکل ۱۲ نشان داده شده است.



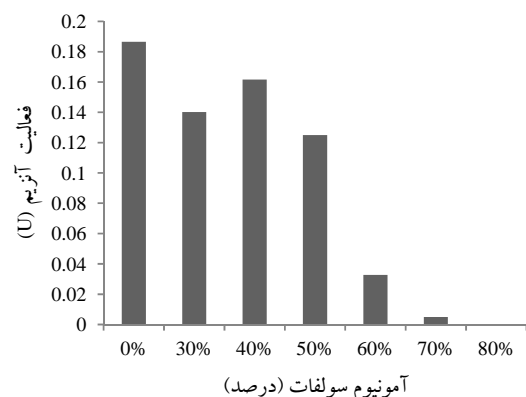
شکل ۱۲- مقایسه بهینه نمک های سدیم، منیزیم و پتاسیم کلراید بر فعالیت آنزیم و رشد در محیط پایه حاوی 5 درصد نمک سدیم کلراید حاوی 0.1 میلی مولار تلوریت با 2 درصد مایه تلقیح (اسیدیته $7/5$). مقادیر نشان گذاری شده با حروف لاتین مختلف دارای اختلاف معنی دار (P value < 0.05) هستند.

نیترات با افزایش غلظت نمک افزایش می یافت ولی هیچ گونه فعالیت آنزیمی در این نمک ها ردیابی نشد (شکل ۱۳). در ضمن با وجود رشد روی غلظت های مختلف نمک، حذفی به شکل مشاهده رسوب سیاه رنگ انجام نشده یا با روش مورد استفاده (DDTC) قادر به سنجش آن نبود.

اثر نمک های مختلف سدیم نیترات، دی سدیم سولفات و سدیم استات روی رشد و فعالیت آنزیم باکتری *Salinicoccus iranensis* QW6 قادر به رشد قابل ملاحظه در نمک های مورد آزمون نبوده ولی به ترتیب رشد دی سدیم سولفات و سدیم استات در غلظت های 10 و 15 درصد بهتر بود. در مورد



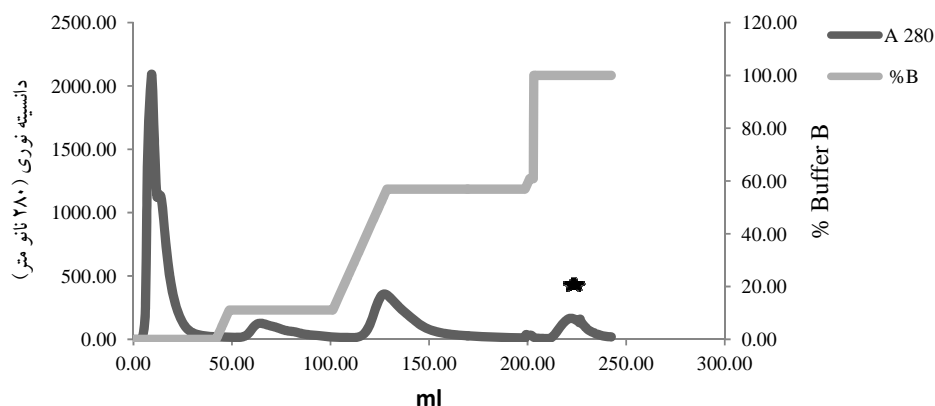
شکل ۱۳- اثر نمک های سدیمی بر رشد و فعالیت آنزیم. باکتری در محیط LB با اسیدیته $7/5$ تلقیح شد



شکل ۱۴- رسوب‌دهی با آمونیوم سولفات. غلظت‌های مختلف آمونیوم سولفات به منظور رسوب دادن پروتئین (های) مورد نظر از ۳۰-۸۰ درصد به کار گرفته شد.

نتایج ستون فنیل سفارز

۱۲۰ فرکشن از بارگذاری نمونه عصاره سلولی پس از رسوب با آمونیوم سولفات، روی ستون فنیل سفارز جمع‌آوری و برای تعیین فعالیت آنزیمی سنجش شد. کروماتوگرام حاصل از سنجش شکل ۱۵ مشاهده می‌شود. فعالیت آنزیمی در بخش انتهایی ستون (۹۵ درصد بافر B) مشاهده شد.



شکل ۱۵- کروماتوگرام ستون فنیل سفارز. ستون با Tris-HCl اسیدیته ۸ به تعادل رسانده شده بود. فعالیت آنزیمی در در پیک انتهایی ستون مشاهده شد که با ستاره در بالای پیک مورد نظر نشان داده شده است. مقدار جذب (mAu) در طول موج ۲۸۰ نانومتر و درصد B میزان بافر B افزوده شده به ستون به منظور شستشو است.

خالص‌سازی آنزیم

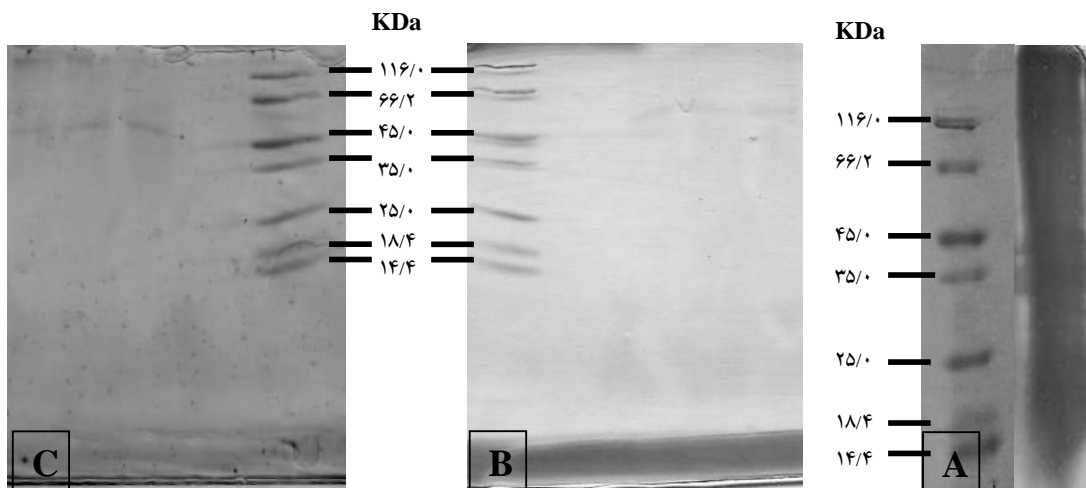
رسوب‌دهی به روش آمونیوم سولفات روش مناسبی برای رسوب دادن آنزیم بود. در ابتدا تصمیم بر این بود تا از روش بخش‌بندی^{۲۷} توسط آمونیوم سولفات برای خالص‌سازی استفاده شود ولی به علت عدم تکرارپذیری از این روش صرف نظر و از همان ماکزیمم غلظت به منظور رسوب‌دهی استفاده شد. در این روش از عصاره سلولی با غلظت ۱۱۴۴۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر استفاده شد. بخش‌هایی که دارای فعالیت آنزیمی بودند، بررسی شدند (شکل ۱۴). با محاسبه فعالیت ویژه، میزان درصد مناسب آمونیوم سولفات به منظور رسوب پروتئین (های) مد نظر ۶۰ درصد به دست آمد.

از آنجا که به نظر آنزیم وابستگی به نمک از خود نشان می‌داد نمونه‌ها بدون دیالیز و با دیالیز سنجش فعالیت آنزیمی شدند. عصاره دیالیز شده در صورت دیالیز علیه بافر فسفات فعالیت از خود نشان نمی‌داد. علاوه بر آن گرماگذاری بخش فعال در حضور سوپسترا نشان داد که با استفاده از درصد آمونیوم سولفات به دست آمده فرآیند ردوکنازی به شکل رسوب سیاه رنگ در محیط مشاهده شد.

ردوکتازی هم مشاهده شد. تغلیظ نمونه نیز نشان داد که در محدوده جرم مولکولی بالاتر از ۱۱۶ کیلودالتون نیز یک باند تغلیظ شده حضور دارد. علاوه بر آن هم در چاهک و هم اطراف این باندها حضور پروتئین مشاهده می شد.

بررسی پروتئین ها با الکتروفورز SDS-PAGE

الکتروفورز بخش فعال به دست آمده از ستون تغلیظ یکی از باندها در محدوده جرم مولکولی ۵۷ کیلودالتون را نشان داد (شکل ۱۶). در این بخش علاوه بر فعالیت تلوریت ردوکتازی، فعالیت سلنیت و نیترات



حذف تلوریت بالاتر به معنای فعالیت بیش تر آنزیم (ها) تعبیر می شد. با توجه به نتایج رشد همان گونه که انتظار می رفت هر چه غلظت اکسی آنیون سمی بالاتر بود، مدت زمان فاز تاخیر میکروارگانسیم هم بیش تر شد. حتی در غلظت های کم تلوریت هم فاز تأخیر در رشد میکروارگانسیم مشاهده می شود که بیان گر سمیت بالای اکسی آنیون و آماده سازی میکروارگانسیم برای مقابله با آن است. در مورد غلظت ۰/۱ میلی مولار تلوریت این موضوع کم رنگ تر بود بدین علت که این غلظت با توجه به MIC میکروارگانسیم که ۱۲ میلی مولار گزارش شده، کم محسوب شده و میکروارگانسیم قادر است به آسانی با آن مقابله نموده و تفاوت زیادی با شاهد و در شرایط بدون حضور اکسی آنیون سمی نداشته باشد. این موارد نیز پیش تر در نتایج کبیری و همکاران^{۲۸} و نیز صعودی و همکاران^{۲۹} گزارش شده بود (۱۳ و ۲۵).

بحث و نتیجه گیری

با وجود مطالعات زیاد بر روی مقاومت به تلوریت و سایر اکسی آنیون ها، تا کنون در زمینه شناسایی عوامل دخیل در مسیر احیای تلوریت کوشش های اندکی انجام شده است.

این مطالعه ها مربوط به میکروارگانسیم های غیر نمک دوست بوده و با وجود مقاومت ذاتی بالای نمک دوست ها به نمک بر روی آن ها، پژوهشی در این زمینه انجام نشده است. علت استفاده از باکتری *Salinicoccus iranensis* QW6، علاوه بر هالوفیل بودن و بومی بودن سویه، مقاومت بالاتر آن به تلوریت نسبت به سایر هالوفیل های گزارش شده بود (۲۱-۲۴). به منظور بررسی فعالیت مکانسیم تلوریت زدای سعی شد از تکنیک های میکربی استفاده شود. در این روش،

تلوریت در باکتری مورد بررسی در محلی در داخل سلول باکتری واقع شده است.

به منظور انجام بررسی و خالص‌سازی آنزیم از غلظت ۰/۵ میلی‌مولار تلوریت استفاده شد. پس از سونیکاسیون، فعالیت آنزیم مثبت بود و کاهش جذب در طول زمان مشاهده می‌شد ولی این مقدار فعالیت آنزیمی اندک بود به گونه‌ای که آغاز فرآیند خالص‌سازی با آن انجام پذیر نبود؛ زیرا در طی مراحل خالص‌سازی این مقدار فعالیت که تنها عامل شناسایی آنزیم بود، قابل ردیابی نبود. بررسی تأثیر شرایط مختلف حضور تلوریت، حضور سلنیت، حضور تلوریت و سلنیت، حضور نیترات و بدون هر گونه اکسی‌آنیون بر میزان فعالیت ویژه آنزیم، عدم القایی بودن آنزیم را پیشنهاد می‌کرد.

بهبود فعالیت آنزیم با روش OFAT افزایش فعالیت آنزیم تلوریت زدای را به همراه داشت.

اثر غلظت‌های مختلف تلوریت

افزایش فعالیت آنزیم در حضور غلظت‌های مختلف تلوریت عدم القاگر بودن آن را برای آنزیم مورد نظر نشان داد؛ ولی نتایج حذف تلوریت این گونه نشان می‌داد که با افزایش غلظت اکسی‌آنیون حذف تلوریت نسبت به فعالیت آنزیمی بالاتر است که این موضوع می‌تواند حضور مسیرهای مختلف حذف تلوریت در باکتری را نشان دهد. وابستگی بین بیوماس و فعالیت آنزیم، فرض القا شونده بودن آنزیمی را که با این روش به دنبال آن بودیم، رد نمود. پیش‌تر نیز چوانگک و همکاران^{۳۰} و نیز موسکوسو و همکاران^{۳۱} عدم وجود ارتباط بین غلظت‌های مختلف تلوریت و فعالیت آنزیم را مربوط به القایی نبودن آن گزارش کردند (۹ و ۲۸).

در مورد حذف تلوریت نتایج جالب به نظر می‌رسید با افزایش غلظت تلوریت تا ۰/۵ میلی‌مولار حذف آن هم بیش‌تر انجام می‌شود. آموزگار و همکاران نیز حذف تلوریت در این غلظت را توسط میکروارگانیسم بیش‌تر گزارش نمودند (۱۷). سریع‌ترین میزان حذف در غلظت ۰/۱ میلی‌مولار تلوریت مشاهده شد. کمی بعد حذف در غلظت ۰/۲۵ میلی‌مولار اکسی‌آنیون مشاهده شد که این موضوع با اختلاف میزان بیوماس مشاهده شده مطابقت دارد. با افزایش غلظت اکسی‌آنیون همان‌طور که میزان بیوماس کاهش بیش‌تری می‌یابد، حذف اکسی‌آنیون هم کم‌تر انجام می‌شود. در غلظت ۱ میلی‌مولار تلوریت حذف به اندازه‌ای کم و نوسان‌دار بود که از ارائه آن صرف نظر شد. نتایج پژوهشی دیگر توسط آموزگار و همکاران بر روی باکتری *Thermoactinomyces sp.* QS-2006 انجام شده بود، نشان داده شد که حذف تلوریت توسط سویه با افزایش غلظت اکسی‌آنیون تا ۱ میلی‌مولار بیشتر انجام می‌شود (۲۶). نکته مشابه این است که حتی در غلظت‌های بالاتر بین ۱، ۲ و ۳ میلی‌مولار تلوریت، ۱ میلی‌مولار حذف بالاتری را نشان داد. نوسانات مشابهی در حذف تلوریت در هر دو گزارش مشاهده می‌شود.

بررسی فعالیت آنزیمی در محیط بیرون سلولی (محیط کشت) منفی بود. این محیط تغلیظ شد ولی باز هم آزمون آنزیمی مربوطه به آن هیچ فعالیت آنزیمی را با این روش نشان نداد. اگرچه بررسی روی *Pseudomonas stutzeri* نشان داده بود که پیریدین ۲ و ۶ بیس تیوکربوکسیلیک اسید (PDTC) که یک سیدروفور است یا محصولات تولید شده توسط آن، هم در احیای سلنیت و هم در احیای تلوریت نقش دارند (۲۷)، این نشان می‌دهد که آنزیم مؤثر در حذف

اثر نمک‌های مختلف

آموزگار و همکاران پیش‌تر با رشد باکتری نمک‌دوست *Thermoactinomyces* sp. QS-2006 در حضور نمک‌های اخیر رشد و حذف تلوریت مناسبی را گزارش کرده بودند (۲۶). در حالی که رشد و حذف تلوریت در این نمک‌ها دیده نشد. هر دو باکتری مقایسه شده از راسته باسیلاز هستند. به نظر می‌رسد میکروارگانیزم مربوطه وابستگی به یون سدیم نشان نمی‌دهد. این موضوع باز هم تأییدکننده همراهی حذف تلوریت با میزان بیوماس است. نکته جالب توجه این بود که بیشتر نمک دوست‌ها نیازمندی به NaCl نشان می‌دهند؛ ولی میکروارگانیزم مورد مطالعه در حضور $MgCl_2$ و KCl نیز رشد قابل ملاحظه‌ای، برابر با رشد در حضور NaCl ($P \text{ value} < 0.05$)، از خود بروز می‌داد. شاید این نمک دوست وابستگی به یون کلراید دارد. مقایسه هر سه نمک $MgCl_2$ ، KCl و NaCl در یک آزمایش نشان داد هر سه، رشد، فعالیت آنزیم و حذف تلوریت را به خوبی پشتیبانی می‌کردند و تفاوت معنی‌داری ($P \text{ value} < 0.05$) نشان ندادند. در هر سه نمک حذف تلوریت به شکل ۱۰۰ درصد انجام شده بود. آشننگرف و همکاران^{۳۳} بین حذف تلوریت در حضور نمک‌های $MgCl_2$ و KCl را تفاوت در میزان حذف تلوریت گزارش کرده بودند، که تفاوت مشاهده شده به زمان بررسی میزان حذف در این نمک‌ها نسبت داده شد (۱۷).

خالص سازی آنزیم با تلفیق دو تکنیک رسوب‌دهی با آمونیوم سولفات و فیل سفارز به نظر روش مناسبی برای خالص سازی آنزیم بود. کروماتوگرام ستون فیل سفارز سه پیک نشان داد که فعالیت آنزیمی در پیک انتهایی مشاهده شد. تغلیظ نمونه نیز نشان داد که هنوز

پروتئین‌های دیگری هم در چاهک و هم در اطراف باند به نظر تغلیظ شده حضور دارد. به همین منظور نیاز است تا در ادامه با افزودن روش‌های دیگر به آن، خالص سازی را بهبود دهیم. به منظور تأیید احیای تلوریت توسط آنزیم مربوطه، از گرماگذاری مستقیم آن با تلوریت و NADH استفاده شد که نتایج حضور آنزیمی را که در احیای این اکسی‌آیون نقش دارد، تأیید کرد.

این نمونه به طور نسبی خالص سازی شده، قادر به احیای سلنیت و نیترات نیز بود. از آنجا که فعالیت تلوریت ردوکتازی نیترات ردوکتازها به عنوان قوی‌ترین فرضیه تا کنون مطرح است، این احتمال را دور از ذهن نمی‌کند که ما به سمت خالص سازی این آنزیم گام نهاده‌ایم ولی اثبات آن منوط به خالص سازی کامل آنزیم است.

مطالعاتی که در زمینه خالص سازی نیترات ردوکتازها در باکتری‌های نمک دوست بوده، یک مورد و آن هم در سال ۲۰۱۰ توسط فیلی مونکو و همکاران^{۳۳} انجام گرفت، که در آن تنها یک زیر واحد را که همان NarG بود، گزارش نمود (۲۹).

در مجموع نتایج این پژوهش بهینه‌سازی آنزیم دخیل در تبدیل زیستی تلوریت به تلوریوم و خالص سازی نسبی آن را به همراه داشت. اما باید خالص سازی به شکل کامل در ادامه کار انجام شود. همچنین، احتمال حضور مسیرهای دیگر و غیر وابسته به NADH نیز بررسی شود.

References

- (1) Fthenakis V M, Kim H C, Alsema E. Emissions from photovoltaic life cycles. *Environmental Science and Technology*. 2008; 42 (6): 2168–74.
- (2) Taylor DE. Bacterial tellurite resistance. *Trends in Microbiology*. 1999; 7 (3):111–5.
- (3) Bradley D. Detection of tellurite-resistance determinants in IncP plasmids. *Journal of general Microbiology*. 1985; 131 (11): 3135–37.
- (4) White C, Wilkinson S C, & Gadd G M. The Role of Microorganisms in Biosorption of Toxic Metals and Radionuclides. *International Biodeterioration and Biodegradation*. 1995; 35 (1-3) : 17- 40.
- (5) Avazeri C, Turner R J, Pommier J, Weiner J H, Giordano G and Verméglio A. Tellurite reductase activity of nitrate reductase is responsible for the basal resistance of *Escherichia coli* to tellurite *Microbiology*. 1997; 143 (Pt 4): 1181- 9.
- (6) Turner RJ, Aharonowitz Y, Weiner JH & Taylor DE. Glutathione is a target in tellurite toxicity and is protected by tellurite resistance determinants in *Escherichia coli*. *Canadian Journal of Microbiology*. 2011; 47 (1): 33–40.
- (7) Moore M D, Kaplan S. Members of the family *Rhodospirillaceae* reduce heavy-metal oxyanions to maintain redox poise during photosynthetic growth. *American Society for Microbiology News*. 1994; 60 (1) : 17-23.
- (8) Coker V S, Richard RAD, van der Laan G, Lloyd JR. Formation of magnetic minerals by non- magnetotactic prokaryotes. In:D. Schüler editor. *Magnetoreception and Magnetosomes in Bacteria*. [Series Microbiology Monographs3 online]. Heidelberg: Springer; 2006 p. 275–300.
- (9) MoscosoH, SaavedraC, LoyolaC, PichuanesS, VasquezC. Biochemical characterization of tellurite reducing activities of *Bacillus stearothermophilus* v. *Research in Microbiology*. 1998; 149 (6): 389-97.
- (10) Kanekar P P, Kanekar S P, Kelkar A S. Halophiles –Taxonomy, Diversity, Physiology. In:Satyanarayana T, Johri B Neditors. *Microorganisms in Environmental Management*. 1st ed. New York: Springer; 2012. p. 1-3.
- (11) Weinheim KGaA. Nanobiotechnology. In:Niemeyer C M and Mirkin C A eds. *Nanobiotechnology*. 1st ed. Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co; 2004 p. 126- 33.
- (12) OrenA. Properties of halophilic proteins. In: Oren A. *Halophilic Microorganism and their Environment*. 1st ed. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers; 2003.
- (13) Kabiri M, Amoozegar M A, Tabebordbar M, Gilany K, Salekdeh G H. Effects of Selenite and Tellurite on Growth, Physiology, and Proteome of a Moderately Halophilic Bacterium. *Journal of Proteome Research*. 2009;8 (6): 3098– 108.
- (14) Amoozegar M A, Schumann P, Hajjighasemi M, Ashengroph M, Razavi M R. *Salinicoccus iranensis* sp. nov. , a novel moderate halophile. *Int. Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2008; 58 (Pt 1): 178–83.
- (15) Turner R J, Weiner J H, Taylor D E. Use of diethylditiocarbamate for quantitative determination of tellurite uptake by bacteria. *Annals of Biochemistry*. 1992; 204 (2): 292– 5.
- (16) Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Annals of Biochemistry*. 1976; 72 (1-2): 248-54.
- (17) Amoozegar M A, Ashengroph M, Malekzadeh F, Reza Razavi M, Naddaf S, Kabiri, M. Isolation and initial characterization of the tellurite reducing moderately halophilic bacterium, *Salinicoccus* sp. strain QW6. *Microbiological Research*. 2008; 163 (4): 456-65.

- (18) Etezad S M, Khajeh K, Soudi M, Ghazvini P T M, Dabirmanesh B. Evidence on the presence of two distinct enzymes responsible for the reduction of selenate and tellurite in *Bacillus* sp. STG-83. *Enzyme and Microbial Technology*. 2009; 45 (1): 1– 6.
- (19) Barbier GG, Campbell WH. Viscosity effects on eukaryotic nitrate reductase activity. *Journal of Biological Chemistry*. 2005 Jul; 280 (28): 26049–54.
- (20) Hochstrasser DF, Patchornik A, Merrill CR. Developmental of polyacrylamide gels that improve the separation of proteins and their detection by silver staining. *Annals of Biochemistry*. 1988; 173 (2): 412–23.
- (21) Moore M D, Kaplan S. Members of the family Rhodospirillaceae reduce heavy-metal oxyanions to maintain redox poise during photosynthetic growth. *American Society for Microbiology News*. 1994; 60: 17–23.
- (22) Pearion C T, Jablonski P E. High-level intrinsic resistance of *Natronococcus occultus* to potassium tellurite. *FEMS Microbiology Letters*. 1999; 174: 19–23.
- (23) Rajwade J M, Paknikar K M. Bioreduction of tellurite to elemental tellurium by *Pseudomonas mendocina* MCM B-180 and its practical application. *Hydrometallurgy*. 2003; 71: 243–8.
- (24) Rathgeber C, Yurkova N, Stackebrandt E, Beatty J T, Yurkov V. Isolation of tellurite- and selenite-resistant bacteria from hydrothermal vents of the Juan de Fuca Ridge in the Pacific Ocean. *Applied and Environmental Microbiology* 2002; 68: 4613–22.
- (25) Soudi M R, Ghazvini P T M, 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. *Journal of hazardous materials*. 2009; 165 (1-3): 71–7.
- (26) Amoozegar M A, Khoshnoodi M, Didari M, Hamed J, Ventosa A, Baldwin S A. Tellurite removal by a tellurium-tolerant halophilic bacterial strain, *Thermoactinomyces* sp. QS-2006. *Annals of Microbiology*. 2012; 62 (3): 1031-7.
- (27) Zawadzka A M, Crawford R L, Paszczyński A J. Pyridine-2, 6-Bis (Thiocarboxylic Acid) Produced by *Pseudomonas stutzeri* KC Reduces and Precipitates Selenium and Tellurium Oxyanions. *Applied and Environmental Microbiology*. 2006; 72 (5): 3119–29.
- (28) Chiong M, Gonzalez E, Barra R, Vasquez C. Purification and biochemical characterization of tellurite reducing activities from *Thermus thermophilus* HB8. *Journal of Bacteriology*, 1988; 170 (7): 3269–73.
- (29) Filimonenkov AA, Zvyagil'skaya RA, Tikhonova TV, Popov VO. Isolation and characterization of nitrate reductase from the halophilic sulfuroxidizing bacterium, *Thioalkalivibrio nitratireducens*. *Biochemistry (Mosc)*. 2010; 75 (6): 744-51.

-
- 1- Ammonium Sulfate Precipitation
 2- Hydrophobic Interaction Chromatography (HIC)
 3- Bioaccumulation
 4- Merck (Darmstadt, Germany)
 5- PhenylMethylsulphonyl Fluorid
 6- Diethyl dithiocarbamate (DDTC)
 7- Sigma (St. Louis, MO, USA) and
 8- Pharmacia
 9- Mojallali
 10- Amoozegar et al
 11- IBRC (Iranian Biological Resources Center)
 12- Shimadzu UV-160A
 13- OD₆₂₀ 1.5
 14- Bovine Serum Albumin (BSA)
 15- Bradford
 16- Mode
 17- One Factor At a Time (OFAT)
 18- Fractionation
 19- Fast Protein Liquid Chromatography
 20- Amicon
 21- Millipore
 22- SDS- PAGE
 23- One way ANOVA
 24- Duncan's multiple-range test
 25- IBM SPSS Statistics 19
 26- Inoculum
 27- Fractionation
 28- Kabiri et al
 29- Soudi et al
 30- Chiong et al
 31- Moscoso et al
 32- Ashengroph et al
 33- Filimonenkov et al

Investigation and Partial Purification of Tellurite Reducing Enzyme from a Moderately Halophilic Bacterium *Salinicoccus iranensis*

Sana Alavi

M.Sc. of Microbiology, Extremophiles Laboratory, University of Tehran, Iran. sana_alavi@ut.ac.ir

Mohammad Ali Amoozegar*

Associate Professor of Microbiology, University of Tehran, Iran, amoozegar@ut.ac.ir

Khosro Khajeh

Professor of Biochemistry, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran, khajeh@modares.ac.ir

Abstract

Introduction: Excessive use of tellurite nowadays, has suffered the environment from the toxic effects of the oxyanion. Hence, biological treatment of polluted areas is considered as an environmentally friendly and inexpensive method. Although the toxic effects of tellurite for most microorganisms have been reported, but several species of the bacteria including the halophilic bacteria used in this project can overcome the toxicity of the oxyanion by its reduction to the elemental form. The aim of this study was to identify the mechanism (s) involved in tellurite detoxification.

Materials and methods: In order to enhance and maintain enzymatic activity during purification, the test conditions and enzyme production by the strain were optimized. The optimization was done by One Factor at A Time (OFAT) method. Several factors, including: time, various percentages of inoculum, range of pH, concentration of tellurite and various salts effects were optimized. For assurance tellurite removal was examined during the experiment. The enzyme was purified by various methods, including ammonium sulphate precipitation and hydrophobic interaction column chromatography in which the Concentration of 1.4 M saturated ammonium sulphate was applied. The purity of the enzyme was assessed by SDS-PAGE during each phase.

Results: The optimum conditions obtained showed that at 30 hours, 3% inoculum, pH 7.5, without tellurite and with 5% NaCl the highest enzyme activity and tellurite removal are observed. Purification of the enzyme greatly reduced the concentration of unrelated proteins and caused a concentrated band which could be one subunit of the enzyme targeted. The partially purified enzyme's fraction was shown to have nitrate and selenite reductase activity other than tellurite reductase activity.

Discussion and conclusion: This study is an approach to the identification of the halophilic microorganisms Physiology and enzymes involved in restoring tellurite. The production of the enzyme responsible for this phenomenon has been optimized and partially purified.

Key words: Tellurite, Halophile, *Salinicoccus*

* Corresponding author, Extremophiles Lab, Dept. of Microbiology, Fac. of Biology and Center of excellence in Phylogeny of Living Organisms, College of Science, University of Tehran, Iran

Received: July 28, 2013 / **Accepted:** October 7, 2013