جذب ئیدروژن سولفوره به وسیله بژیاتوآ

دکتر گیتی امتیازی - زهره صهبایی

دانشگاه اصفهان - دانشکده علوم - آزمایشگاه تحقیقاتی بیولوژی

مقدمه

در حضور اکسیژن ، ترکیبات سولفور احیاء شده ، می‌توانند بوسیله متابولیسم میکروارگانیسمهای شیمیولیتوتروف ، مورد استفاده واقع شوند. بژیاتوآ، تیوپلوکا، تیوتریکس ،تریوتریکس ترموفیل که همگی رشته‌ای می‌باشند، باکتریهای میکروآئروفیلیکی هستند که قادرند H_2S را مطابق فرمول زیر، اکسید نمایند:

$$H_2S + 1/2O_2 \longrightarrow S + H_2O$$

$$(\Delta G = - 50.1 \text{ Kcal / mole })$$

دانه‌های سولفور در داخل سلولهای باکتریایی ذخیره و در عدم حضور H_2S به آرامی به سولفات ، اکسید می‌شوند. جرگنسون وریوزبک [۱] نشان دادند که این ارگانیسمهای گرادیان تیپیک ، قادرند که موقعیت خود را در بین یک محیط بیهوازی ، ته‌نشین و آبی که دارای مقدار کمی اکسیژن است و در تماس با محیط ته‌نشین می‌باشد، تعیین نمایند. دانه‌های بزرگ و قابل مشاهده سولفور در بژیاتوآ باعث شد که سرگئی وینوگرادسی [۲] در حدود صد سال قبل ، متابولیسم شیمیولیتوتروفی میکروبی را به آن نسبت دهد. هرچند بژیاتوآ ظاهراً انرژی خود را از اکسیداسیون H_2S و S° بدست می‌آورد، تا مدتی قبل ، رشد بژیاتوآ در محیط کشت خالص ، تحت شرایط شیمیولیتوتروفی محض ، غیر ممکن ونظر وینوگرادسکی مردود شمرده می‌شد. اما جاناش و نلسون[۳] نشان دادند که با کنترل فشار و غلظت O_2 و SH_2 بژیاتوآ می‌تواند ازگوگرد به عنوان تنها منبع انرژی استفاده کند و رشد اتوتروفی داشته باشد.

در طی آزمایشاتی که در این بررسی انجام گرفت ، رشد شیمیولیتوتروفی سوشی از بژیاتوآ بار دیگر به اثبات رسید. لازم به ذکر است که این میکروارگانیسم ،

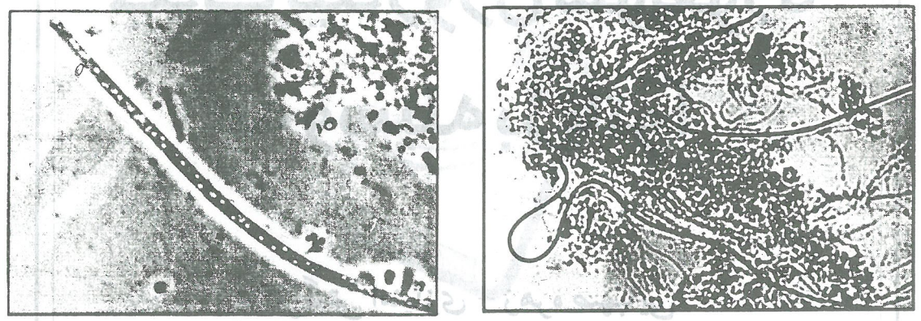
۱- *Revsbeck & Jergensen*

۲- Sergi Winogradsky

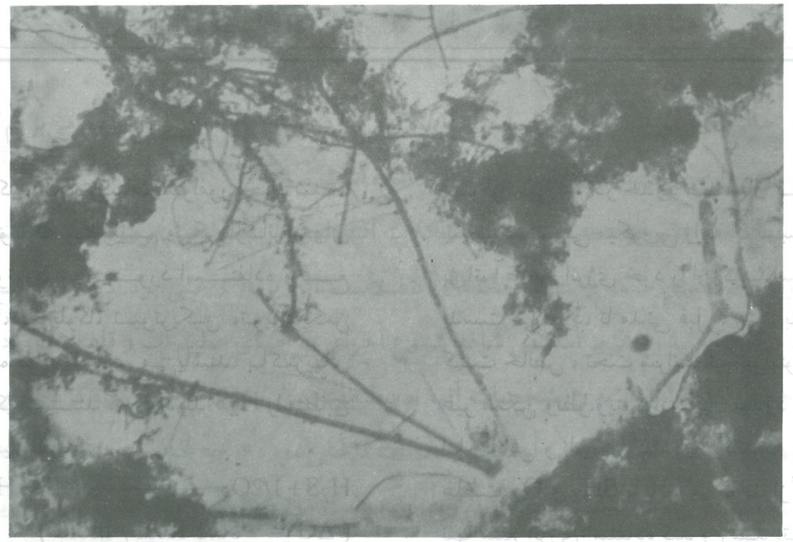
۳- *Jannasch & Nelson*

به راحتی در مایع مخلوط استخرهای هوادهی تصفیه خانه های فاضلاب شمال و جنوب اصفهان دیده شده است .(شکل ۱ و۲)

حالتی که بصورت رشته‌ای ظاهر شوند ، دارای عرض ثابتی هستند. بژیاتوآ می‌تواند بصورت سلولهای منفرد و یا رشته‌ای دارای ۵۰ سلول ویا بیشتر، وجود داشته



شکل (۱) - شکل تیپیک «بژیاتوآ» باگرانولهای سولفور پس از تست سولفور



شکل (۲) - «بژیاتوآ» همراه با تعدادی از باکتریهای رشته‌ای پس از رنگ آمیزی گرم

جنس بژیاتوآ به گروه باکتریهای بدون فتوسنتز ، بدون جسم میوه‌ای و متحرک و به زیرگروه باکتریهای اکسیدکننده سولفور ، تعلق دارد. سلولهای بژیاتوآ، بدون رنگ و دارای ۱/۰ تا حدود ۲۰۰ میکرومتر عرض و حدود ۱۰-۲ میکرومتر درازا می‌باشند. البته در باشند. سلولهای رشته‌ای سوشهای باریکتر (کمتر از ۷ میکرومتر، عرض) بصورت استوانه‌ای ظاهر می‌شوند، ولی در سوشهای عریض‌تر، معمولاً سلولهابه شکل دیسک می‌باشند. رشته‌های سلولی بصورت منفرد یا توده‌های نخی شکل می‌گیرند. در محیطهای آبی این

سلولها ممکن است در حد فاصل بین رسوب و آب یک بستر، تشکیل شوند. شکستگی رشته می‌تواند در اثر مرگ سلولی و یاایجاد سلولهای منفرد یا دوتایی (هورموگونیا) حاصل شود. ذخایر سولفور سلولها زمانی تشکیل می‌شوند که ، سلولها در حضور سولفید هیدروژن و در مورد بعضی از سوشها، در حضور تیوسولفات ، رشد نمایند.

ذخایر داخل سلولی پلی - بتا - هیدروکسی بوتیریک اسید (PHB) یا پلی فسفات ، نیز ممکن است در اینگونه سلولها، حضور داشته باشند . در این جنس سلولها بدون غلافند. هنگامی که رشته‌ها، به اجسام غوطه‌ور در آب می‌چسبند، قلاب نیز ممکن است مشاهده شود. سلولهای بژیاتوآ گرم منفی‌اند. هورموگونیا و رشته‌ها حرکت دارند. سلولها، هوازی یا میکروآئروفیلیک ، شیمیوارگانوتروف و اتوتروف اختیاری هستند. البته بعضی از سوشها هم بصورت میگزوتروف رشد می‌نمایند.متابولیسم بژیاتوآ ، تنفسی است و در آن ، اکسیژن مولکولی بعنوان پذیرنده نهایی الکترون مورد استفاده قرار می‌گیرد. بژیاتوآها، ارگانیسمهای گرادیانی هستند که در لایه‌های افقی ، در رسوبات حد فاصل بین ناحیه آزاد کننده سولفید و بدون اکسیژن زیرین و ناحیه دارای اکسیژن رویی رشد می‌نمایند. بژیاتوآها، در درجه حرات ۴۰-۰ درجه سانتیگراد قدرت رشد دارند.

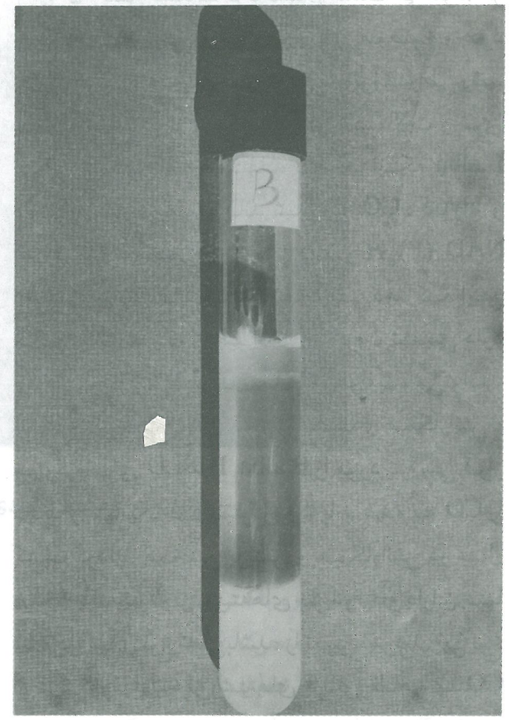
اخیراً بعضی از جنبه‌های متابولیسم سولفور بژیاتوآ مشخص شده است .اکسیداسیون سولفید به سولفور به وسیله B.alba ، یک عمل ساختمانی است و در سرعت رشد باکتری یا در سرعت رشد باکتری یا در سرعت سنتز پروتئین نمی‌تواند افزایشی را سبب شود. اکسیداسیون سولفید توسط B.alba وابسته به اکسیژن است و بوسیله تعدادی از جلوگیری کننده‌های انتقال الکترون ، جلوگیری می‌شود ، بنابراین پیشنهاد شده که اکسیداسیون سولفید با اکسیژن، از طریق سیستم انتقال الکترون ، کوپل می‌شود. بررسی های شیمیایی و ایزوتوپی و عدم تولید اسید سولفوریک،نشان می‌دهند که سولفوری که بوسیله B.alba تشکیل می‌شود، در مرحله بعدی ، ظاهراً به سولفات اکسید نمی‌شود.

در بعضی از سوشهای بژیاتوآ متعلق به آب شیرین ، مقدارکمی از CO_2 ، تثبیت می‌شود، ولی این مکانیسم با مکانیسم هتروتروفی سازگاری دارد نه با سیکل Calvin-Benson .اخیراً در عصاره‌های سوشهای آب شیرین OH-75-2a و B.alba B18L ، سطوح پائینی از فعالیت ریبولوز ۱- و ۵- بی فسفات کربوکسیلاز/اکسیژناز (RuBis Co) مشاهده شده است . علاوه براین ، یک الگوی ژنی مشتق از ژن کد کننده قطعه بزرگ RuBis Co متعلق به Abactstuc budykabts، با DNA جدا شده از سوش OH-75-2a بطور قوی ، هیبرید می‌شود. در طی رشد اتوتروفی بوسیله سوش متعلق به‌آب دریا، CO_2 بوسیله ریبولوز ۱- و ۵- بیس فسفات کربوکسیلاز تثبیت می‌شود. هر چند تاکنون مدرک محکمی برای این موضوع وجود ندارد، اما امکان دارد که سوشهای بژیاتوآ ، در طی رشد بر روی استات ، از سیکلهای گلی اکسالات و تری کربوکسیلیک اسید استفاده نمایند. اینکه B.alba دارای سیتوکرومهای باند شده با CO ، atype و C type و همچنین یوبی کینون ۸ و NAD (P) H دهیدروژنازها می‌باشد، نشان می‌دهد که این میکروارگانیسم یک زنجیر انتقال الکترون تنفسی دارد که در آن ، اکسیداسیون استات و سولفید، می‌توانند کوپل شوند. چندی قبل اشمیت و همکارانش ، سیتوکرومهای B.alba B18LD را مورد بررسی قرار دادند و تنها یک فلاوسیتوکروم c باند شده به CO را کشف کردند. همچنین پرینس و همکارانش در سال ۱۹۸۸ یک نمونه از رشته‌های بژیاتوآ که دارای تنها سنتوکرومهای نوع c می‌باشد، را تعیین نمودند. این نوع از سیتوکرومهای c از رشته‌های بژیاتوآ ظاهراً با CO باند نمی‌شود.

روش آزمایش و نتیجه

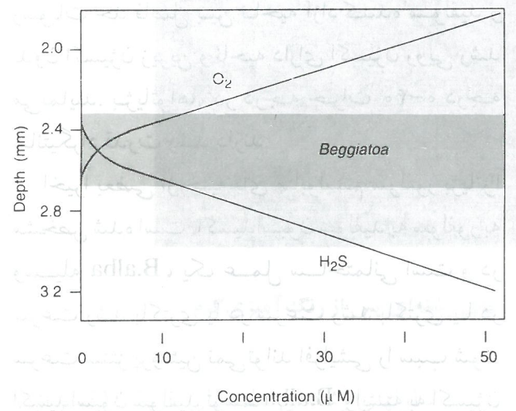
در طی آزمایشاتی که در این بررسی انجام گرفت ابتدا ۱۰۰میلی‌لیتر از محیط کشت عصاره یونجه را در یک ارلن ۲۵۰ میلی‌لیتر استریل نموده سپس ۱۰ میلی‌لیتر از فاضلاب خروجی را به آن اضافه نموده و پس از آن بمدت یک هفته در شرایط آزمایشگاه نگهداری گردید تااینکه ورقه‌ای سفید، سطح محیط راپوشانید.

در مرحله بعد، از محیط فوق به محیط کشت دیگری که در داخل لوله تهیه گردید، تلقیح شد. این محیط کشت از دو قسمت تشکیل شده است ، بخش زیرین آن،سولفید-آگار (محیط کشت مینرال با ۱/۵٪ آگار و ۸-۱ میلی مولار سولفید سدیم) و بخش رویی آن مینرال -آگار (محیط کشت مینرال با ۰/۲٪آگار) می‌باشد. در ضمن قسمت بالایی لوله خالی ماند. لازم به ذکر است که باکتری به بخش زیرین محیط فوق ، تلقیح گردید. این محیط کشت بمدت ۴ روز تا یک هفته در شرایط آزمایشگاه،نگهداری گردید. پس از نگهداری محیط کشت لوله‌ای بمدت ۴ روز تا یک هفته ، در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد همانطور که در شکل ۳ منحنی شماره ۱ مشاهده می‌شود، حلقه‌ای قهوه‌ای رنگ در مکان خاصی از لوله تشکیل گردید.



شکل ۳ - رشد بژیاتوآ درگرادیان مناسبی از سولفید و اکسیژن

منحنی (۱)
منحنی جذب SH_2 به وسیله بژیاتوآ در رابطه با تنظیم فشار اکسیژن



در محیط کشت فوق ، سولفید، آزادانه می‌تواند در محیط رویی حرکت کند. منبع اکسیژن این لوله بسته نیز هوای بالای لوله می‌باشد. بژیاتوآ که در قسمت زیرین این محیط تلقیح شده بود، موقعیت خود را در گرادیان مناسبی از سولفید واکسیژن ، انتخاب کرده و در آن‌جا شروع به رشد می‌کند.

با وجود آنکه بژیاتوآ عامل ایجاد بالکینگ در تصفیه فاضلاب در سیستم لجن فعال می‌باشد، ولی در کم کردن آلودگی SH_2 و جذب آن می‌تواند مؤثر باشد.

طبق منحنی شماره ۱ ، با تنظیم فشار اکسیژن و SH_2 بژیاتوآ می‌تواند SH_2 را جذب نموده و از آن بعنوان منبع انرژی استفاده کند . بنابراین در تنظیم SH_2 محیط آلوده می‌تواند مؤثر باشد.

با توجه به منحنی شماره ۱ بژیاتوآ به شرطی می‌تواند SH_2 را جذب کند که فشار اکسیژن تنظیم شده باشد به همین جهت باکتری از ته لوله با حرکت لغزنده به طرف ابتدای لوله حرکت می‌کند و در جایی که فشار اکسیژن مناسب باشد رشد کرده و یک هاله ایجاد می‌کند با رنگ‌آمیزی این هاله باکتریهای گرم منفی که خصوصیات آن مطابق با جدول (۱) می‌باشد مشاهده شد.

جدول (۱)- خصوصیات رنگ‌آمیزی و مورفولوژیکی تیپیک "بژیاتوا"

بررسی میکروسکوپی (Bright Field)			بررسی میکروسکوپی (Phase Contrast and Nomarski Interference Contrast)										
رنگ‌آمیزی گرم	رنگ‌آمیزی نایسر		ذخایر			خصوصیات رشته				دیواره عرضی		غلاف	چسبندگی	شکل سلول	اندازهٔ سلول (μm)
	A	B	سولفور		دیگر	عرض (μm)	طول (μm)	شکل	موقعیت	کامل	دندانه‌دار				
			A	B											
+ -	-	+ -	+ -	+	PHB	1.2-3.0	100-> 500	مستقیم	بطورآزاد در بین فلوکه‌ها	+ -	-	-	-	چهارگوش	2.0 × 6.0

رنگ‌آمیزی گرم : -+ :گرم متغیر،غالباً

رنگ‌آمیزی نایسر: A:رشته بطورکامل رنگ می‌گیرد.B:گرانولهایا نواحی +ve

ذخایر سولفور: A:در محیط in situ قابل مشاهده‌اند.B:پس از تست سولفور قابل مشاهده هستند.

REFERENCES

1. JORGENSEN, B.B. and REVESBECK. N.P. Colorless Sulfur Bacteria SPP and Thiovulum SPP in O_2 and H_2S Micrograd ient. *Applied and Environmental Microbiology.* 45:1261-1270 (1983).

2. NELSON, D.C. and JANNASCH, H.W. Chemoautotrophic Growth of a Marine Beggiatoa in Sulfide Gradient Cultures. *Archieves for Microbiology.* 136:262-269 (1983).

3. STROHL, W.R., SCHMIDT, T.; and Strohl and Tuovinen (editors). Mixotrophy of Beggiatoa and Thiothrix. *Microbial Chemoautotrophy*. Ohio St. Univ. Press, Colubus, OH. pp. 65-79 (1984).

4. NELSON, D.C. and Schlegel and Bowien (editors). Physiology and Biochemistry of Filamentous Sulfur Bactria. *Autotrophic Bacteria*. Science Tech. Publishers, Madison, WI. (1989).