مجله تاکسونومی و بیوسیستماتیک، سال اول، شماره اول، زمستان ۱۳۸۸، صفحه ۳۲-۲۱

جداسازی و شناسایی باکتری‌های نمک دوست نسبی و بررسی اثر تغییرات دما و pH محیط کشت بر رشد آن‌ها

مریم زنجیربند، کارشناس ارشد میکروبیولوژی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران*
روحا کسری کرمانشاهی، استاد میکروبیولوژی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران
ناصر گلبانگ، استادیار میکروبیولوژی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران

چکیده

میکروارگانیسم‌هایی را که قادر به زندگی در زیستگاه‌هایی با دمای بالا و پایین، pH قلیایی و اسیدی، فشار هیدروستاتیک بالا و غلظت بالای نمک هستند، اصطلاحاً اکسترموفیل می‌نامند. میکروارگانیسم‌های نمک‌دوست یا تحمل کننده نمک گروهی از اکسترموفیل‌ها هستند که قادر به رشد در محیط واجد نمک سدیم کلراید هستند و برای زندگی در محیط‌های شور تطابق یافته‌اند. برای جداسازی باکتری‌های نمک‌دوست نسبی نمونه‌گیری از آب خلیج فارس و بخش‌های مختلف کارخانه چرم‌سازی (پوست نمک زده، روده نمک زده و پساب کارخانه) در شهریور ماه انجام شد. نمونه‌ها در محیط کشت اختصاصی نمک‌دوست‌ها غنی‌سازی شد و باکتری‌ها به روش کشت خطی روی پلیت خالص‌سازی و سپس شناسایی شدند. برای بررسی اثر تغییرات دما بر رشد آن‌ها، از روش قطره پلیت (Drop plate method)، و برای بررسی اثر تغییرات pH بر رشد آن‌ها، از روش کدورت‌سنجی و دستگاه قرائت گر الایزا استفاده شد. در این پژوهش ۸ باکتری از کارخانه و ۸ سویه از آب خلیج فارس جداسازی شد و مطالعات فنوتیپی و بیوتیپی گسترده‌ای روی این باکتری‌ها انجام گردید. در بررسی رشد کلی باکتری‌های جداسازی شده برحسب درجه حرارت محیط کشت، برابر نتایج به دست آمده، درجه حرارت ۳۷ درجه سانتی‌گراد مناسبترین درجه حرارت، برای باکتری‌های جدا شده از آب خلیج فارس است. از طرف دیگر، مناسبترین درجه حرارت برای رشد باکتری‌های جدا شده از کارخانه، ۲۸ درجه سانتی‌گراد و بهترین درجه pH برای رشد باکتری‌های جدا شده از آب خلیج فارس و کارخانه ۷/۲ بوده است.

واژه‌های کلیدی: باکتری‌های نمک‌دوست نسبی، قطره پلیت، کدورت سنجی، نمک سدیم کلراید

مقدمه

باکتری‌های حقیقی نمک‌دوست مجموعه متنوعی از میکروارگانیسم‌ها را تشکیل می‌دهند که از نظر فیزیولوژی متعلق به جنس‌های متفاوتی هستند. باکتری‌های مذکور به دو گروه نمک‌دوست و تحمل کننده نمک تقسیم می‌شوند: ۱- میکروارگانیسم‌هایی که بهینه رشد آن‌ها در محیط فاقد نمک یا غلظت‌های پایین‌تر از نمک دریا باشد، ولی تراکم‌های نسبتاً بالای نمک را نیز تحمل می‌کنند،

* mzanjirband@yahoo.com

Archive of SID
www.SID.ir

تحمل کننده نمک نامیده می‌شوند، ۲- میکروارگانیسم‌های نمک‌دوست قادر به رشد در محیط فاقد نمک نیستند، در محدوده شوری متفاوتی می‌توانند رشد کنند و دارای بهینه رشد در محیط‌هایی با میزان شوری نسبتاً بالا هستند (Margesin *et al*., 2001). بسیاری از فرایندهای صنعتی تحت شرایط فیزیکی و شیمیایی ویژه انجام می‌شوند. به این دلیل، اکسترموفیل‌ها بسیار مهم و با ارزش هستند(Ventosa *et al*., 1998). در اروپا، کنسرسیومی از ۳۹ تیم تشکیل شده است که بودجه آن به وسیله Biotech-program اروپایی تأمین می‌شود و در حال تحقیق برای جداسازی و انتخاب اکسترموفیل‌ها با پتانسیل کاربردهای صنعتی است. از بین اکسترموفیل‌ها، نمک‌دوست‌های نسبی خصوصیات در خور توجه بیشتری نسبت به سایرین از خود نشان می‌دهند که بر اهمیت تحقیق در مورد آن‌ها می‌افزاید (Vereeland *et al*., 1993 and. Ventosa *et al*., 1998).

عوامل محیطی نظیر دما، pH، تراکم نمک NaCl و حضور کاتیون‌ها و آنیون‌های مختلف روی رشد نمک‌دوست‌ها بسیار مؤثر است. عوامل مذکور، علاوه بر تأثیر بر میزان رشد، در نمک‌دوستی میکروارگانیسم نیز دخالت دارند؛ به گونه‌ای که می‌توانند حتی در طبقه‌بندی آن‌ها به نمک‌دوست یا تحمل کننده نمک تأثیرگذار باشند. در این تحقیق باکتری‌های نمک‌دوست نسبی از بخش‌های مختلف کارخانه چرم‌سازی (پساب، پوست نمک‌زده، روده نمک‌زده) و آب خلیج فارس جداسازی و شناسایی شدند و تأثیر عوامل محیطی دما و pH بر روی رشد آن‌ها بررسی شد تا شرایط رشد برای آن‌ها بهینه‌سازی گردد (Vreeland *et al*., 1993 and Kaye *et al*., 2004).

با توجه به اهمیت و کاربرد باکتری‌های نمک دوست نسبی در بیوتکنولوژی و نانوتکنولوژی و تأثیر عوامل محیطی مختلف، به ویژه دما بر رشد آنهاو غلظت بهینه نمک برای رشد آنها، در این پژوهش باکتری‌های مذکور جداسازی شد و تأثیر تغییر عوامل دما و pH بر رشد آنها مورد بررسی و تحقیق قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

سویه‌های باکتریایی و شرایط رشد

برای جداسازی باکتری‌های نمک‌دوست نسبی نمونه‌گیری از بخش سطحی آب خلیج فارس و بخش‌های مختلف کارخانه چرم‌سازی در اصفهان انجام شد. نمونه‌ها در محیط کشت اختصاصی نمک‌دوست‌ها واجد محیط نوترینت براث دارای غلظت نمکی کل(g/l)۷۱ غنی گردیدند. ترکیب محلول نمکی عبارت است از : (گرم در لیتر) ۵۱ ;NaCl، ۷ ; $MgCl_2$ ، ۹/۶ ; $MgSo_4$ ، ۰/۳۶ ; $CaCl_2$ ، ۲ ; KCl ، ۰/۰۶ ; $NaHCo_3$ ، ۰/۰۲۶ ; NaBr، سپس نمونه‌ها در انکوباتور شیکردار با دور rpm ۱۳۰ و دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت قرار داده شد (Amoozegar *et al*., 2003 and Nieto *et al*., 1989). در مرحله بعد به منظور خالص‌سازی باکتری‌ها، یک لوپ از هر نمونه به محیط خالص‌سازی کننده و اختصاصی نمک‌دوست‌ها واجد محیط نوترینت آگار به همراه غلظت نمکی مذکور انتقال یافت و به روش کشت خطی روی پلیت کشت داده شد. pH محیط با

Archive of SID

www.SID.ir

استفاده از KOH یک مولار روی ۷/۴ تنظیم شد (Amoozegar *et al*., 2003).

شناسایی باکتری‌های جداسازی شده

برای شناسایی باکتری‌ها از خصوصیات ماکروسکوپی (رنگ کلونی)، میکروسکوپی (مورفولوژی و رنگ‌آمیزی گرم و تایید آن با تست KOH)، واکنش کاتالاز، اکسیداز و تست‌های بیوشیمیایی (تخمیر قندها، احیای نیترات، ژلاتین هیدرولاز و حرکت) استفاده شد (Brenner *et al*., 2005 and Holt *et al*., 1994). باکتری‌های میله‌ای گرم‌منفی که قادر به رشد در دامنه وسیعی از غلظت نمک NaCl بودند، علاوه بر مطالعات فنوتیپی و بیوتیپی توسط یک جفت پرایمر (پرایمرهای اکتوئین) اختصاصی برای باکتری‌های متعلق به جنس هالوموناس (*Halomonas*) شناسایی شدند (Zanjirband *et al*., 2008). طول قطعه تکثیر شده توسط این پرایمرها ۲۷۷ جفت باز بود. توالی پرایمرها به شرح زیر است:

Forward ectoine primer: 5'-GGTAAYTGGGAYAGYACRC-3'

Reverse ectoine primer: 5'-GBGGHGTRAAKACRCADCC-3'

y=C or T (pyrimidine)

H=A, C or T

K=G or T (keto)

R=A or G (purine

B= C, G or

D=A, G or T

در این تحقیق برای استخراج DNA از باکتری‌های نمک‌دوست نسبی، از روش جوشاندن استفاده گردید. برای بررسی کیفیت DNA، از ژل الکتروفورز و رنگ‌آمیزی آن با اتیدیوم بروماید استفاده شد. همچنین، برای بررسی و ارزیابی دقیق، جذب نوری DNA استخراج شده در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر قرائت شد و نسبت OD260/OD280 به دست آمد و برای بررسی محصول PCR از ژل آگارز استفاده شد (Mcpherson *et al*., 2000 and Sambrook *et al*., 2001). برنامه PCR به طور خلاصه به صورت زیر است:

۹۴°C ۵ (دقیقه)، {۹۸°C ۲۰ (ثانیه)، ۵۷°C ۶۰ (ثانیه)، ۷۲°C ۶۰ (ثانیه)} ×۳۰ و ۷۲°C ۱۰ (دقیقه) (Zanjirband *et al*., 2008).

روش بررسی اثر دما بر روی رشد باکتری‌های جداسازی شده و تعیین بهینه دمای رشد آن‌ها

برای انجام این مرحله از تحقیق، از روش قطره پلیت (Drop plate method) استفاده شد. ابتدا باکتری به محیط مایع غنی‌کننده با غلظت بهینه نمک سدیم کلراید تلقیح و کشت شبانه انجام شد. سپس کشت مجدد در محیط مشابه انجام گردید تا کدورت باکتری مطابق با لوله ی ۰/۵ مک‌فارلند برسد. از این محیط رقت‌های مختلف تهیه شد. سپس پلیت حاوی محیط خالص‌سازی (نوترینت آگار به اضافه املاح و غلظت بهینه رشد باکتری مورد نظر) به ۴ قسمت مساوی تقسیم شد و توسط سمپلر، ۱۰ میکرولیتر از یک سوسپانسیون (با رقت مشخص) برداشته، در یک قسمت از ۴ قسمت یک پلیت تلقیح گردید. این کار ۵ مرتبه انجام شد و لذا در یک قسمت از یک پلیت که مربوط به آن رقت خاص است، دقیقاً ۵ قطره ۱۰ میکرولیتری دیده می‌شود. این عمل در یک قسمت دیگر پلیت نیز تکرار می‌شود و در نهایت، بعد از جذب قطرات روی پلیت، پلیت‌های مورد نظر به مدت ۲۴ ساعت تا یک هفته در دماهای ۴، ۲۸، ۳۷، ۴۵ و ۵۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند (برای هر باکتری ۵ دمای مختلف در نظر

Archive of SID

www.SID.ir

گرفته شده است) و سپس شمارش کلونی‌ها صورت گرفت. به منظور شمارش کلونی، بعد از مدت زمان لازم، (۲۴ ساعت الی ۱۰ روز) با بررسی پلیت‌ها تمام کلونی‌ها در هر قطره شمارش شده، با هم جمع شده و تقسیم بر ۵ می‌گردد. (شایان ذکر است که از نظر آماری تعداد ۳ تا ۳۰ کلونی در هر قطره قابل قبول است.) (Baron *et al.*, 1990 and Stachebrant *et al.*, 1995).

روش بررسی اثر تغییرات pH محیط کشت بر روی رشد باکتری‌های نمک‌دوست شناسایی شده و تعیین بهینه pH برای رشد آن‌ها

برای انجام این آزمایش، از روش کدورت‌سنجی و دستگاه قرائت‌کننده الایزا استفاده شد (Emtiazi *et al.*, 2005). برای این کار، باکتری به محیط مایع غنی‌کننده با غلظت بهینه نمک سدیم کلراید (نمک دوست‌های نسبی به طور نرمال در ۰/۵ تا ۲/۵ مول نمک سدیم کلراید رشد می‌کنند(Ventosa *et al.*, 1998)، تلقیح و کشت انجام شد. pH محیط کشت‌ها به وسیله HCl یا KOH ۱ مولار روی ۵، ۶، ۷/۲، ۸، ۹ و ۹/۷ تنظیم شد (Vreeland *et al.*, 1993). میکروپلیت ۹۶ چاهکی را به وسیله الکل و اشعه UV استریل نموده، سپس محیط کشت با pHهای مختلف در یک ردیف ۱۲تایی اضافه شد؛ به این ترتیب که در چاهک شماره ۱ و ۲ مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از محیط کشت با pH=۵ ریخته شد و به ترتیب در چاهک‌های بعدی ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت با pHهای مذکور با دو تکرار اضافه گردید. به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر از باکتری رشد یافته در محیط کشت با pH برابر همان چاهک با رقت CFU/ml 5×10^5 اضافه شد. به این ترتیب، در هر بار آزمایش، رشد هفت باکتری (ردیف‌های B، C، D، E، F، G و F) در شش pH متفاوت (۵، ۶، ۷/۲، ۸، ۹ و ۹/۷) مقایسه شد. پس از آن، درب میکروپلیت‌ها گذاشته شد و دور آن‌ها با پارافیلم بسته شد و با توجه به دمای مطلوب رشد باکتری‌های مورد آزمایش، میکروپلیت‌ها به مدت ۲۴-۲۰ ساعت در دمای ۲۸ یا ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس جذب نوری چاهک‌ها در طول موج ۶۳۰ نانومتر با استفاده از دستگاه قرائت کننده الایزا قرائت و رشد یا عدم رشد در آن‌ها بررسی گردید (Brooks *et al.*, 2001). شایان ذکر است که برای جلوگیری از تغییرات pH، برای تهیه رقت از باکتری، از سرم فیزیولوژی استفاده نشد، بلکه از محیط کشت با pH مشابه استفاده گردید. همچنین ردیف A برای اندازه‌گیری کدورت محیط کشت‌ها لحاظ شده است و برای بررسی کدورت حاصل از رشد باکتری، کدورت ردیف A از آن کسر شد و رشد در هر pH، دو بار تکرار گردید.

نتایج

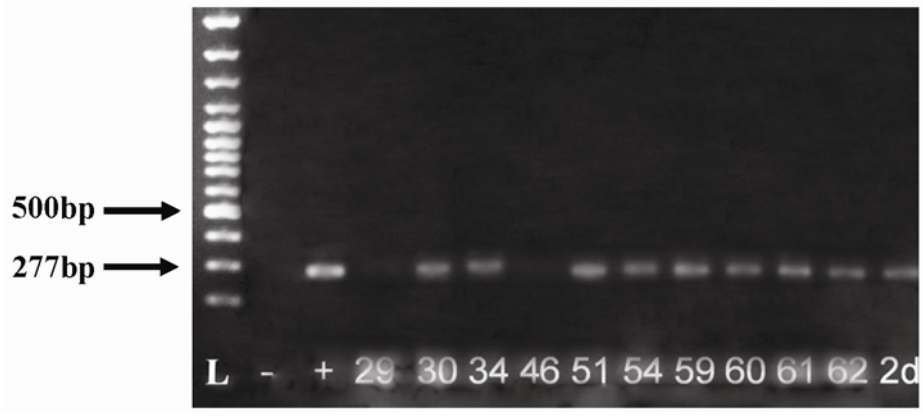
در این پژوهش ۸ باکتری از کارخانه چرم‌سازی و ۸ سویه از آب خلیج فارس جداسازی شد. مطالعات فنوتیپی و بیوتیپی گسترده‌ای روی این باکتری‌ها انجام شده و نتایج آن در جدول ۱ آمده است. باکتری‌های میله‌ای گرم‌منفی علاوه بر مطالعات فنوتیپی و بیوتیپی توسط یک جفت پرایمر (پرایمرهای اکتوئین) اختصاصی برای باکتری‌های متعلق به جنس هالوموناس (*Halomonas*) شناسایی شدند (شکل ۱). همان گونه که در شکل ۱ نشان داده شده است، از ۱۱ باکتری میله‌ای و گرم منفی، ۹ باکتری متعلق به جنس هالوموناس هستند.

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۱: خصوصیات بیوشیمیایی سویه‌های باکتریایی جداسازی شده در این تحقیق

مورفولوژی و واکنش گرم	نام باکتری / تست	حرکت	پیگمان	اکسیداز	نیترات	آرابینوز	گلوکز	لاکتوز	ترهالوز	مانیتول	هیدرولیز نشاسته	هیدرولیز ژلاتین
میله‌ای گرم منفی	***H30***	−	کرم	+	+	−	−	−	−	−	−	−
	H34	−	کرم	+	+	−	+	−	+	−	−	−
	H51	+	کرم	+	+	−	+	−	+	+	−	−
	H54	+	کرم	+	+	−	+	−	+	+	−	−
	H59	+	کرم	+	+	−	+	+	−	+	−	−
	H60	+	کرم	+	+	+	+	+	+	+	+	−
	H61	−	کرم	+	−	−	−	−	−	−	−	+
	H62	+	کرم	+	+	−	+	−	−	−	+	−
	H2d	−	کرم	+	+	−	+	−	−	−	−	−
	H46	−	کرم	+	+	−	+	−	+	−	−	−
	Ar29	+	−	+	+	−	−	−	−	−	−	−
میله‌ای گرم مثبت	***HB1***	−	کرم	+	+	−	−	−	−	−	+	−
	B1	+	زرد	+	+	−	−	−	+	−	−	−
کوکسی گرم مثبت	***MA1***	+	−	+	+	−	−	−	−	−	+	+
	NH1	−	−	+	−	−	+	−	−	−	−	+
	MH1	+	نارنجی	−	−	−	+	−	+	+	−	+



شکل ۱- تصویر ژل الکتروفورز محصولات PCR از سویه‌های H29, H30, H34, H46, H51, H54, H59, H60, H61, H62, و H2d با پرایمرهای اکتوئین

توضیح علایم: L : Ladder، - : کنترل منفی (آب مقطر)، + : کنترل مثبت(*Halomonas salina* ATCC 49509)

Archive of SID

www.SID.ir

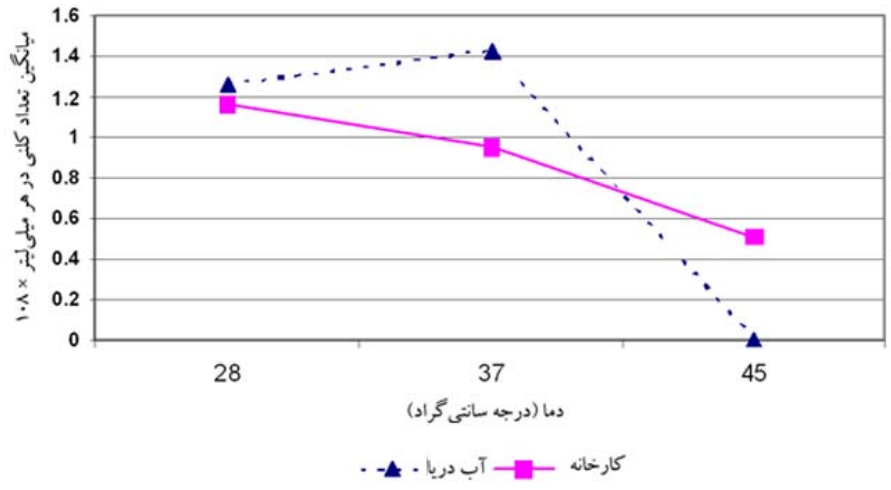
بر اساس نتایج به دست آمده، در بررسی اثر دما، در درجه حرارت ۴ درجه سانتی‌گراد تنها یک سویه از باکتری‌های شناسایی شده از کارخانه و متعلق به جنس *Halomonas* رشد نمود. همچنین در درجه حرارت ۵۵ درجه سانتی‌گراد هیچ باکتری رشد نکرد.

تجزیه وتحلیل داده‌های به‌دست آمده از این قسمت نشان داد که درجه حرارت ۳۷ درجه سانتی‌گراد مناسبترین درجه حرارت، برای باکتری‌های جدا شده از آب خلیج فارس است، به طوری که در این درجه حرارت میانگین تعداد کلونی‌ها در هر میلی‌لیتر $۱/۴۳ \times ۱۰^{۸} \pm ۰/۰۶۱ \times ۱۰^{۸}$ بود. از طرف دیگر، مناسبترین درجه حرارت برای رشد باکتری‌های جدا شده از کارخانه، ۲۸ درجه سانتی‌گراد بوده است؛ به طوری که میانگین تعداد کلونی‌ها در هر میلی‌لیتر در این درجه حرارت $۱/۱۵ \times ۱۰^{۸} \pm ۰/۰۳۷ \times ۱۰^{۸}$ است. نتایج فوق در جدول ۲ و شکل ۲ نشان داده شده است.

جدول ۲- مقایسه میانگین وانحراف معیار رشد باکتری‌ها درpH و غلظت مطلوب نمک و درجه حرارت‌های مختلف

درجه حرارت (°C)	منبع جداسازی	میانگین *	انحراف معیار ($\times ۱۰^{۸}$)
۲۸	آب خلیج فارس	۱/۲۶	۰/۰۴۸
	کارخانه چرم‌سازی	۱/۱۵	۰/۰۳۷
۳۷	آب خلیج فارس	۱/۴۳	۰/۰۶۱
	کارخانه چرم‌سازی	۰/۹۵۱	۰/۰۴۵
۴۵	آب خلیج فارس	-	-
	کارخانه چرم‌سازی	۰/۵۰۹	۰/۰۵۷

***: میانگین تعداد کلونی$\times ۱۰^{۸}$ در هر میلی‌لیتر**



شکل ۲- مقایسه تغییرات رشد باکتری‌ها در pH و غلظت مطلوب نمک و درجه حرارت‌های مختلف محیط کشت برحسب منبع جداسازی

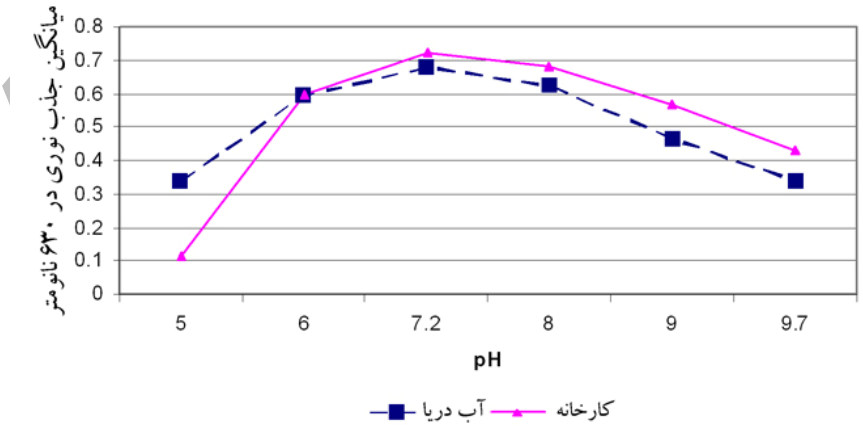
Archive of SID

www.SID.ir

نتایج بررسی تغییرات رشد باکتری‌های جداسازی شده از آب خلیج فارس و کارخانه چرم‌سازی در مقادیر مختلف pH در جدول ۳ نشان داده شده است. همان‌گونه که از جدول مشهود است، مناسبترین درجه pH برای رشد باکتری‌های جدا شده از آب خلیج فارس ۷/۲ بوده که در آن میانگین رشد باکتری‌ها ۰/۰۴۳ ±۰/۶۷۹ بوده است. همچنین مناسبترین درجه pH برای رشد باکتری‌های کارخانه نیز همین درجه pH بوده است. نتایج فوق در شکل ۳ بهتر نشان داده شده است. برابر این نمودار نیز، بهترین درجه pH برای رشد باکتری‌ها، در هر دو دسته pH = ۷/۲ بوده و تغییرات رشد باکتری‌ها در هر دو گروه تقریباً مشابه است.

جدول۳- مقایسه میانگین وانحراف معیار رشد باکتری‌های جدا شده از آب خلیج فارس وکارخانه در مقادیر مختلف pH محیط

pH	منبع	میانگین OD	انحراف معیار
۵	آب خلیج فارس	۰/۳۳۸	۰/۰۵
	کارخانه چرم‌سازی	۰/۱۱۳	۰/۰۱۴
۶	آب خلیج فارس	۰/۵۹۷	۰/۰۴
	کارخانه چرم‌سازی	۰/۵۹۶	۰/۰۴۹
۷/۲	آب خلیج فارس	۰/۶۷۹	۰/۰۴۳
	کارخانه چرم‌سازی	۰/۷۲۲	۰/۰۵۶
۸	آب خلیج فارس	۰/۶۲۴	۰/۰۳۸
	کارخانه چرم‌سازی	۰/۶۸۲	۰/۰۵۱
۹	آب خلیج فارس	۰/۴۶۷	۰/۰۲۹
	کارخانه چرم‌سازی	۰/۵۷۰	۰/۰۴۲
۹/۷	آب خلیج فارس	۰/۳۳۸	۰/۰۱۹
	کارخانه چرم‌سازی	۰/۴۳۳	۰/۰۳۲



شکل ۳- مقایسه تغییرات رشد باکتری‌ها در دما وغلظت مطلوب نمک و مقادیر مختلف pH محیط کشت برحسب منبع جداسازی

Archive of SID

www.SID.ir

بحث و نتیجه‌گیری

باکتری‌های نمک‌دوست نسبی پتانسیل بالایی برای بیوتکنولوژی و نانوتکنولوژی دارند و بسیاری از آن‌ها نه تنها ترکیبات صنعتی نظیر آنزیم‌ها، پلیمرها، پیگمان و غیره را تولید می‌کنند، بلکه دارای خصوصیات فیزیولوژیک خاص هستند که بهره‌وری از آن‌ها را تسهیل می‌کند (Margesin *et al*., 2001). عوامل محیطی مختلف بر روی رشد نمک‌دوست‌ها بسیار مؤثر است. دمای محیط‌کشت علاوه بر تأثیر بر میزان رشد، در نمک‌دوستی میکروارگانیسم نیز دخالت دارند؛ به گونه‌ای که می‌تواند حتی در طبقه‌بندی آن‌ها به نمک‌دوست یا تحمل کننده‌ی نمک تأثیرگذار باشد (Kaye *et al*., 2004 and Ventosa *et al*., 1998). به این دلیل، اثر تغییرات دما و pH محیط کشت بررسی شد تا شرایط رشد از نظر دما برای آن‌ها بهینه‌سازی گردد.

باکتری‌های نمک‌دوست نسبی مجموعه متنوعی از میکروارگانیسم‌ها را تشکیل می‌دهند و متعلق به جنس‌های مختلفی هستند. هالوموناس جنس شاخص در خانواده هالوموناداسه است و به آسانی از جنس‌های دیگر ، به دلیل توانایی رشد و تحمل دامنه وسیعی از نمک NaCl (۰/۱- ۰/۳۲/۵٪) قابل تشخیص است.سویه‌های متعلق به این جنس کاتالاز مثبت و بیشتر آن‌ها اکسیداز مثبت هستند و قادر به مصرف کربوهیدرات‌های مختلف بوده، میزان G+C (مول ٪) در آن‌ها بالاست (Cumming *et al*., 1995 and Ciulla *et al*., 1997). اکتوئین اسمولیت غالب در خانواده هالوموناداسه است و با افزایش غلظت نمک در محیط میزان اکتوئین نیز افزایش می‌یابد (Deutch, 2002).

پرایمرهای به کار رفته در این تحقیق برای شناسایی ژن *ectC* تولید کننده آنزیم اکتوئین سنتتاز در جنس هالوموناس هستند. بنابراین نمونه‌های مثبت PCR دارای دو خصوصیت ویژه هستند: اول این که قادر به تولید اکتوئین برای رشد در محیط واجد نمک سدیم کلراید هستند و دیگر این که این باکتری‌ها در جنس هالوموناس قرار می گیرند (Zanjirband *et al*., 2008).

در بررسی اثر تغییرات دمای محیط کشت روی رشد باکتری‌های جداسازی شده از آب خلیج فارس و کارخانه‌ی چرم‌سازی میانگین تعداد باکتری‌های آب خلیج فارس و کارخانه در هر میلی‌لیتر در غلظت مطلوب نمک و دماهای مختلف به ترتیب $۱/۳۴\times۱۰^{۸}\pm ۰/۰۵۶\times۱۰^{۸}$ و $۱/۰۵\times۱۰^{۸}\pm ۰/۰۴۷\times۱۰^{۸}$ است و انجام آزمون آماری T بر روی دو دسته باکتری نشان داد که اختلاف بین این دو گروه معنی‌داراست ($p = 0.016$).

همچنین تحلیل داده‌های به‌دست آمده از این قسمت نشان داد درجه حرارت ۳۷ درجه سانتی‌گراد مناسبترین درجه حرارت، برای باکتری‌های جدا شده از خلیج فارس است؛ به طوری که در این درجه حرارت میانگین تعداد باکتری‌های جدا شده در هر میلی‌لیتر $۱/۴۳\times۱۰^{۸}\pm ۰/۰۶۱\times۱۰^{۸}$ بود .با توجه به این‌که این باکتری‌ها از آب خلیج فارس جداسازی شده‌اند و در این محیط دمای هوای محیط و آب بالاست، این نتیجه‌گیری مورد انتظار است.

از طرف دیگر، مناسبترین درجه حرارت برای رشد باکتری‌های جدا شده از کارخانه ، ۲۸ درجه سانتی‌گراد بوده است؛ به طوری که میانگین تعداد باکتری‌ها در هر میلی‌لیتر در این درجه حرارت $۱/۱۵\times۱۰^{۸}\pm ۰/۰۳۷\times۱۰^{۸}$ است. این نتیجه نیز با توجه به محل و زمان نمونه‌گیری طبیعی به نظر می‌رسد.

انجام آزمون آنالیز واریانس بر روی این داده‌ها نیز نشان داد میانگین تغییرات رشد باکتری‌ها در درجه حرارت‌های مختلف بر حسب منبع جداسازی شده باکتری متفاوت است ($p<0.001$) . به عبارت دیگر، بین درجه حرارت و منبع

Archive of SID

www.SID.ir

باکتری اثر متقابل معنی‌داری وجود دارد که به محل جداسازی باکتری‌ها مربوط است. همان‌گونه که در شکل ۲ آمده است، باکتری‌های جداسازی شده از آب خلیج فارس قادر به رشد در ۴۵ درجه سانتی‌گراد نبوده، در این دما شیب تندی مشاهده می‌شود. با مراجعه به کتاب مرجع سیستماتیک برگی ملاحظه شد که اکثر باکتری‌های جداسازی شده از آب خلیج فارس (که متعلق به جنس هالوموناس هستند.) مزوفیل اجباری هستند (Holt *et al.*, 1994 and Brenner *et al.*, 2005).

برابر این نتایج در تحقیق انجام شده به وسیله Ventosa در سال ۱۹۹۸، دامنه تحمل دما در بین باکتری‌های نمک‌دوست نسبی جداسازی شده از زیستگاه‌های معمول اکثراً بین ۴۵-۱۵ درجه سانتی‌گراد است (Ventosa *et al.*, 1998).

از طرفی، در کتاب مرجع برگی نیز گزارش‌های ارائه شده در مورد دامنه تحمل دما در باکتری‌های نمک‌دوست نسبی بیشتر بین ۴۵-۱۵ درجه سانتی‌گراد است و برخی در ۴ درجه سانتی‌گراد نیز رشد می‌کنند (Holt *et al.*, 1994 and Brenner *et al.*, 2005).

Hao در سال ۱۹۸۴، Marquez در سال ۱۹۹۲، Mota درسال ۱۹۹۷ و Stack Brandt در سال ۱۹۹۵ اثر تغییرات دما را بر روی برخی از باکتری‌های نمک دوست نسبی بررسی کردند و طبق گزارش‌های آن‌ها اکثر این سویه‌ها قادر به رشد در ۴۵ درجه سانتی‌گراد نمی‌باشند.

نتایج حاضر در این تحقیق به غیر از برخی سویه‌ها با نتایج گزارش شده دیگر همخوانی دارد. وجود برخی تفاوت‌ها نیز به محل جداسازی، موقعیت جغرافیایی و نوع سویه‌ها بستگی دارد.

حضور پروتئین‌های شوک گرمایی، وجود اسمولیت‌های القا شده در اثر فشار اسمزی، تغییر ترکیب فسفولیپیدها و اسیدهای چرب از عوامل مؤثر در رشد باکتری‌های نمک‌دوست نسبی در دماهای بالاتر و پایین‌تر از بهینه دمای رشد آن‌هاست (Ventosa *et al.*, 1998 and Vreeland *et al.*, 1993).

ظهور پروتئین‌های شوک گرمایی در کروموهالوباکتر ماریس مورتوئی آزمایش شده است؛ به این ترتیب که باکتری مذکور که در حضور غلظت ۱ مول نمک رشد کرده بود، به محیط ۴۲ درجه سانتی‌گراد انتقال داده شد. این امر به ممانعت کامل از سنتز پروتئین‌های نرمال و القا سنتز پروتئین‌های شوک گرمایی منجر شد. در سلول‌های رشد یافته در ۲/۵ مول نمک، شوک گرمایی ۴۲ درجه سانتی‌گراد سنتز بعضی پروتئین‌های نرمال را متوقف نمی‌کند و پروتئین‌های شوک گرمایی القا می‌شود. در سلول‌های رشد یافته در غلظت بالاتر نمک و در دمای بالا، سنتز پروتئین‌های شوک گرمایی ممانعت شد. پدیده مشابه در هالوموناس هالوفیلا نیز مشاهده شده است. این به دلیل وابستگی شوک گرمایی به غلظت نمک NaCl در محیط کشت است (Katinakis *et al.*, 1989 and Ventosa *et al.*, 1998). ممانعت از تولید پروتئین‌های شوک گرمایی در تراکم بالاتر از ۲/۵ مول NaCl و دمای بالا، احتمالاً مربوط به اثرات حفاظتی اسمولیت‌ها از پروتئین‌ها و آنزیم‌ها در مقابل گرما، انجماد و خشکی است (Vreeland *et al.*, 1993 and Ventosa *et al.*, 1998). با افزایش غلظت نمک، میزان تجمع اسمولیت‌ها و در نتیجه اثر حفاظتی آنها افزایش می‌یابد. بنابراین، دامنه تحمل دمایی به غلظت نمک نیز وابسته است (Lippert *et al.*, 1992).

در بررسی اثر تغییرات pH ،برابر نتایج به دست آمده در این تحقیق بیشتر جدایه‌ها قادر به رشد در درجات مختلف pH (۹/۷-۵) بودند و مناسبترین درجه pH برای رشد

Archive of SID

www.SID.ir

باکتری‌های جدا شده ۷/۲ بوده است .شایان ذکر است که هر دو گروه باکتری‌ها در pH قلیایی نسبت به اسیدی رشد بهتری را نشان داده‌اند. تحلیل داده‌های به دست آمده از این قسمت، با استفاده از آزمون آنالیز واریانس نشان می‌دهد، تغییرات رشد باکتری‌ها در مقادیر مختلف pH محیط در دو گروه، تفاوت معنی‌داری ندارد ($P=0.08$). به‌عبارت دیگر، می‌توان گفت بین درجه pH محیط کشت و منبع جداسازی باکتری اثر متقابل وجود ندارد.

برابر مطالعات موجود در کتاب مرجع سیستماتیک برگی در محیط کشت‌های طراحی شده برای نمک‌دوست‌های نسبی، اکثر گونه‌های جنس هالوموناس قادر به رشد در درجات مختلف pH (۸-۵) هستند (Brenner *et al*., 2005).

همچنین در پژوهش انجام شده توسط Brandon در سال ۲۰۰۶ حدود نیمی از باکتری‌های نمک‌دوست جداسازی شده قادر به رشد در pH اسیدی بودند و ۳۲٪ آن‌ها در pH=5 رشد کردند (Brandon *et al*., 2006).

از سوی دیگر، در تحقیقات ارائه شده روی باکتری‌های نمک‌دوست نسبی ،بیشتر آن‌ها قادر به رشد در درجات مختلف pH (۹/۵-۵) بوده‌اند و بهینه pH برای رشد آن‌ها ۷/۴-۷/۲ است (Amoozegar *et al*., 2003). نتایج موجود در این تحقیق با نتایج ارائه شده توسط سایر محققین همخوانی دارد و وجود تفاوت در بعضی موارد نیز، به محل جداسازی و نوع سویه مربوط است.

عوامل متعددی در توانایی باکتری‌های نمک‌دوست برای رشد در درجات مختلف pH دخالت دارد. سالینی‌ویبریو کاستیکولا که در pH متغیر از ۵/۷ تا ۹ رشد یافته است، نیرومایه پروتونی تولید شده ، شیب pH و پتانسیل غشا را حفظ می نماید و از ۱۷۰ به ۱۰۰ میلی‌ولت تغییر می‌کند. سلول‌ها pH درون سلولی را نزدیک به ۷/۵ نگه می‌دارند و بنابراین شیب pH معکوس شده، حداقل در قسمتی به وسیله افزایش پتانسیل غشاء در محیط با pH بالا، جبران می‌شود (Ventosa *et al*., 1998).

در برخی باکتری‌های نمک‌دوست حضور حامل آنتی‌پورت خاص Na^+/H^+ در pH قلیایی ضروری است. در ویبریو پاراهمولیتیکوس سه حامل آنتی‌پورت Na^+/H^+ به نام‌های NhaA، NhaB و NhaD وجود دارد. حاملان مذکور، به ویژه NhaA مسؤول مقاومت به LiCl و تراکم بالای NaCl هستند. مهم‌ترین نقش آنتی‌پورت Na^+/H^+، انتشار Na^+ و Li^+ به خارج سلول برای بقای سلول در حضور غلظت بالای یون‌های مذکور است. مهار رشد در حضور غلظت بالای نمک، به pH متوسط محیط کشت وابسته است. میزان بیان NhaA در pH=۸/۵ بالا و در pH=۷ کم است ولی میزان بیان NhaB در pH=۷ بالا و در pH=۸/۵ پایین است. در واقع، آنتی‌پورت Na^+/H^+ در NhaA در مقاومت به NaCl در pH قلیایی دخالت دارد، ولی NhaB در pH خنثی در مقاومت به نمک سدیم کلراید دخالت بیشتری دارد. بنابراین، بیان و فعالیت آنتی‌پورت‌ها توسط pH محیط کشت تحت تأثیر واقع می‌شود (Karoda *et al*., 2005).

در هالوموناس اسرائیلی، تحریک تنفس به وسیلهٔ یون پتاسیم در pH اسیدی قطعی است و با قلیایی شدن سیتوپلاسم همراه می‌شود و در واقع پتاسیم در تنظیم pH درونی مؤثر است (Ventosa *et al*., 1998).

در محیط با pH قلیایی و تراکم بالای یون Na^+، باکتری‌های نمک‌دوست و قلیایی پسند، علاوه بر تطابق اسمزی، نگهداری تعادل pH در سلول‌ها نیز مطرح است. برخی از میکروارگانیسم‌های جداسازی شده از دریاچه‌های قلیایی، بهینه pH برای رشد آن‌ها حدود ۱۰-۸ است. آنزیم‌های این باکتری‌ها قادر به فعالیت در pH بالاست که

Archive of SID

www.SID.ir

در حقیقت یکی از مکانیسم‌های تطابقی میکروارگانیسم‌های مذکور برای رشد و بقا در pH بالاست. نسبت آمینواسیدهای اسیدی در پروتئین‌های باکتری‌های نمک‌دوست قلیایی پسند نسبت به باکتری‌های نمک‌دوست با فعالیت بهینه در pH خنثی، به طور قابل توجهی بیشتر است که احتمالاً چنین فراوانی بالا از آمینواسیدهای اسیدی نه تنها برای تنظیم و تطابق فشار اسمزی لازم است، بلکه برای تنظیم pH درون سلولی نیز ضروری است. قلیایی پسندهای اجباری، pH درون سلولی را حدود ۹-۸ نگه می‌دارند که حداقل ۲ واحد از pH محیط کمتر است (Detkova *et al*., 1998 and Ventosa *et al*., 2006).

بنابراین، رشد بهتر باکتری‌های نمک‌دوست در pH قلیایی نسبت به pH اسیدی، به دلیل مکانیسم‌های تطابقی بیشتر آن‌ها برای رشد در شرایط قلیایی است، نظیر حضور پروتئین‌هایی با فراوانی آمینواسیدهای اسیدی و بیان بالای آنتی‌پورت NhaA.

منابع

Amoozegar, M. A., Malekzadeh, F., Malik, K. A., Schuman, P. and Sproer, C. (2003) *Halobacillus karajensis* sp. Nov. a novel moderate halophile. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbioogy 53: 1059-1063.

Baron, E. J. and Finegold, S. M. (1990) Baily and scott's Diagnostic Microbiology. 8th ed, St. louis: Mosby.

Brenner, D. J, Krieg, N. R. and Staley J. T. (2005) Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Sec ed. Vol 2. Part B. Springer.

Brandon, R., Litzner, T., Caton, M. and Schneegurt, A. (2006) Carbon substrate utilization, antibiotic sensitivity and numerical taxonomy of bacterial isolates from the Great salt plains of Oklahoma. Arch Microbiol 185: 286-296.

Brooks, G. F, Butel, J. S. and Morse, S. A. (2001) Jawetz, Melnick, and Adelberg's Medical Microbiology. 22nd ed. Appleton and Lange. New York.

Ciulla, R. A., Diaz, M. R., Taylor, B. F. and Roberts M. F. (1997) Organic osmolytes in aerobic bacteria from Mone Lake, an alkaline, moderately hypersaline environment. Applied and Environmental Microbiology Jan: 220-226.

Cummings, S. P. and Gilmour, D. J. (1995) The effect of NaCl on the growth of *Halomonas* species: accumulation and utilization of compatible solutes. Microbiology 141:1413-1418.

Detkova, E. N. and Boltyanskaya, V. Yu. (2006) Relationships between the osmoadaptation strategy, amine acid composition of bulk protein, and properties of certain enzymes of haloalkaliphilic bacteria. Microbiology 75: 259-265.

Deutch, C. E. (2002) Characterization of a salt-tolerant extracellular α-amylase from *Bacillus dipsosauri*.Letters in Appiedl Microbioogy 35: 78-84.

Emtiazi, G, Hassanshahyan, M. and Golbang, N. (2005) Development of a microtitre plate method for determination of phenol utilization, biofilm formation and respiratory activity by environmental bacterial isolates. International Biodeterioration and Biodegradation 56: 231-235.

Hao, M. R., Kocur, M. and komagata, K. (1984) *Marinococcus* gen. Nov., a new genus for motile cocci with meso-diaminopimelic acid in the cell walls, and *Marinococcus albus* sp. Nov., and *Marinococcus halophilus* (Novitsky and Kushner) comb.Novel Journal Genetic and Applied Microbiology 30: 449-459.

Holt, J. G., Krieg, N. R., Sneath, P. H. A., staley, J. T. and Williams, S. T. (1994) Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 9th ed. Williams and Wilrins. Maryland.

Archive of SID

www.SID.ir

Sambrook, J. and Russel, D. W. (2001) Molecular cloning. Cold Spring Harbor. New York.

Stachebrandt, E., Koch, C., Gvozdiak, O. and Schumann, p. (1995) Taxonomic dissection of the genus *Micrococcus: Kocuria* gen. nov., *Nesterenkonia* gen. nov., *kytococcus* gen. nov., *Dermacoccus* gen nov. and *Micrococcus* cohn 1987 gen. emend. International Journal and Systematic Bacteriology 45: 682-692.

Ventosa, A., Nieto, J. J. and Oren, A. (1998) Biology of moderately holophilic aerobic bacteria. Microbiologyand Molecular Biology Reviews June: 504-544.

Vreeland, R. H. and Hochstein, L. I. (1993) The biology of holophilic bacteria. Boca Raton, FL: CRC Press.

Zanjirband, M., Golbang, N. and Kermanshahi R. K. (2008). Detection of the ectC gene in *Halomonas* strains by polymerase chain reaction. Iranian Journal of Biotecnology July. 6 (3): 181-185.

Karoda, T., Mizushima, T. and Tsuchiya, T. (2005) Physiological roles of three Na^+/H^+ antiporters in the halophilic bacterium *Vibrio parahaemolyticus*. Microbiology and Immunology 49: 711-719.

Katinakis, P. (1989) The pattern of protein synthesis induced by heat-shock of the moderately halophilic bacterium *Chromobacerium marismortai*: Protective effect of high salt concentration against the thermal shock. Microbiology 12: 61-67.

Kaye, J. Z. and Baross, A. J. (2004) Synchronous effects of temperapture, hydrostatic pressure and salinity on growth, phospholipids profiles, and protein patterns of four *Halomonas* species isolated from deep see hydrothermal - vent and sea surface environments. *A*pplied and Environmental Microbiology 56: 6220-6229.

Lippert, K. and Galinski, E. A. (1992) Enzyme stabilization by ectoine - type compatible solutes: protection against healting, freezing and drying. Applied Microbiology and Biotechnol 37: 61-65.

Margesin R. and Schinner F. 2001: Potential of halotolerant and halophilic Microorgnisms for biotechnology. *Extremophiles*. 5: 73-83.

Marquez, M. C., Ventosa, A. and Ruiz-Berraquero, F. (1992) phenotypic and chemotaxonomic characterization of *Marinococcus halophilus*. Systematic and Applied Microbiology 15: 63-69.

Mcpherson, M. J. and Moller, S. G. (2000) PCR. Bios scientific publisher. New York.

2o. Mota, R. R., Marquez, M. C., Arahal, D. A., Mellado, E. and Ventosa, A. (1997) polyphasic taxonomy of *Nesterenkonia halobia*. International Journal and Systematic Bacteriology 47: 1231-1235.

Nieto, J. J., Fernandez- Castillo, R., Marquez, M. C., Ventosa, A., Quesada, E. and Ruiz-Berraquero, F. (1989) Survey of metal tolerance in moderately halophilic eubacteria. Applied and Environmental Microbiology 55: 2385-2390.

Archive of SID

www.SID.ir