مقاله پژوهشی

مقاومت به نیکل و سایر فلزات سمی توسط یک باکتری نمک دوست نسبی جداشده از دریاچه نمک آران و بیدگل و شناسایی فیلوژنیک آن با استفاده از ژن SrDNA ۱۶

فرناز خدابخش: گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا همدان، همدان، ایران، نویسنده رابط:
Email: farnaz.khodabakhsh@yahoo.com
سنبل ناظری: گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا همدان، همدان، ایران
محمدعلی آموزگار: گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم، دانشگاه تهران، تهران، ایران

دریافت: ۹۱/۶/۱۸ **پذیرش**: ۹۱/۹/۲۸

چکیده

زمینه و اهداف: فلزات سنگین اثرات سمی برای انسان، حیوانات و گیاهان دارند مثلاً نیکل در انسان اثرات ازدیاد حساسیت تماسی و سرطانزایی دارد. جهت زدودن این فلزات از محیط زیست علاوه بر روش های فیزیکو شیمیایی، از روشهای بیولوژیک استفاده می‌شود. برخی باکتری ها در تجزیه زیستی فلزات سنگین موثرند. این باکتری‌ها می‌توانند به فلزات سنگین مقاومت داشته و در حضور آنها رشد کنند. در این پژوهش مقاومت باکتری های دریاچه شور آران و بیدگل نسبت به فلزات سنگین مورد مطالعه قرار گرفت.

مواد و روش ها: هفت نمونه گرفته شده از دریاچه به محیط ونتوزا برده شدند. کلونی‌های جدا شده ابتدا جهت بررسی مقاومت به نیکل به محیط حاوی نیکل برده شد و باکتری مقاوم جدا شده به محیط های حاوی سایر فلزات منتقل شدند. بررسی‌های بیوشیمیایی، مرفولوژیکی و فیلوژنتیکی بر اساس تعیین توالی ژن ۱۶ S rDNA جهت شناسایی دقیق جنس و گونه باکتری انجام شد. جهت تعیین ارزش بیوتکنولوژیکی باکتری، توانایی آن در تولید برخی آنزیم ها بررسی شد.

یافته‌ها: از ۴۶ ایزوله باکتری نمک دوست جدا شده ، یک ایزوله باکتری با قابلیت رشد در محدوده نمک ۲۵-۱ درصد، تحمل بالا به نیکل و سایر فلزات سنگین، از نظر ژن ۱۶S rDNA تعیین توالی گردید که مقایسه آن با بانک ژن نشان دهنده شباهت بیش از ۹۷ درصد با *Halomonas elongate* بود. این باکتری قابلیت تولید آنزیم هایی همچون اوره‌آز، آمیلاز و اکسیداز را داشت.

نتیجه گیری: با توجه به نتایج بدست آمده در این آزمایش، میکروارگانیسم مقاوم به فلزات سمی و با قابلیت استفاده در کارایی پاکسازی محیط‌های آلوده به نیکل و قابلیت تولید آنزیم‌های صنعتی در دریاچه آران و بیدگل جداسازی شد.

کلیدواژه ها: سمیت فلزات سنگین، نیکل، مقاومت، Halomonadaceae, Halomonas elongate

مقدمه

در غلظت‌های پایین، فلزات می‌توانند به عنوان اجزایی مهم در فرآیندهای زیستی نقش داشته باشند و اغلب عملکردهای مهمی در تولید آنزیم دارند. با این حال در غلظت‌هایی فراتر از حد خاص، فلزات می‌توانند برای بسیاری از گونه‌ها سمی باشند (۱). فلزات سمی و سنگین عمدتاً در اثر انبوه فعالیت های صنعتی، باعث آلودگی محیط زیست شده اند، هر چند که منابعی مانند پساب های کشاورزی نیز در این امر شرکت دارند. این آلاینده ها وارد زیستگاه‌های آبی و خاکی شده و در محل ورود به محیط، تراکم‌های خیلی بالایی از آنها تشکیل می‌شود. انباشت فلزات سنگین و سمی در خاکهای مرغوب کشاورزی، به دلیل جذب بیولوژیک فلزات سمی و سنگین توسط گیاهان و به دنبال آن انباشت در زنجیره ی غذایی، آنها را بدون استفاده می‌کند (۲). نیکل عنصر فلزی و متعلق به گروه *VIII* جدول تناوبی است که در خاک، آب، هوا و در بیوسفر وجود دارد (۳). نیکل ناشی از فرآیند های مختلف صنعتی و سایر منابع عمدتاً وارد فاضلاب ها و پساب ها می‌گردد. نیکل کربونیل حاوی ترکیب سمی برای سلامتی انسان است که اثرات مسمومیت حاد و مزمن در کارگران معدن نیکل و در ذوب نیکل گزارش شده است (۴). همچنین حساسیت فوق العاده تماسی نیکل گزارش شده است. مدت زمان زیادی است که نیکل در انسان به عنوان یک عامل بالقوه سرطانزایی و آلرژن

Archive of SID

www.SID.ir

شناخته شده است. نیکل تشکیل رادیکال های اکسیژن را تسهیل می‌کند که نقش مهم در سرطانزایی آن دارند (۵).

روش های متنوع فیزیکو-شیمیایی در تصفیه پساب های حاوی فلزات سنگین و سمی وجود دارد. ولی روش های تصفیه موجود برای چنین پساب هایی، پرهزینه بوده و سازگار با شرایط محیط زیست نیست (۶). از آنجا که پساب‌هایی با غلظت بالای نمک در خلال تولید مواد شیمیایی و احیای نفت و گاز ایجاد می‌شود و اغلب آلوده به فلزات سنگین و عناصر سمی می‌باشد و روش‌های میکروبی سنتی در غلظت‌های بالای نمک عمل نمی‌کند، استفاده از باکتری‌های نمک دوست نسبی که اغلب نیازمندی‌های بسیار ساده‌ای دارند و شرایط نامساعد را بهتر تحمل می‌کنند باید مورد توجه بیشتر واقع شود (۷). میکروارگانیسم ها بر اساس بهینه رشد خود در شوری های مختلف، در گروه های گوناگون طبقه بندی شوند. گروه های مختلفی از نمک دوست ها بوسیله Kamekura و Kushner (۱۹۹۸) تعریف شده است (۸). نمک دوست های نسبی، میکروارگانیسم هایی را شامل می‌شوند که بهینه رشد را در حضور ۰/۵ تا ۲/۵ مول سدیم کلراید (۲/۹ تا ۱۴/۶٪) دارند. تحقیقات نشان داده اند که این میکروارگانیسم ها مقاومت جالب و قابل توجهی به برخی از فلزات سنگین دارند که از این خصوصیت می‌توان در پاکسازی مناطق آلوده به این فلزات سمی استفاده کرد (۹).

هدف این تحقیقات به طور فزاینده ای به سمت استفاده عملی از میکروارگانیسم ها در تصفیه فلزات سنگین از پساب ها، جهت گیری نموده است (۲).

مکانیسم‌های مقاومت میکروبی به فلزات سنگین در نتیجه زندگی باکتری در محیط‌هایی که اغلب آلوده به فلزات سنگین می‌باشند، ایجاد می‌شود و شامل ممانعت از ورود فلزات از طریق سد نفوذ پذیری، پمپ برون ریز انتقال فعال، تجمع درون سلولی، تجمع خارج سلولی، سمیت زدایی آنزیمی و کاهش حساسیت به فلز به واسطه تغییر در مناطق حساس سلولی است (۱۰).

علاوه بر این، باکتری‌های نمک دوست نسبی مانند سایر میکروارگانیسم های اکسترموفیل دارای اهمیت بیوتکنولوژیکی هستند. زیرا نه تنها اغلب آن ها قادر به تولید ترکیبات مفید جهت استفاده در صنعت می‌باشند (مانند آنزیم ها، پلی مرها و محافظ های اسمزی) بلکه داشتن ویژگی های فیزیولوژیک مفید، بهره برداری از آن ها را به منظور اهداف تجاری تسهیل می‌کند (۹). اغلب آن ها می‌توانند در غلظت های بالای نمک رشد کنند که در نتیجه ریسک آلوده شدن محیط کشت به حداقل می‌رسد (این مورد از نظر اقتصادی ارزشمنداست) و نیز اینکه این باکتری ها به آسانی رشد کرده و احتیاجات غذایی آن ها ساده است، طوری که اغلب آنها می‌توانند از ترکیبات مختلفی به عنوان تنها منبع کربن و انرژی استفاده کنند (۸). همچنین از باکتری های نمک دوست نسبی می‌توان به عنوان مدلی برای مطالعه ملکولی مکانیسم های تنظیم اسمزی استفاده کرد. به نظر می‌رسد که دستکاری ژنتیکی این باکتری ها نسبتاً ساده و راحت باشد (۹).

ژن 16 S rDNA دارای تمام ویژگی مربوط به مطالعات فیلوژنی موجودات است به اینصورت که این ژن بین گونه‌ها منتقل نمی-شود و ژن مورد مطالعه سطوح مناسبی از توالی حفاظت شده را دارا است. این ژن در طول تکامل تغییرات محدودی یافته است و برای ثبت اطلاعات تاریخی و تکاملی اندازه‌ای مناسبی دارد. از طرفی ژن 16S rDNA دارای بزرگترین پایگاه اطلاعاتی برای مقایسه ایزوله‌های جدید است و اغلب موارد نتایج حاصل از این آنالیز با اطلاعات سایر روش‌ها تایید می‌شود (۱۱).

هدف از انجام این پژوهش در مرحله نخست جداسازی میکروارگانیسم های نمک دوست مقاوم به فلز سمی نیکل و سپس بررسی مقاومت به سایر فلزات سنگین و سمی و در مرحله ی بعد تعیین هویت باکتری مقاوم به نیکل جدا شده از آب شور دریاچه آران و بیدگل به روش ژن 16S rDNA بود.

مواد و روش ها

دریاچه آران و بیدگل یکی از اکوسیستم‌های پرنمک ایران است که در ۶۰ کیلومتری قم و ۱۲۰ کیلومتری تهران واقع شده است. مساحت آن بالغ بر ۲۴۰۰ کیلومتر مربع است و ارتفاع آن از سطح دریا ۷۹۵ متر است. این دریاچه از شمال به دشت ورامین، از جنوب به شهرستان آران و بیدگل، از مشرق به سیاه کوه و از مغرب به استان قم محدود می‌شود. این دریاچه شکلی شبیه به مثلث دارد که رأس آن به سمت شمال است. طول و قاعده این مثلث به ترتیب ۳۵ و ۳۸ کیلومتر است.

به منظور انجام یک مطالعه توصیفی در دانشگاه بوعلی سینا همدان، هفت نمونه مختلف از سطح و عمق آب دریاچه و نیز نمک حاشیه دریاچه در ظروف استریل از دریاچه آران و بیدگل در اردیبهشت ماه ۱۳۸۸ جمع آوری شد.

جداسازی و عوامل مورد نیاز کشت باکتری‌های نمک دوست: نمونه های جمع آوری شده بر روی محیط NA به همراه نمک های زیر (غلظت نهایی ۱۰۰ گرم نمک، در لیتر) کشت داده شدند و مجموع ۴۶ ایزوله باکتری نمک دوست نسبی رشد کرد. ترکیب محلول نمکی عبارت است از (بر حسب گرم در لیتر) (۱۲):

$NaCl$:۸۱, $MgCl_2$:۷, $MgSO_4$:۹/۶, $CaCl_2$:۰/۳۶, KCL:۲, $NaHCO_3$:۰/۰۶, $NaBr$:۰/۰۲۶

محیط های کشت در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه گرماگذاری شدند. pH محیط های مورد استفاده در محدوده ۷/۴-۷/۲ تنظیم گشت.

بررسی میزان مقاومت به نیکل و سایر فلزات سنگین: میزان مقاومت به فلزات سنگین، با استفاده از روش رقت در آگار(۱۳) برای ۴۶ ایزوله جدا شده انجام شد. غلظت مشخصی از فلز به ۲۰ میلی لیتر از محیط نوترینت آگار ذوب شده حاوی ترکیب نمکی، اضافه گشت و سپس محیط داخل پلیت های شیشه ای ریخته شد. میزان غلظت های مورد آزمایش (بر حسب میلی مول) برای تمامی فلزات به صورت زیر بود:

۰/۰۰۵، ۰/۰۱، ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۵، ۱، ۲/۵، ۳، ۳/۵، ۴، ۴/۵، ۵، ۶، ۷، ۸، ۹، ۱۰، ۱۲، ۱۴، ۱۶، ۱۸، ۲۰.و ۴۰.

Archive of SID

www.SID.ir

قبل از کشت باکتری، پلیت های آگار دار در دمای ۴۰ درجه سانتیگراد بمدت ۳۰ دقیقه نگهداری شد تا سطح مرطوب آنها خشک شود و سپس بوسیله سمپلر، ۱۰ میکرولیتر از محیط مایع میکروب روی محیط آگار دار قرار داده شد. باکتری مورد نظر در مرحله رشد لگاریتمی برداشت شد که غلظت آن معادل با ۰/۵ لوله مک فارلند تنظیم شده بود (برابر 10^5تا 10^6 باکتری در میلی لیتر). کنترل شامل محیط های بدون فلز بود که میکروارگانیسم های کشت شده روی آن قادر به رشد بودند. پلیت ها، پس از گرماگذاری در ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت یک هفته، مورد مطالعه قرار گرفت. MIC (Minimum inhibitory concentration)، بمعنی پایین ترین غلظتی از فلز است که کاملاً مانع رشد باکتری می‌شود. MIC برای هر فلز، در سه آزمایش مستقل مورد بررسی قرار گرفت. محیط بدون فلز به عنوان تیمار کنترل بکار رفت که میکروارگانیسم‌های کشت شده روی آن قادر به رشد بودند. رشد در غلظت‌های مساوی یا بالاتر از ۱ میلی مولار به عنوان باکتری مقاوم به این فلز تلقی شد (۱۴ و۱۵). فلزات سنگین آزمایش شده از شرکت Merck تهیه گشت. این نمک ها عبارت بودند از: نیترات سرب، نیترات نقره، نیترات کادمیوم، کلرید کبالت، کلرید نیکل، سولفات مس و سولفات روی. محلول های استوک در آب مقطر تهیه گشته و با فیلتراسیون از طریق فیلترهای غشایی(میلی پور) با قطر سوراخ ۰/۲۲ µm استریل گشت. محلول های فلزی به مدت ۳ روز در یخچال ۴ درجه سانتی گراد قرار داده شد.

بررسی‌های مورفولوژیکی و بیوشیمیایی باکتری: در مرحله بعد جهت شناسایی مورفولوژیکی و بیوشیمیایی سویه مورد نظر، کلونی باکتری نمک دوست نسبی مقاوم به نیکل جدا شده بر روی محیط نوترینت آگار حاوی ۱۰ درصد سدیم کلراید کشت و بعد از ۴۸ ساعت تشکیل شد. رنگ آمیزی گرم بر اساس روش Smibert و Krieg (۱۹۹۴) انجام شد (۱۶)، در عین حال آزمایش حلالیت در هیدروکسید پتاسیم ۳ درصد نیز انجام گرفت. فعالیت کاتالازی بوسیله محلول ۳٪ هیدروژن پراکسید مورد بررسی قرار گرفت. فعالیت آمیلاز با افزودن ید در محیط نشاسته دار حاوی ۱۰٪ نمک سدیم کلراید نشان داده شد. تست های لیپاز، اوره آز، سلولاز و اکسیداز نیز بر اساس روش Smibert و Krieg (۱۹۹۴) انجام شد (۱۶). بررسی مصرف منابع کربنی بر اساس روش و محیط توصیه شده ونتوزا و همکاران (۱۹۸۲) تعیین گشت (۱۲).

شناسایی ملکولی باکتری با استفاده از تکثیر ژن 16Sr DNA: استخراج DNA با استفاده از روش Marmur (۱۹۶۱) با اندکی تغییرات انجام شد (۱۷). تغییرات صورت گرفته در زمان قرار گیری در نیتروژن مایع و بن ماری بود که افزایش این مدت زمان به ۳۰ دقیقه سبب بهتر شکسته شدن دیواره سلولی باکتری شده و در نتیجه استخراج DNA بهتر صورت می‌گرفت. DNA استخراج شده برای نگهداری به فریزر ۲۰- منتقل شد. برای اطمینان از انجام صحت استخراج، نمونه های DNA ابتدا در ژل آگاروز ۱٪ بارگذاری شدند. برای تکثیر ژن Sr DNA ۱۶ از پرایمرهای یونیورسال ۲۷F و ۱۴۹۲R استفاده شد. ذکر این نکته ضروری است که این پرایمرها، پرایمرهای عمومی بوده و جهت شناسایی باکتری‌های هالوفیل پیشنهاد شده است (۱۸). تمام مواد مورد استفاده برای آزمایشات ملکولی از شرکت سیناژن تهیه گشت.

توالی پرایمرها و دمای اتصال آن ها به شرح زیر است:

۲۷F →3' AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG 5' Tm=۶۰ ^{C}

۱۴۹۲R→3' AAG GAG GTG ATC CAG CCG CA 5' Tm=۶۰ ^{C}

واکنش های زنجیره ای پلیمراز با روش استاندارد Rohban و همکاران (۲۰۰۹) و با اندکی تغییرات انجام شد. تغییرات انجام شده در مدت زمان دمای اتصال و تغییر در دمای اتصال بود که افزایش اندک این پارامترها سبب بدست آمدن باند مورد نظر شد (۱۸). دناتوراسون اولیه در دمای ۹۶ درجه به مدت ۵ دقیقه انجام شد. چرخه تکثیر ۳۵ سیکل تکرار شونده با دمای دناتوراسیون ۹۴ درجه به مدت ۱ دقیقه، دمای اتصال ۶۱ درجه به مدت ۹۰ ثانیه و دمای سنتز ۷۲ درجه به مدت ۱ دقیقه بود. به منظور تکمیل نهایی ساختار DNA های تکثیر شده، نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه نگهداری شدند.

محصول PCR در ژل آگاروز ۱/۲ درصد الکتروفورز شد. نمونه های DNA به مدت ۱ ساعت در ولتاژ ثابت ۱۲۰ ولت به حرکت درآمدند و عکس برداری از ژل انجام شد. نمونه های حاصل از PCR، جهت توالی یابی به شرکت ماکروژن در کره ارسال شد. با نتایج حاصل از توالی یابی، شناسایی سویه باکتری جدا شده با استفاده از پایگاه اطلاعاتی NCBI صورت گرفت.

یافته‌ها

نتایج نشان داده شده در جدول ۱ و۲، بیان می‌دارد که باکتری توانایی رشد در حضور غلظت های ذکر شده از فلزات سنگین را دارا می باشد. این باکتری قادر است حتی تا غلظت ۸ میلی مول نیکل را نیز در محیط تحمل کرده و زنده بماند. بیشترین غلظت بازدارندگی مربوط به فلز نقره (با غلظت ۰/۱ میلی مول) و کمترین آن مربوط به فلزهای سرب و کادمیوم (با غلظت ۱۳ میلی مول) بود. نتایج آزمایشات مرفولوژی و بیوشیمیایی مشخص کرد که *Halomonas elongate* (خانواده *Halomonadaceae*) یک باسیل گرم منفی، هوازی اختیاری و نمک دوست نسبی بود. شکل کلونی مدور، نرم و کرم رنگ بود. باکتری قابلیت تحمل نمک تا ۲۵ درصد در محیط کشت را دارا بود. این باکتری قادر به مصرف کربوهیدرات هایی چون فروکتوز و ترهالوز، گلوکز، سوربیتول و ساکاروز بود. تست آنزیم های خارج سلولی، نشاندهنده حضور آنزیم های اکسیداز، اوره آز و آمیلاز در این باکتری بود.

نتایج مربوط به بررسی های فیلوژنتیکی: باند حاصل از استخراج DNA و نیز باند حاصل از تکثیر ژن 16 S rDNA در شکل ۲ نشان داده شده است. مقایسه نتایج حاصل از توالی یابی با بانک اطلاعاتی NCBI نشاندهنده وجود بیش از ۹۷٪ شباهت با *Halomonas elongate* بود.

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۱: MIC (حداقل غلظت مهار کننده رشد) ۷ فلزات سنگین مورد آزمایش بر حسب میلی مول بر روی رشد باکتری نمک دوست نسبی مقاوم به نیکل *Halomonas elongate* جدا شده از دریاچه آران و بیدگل با استفاده از روش رقت سازی آگار

فلز	MIC (Mm)
Ni	**۹**
Cd	**۱۳**
Co	**۸**
Zn	**۲**
Cu	**۲/۵**
Pb	**۱۳**
Ag	**۰/۱**

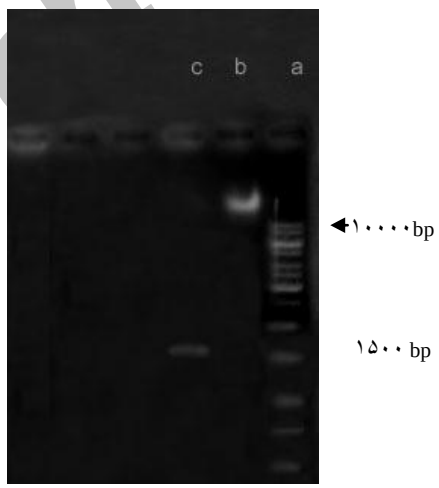
Minimum Inhibitory Concentration : MIC

نمک‌های مورد استفاده به ترتیب عبارت بودند از: Ni :کلرید نیکل، Cd : نیترات کادمیوم، Co :کلرید کبالت، Zn : سولفات روی، Cu: سولفات مس، Pb : نیترات سرب، Ag: نیترات نقره.

جدول ۲: میزان مقاومت یا حساسیت ۷ فلزات سنگین مورد آزمایش بر رشد باکتری نمک دوست نسبی مقاوم به نیکل *Halomonas elongate* جدا شده از دریاچه آران و بیدگل با استفاده از روش رقت سازی آگار.

فلز	نحوه مقاومت
Ni	**مقاوم**
Cd	**مقاوم**
Co	**مقاوم**
Zn	**مقاوم**
Cu	**مقاوم**
Pb	**مقاوم**
Ag	**حساس**

نمک‌های مورد استفاده به ترتیب عبارت بودند از: Ni :کلرید نیکل، Cd : نیترات کادمیوم، Co :کلرید کبالت، Zn : سولفات روی، Cu: سولفات مس، Pb : نیترات سرب، Ag: نیترات نقره.



شکل۱- باندی مربوط به DNA استخراج شده از باکتری نمک دوست نسبی مقاوم به نیکل *Halomonas elongate* و محصول تکثیر ژن S rDNA ۱۶آن به روش PCR با استفاده از آغازگرهای ۲۷F و ۱۴۹۲R (a: نشانگر ۱ کیلو بازی، b: باند حاصل از DNA استخراج شده، c: باند محصول تکثیر ژن S rDNA ۱۶).

Archive of SID

www.SID.ir

بحث

در آزمایش مقاومت به فلز نیکل، یک باکتری *Halomonas elongate* مقاومت را نشان داد. این باکتری اکسیداز، اوره آز و آمیلاز مثبت بود. این ایزوله به سرب، کبالت، کادمیوم، روی و مس مقاوم و به نقره حساس بود. مناطقی از جهان که باکتری‌های این جنس از آنجا جداسازی شده‌اند به شرح زیر است:

Vreeland و همکاران (۱۹۸۰) موفق به جداسازی سویه‌ای از *Halomonas elongate* از معدن استخراج نمک خورشیدی در بونایر هلند شدند (۱۹).

Wang و همکاران (۲۰۱۱) باکتری *Halomonas alkalitolerans* (خانواده *Halomonadaceae*) را در خاک‌های نمکی از چین جداسازی کردند (۲۰). همچنین Guzman و همکاران (۲۰۱۰) باکتری *Halomonas andesensis* (خانواده *Halomonadaceae*) را از دریاچه شور لاگونا کلورادا در بولیویا جداسازی کردند(۲۱). Cabrera و همکاران (۲۰۰۷) باکتری *Halomonas indalinina* (خانواده *Halomonadaceae*) را از معدن استخراج نمک خورشیدی جدا کردند (۲۲). Lim و همکاران (۲۰۰۴) باکتری *Halomonas koreensis* (خانواده *Halomonadaceae*) را از معدن استخراج نمک خورشیدی در کره جداسازی کردند (۲۳). Chen و همکاران (۲۰۱۱) هم باکتری *Halomonas qijiaojingensis* و *Halomonas flava* (خانواده *Halomonadaceae*) را از دریاچه شوری در شمال غرب چین جداسازی کردند (۲۴).

برخی مطالعات روشی را برای تعیین مقاوم و یا حساس بودن باکتری به فلز سنگین بیان داشتند (۱۴ و ۱۵). بدین صورت اگر باکتری در حضور ۱ میلی مول از فلز سنگین در محیط کشت قادر به رشد باشد، به عنوان باکتری مقاوم و در صورتی که فقط در غلظت های پایین تر از ۱ میلی مولار رشد کند، به عنوان باکتری حساس در نظر گرفته می‌شود. با توجه به تعریف فوق، باکتری جدا شده در این آزمایش، مقاوم به نیکل، سرب، مس، کادمیوم، روی و کبالت ولی حساس به نقره بود. سویه‌ای از باکتری تمک دوست *Halomona seurihalina* (خانواده *Halomonadaceae*) جدا شده توسط آموزگار و غضنفری نیز مقاوم به کادمیوم و سرب (۵ میلی مول) بود (۲۵). مقاومت به کادمیوم و سرب در سویه جدا شده در این آزمایش نسبت به سویه جدا شده توسط آموزگار و غضنفری بسیار قابل ملاحظه‌تر بود. سویه‌های باکتری‌های نمک دوست متعلق به جنس هالوموناس که مقاوم به مس، نیکل، کبالت و روی بود توسط عثمان و همکاران نیز جداسازی شدند (۲۶). حساسیت به نقره در ایزوله جداسازی شده در این تحقیق مطابق با نتایج Amoozegar و همکاران (۲۰۰۵) می‌باشد که در تمام ایزوله-های نمک دوست نسبی جداسازی شده توسط آنها نیز حساسیت به نقره گزارش شده است که دلیل این امر می‌تواند سمیت بالای فلز نقره نسبت به سایر فلزات باشد. باکتری جدا شده در این آزمایش قادر بود تا غلظت ۸ میلی مولار نیکل را در محیط تحمل کند، این در حالی است که باکتری‌های نمک دوست نسبی جدا شده در تحقیقات آموزگار و همکاران (۲۰۰۵) بر خلاف نتایج این آزمایش همگی حساس به نیکل بودند (۱۴). Park و همکاران (۲۰۰۳) باکتری مقاوم به نیکل *Hafina alvei5-5* را از مناطق با غلظت بالای نیکل جداسازی کردند که قادر به تحمل ۳۰ میلی مول نیکل بود (۲۷). در مقایسه با این باکتری، ایزوله جدا شده در این تحقیق به غلظت کمتری از نیکل مقاوم است. دلیل این امر را می‌توان سازگاری باکتری *Hafina alvei5-5* *به غلظت بالای نیکل در محیط حاوی این فلز، در طی زمان نسبت داد.* در نتایج آموزگار و همکاران (۲۰۰۵) باکتری‌های نمک دوست نسبی همگی به کبالت نیز حساس بودند (۱۴). در صورتی که باکتری *Halomonas elongate* جدا شده در این آزمایش مقاومت بالایی به این فلز داشت. یکی از دلایل مقاومت به فلزات سمی و سنگین در باکتری‌های نمک دوست را می‌توان حضور یون‌های سدیم و پتاسیم دانست که عناصر ضروری برای رشد این میکروارگانیسم‌ها هستند و برای فعالیت آنزیم‌ها و پمپ‌ها در هالوفیل‌ها نیز ضروری هستند(۹).

Coronado و همکاران(۲۰۰۰) نشان دادند که ژن amyH که مسئول فعالیت آمیلازی است، در *Halomonas elongate* دارای فعالیت عملکردی است (۲۸). نتایج بررسی حضور آنزیم‌های مختلف در باکتری مقاوم به نیکل جدا شده، نشاندهنده حضور آنزیم‌هایی مانند آمیلاز بود. Uzyol و همکاران (۲۰۱۲) موفق به جداسازی یک آلفا آمیلاز پایدار در برابر گرما از باکتری *Halomonas.sp AAD21* (خانواده *Halomonadaceae*) از یک معدن استخراج نمک در ناحیه‌ای از ازمیر ترکیه شدند (۲۹). کورونادو و همکاران (۲۰۰۰) موفق به جداسازی یک آلفا آمیلاز از باکتری *Halomonas meridian* (خانواده *Halomonadaceae*) شدند (۳۰). به دلیل اهمیت این آنزیم در صنعت، به نظر می‌رسد باکتری *Halomonas elongate* جدا شده در این آزمایش دارای پتانسیل بالقوه بیوتکنولوژیکی بالایی در این زمینه است.

نتیجه گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که باکتری *Halomonas elongate* پتانسیل بالقوه‌ای را در جهت پاکسازی محیطی و کنترل آلودگی فلزات سنگین و سمی از جمله نیکل، سرب، روی، کادمیوم، کبالت و مس دارد. البته ذکر این نکته ضروری است که فقط با استناد به نتایج این تحقیق نمی‌توان این باکتری‌ها را در پاکسازی محیطی مورد استفاده قرار داد و باید جهت انجام مطالعات تکمیلی میزان فلز جذب شده در درون سلول باکتری با استفاده از روش AAS(Atomic Absorption Spectroscopy) بررسی گردد.

تقدیر و تشکر

از زحمات و تلاش‌های تمامی عزیزانی که ما را در انجام این تحقیق یاری کردند، سپاسگزاری می‌شود.

Archive of SID

www.SID.ir

References

1. Adeniji A. *Bioremediation of Arsenic, Chromium, Lead and Mercury*. National Network of Environmental Management studies Fellow for U.S. Environmental Protection Agency Office of Solid Waste and Emergency Response Technology Innovation Office Washington Dc, 2004; PP: 1-43.
2. Gadd GM, White Ch. Microbial Treatment of Metal Pollution a Working Biotechnology. *Elsevier Science Publishers LTD* 1993; **11**: 353-359.
3. Babich H, Stotzky G. Toxicity of Nickel to Microbes: Environmental Aspects. *Advances in Applied Microbiology* 1983; **29**: 195-265.
4. Trombetta D, Mondello MR, Cimino F, Cristani M, Pergolizzi S, Saija A. Toxic effect of nickel in an in vitro model of human oral epithelium. *Toxicol Lett* 2005; **3**: 219-225.
5. Wu LF, Navarro C, Pina KD, Quenard M, Mandrand MA. Antagonistic Effect of Nickel on the Fermentative Growth of Escherichia coli k-12 and Comparison of Nickel and Cobalt Toxicity on the Arobic and Anaerobic Growth. *Environ Health Percept* 1994; **102**: 297-300.
6. Fourest E, Roux JC. Heavy metal bio sorption by fungal mycelia by-product: mechanisms and influence of PH. *Microbiol.Biotechnol* 1992; **37**: 399-403.
7. Iyer A, Mody K, Jha B. Bio sorption of heavy metals by a moderately halophilic eubacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 2005; **55**: 2385-2390.
8. Kushner DJ, Kamekura M. Physiology of halophilic eubacteria. In: *Halophilic Bacteria*, (Rodriguez-Valera F, ed). 1st ed Boca Raton, CRC Press, 1998; PP**:** 109-140.
9. Ventosa A, Nieto JJ, Oren A. Biology of moderately halophilic aerobic bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Review* 1998; **62**: 504-544.
10. Bruins MR, Kapil S, Oehme FW. Microbial resistance to metals in the environment. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 2000; **45**: 198-207.
11. Koepple AB, Perry E, Sikorski J, Krizance D, Warner AM, Ward DP, et al. Identifying the fundamental units of bacterial diversity: paradigm shift to incorporate ecology in to bacterial systematic. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2008; **105**(7): 2504-2509.
12. Ventosa A, Quesada E, Rodriguez-Valera F, Ruiz-Berraqueroand A, Ramos-Cormenzana F. Numerical taxonomy of moderately halophilic Gram-negative rods. *J Gen Microbial* 1982; **128**: 1959-1968.
13. Washington JAII, Sutter VL. Dilution susceptibility test: agar and macro-broth dilution procedures. In: *Manual of Clinical Microbiology*, (*Lennette* EH, Balows A, Hausler Jr, Truant JP, ed). 3rd ed. Washington, D.C, 1980; PP: 453-458.
14. Amoozegar MA, Hamedi J, Dadashipour M, Shariatpannahi S. Effect of salinity on the tolerance to toxic metals and oxyanions in native moderately halophilic spor-forming bacilli. *Word Journal of Basic Microbiology and Biotechnology*; 2005; **10**: 1-7.
15. Ratheber C, Yurova N, Stackebrandt E, Beatty JT, Yurova 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**: 4613-4622.
16. Smibert RM, Krieg NR. Phenotypic characterization. In: *Methods for general and molecular bacteriology*. (Gerhardt P, Murray RGE, Wood WA, Krieg NR, eds*)*. Washington D.C, American Society for Microbiology, 1994; PP: 607-654.
17. Marmur J. A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. *J Mol Biol* 1961; **3**: 208-218.
18. Rohban R, Amoozegar MA, Ventosa A. Screening and isolation of halophilic bacteria producing extracellular hydrolyses from Howz Soltan Lake, Iran. *J Ind Microbiol Biotechnol* 2009; **36**: 333–340.
19. Vreeland RH, Litchfield CD, Martin EL, Elliot E. Halomonas elongate, a new genus and species of extremely salt-tolerant bacteria *Int J Syst Bacteriol* 1980; **30**: 485-495.
20. Wang S, Yang Q, Liu ZH, Sun L, Wei D, Zhang JZ, et al. Halomonas alkalitolerans sp. nov, a novel moderately halophilic bacteriun isolated from soda meadow saline soil in Daqing, China. *J Microbiol* 2011; **49**(1): 24-28
21. Guzman D, Quillaguaman J, Munoz M, Hatti-Kaul R. Halomonas andesensis sp. nov, a moderate halophile isolated from the saline lake Laguna Colorada in Bolivia. *Int J Syst Evol Microbiol* 2010; **60**:749-753.
22. Cabrera A, Aguilera M, Fuentes S, Incerti C, Russell NJ, Ramos-Cormenzana A, et al. Halomonas indalinina sp. nov, a moderately halophilic bacterium isolated from a solar saltern in Cabo de Gata, Almeria, southern Spain. *Int J Syst Evol Microbiol* 2007; **57**: 376-380.
23. Lim JM, Yoon JH, Lee JC, Jeon CO, Park DJ, Sung C, et al. Halomonas koreensis sp. nov, a novel moderately halophilic bacterium isolated from a solar saltern in Korea. *Int J Syst Evol Microbiol* 2004; **54**: 2037–2042.
24. Chen C, Shi R, Liu BB, Zhang YJ, Sun HZ, Li CT, et al. Halomonas qijiaojingensis sp. nov. Halomonas flava sp. nov, two moderately halophilic bacteria isolated from a salt lake. *Antonie Van Leeuwenhoek* 2011; **100**(3): 365-373.
25. Amoozegar MA, Ghazanfari N. [evaluation of bioremediation lead and cadmium by moderately halophilic bacterium Halomonas eurihalina strained]. *Journal of Environmental Sciences and Technology* 2009; **11**(4): 479-491.
26. Osman O, Tanguichi H, Ikeda K, Park P, Tanabe-Hosoi S, Nagata S J. Copper resistance halophilic bacterium isolated from the plluted Maruit Lake, Ejypt. *Appl Microbiol* 2010; **108**(4):1459-1470.
27. Park EP, Young KE, Schlegel HG, Rhie HG, Lee HS. Conjugative plasmid mediated inducible nickel resistance in Hafnia alvei 5-5. *International Microbiology* 2003; **6**: 57-64.

Archive of SID

www.SID.ir

28. CoronadoMJ, Vargas C, Mellado E, Tegos G, Drainas C, Nieto JJ, et al. The a-amylase gene amyH of the moderate halophile Halomonas meridiana: cloning and molecular characterization. *Microbiol* 2000; **146**: 861-868.
29. Uzyol KS, Sariyar akbulut B, Denizci AA, Kazan D. The ermostable α-amylase from moderately halophilic Halomonas sp. AAD21. *Turk J Biol* 2012; **36**: 327-338.
30. Coronado MJ, Vargas C, Hofemeister J, Ventosa A, Nieto JJ. Production and biochemical characterization of an α- amylase from the moderate halophile Halomonas meridiana. *FEMS Microbiol Lett* 2000; **183**: 67-71.

Archive of SID

www.SID.ir