جداسازی باکتری نمک دوست نسبی مقاوم به برخی فلزات سمی از دریاچه نمک آران و بیدگل و شناسایی فیلوژنیک آن با استفاده از ژن ۱۶S rDNA

فرناز خدابخش [۱]، سنبل ناظری [۲*]، محمدعلی آموزگار [۳]، غلامرضا خداکرمیان [٤]

خلاصه

سابقه و هدف: فلزات سنگین اثرات سمی برای انسان، حیوانات و حتی گیاهان دارند و جهت زدودن آنها از محیط زیست علاوه بر روش‌های فیزیکوشیمیایی، از روش‌های بیولوژیک نیز استفاده می‌شود. برخی باکتری‌ها در تجزیه زیستی این فلزات سنگین موثرند. در این پژوهش مقاومت باکتری های دریاچه شور آران و بیدگل نسبت به فلزات سنگین مورد مطالعه قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: 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 شده و سپس باکتری مقاوم جدا شده به محیط‌های حاوی سایر فلزات سنگین منتقل شدند. بررسی‌های بیوشیمیائی، مورفولوژیکی و فیلوژنتیکی بر اساس تعیین توالی ژن ۱٦ S rDNA جهت شناسایی دقیق جنس و گونه باکتری انجام گردید. همچنین، جهت تعیین ارزش بیوتکنولوژیکی باکتری، توانایی آن در تولید برخی آنزیم ها بررسی شد.

نتایج: از ٤٦ ایزوله باکتری نمک دوست جدا شده از دریاچه، یک ایزوله باکتری با قابلیت رشد در محدوده نمک ۱۰- ۲/۵ درصد، با تحمل بالا نسبت به نیکل و سایر فلزات سنگین، از نظر ژن ۱٦ S rDNA تعیین توالی گردید که مقایسه آن با بانک ژن نشان دهنده شباهت ۹۸ درصدی ایزوله مذکور با *Salinovibrio Costicola* بود. این باکتری قابلیت تولید آنزیم‌های متعدد از جمله سلولاز، آمیلاز و استراز را دارا بود.

نتیجه گیری: در این مطالعه میکروارگانیسم مقاوم به فلزات سمی و با قابلیت استفاده در پاک‌سازی محیط‌های آلوده به نیکل و نیز قابلیت تولید آنزیم‌های صنعتی در دریاچه نمک آران و بیدگل شناسائی و جداسازی شد.

واژگان کلیدی: فلزات سنگین، باکتری نمک دوست نسبی، نیکل، ژن ۱٦ S rDNA

فصلنامه علمی ــ پژوهشی فیض، دوره پانزدهم، شماره ۱، بهار ۱۳۹۰، صفحات ٦۰-۵۳

مقدمه

میکروارگانیسم‌ها بر اساس بهینه رشد خود در شوری‌های مختلف، در گروه‌های گوناگون طبقه بندی می‌شوند [۲،۱]. نمک دوست های ملایم، بهترین رشد را در محیط های دارای ۰/۲تا ۰/۵ مول سدیم کلراید (۱/۲ تا ۲/۹ درصد سدیم کلراید) دارند. نمک دوست‌های نسبی، میکروارگانیسم‌هایی را شامل می‌شوند که رشد بهینه آن‌ها در حضور ۰/۵ تا ۲/۵ مول سدیم کلراید (۲/۹ تا ۱٤/٦ درصد) رخ داده و نمک دوست‌های اجباری آن دسته از میکروارگانیسم هایی هستند که بهترین رشد را در محیط‌های ۲/۵ تا ۵/۲ مول (نمک اشباع) سدیم کلراید دارند.

این باکتری‌ها نیز مانند سایر میکروارگانیسم‌های اکسترموفیل دارای اهمیت بیوتکنولوژیکی هستند؛ زیرا نه تنها اغلب آنها قادر به تولید ترکیبات مفید جهت استفاده در صنعت می‌باشند (مانند آنزیم‌ها، پلی‌مرها و محافظ‌های اسمزی) بلکه با داشتن ویژگی‌های فیزیولوژیک مفید، بهره برداری از آنها به‌منظور اهداف تجاری تسهیل می‌شود [۳]. اغلب آن‌ها می‌توانند در غلظت‌های بالای نمک رشد کنند [٤] که در نتیجه ریسک آلوده شدن محیط کشت به حداقل می‌رسد (این مورد از نظر اقتصادی ارزشمنداست) و نیز اینکه این باکتری‌ها به آسانی رشد کرده و احتیاجات غذایی آن‌ها ساده است، به‌طوری‌که اغلب آنها می‌توانند از ترکیبات مختلفی به عنوان تنها منبع کربن و انرژی استفاده کنند [۲]. از باکتری‌های نمک دوست نسبی همچنین می‌توان به‌عنوان مدلی برای مطالعه ملکولی مکانیسم‌های تنظیم اسمزی استفاده کرد. اغلب ابزارهای ژنتیکی که برای باکتری‌های غیر نمک دوست فراهم شده است را می‌توان برای این دسته از باکتری‌ها نیز به‌کار برد؛ به همین دلیل به نظر می‌رسد که دستکاری ژنتیکی آنها نسبتا ساده و راحت باشد. تحقیقات نشان داده‌اند که این میکروارگانیسم‌ها مقاومت قابل توجهی به برخی از فلزات سنگین دارند و از این خصوصیت می-

[۱] دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا همدان

[۲] استادیار، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا همدان

[۳] استادیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم، دانشگاه تهران

[۴] دانشیار، گروه گیاه پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا همدان

* **نشانی نویسنده مسوول:**

همدان، دانشگاه بوعلی سینا همدان، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی

تلفن: ۰۸۱۱۴۲۲۴۰۱۳ **دورنویس:** ۰۸۱۱۴۲۲۴۰۱۲

پست الکترونیک: snblnazeri@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۸۹/۸/۹ **تاریخ پذیرش نهایی:** ۸۹/۸/۲۹

Archive of SID

www.SID.ir

توان در پاک‌سازی مناطق آلوده به این فلزات سمی استفاده کرد. گزارشات زیادی در مورد تصفیه فلزات سنگین توسط باکتری‌ها وجود دارد که با گذشت زمان افزایش تصاعدی را نشان می‌دهد [۷-۵]. فلزات سمی و سنگین عمدتا در اثر انبوه فعالیت‌های صنعتی، باعث آلودگی محیط زیست شده‌اند، هر چند که منابعی مانند پساب‌های کشاورزی نیز در این امر شرکت دارند. این آلاینده‌ها وارد زیستگاه‌های آبی و خاکی شده و در محل ورود به محیط، تراکم‌های خیلی بالایی از آنها تشکیل می‌شود [۸]. انباشت فلزات سنگین و سمی در خاک‌های مرغوب کشاورزی، به‌دلیل جذب بیولوژیک فلزات سمی و سنگین توسط گیاهان و به‌دنبال آن انباشت در زنجیره‌ی غذایی، آنها را بدون استفاده می‌کند [۹]. نیکل عنصر فلزی و متعلق به گروه *VIII* جدول تناوبی است که در خاک، آب، هوا و در بیوسفر وجود دارد [۱۰]. منابع اولیه برای وارد کردن نیکل به هوای محیط سوختن زغال، زباله‌ها و مواد ناشی از لجن فاضلاب، استخراج معدن نیکل، کارخانه‌های تولید استیل و آبکاری نیکل هستند. نیکل ناشی از فرآیندهای مختلف صنعتی و سایر منابع عمدتا وارد فاضلاب‌ها و پساب‌ها می‌گردد. نیکل کربونیل حاوی ترکیب سمی برای سلامتی انسان است و اثرات مسمومیت حاد آن عبارتند از: درد در ناحیه پیشانی، سرگیجه، تهوع، استفراغ و بی خوابی که توسط علایم ریوی مشابه پنومونی ویروسی ادامه پیدا می‌کند. اثرات مزمنی همانند التهاب شبکیه، سینوزیت و آسم نیز در کارگران معدن نیکل و در ذوب نیکل گزارش شده است [۱۱]. همچنین حساسیت فوق العاده تماسی نیکل گزارش شده است. مسئله مهم این است که نیکل به‌طور یقین، بسیار سرطان زاست [۱۲]. مدت زمان زیادی است که نیکل در انسان به‌عنوان یک عامل بالقوه سرطان‌زایی و آلرژن شناخته شده است [۱۳]. نیکل تشکیل رادیکال‌های اکسیژن را تسهیل می‌کند و این امر نقش مهمی در سرطان‌زایی این عنصر [۱٤]. روش‌های متنوع فیزیکو-شیمیایی همانند فیلتراسیون – رسوب دهی، تعویض یونی، اکسیداسیون و احیا، اسمز معکوس، بازیابی الکتروشیمیایی و جداسازی غشایی برای تصفیه پساب‌های حاوی فلزات سنگین و سمی وجود دارد [۱۵] ولی روش‌های تصفیه موجود برای چنین پساب‌هایی، نمی‌توانند با قوانین استاندارد زیست محیطی تطبیق کنند. زیرا اغلب، روش‌های فیزیکو-شیمیایی، هنگامی که غلظت های فلز سنگین در محیط‌های آلوده در دامنه‌ی ppm ۱۰۰-۱۰ باشند، غیر موثر و یا غیر اقتصادی هستند. غلظت‌های مجاز فلزات سنگین، کمتر از ppm ۱ هستند [۱۷،۱٦]. در چند دهه اخیر، تحقیقات دامنه داری روی اتصال فلزات بر روی باکتری‌ها، مخمرها، قارچ‌های رشته‌ای و جلبک‌ها صورت گرفته است. هدف این تحقیقات به‌طور فزاینده‌ای به‌سمت استفاده عملی از میکروارگانیسم‌ها در تصفیه فلزات سنگین از پساب‌ها، جهت‌گیری نموده است [۸]. 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 [۱۸]. ژن ۱٦ S rDNA یک ملکول DNA است که ۱۵٤۲ نوکلئوتید طول دارد. ویژگی این DNA، وجود توالی‌های مکمل در داخل آن می‌باشد. این ژن دارای تمام ویژگی-های مربوط به مطالعات فیلوژنی موجودات است؛ به این‌صورت که این ژن بین گونه‌ها منتقل نمی‌شود 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 ۱٦S rDNA دارای بزرگترین پایگاه اطلاعاتی برای مقایسه ایزوله‌های جدید است و اغلب موارد نتایج حاصل از این آنالیز با اطلاعات سایر روش‌ها تایید می‌شود [۲۰،۱۹]. هدف از انجام این پژوهش در مرحله نخست جداسازی میکروارگانیسم‌های مقاوم به نیکل و سپس بررسی مقاومت به سایر فلزات سنگین و سمی و در مرحله‌ی بعد تعیین هویت باکتری مقاوم به نیکل جدا شده از آب شور دریاچه آران و بیدگل به روش ژن ۱٦ S rDNA بود.

مواد و روش ها

دریاچه آران و بیدگل یکی از اکوسیستم‌های پرنمک ایران است که در ٦۰ کیلومتری قم و ۱۲۰ کیلومتری تهران واقع شده است. مساحت آن بالغ بر۲٤۰۰ 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. به‌منظور 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 در اردیبهشت ماه ۱۳۸۸ جمع آوری شد.

جداسازی و عوامل مورد نیاز کشت باکتری‌های نمک دوست: نمونه‌های جمع آوری شده بر روی محیط NA به همراه نمک‌های زیر (غلظت نهایی ۱۰۰ گرم نمک، در لیتر) کشت داده

www.SID.ir

Archive of SID

شدند و مجموع ٤٦ ایزوله باکتری نمک دوست نسبی رشد کرد. ترکیب محلول نمکی عبارت است از (بر حسب گرم در لیتر) [۲۱]: NaCl: ۸۱, $MgCl_2$:۷ , $MgSO_4$: ۹/٦, $CaCl_2$:۰/۳٦, KCL: ۲, $NaHCO_3$: ۰/۰٦ , NaBr: ۰/۰۲٦

محیط‌های کشت در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه گرماگذاری شدند و pH محیط‌های مورد استفاده در محدوده ۷/٤-۷/۲ تنظیم گشت.

بررسی میزان مقاومت به نیکل و سایر فلزات سنگین: میزان مقاومت به فلزات سنگین، با استفاده از روش رقت در آگار [۲۲] برای ٤٦ 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 پلیت‌های شیشه‌ای ریخته شد. میزان غلظت‌های 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، ٤، ٤/۵، ۵، ٦، ۷، ۸، ۹، ۱۰، ۱۲، ۱٤، ۱٦، ۱۸، ۲۰. و ٤۰. قبل از کشت باکتری، پلیت‌های آگار دار در دمای ٤۰ درجه سانتیگراد به‌مدت ۳۰ دقیقه نگهداری شد تا سطح مرطوب آنها خشک شود و سپس به‌وسیله 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 $۱۰^۵$ تا $۱۰^٦$ باکتری در میلی لیتر). نمونه کنترل شامل محیط‌های بدون فلز بود که میکروارگانیسم‌های کشت شده روی آن قادر به رشد بودند. پلیت‌ها، پس از گرماگذاری در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌مدت یک هفته، مورد مطالعه قرار گرفت. MIC (Minimum Inhibitory Concentration) برای هر فلز، در سه آزمایش مستقل مورد بررسی قرار گرفت. محیط بدون فلز به‌عنوان تیمار کنترل به‌کار رفت. در این محیط میکروارگانیسم‌های کشت شده روی آن قادر به رشد بودند. رشد در غلظت‌های مساوی یا بالاتر از ۱ میلی‌مولار به‌عنوان باکتری مقاوم به این فلز تلقی شد [۲٤،۲۳]. فلزات سنگین آزمایش شده از شرکت مرک تهیه شدند. این نمک‌ها عبارت بودند از: نیترات سرب، نیترات نقره، نیترات کادمیوم، کلرید کبالت، کلرید نیکل، سولفات مس و سولفات روی. محلول‌های استوک در آب مقطر تهیه شده و با فیلتراسیون از طریق فیلترهای غشایی (میلی پور) با قطر سوراخ ۰/۲۲ µm استریل گردیدند، سپس به‌مدت ۳ روز در یخچال ٤ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند.

بررسی‌های مرفولوژیکی و بیوشیمیایی باکتری: در مرحله بعد جهت شناسایی مرفولوژیکی 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 برای مدت ٤۸ ساعت کشت داده شد. رنگ آمیزی گرم بر اساس روش Smibert و Krieg انجام شد [۲۵]، در عین حال آزمایش حلالیت در هیدروکسید پتاسیم ۳ درصد نیز انجام گرفت. همچنین، تست اسپورزائی به روش Atlas انجام شد [۲٦]. فعالیت کاتالازی به‌وسیله محلول ۳ درصد هیدروژن پراکسید مورد بررسی قرار گرفت. فعالیت آمیلاز با افزودن ید در محیط نشاسته دار حاوی ۱۰ درصد نمک سدیم کلراید نشان داده شد. تست‌های لیپاز، اوره آز، سلولاز و اکسیداز نیز بر اساس روش Smibert و Krieg انجام شدند [۲۵]. بررسی مصرف منابع کربنی نیز بر اساس روش و محیط توصیه شده Ventosa و همکاران تعیین شد [۲۱]. آزمایش تعیین حساسیت به سه آنتی بیوتیک پنی‌سیلین، تتراسایکلین و اریترومایسین با تلقیح سوسپانسیون باکتری در مرحله رشد لگاریتمی (۰/۵ مک فارلند)، به محیط نوترینت آگار حاوی ۱۰ درصد سدیم کلراید و با بکارگیری دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی انجام گرفت. هاله‌های عدم رشد بعد از ۲ روز گرماگذاری در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد اندازه گیری شده و با توجه به جدول سازنده کارخانه دیسک‌ها تفسیر شدند [۲۵].

شناسایی ملکولی باکتری با استفاده از تکثیر ژن Sr ١٦DNA: استخراج DNA با استفاده از روش Marmur با اندکی تغییرات انجام شد [۲۷]. تعییرات صورت گرفته در زمان قرارگیری 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، نمونه‌های DNA ابتدا در ژل آگاروز ۱ درصد بار گذاری شدند. برای تکثیر ژن Sr DNA ١٦ از پرایمرهای یونیورسال ۲۷ F و ١٤٩٢ R استفاده شد. ذکر این نکته ضروری است که این پرایمرها، عمومی بوده و جهت شناسایی باکتری‌های هالوفیل پیشنهاد شده‌اند [۲۸]. تمام مواد مورد استفاده برای آزمایشات ملکولی از شرکت سیناژن تهیه گشت. دمای اتصال پرایمرها ٦۰ درجه سانتی گراد بوده و توالی آن‌ها به شرح زیر است:

۲۷F →3' AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG 5'

١٤٩٢R→3' AAG GAG GTG ATC CAG CCG CA 5'

واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمراز با روش استاندارد Rohban و همکاران 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 به‌دست آمدن باند مورد نظر گردید [۲۹].

Archive of SID

www.SID.ir

دناتوراسون اولیه در دمای ۹۶ درجه به‌مدت ۵ دقیقه انجام شد. چرخه تکثیر ۳۵ سیکل تکرار شونده با دمای دناتوراسیون ۹۴ درجه به مدت ۱ دقیقه، دمای اتصال ۶۱ درجه به‌مدت ۹۰ ثانیه و دمای سنتز ۷۲ درجه به‌مدت ۱ دقیقه بود. به‌منظور تکمیل نهایی ساختار DNA های تکثیر شده، نمونه‌ها به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه نگهداری شدند. محصول PCR در ژل آگاروز ۱/۲ درصد الکتروفورز شد. نمونه‌های DNA به مدت ۱ ساعت در ولتاژ ثابت ۱۲۰ ولت به حرکت درآمدند و عکس برداری از ژل انجام شد. نمونه‌های حاصل از PCR، جهت توالی یابی به شرکت ماکروژن در کره ارسال شدند. نتایج حاصل از توالی قطعه تکثیر شده با آغازگر رو به جلوی ۲۷F در شکل شماره ۱ نشان داده شده است. با نتایج حاصل از توالی یابی، شناسایی سویه باکتری جدا شده با استفاده از پایگاه اطلاعاتی NCBI صورت گرفت.

نتایج

نتایج نشان داده شده در جدول‌های شماره ۱ و۲، بیان می‌دارد که باکتری توانایی رشد در حضور غلظت‌های ذکر شده از فلزات سنگین را دارا می‌باشد. این باکتری قادر است حتی تا غلظت ۱۰ میلی مول نیکل را نیز در محیط تحمل کرده و زنده بماند. بیشترین غلظت بازدارندگی مربوط به فلز نقره (با غلظت ۰/۰۵ میلی مول) و کمترین آن مربوط به فلز نیکل (با غلظت ۱۱ میلی مول) بود. نتایج آزمایشات مرفولوژی و بیوشیمیایی مشخص کرد که *Salonovibrio costicola* (خانواده *Vibrionaceae*) یک کوکوباسیل گرم منفی، هوازی اختیاری، فاقد اندوسپور و نمک دوست نسبی بود. شکل کلونی مدور، محدب، کدر (غیر شفاف)، نرم و کرم رنگ بود. باکتری قابلیت تحمل نمک تا ۲۰ درصد در محیط کشت را دارا بود. این باکتری قادر به مصرف کربوهیدرات-هایی چون فروکتوز و ترهالوز بود، ولی توانایی استفاده از گلوکز، سوربیتول و ساکاروز را به عنوان منبع کربن نداشت. تست آنزیم-های خارج سلولی، نشان‌دهنده حضور آنزیم‌های کاتالاز، اکسیداز، اوره‌آز، استراز، سلولاز و آمیلاز در این باکتری بود. بررسی مقاومت به آنتی‌بیوتیک، مقاومت این سویه به پنی‌سیلین و حساسیت نسبی به اریترومایسین و حساسیت شدید نسبت به تتراسایکلین را نشان داد. باند حاصل از استخراج DNA و نیز باند حاصل از تکثیر ژن ۱۶ S rDNA در شکل شماره ۲ نشان داده شده است. مقایسه نتایج حاصل از توالی یابی با بانک اطلاعاتی NCBI نشان‌دهنده وجود ۹۸ درصد شباهت با *Salinovibrio costicola* بود.

شکل شماره ۱- توالی قطعه تکثیر شده با آغازگر رو به جلوی F ۲۷ در باکتری *Salonovibrio costicola* جدا شده از دریاچه نمک آران و بیدگل

3'GCCATNNNNCNGGTTACCATGCAAGTCGAGCGGAACGGCAGCATTGAAGCTTCGGTGGATTTGCTGG
ACGTCGAGCGGCGGACGGGTGAGTAACGGCTGGGAACCTGCCCTGACGCGGGGGATAACCGTTGGAA
ACGACGGCTAATACCGCATAATGTCTTAGTTCATTACGAGCTGGGACCAAAGGTGGCCTCTACATGTAA
GCTATCGCGTTGGGATGGGCCCAGTTAGGATTAGCTAGTTGGTAAGGTAATGGCTTACCAAGGCGACG
ATCCTTAGCTGGTTTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGA
GGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGGGAGACCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAG
GCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTCAGCAGTGAGGAAGGTGGTGTACTTAATAGGTGCATGGCTTGACGT
TAGCTGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCGAGCGTTA
ATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCATGCAGGCGGTTTGTTAAGTCAGATGTGAAAGCCCGGGGCTCA
ACCTCGGAACCGCATTTGAAACTGGCAGGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTTCAGGTGTAGC
GGTGAAATGCGTAGAGATCTGAAGGAATACCAGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACAAAGACTGACGC
TCAGATGCGAAAGCGTGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGCTGTCT
ACTTGGAGGTTGAGGTTTAGACTTTGGCTTTCGGCGCTAACGCATTAAGTAGACCGCCTGGGGAGTACG
GCCGCAAGGTTAAAACTCATATGAATTGACGGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTATT5'

جدول شماره ۱- MIC. (حداقل غلظت مهار کننده رشد) ۷ فلز سنگین مورد آزمایش بر حسب میلی مول بر روی رشد باکتری نمک دوست نسبی مقاوم به نیکل. *Salinovibrio costicola* جدا شده از دریاچه آران وبیدگل با استفاده از روش رقت سازی آگار

فلز	Ag	Pb	Cu	Zn	Co	Cd	Ni
MIC (Mm)	۰/۰۵	۸	۲	۰/۱	۸	۰/۵	۱۱

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

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

www.SID.ir

Archive of SID

شکل شماره ۲- باند مربوط به DNA استخراج شده از باکتری نمک دوست نسبی مقاوم به نیکل *Salonovibrio costicola* و محصول تکثیر ژن ۱۶S rDNA آن 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 ۱۶S rDNA).

بحث

در آزمایش مقاومت به فلز نیکل، باکتری *Costicola Salinivibrio* بیشترین مقاومت را نشان داد. این باکتری کاتالاز، اکسیداز، اوره آز، استراز، آمیلاز و سلولاز مثبت بود. همچنین، این ایزوله به سرب، کبالت و مس مقاوم و به نقره حساس بود. مناطقی از جهان که باکتری‌های این جنس از آنجا جداسازی شده‌اند به شرح زیر است: Romano و همکاران باکتری *Salinivibrio sp.* را از منطقه‌ای در جنوب ایتالیا جداسازی کردند [۳۰]. همچنین Wang و همکاران همین باکتری را از مناطق نمک دوست تایوان جداسازی کردند [۳۱]. Huang و همکاران نیز باکتری *Salinivibrio costicola* را از دریاچه پرشور کالیفرنیا جدا کردند [۳۲]. Chamroensaksri و همکاران باکتری *Salinivibrio siamensis* را از ماهی تخمیر شده در تایلند جدا سازی کردند [۳۳] و آموزگار و همکاران هم باکتری *Salinivibrio proteolyticus* از دریاچه شور بختگان جدا کردند [۳۴]. برخی مطالعات روشی را برای تعیین مقاوم و یا حساس بودن باکتری به فلز سنگین بیان داشته‌اند [۳۵،۲۴،۲۳]؛ بدین صورت که اگر باکتری در حضور ۱ میلی مول از فلز سنگین در محیط کشت قادر به رشد باشد، به‌عنوان باکتری مقاوم و در صورتی که فقط در غلظت‌های پایین‌تر از ۱ میلی مولار رشد کند، به‌عنوان باکتری حساس در نظر گرفته می‌شود. با توجه به تعریف فوق، باکتری جدا شده در این آزمایش، مقاوم به نیکل، سرب، مس و کبالت ولی حساس به نقره، کادمیوم و روی بود. باکتری نمک دوست *Vibrio Costicola* (از خانواده *Vibrionaceae*) نیز مقاومت مشابهی را نسبت به نیکل و سرب از خود نشان داده است [۳۶]. حساسیت به نقره در ایزوله جداسازی شده در این تحقیق مطابق با نتایج آموزگار و همکاران می‌باشد که در تمام ایزوله‌های نمک دوست نسبی جداسازی شده توسط آنها نیز حساسیت به نقره گزارش شده است و دلیل این امر می‌تواند سمیت بالای فلز نقره نسبت به سایر فلزات باشد [۲۳]. باکتری جدا شده در این آزمایش قادر بود تا غلظت ۱۰ میلی مولار نیکل را در محیط تحمل کند، باکتری نمک دوست نسبی *Staphylococcus. sp* جدا شده توسط Gaballa و همکاران نیز قابلیت تحمل به نیکل تا ۱۰ میلی مولار را داشت [۵]. این در حالی است که باکتری‌های نمک دوست نسبی جدا شده در تحقیقات آموزگار و همکاران بر خلاف نتایج این آزمایش همگی حساس به نیکل بودند [۲۳]. Park و همکاران باکتری مقاوم به نیکل *Hafina alvei5-5* را از مناطق با غلظت بالای نیکل جداسازی کردند و این باکتری قادر به تحمل ۳۰ میلی مول نیکل بود [۳۷]. 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 باکتری‌های نمک دوست نسبی همگی به کبالت نیز حساس بودند [۲۳]، در صورتی که باکتری *costicola S.* 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 ضروری‌اند [۳]. نتایج بررسی حضور آنزیم‌های مختلف در باکتری مقاوم به نیکل جدا شده، نشان‌دهنده حضور آنزیم‌هایی مانند آمیلاز، سلولاز و استراز بود. حضور آنزیم خارج سلولی استراز و سلولاز در باکتری *Salinovibrio costicola* نشان داده شد. آموزگار و همکاران نیز حضور آنزیم خارج سلولی استراز را در باکتری *Salinivibrio sp. Strain SA-2* نشان دادند. همچنین Wang و همکاران آنزیم سلولاز را از باکتری *Salinivibrio sp strain NTU-50* جدا کردند [۳۸،۳۱]. به دلیل اهمیت این آنزیم‌ها در صنعت، به نظر می‌رسد باکتری *Salinovibrio costicola* جدا شده در این آزمایش دارای پتانسیل بالقوه بیوتکنولوژیکی بالایی در این زمینه است.

Archive of SID

www.SID.ir

نتیجه گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که باکتری *Salinovibrio costicola* پتانسیل بالقوه‌ای را در جهت پاک‌سازی محیطی و کنترل آلودگی فلزات سنگین و سمی از جمله نیکل، سرب، 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 (Atomic Absorption Spectroscopy; AAS) بررسی گردد.

تشکر و قدردانی

با تشکر از معاونت محترم آموزش و تحقیقات دانشگاه بو علی سینای همدان که امکانات لازم جهت انجام این تحقیق را فراهم نمودند.

References:

[1] Kushner DJ. Life in high salt and solute concentrations: halophilic bacteria, In: Kushner D. J, editors. Microbial life in Extreme Environments. London; New York: Academic Press; 1978. p. 317-68.

[2] Kushner DJ, Kamekura M. Physiology of halophilic eubacteria. In: Rodriguez-Valera F, editors. Halophilic Bacteria. Boca Raton, Fla. CRC Press, c; 1988. p. 109-40.

[3] Ventosa A, Nieto JJ, Oren A. Biology of moderately halophilic aerobic bacteria. ***Microbiol Mol Biol Rev*** 1998; 62(3): 504-44.

[4] Vreeland RH. The family Halomonadaceae. In: Balows A, Tru¨per H G, Dworkin M, Harder W, Schleifer K H, editors. The prokaryotes. A handbook on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification, applications. 2nd ed. Springer-Verlag, New York: N.Y; 1992. p. 3181–8.

[5] Gaballa A, Amer A, Hussein H, Moawad H, Sabry H. Heavy metals resistance pattern of moderately halophytic bacteria. ***Arab J Biotech*** 2003; 6(2): 267-78.

[6] Pal A, Choudhuri P, Dutta S, Mukherjee PK, Paul AK. Isolation and Characterisation of nickel-resistant microflora from serpentine soils of Andaman. ***W J Microbiol Biotechnol*** 2004; 20: 881–6.

[7] Patel JS, Patel PC, Kalia K. Isolation and characterization of nickel uptake by nickel resistant bacterial isolate (NiRBI). ***Biomed Environ Sci*** 2006; 19(4): 297-301.

[8] Gadd GM, White C. Microbial Treatment of Metal Pollution a Working Biotechnology. ***Trends Biotechnol*** 1993; 11(8): 353-9.

[9] Blais JF, Auclair JC, Tyagi RD. Cooperation between two Thiobacillus strains for heavy-metal removal from municipal sludge. ***Can J Micrbiol*** 1992; 38(3): 181-7.

[10] Babich H, Stotzky G. Toxicity of Nickel to Microbes: environmental aspects. ***Adv Appl Microbiol*** 1983; 29: 195-265.

[11] 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; 159(3): 219-25.

[12] Gadd GM. Accumulation of Metals by Microorganisms and Algae. ***Biotechnology*** 1988; 6: 402-31.

[13] Bossrez S, Remacle J, Coyette J. Adsorption of nickel on *Entrococcus hirae* Cell Walls. ***J Chemical Technol Biotechnol*** 1997; 70(1): 45-50.

[14] Wu LF, Navarro C, Pina KD, Quenard M, Mandrand MA. Antagonistic effect of nickel on the fermentative growth of Esherchia coli k-12 and comparison of nickel and cobalt toxicity on the arobic and anaerobic growth. ***Environ Health perspect*** 1994; 102 suppl 3: 297-300.

[15] Torresdey JLG, Tiemann KJ, Gonzalez JH, Cano-Aguilera I, Henning JA, Townsend MS. Removal of nickel ions from aqueous solution by biomass and silica-immobilized biomass of Medicago sativa (alfalfa). ***J Hazard Mater*** 1996; 49(2-3): 205-16.

[16] Fourest E, Roux JC. Heavy metal biosorption by fungal mycelia by-product: mechanisms and influence of PH. ***App Microbiol Biotechnol*** 1992; 37: 399-403.

[17] Shumate SA, Strandberg GW, Parrott JR. Biological removal of metal ions from aqueous process streams. ***Biotechnol Bioeng Symp*** 1978; 8: 13-20

[18] Bruins MR, Kapil S, Oehme FW. Microbial resistance to metals in the environment. ***Ecotoxicol Environ Saf*** 2000; 45(3): 198-207.

[19] Koepple AB, Perry E, Sikorski J, Krizance D, Warner AM, Ward DP, et al. Identifying the fundamental units of bacterial diversity: aparadigm shift to incorporate ecology in to bacterial systematic. ***Proc Nati Acad Sci USA*** 2008; 105(7): 2504-9.

[20] Sessitsch A, Howieson JC, Perret X, Antoun H, Martinez-Romero E. Advances in Rhizobium research. ***Crit Rev Plant Sci*** 2002; 21(4): 323-78.

[21] Ventosa A, Quesada E, Rodriguez-Valera F, Ruiz-Berraqueroand A, Ramos-Cormenzana F. Numerical taxonomy of moderately halophilic Gram-negative rods. ***J Gen Microbiol*** 1982; 128: 1959-68.

[22] Washington JAII, Sutter VL. Dilution susceptibility test: agar and macro-broth dilution

Archive of SID

www.SID.ir

procedures. In Lennette EH, Balows A, Hausler Jr, Truant JP, editors. Manual of clinical microbiology, 3rd ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C. 1980; p. 453-8.
[23] Amoozegar MA, Hamedi J, Dadashipour M, Shariatpannahi S. effect of salinity on the tolerance to toxic metals and oxyonions in native moderately halophilic spor-forming bacilli. ***W J Basic Microbiol Biotechnol*** 2005; 10: 1-7.
[24] 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. ***Appl Environ Microbiol*** 2002; 68(9): 4613-22.
[25] Smibert RM, Krieg NR. Phenotypic characterization. In: Gerhardt P, Murray RGE, Wood WA, Krieg NR, editors. Methods for general and molecular bacteriology. American Society for Microbiology. Washington D.C; 1994. p. 607-54.
[26] Atlas RM. Handbook of Microbiological Media. 2nd ed. New York, USA, CRC Press. 1997; p. 352-7.
[27] Marmur J. A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. ***J Mol Biol*** 1961; 3: 208-18.
[28] Kobayashi T, Kimura B, Fujii T. Strictly anaerobic halophiles isolated from canned Swedish fermented herrings (Surstro¨mming). ***Int J Food Microbiol*** 2000; 54(1-2): 81–9.
[29] 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(3): 333–40.
[30] Romano I, Gambacorta A, Lama L, Nicolaus B, Giordano A. Salinivibrio costicola subsp. alcaliphilus subsp. Nov., a haloalkaliphilic aerobe from Campania Region (Italy). ***Syst Appl Microbiol*** 2005; 28(1): 34-42.
[31] Wang CY, Hsieh YR, Ng CC, Chan H, Lin HT, Tzeng WS, Shyu YT. Purification and characterization of a novel halostable cellulase from Salinivibrio sp. strain NTU-05. ***Enzyme Microbi Technol*** 2009; 44: 373-9.
[32] Huang CY, Garcia JL, Patel BKC, Cayol JL, Baresi L, Mah RA. Salinivibrio costicola subsp. vallismortis subsp. nov., a halotolerant facultative anaerobe from Death Valley, and emended description of Salinivibrio costicola. ***Int J Syst Evol Microbiol*** 2000; 50: 615–22.
[33] Chamroensaksri N, Tanasupawat S, Akaracharanya A, Visessanguan W, Kudo T, Itoh T. Salinivibrio siamensis sp. nov., from fermented fish (pla-ra) in Thailand. ***Int J Syst Evol Microbiol*** 2009; 59: 880-5.
[34] Amoozegar MA, Schumann P, Hajighasemi M, Fatemi AZ, Karbalaei-Heidari HR. Salinivibrio proteolyticus sp. nov., a moderately halophilic and proteolytic species from a hypersaline lake in Iran. ***Int J Syst Evol Microbiol*** 2008; 58(Pt 5): 1159-63.
[35] Nieto JJ, Fernandez-Castillo R, Marquez MC, Ventosa A, Quesada E, Ruiz- Berraguero F. Survey of metal tolerance in moderately halophilic eubacteria. ***Appl Environ Microbiol*** 1989; 55(9): 2385-90.
[36] Garcia MT, Niet JJ, Ruiz-Berraquero F, Kocur M. Taxonomic study and amended description of Vibrio costicola. ***Int J Syst Bacteriol*** 1987; 37: 251-6.
[37] Park EP, Young KE, Schlegel HG, Rhie HG, Lee HS. Conjugative plasmid mediated inducible nickel resistance in Hafnia alvei 5-5. ***Int Microbiol*** 2003; 6(1): 57–64.
[38] Amoozegar MA, Salehghamari E, Khajeh K, Kabiri M, Naddaf S. Production of an extracellular thermohalophilic lipase from a moderately halophilic bacterium Salinivibrio sp. strain SA-2. ***J Basic Microbiol*** 2008; 48(3): 160–7.

Archive of SID

www.SID.ir