

## Original Article

# Isolation of a moderately halophilic bacterium resistant to some toxic metals from Aran & Bidgol Salt Lake and its phylogenetic characterization by 16S rDNA gene

Khodabakhsh F<sup>1</sup>, Nazeri S<sup>1\*</sup>, Amoozegar MA<sup>2</sup>, Khodakaramian Gh<sup>3</sup>

1- Department of Agricultural Biotechnology, Faculty of Agriculture, Bu Ali Sina University of Hamedan, Hamedan, I. R. Iran.

2- Department of Microbiology, Faculty of Science, Tehran University, Tehran, I. R. Iran.

3- Department of Medical Plants, Faculty of Agriculture, Bu Ali Sina University of Hamedan, Hamedan, I. R. Iran.

Received September 18, 2010; Accepted November 20, 2010

### Abstract:

**Background:** Heavy metals are toxic for human beings, animals and even plants. For example, nickel causes contact hypersensitivity and also may have carcinogenic effects in human. There are physicochemical and biological methods for removing these elements from environment. Some bacteria are able to remove these elements. In this study, the resistance of bacteria in Aran and Bidgol Salt Lake to heavy metals has been evaluated.

**Materials and Methods:** Seven bacterial samples of the lake were transferred to Ventosa culture medium. Isolated colonies were grown on the medium containing nickel. The resistant bacteria were transferred to media containing other heavy metal elements. Biochemical, morphological and phylogenetic studies were done based on sequencing of 16S rDNA gene in order to identify the isolated resistant bacterium. In addition, enzymatic potency of the bacteria was evaluated for determination of biotechnological value.

**Results:** 16s rDNA sequencing was applied only for one (out of 46) isolated halophilic bacterium. The bacterium displayed a good potency for growing up in the medium containing 2.5-10% NaCl with a considerable tolerance to nickel and other heavy metals.

**Conclusion:** A bacterium with 98% homology with *Salinovibrio costicola* species is resistant to some toxic metals and it also has the potency of removing nickel from the contaminated environment and producing some industrial enzymes.

**Keywords:** Heavy metals, Moderately-halophilic bacterium, Nickel, 16S rDNA gene

\* Corresponding Author.

Email: snblnazeri@yahoo.com

Tel: 0098 811 422 4013

Fax: 0098 811 422 4012

Conflict of Interests: No

Feyz, Journal of Kashan University of Medical Sciences, Spring, 2011; Vol. 15, No1, Pages 53-60

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

فرناز خدابخش<sup>۱</sup>، سنبل ناظری<sup>\*۲</sup>، محمدعلی آموزگار<sup>۳</sup>، غلامرضا خداکرمیان<sup>۴</sup>

## 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 باکتری‌های دریاچه شور آران و بیدگل نسبت به فلزات سنگین مورد مطالعه قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: هفت نمونه گرفته شده از دریاچه به محیط و تنوزا 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 بیوشیمیایی، مورفولوژیکی و فیلوزنیکی بر اساس تعیین توالی ژن ۱۶S rDNA جهت شناسایی دقیق جنس و گونه باکتری انجام گردید. همچنین، جهت تعیین ارزش بیوتکنولوژیکی باکتری، توانایی آن در تولید برخی آنزیم‌ها بررسی شد.

نتایج: از ۴۶ ایزوله باکتری نمک دوست جدا شده از دریاچه، یک ایزوله باکتری با قابلیت رشد در محدوده نمک ۰-۱۰٪ درصد، با تحمل بالا نسبت به نیکل و سایر فلزات سنگین، از نظر ژن ۱۶S 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 سلوالاز، آمیلاز و استراز را دارد.

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 شناسایی و جداسازی شد.

واژگان کلیدی: فلزات سنگین، باکتری نمک دوست نسبی، نیکل، ژن ۱۶S rDNA

فصلنامه علمی - پژوهشی فیض، دوره پانزدهم، شماره ۱، بهار ۱۳۹۰، صفحات ۵۳-۶۰

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 محافظه‌های اسمزی) بلکه با داشتن ویژگی‌های فیزیولوژیک مفید، بهره برداری از آنها به منظور اهداف تجاری تسهیل می‌شود [۳]. اغلب آنها می‌توانند در غلظت‌های بالای نمک رشد کنند [۴] که در نتیجه ریسک آلوده شدن محیط کشت به حداقل می‌رسد (این مورد از نظر اقتصادی ارزشمند است) و نیز اینکه این باکتری‌ها به آسانی رشد کرده و احتیاجات غذایی آنها ساده است، به طوری که اغلب آنها می‌توانند از ترکیبات مختلفی به عنوان تنها منبع کربن و انرژی استفاده کنند [۲]. از باکتری‌های نمک دوست نسبی همچنین می‌توان به عنوان 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 به کار برد؛ به همین دلیل به نظر می‌رسد که دستکاری ژنتیکی آنها نسبتاً ساده و راحت باشد. تحقیقات نشان داده‌اند که این میکروارگانیسم‌ها مقاومت قابل توجهی به برخی از فلزات سنگین دارند و از این خصوصیت می-

## مقدمه

میکروارگانیسم‌ها بر اساس بهینه رشد خود در شوری‌های مختلف، در گروه‌های گوناگون طبقه بندی می‌شوند [۲، ۱]. نمک دوست‌های ملایم، بهترین رشد را در محیط‌های دارای ۰/۵٪ تا ۰/۱٪ 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 ۱۴/۶ درصد) رخ داده و نمک دوست‌های اجباری آن دسته از میکروارگانیسم‌هایی هستند که بهترین رشد را در محیط‌های ۲/۵٪ تا ۵/۲٪ مول (نمک اشباع) سدیم کلراید دارند.

<sup>۱</sup> دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا همدان

<sup>۲</sup> استادیار، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا همدان

<sup>۳</sup> استادیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم، دانشگاه تهران

<sup>۴</sup> دانشیار، گروه گیاه پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا همدان

\* لیتل نیسلد مسحوق؛

همدان، دانشگاه بوعلی سینا همدان، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی

تلفن: ۰۸۱۱۴۲۲۴۰۱۳؛ دوفلپس: ۰۸۱۱۴۲۲۴۰۱۲

پست الکترونیک: snblnazeri@yahoo.com

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

صورت گرفته است. هدف این تحقیقات به طور فزاینده‌ای به سمت 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 آلووده به فلزات سنگین می‌باشند، ایجاد می‌شود و شامل میانعت 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 [۸]. ژن  $\text{rRNA}$  ۱۶S یک ملکول DNA سلولی است [۸]. ۱۶S rRNA است که ۱۵۴۲ نوکلوتید طول دارد. ویژگی این DNA وجود توالی‌های مکمل در داخل آن می‌باشد. این ژن دارای تمام ویژگی‌های مربوط به مطالعات فیلوجنی موجودات است؛ به این صورت که این ژن بین گونه‌ها متغیر نمی‌شود و ژن مورد مطالعه سطوح مناسبی از توالی حفاظت شده را دارد. این ژن در طول تکامل تغییرات محدودی یافته است و برای ثبت اطلاعات تاریخی و تکاملی اندازه‌های مناسبی دارد. از طرفی ژن  $\text{rRNA}$  ۱۶S دارای بزرگترین پایگاه اطلاعاتی برای مقایسه ایزوله‌های جدید است و اغلب موارد نتایج حاصل از این آنالیز با اطلاعات سایر روش‌ها تایید می‌شود [۱۹، ۲۰]. 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  $\text{rRNA}$  ۱۶S بود.

### مواد و روش‌ها

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 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

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 [۵-۷]. فلزات سمی و سنگین عدتاً در اثر ابیه 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]. ابناشت فلزات سنگین و سمی در خاک‌های مرغوب کشاورزی، به‌دلیل جذب بیولوژیک فلزات سمی و سنگین توسط گیاهان و به‌دبان آن ابناشت 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]. متابع 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 متابع عدتاً 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 علاج‌های ریوی مشابه پنومونی ویروسی ادامه پیدا می‌کند. اثرات مزممی 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 به عنوان یک عامل بالقوه سرطان‌زاوی و آرژن شناخته شده است [۱۳]. نیکل تشکیل رادیکال‌های اکسیژن را تسهیل می‌کند و این امر نقش مهمی در سرطان‌زاوی این عنصر [۱۴]. 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] و لی روش‌های تصفیه موجود برای چنین پساب‌هایی، نمی‌توانند با قوانین استاندارد زیست محیطی تطبیق کنند. زیرا اغلب، روش‌های فیزیکو-شیمیایی، هنگامی که غلظت‌های فلز سنگین در محیط‌های آلوده در دامنه‌ی ۱۰-۱۰۰ ppm باشند، غیر موثر و یا غیر اقتصادی هستند. غلظت‌های مجاز فلزات سنگین، کمتر از ۱ ppm ۱ هستند [۱۶، ۱۷]. در چند دهه اخیر، تحقیقات دامنه داری روی اتصال فلزات بر روی باکتری‌ها، مخمرها، قارچ‌های رشته‌ای و جلبک‌ها

روی محیط نوترینت آگار حاوی ۱۰ درصد سدیم کلراید برای مدت ۴۸ ساعت کشت داده شد. رنگ آمیزی گرم بر اساس روش Krieg و Smibert انجام شد [۲۵]، در عین حال آزمایش حلالیت در هیدروکسید پتاسیم ۳ درصد نیز انجام گرفت. همچنین، تست اسپورزایی به روش Atlas انجام شد [۲۶]. فعالیت کاتالالزی به-وسیله 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 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 اریتروماسین با تلقیح سوسپانسیون باکتری در مرحله رشد لگاریتمی (۰/۵ مک فارلن)، به محیط نوترینت آگار حاوی ۱۰ درصد سدیم کلراید و با بکارگیری دیسک‌های آنتی بیوتیکی انجام گرفت. هاله‌های عدم رشد بعد از ۲ روز گرم‌گذاری در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد اندازه گیری شده و با توجه به جدول سازنده کارخانه دیسک‌ها تفسیر شدند [۲۵].

شناസایی ملکولی باکتری با استفاده از تکثیر ژن Marmur DNA با استخراج DNA با استفاده از روش Marmur با اندکی تغییرات انجام شد [۲۷]. تغییرات 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. 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 از پرایمرهای یونیورسال ۲۷ F و R ۱۴۹۲ استفاده شد. ذکر این نکته ضروری است که این پرایمرهای عمومی بوده و جهت شناناسی باکتری‌های هالوفیل پیشنهاد شده‌اند [۲۸]. تمام مواد مورد استفاده برای آزمایشات ملکولی از شرکت سیناژن تهیه گشت. دمای اتصال پرایمرهای ۶۰ درجه سانتی گراد بوده و توالی آن‌ها به

۷۷F → 3' AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG 5'  
 ۱۴۹۲R → 3' AAG GAG GTG ATC CAG CCG CA 5'  
 واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمراز با روش استاندارد Rohban و همکاران و با اندازی تغییرات انجام شد. تغییرات انجام شده در مدت زمان دمای اتصال و تغییر در دمای اتصال بود که افزایش اندازه این پارامترها سبب بدست آمدن باند موردنظر گردید.<sup>[۲۹]</sup>

شدنده و مجموع ۴۶ ایزوله باکتری نمک دوست نسیبی رشد کرد.  
ترکیب محلول نمکی عبارت است از (پر حسب گرم در لیتر) [۲۱]:  
NaCl: ۸٪، MgCl<sub>2</sub>: ۷٪، MgSO<sub>4</sub>: ۹٪، CaCl<sub>2</sub>: ۰/۳٪، KCl: ۲٪، NaHCO<sub>3</sub>: ۰/۰۶٪، NaBr: ۰/۰۲٪

محیط‌های کشت در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه گرم‌اگذاری شدند و pH محیط‌های مورد استفاده در محدوده ۴-۷/۴ تنظیم گشت.

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

۱۱٪ میلی مول) و کمترین آن مربوط به فلز نیکل (با غلظت ۰/۰۵ میلی مول) بود. نتایج آزمایشات مرفولوژی و بیوشیمیابی مشخص کرد که *Salonovibrio costicola* (خانواده *Vibrionaceae*) یک کوکوباسیل گرم منفی، هوایی 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 کربوهیدرات‌هایی چون فروکتونز و ترالوز بود، ولی توانایی استفاده از گلوکز، سوربیتول و ساکاروز را به عنوان منبع کربن نداشت. تست آنزیم‌های 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 اریتروماسین و حساسیت شدید نسبت به تتراسایکلین را نشان داد. باند حاصل از استخراج DNA و نیز باند حاصل از تکثیر ژن rRNA ۱۶S در شکل شماره ۲ نشان داده شده است. مقایسه نتایج حاصل از توالی یابی با بانک اطلاعاتی NCBI نشان‌دهنده وجود ۹۸ درصد شباهت با *Salonovibrio costicola* بود.

داناتوراسون اولیه در دمای ۹۶ درجه به مدت ۵ دقیقه انجام شد. چرخه تکثیر ۳۵ سیکل تکرار شونده با دمای داناتوراسیون ۹۴ درجه به مدت ۱ دقیقه، دمای اتصال ۶۱ درجه به مدت ۹۰ ثانیه و دمای سنتز ۷۲ درجه به مدت ۱ دقیقه بود. به‌منظور 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. 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 و ۲، 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

شكل 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 ۳'GCCATNNNCNGTTACCATGCAAGTCGAGCGGAACGGCAGCATTGAAGCTTCGGGATTGCTGGACGTCGAGCGGGAGGGTAGTAACGGCTGGGAAACCTGCCCTGACGCCGGGATAACCGTTGGAAACGACGGCTAATACCGCATAATGTCTTAGTCATTACGAGCTGGGACCAAGGTGGCTCTACATGTAAGCTATCGCGTTGGGATGGGCCAGTTAGGATTAGCTAGTTGGTAAGGTAAATGGCTTACCAAGGCACGATCCTACGGGAGTCCTTAGCTGGTTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTGACAATGGGAGACCCCTGATGCGCCATGCCCGTGTGAAGAAGGCCTCGGGTTGTAAGCAGCTTCAGCAGTGAGGAAGGTGGTACTTAATAGGTGCATGGCTTGACGTTAGCTGCAGAAGAACGACCAGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGGTAATACGGAGGGTGCAGCGTTAACCGAATTACTGGCGTAAAGCGCATGCAGCGGTTGTTAAGTCAGATGTGAAAGCCCAGGCTCAACCTCGGAACCGCATTGAAACTGGCAGGCTAGAGTCTTAGAGGGGGTAGAATTCAGGTGAGCCTGGAAATGCGTAGAGAGATCTGAAGGAATACCAAGTGGCGAAGGCAGCCCCCTGGACAAAGACTGACGCCTAGATGCGAAAGCGTGGTAGCAAACAGGATTAGATAACCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGCTGTCTACTTGGAGGTTGAGGTTAGACTTGGCTTCCGGCGCTAACGCATTAAGTAGACCGCCTGGGAGTACGGCAAGGTTAAAACATGAAATTGACGGGGGCCGACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTATT5'

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. *Salonovibrio costicola*. جدا شده از دریاچه آران و بیدگل با استفاده از روش رقت سازی آگار

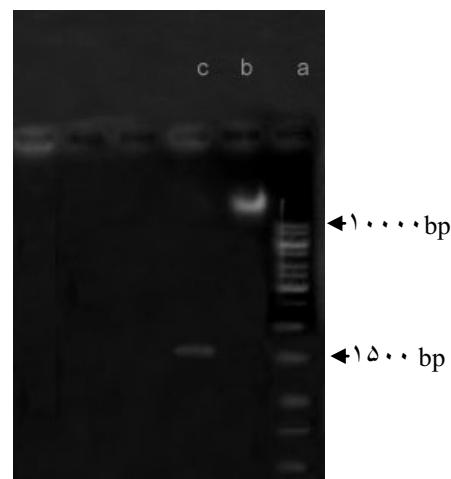
Ni	Cd	Co	Zn	Cu	Pb	Ag	فلز
۱۱	۰/۵	۸	۰/۱	۲	۸	۰/۰۵	MIC (Mm)

جدول شماره ۲- میزان مقاومت یا حساسیت ۷ فلزات سنگین مورد آزمایش بر رشد باکتری نمک دوست نسبی مقاوم به نیکل. *Salonovibrio 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	مقاوم	حساس	حساس	حساس	حساس	نیترات

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

دوست نیز (*Vibrionaceae*) از خانواده *Vibrio Costicola* 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 شدهGaballa 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 ۵-۵*Hafnia alvei* 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 ۵-۵*Hafnia alvei* 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. costicola* 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 *Salinovibrio sp. Strain SA-2* و Wang می‌دانند. همچنین *Salinovibrio sp. strain NTU-50* جدا کردنده [۳۸، ۳۹] به دلیل اهمیت این آنزیم‌ها در صنعت، به نظر می‌رسد باکتری *costicola* جدا شده در این آزمایش دارای پتانسیل بالقوه بیوتکنولوژیکی بالایی در این زمینه است.



شکل شماره ۲- باند مربوط به 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 ۱۶S و ۲۷F و ۱۴۹۲R (a: نشان‌گر ۱ کیلو بازی، b: باند حاصل از DNA استخراج شده، c: باند محصول تکثیر ژن ۱۶S rDNA).  
[۳]

## بحث

در آزمایش مقاومت به فلز نیکل، باکتری *Costicola* 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 *Salinivibrio sp.* و همکاران باکتری Romano را از منطقه‌ای در جنوب ایتالیا جداسازی کردنده [۳۰]. همچنین Wang و همکاران همین باکتری را از مناطق نمک دوست تایوان جداسازی کردنده [۳۱]. Huang و همکاران نیز باکتری *costicola* *Salinivibrio* را از دریاچه پرشور کالیفرنیا جدا کردنده [۳۲]. Chamroensaksri و همکاران باکتری *Salinivibrio siamensis* را از ماهی تخمیر شده در تایلند جدا کردنده [۳۳] و آموزگار و همکاران هم باکتری *proteolyticus* از دریاچه سور بختگان جدا کردنده [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، به عنوان باکتری مقاوم و در صورتی که فقط در غلظت‌های پایین‌تر 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 و کبالت ولی حساس به نقره، کادمیوم و روی بود. باکتری نمک

جداسازی باکتری نمک دوست نسبی مقاوم، ...  
نوعی (Atomic Absorption Spectroscopy; AAS)  
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 ننمودند.

### 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

### 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, Trüper H G, Dworkin M, Harder W, Schleifer K H, editors. The prokaryotes. A handbook on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification, applications. 2<sup>nd</sup> 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 Microbiol* 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] Bosserez 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 *Escherichia coli* k-12 and comparison of nickel and cobalt toxicity on the aerobic 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] Koeppel AB, Perry E, Sikorski J, Krizancic D, Warner AM, Ward DP, et al. Identifying the fundamental units of bacterial diversity: a paradigm 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

- procedures. In Lennette EH, Balows A, Hausler Jr, Truant JP, editors. Manual of clinical microbiology, 3<sup>rd</sup> ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C. 1980; p. 453-8.
- [23] Amoozegar MA, Hamed J, Dadashipour M, Shariatpannahi S. effect of salinity on the tolerance to toxic metals and oxyanions 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. 2<sup>nd</sup> 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-Berraguero 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, Rhee 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.