

## Investigation of Resistant to the Nickel and Some Toxic Metals by Moderately Halophilic Bactery Isolated from Aran-Bidgol Salt Lake and Their Phylogenetic Characterization by 16S rDNA Gene

Farnaz Khodabakhsh<sup>1\*</sup>, Sonbol Nazeri<sup>1</sup>, Mohammad Ali Amoozegar<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Agricultural Biotechnology, School of Agriculture, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran

<sup>2</sup>Department of Microbiology, School of Science, Tehran University, Tehran, Iran

Received: 9 Sep, 2012      Accepted: 18 Dec, 2012

### Abstract

**Backgrounds and Objectives:** Heavy metals are toxic for human and animals and plants. For example nickel can cause contact dermatitis and may have carcinogenic effect. There are physicochemical and biological methods for removal of these elements from the environment. Some bacterial species are able to remove the elements by bioremediation mechanism. These types of bacteria could resist heavy metals and grow in the presence of these elements. In this research, the resistance of the nature of a heavy metal resistance bacteria's that is bacteria's living in Aran-Bidgol Lake has been evaluated.

**Materials and Methods:** Seven Bacterial samples of the Lake were transferred on ventosa culture medium. Isolated colonies were grown on the media containing nickel transferred to mediums with other heavy metal elements. Biochemical and morphologic and also phylogenies studies based on sequencing of the 16S rDNA gene were performed in order to characterization genus and species of resistant isolates. Enzyme production of these bacteria's was also investigated.

**Results:** From 46 isolated halophilic bacteria, one isolate that was able to grow in the medium containing 1-25% NaCl and also was resistant to nickel and other toxic metal was considered for future study and characterization by sequencing of the 16S rDNA. This isolate had more 97% homology with *Halomonas elongate* species.

**Conclusion:** Microorganism those are isolated from Aran-Bidgol Lake and are resistant to toxic metals have the potential usage for removal of environment toxins such as Nickel.

**Keyword:** Halomonadaceae, Halomonas elongate, Heavy metal toxicity, Nickel, Resistance

\*Corresponding author:

E-mail: farnaz.khodabakhsh@yahoo.com

## مقاله پژوهشی

# مقاومت به نیکل و سایر فلزات سمی توسط یک باکتری نمک دوست نسبی جدا شده 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 فیزیکی شیمیایی، از روشهای بیولوژیک استفاده می شود. برخی باکتری ها در تجزیه زیستی فلزات سنگین موثرند. این باکتری ها می توانند 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 و تنوذا برده شدند. کلونی های 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. بررسی های بیوشیمیایی، مرفولوژیکی و فیلوژنتیکی بر اساس تعیین توالی ژن *SrDNA* ۱۶ جهت شناسایی دقیق جنس و گونه باکتری انجام شد. جهت تعیین ارزش بیوتکنولوژیکی باکتری، توانایی آن در تولید برخی آنزیم ها بررسی شد.

**یافته ها:** 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 *SrDNA* ۱۶ 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 اوره آز، 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 محیط های آلوده به نیکل و قابلیت تولید آنزیم های صنعتی در دریاچه آران و بیدگل جداسازی شد.

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

## مقدمه

بیولوژیک فلزات سمی و سنگین توسط گیاهان و به دنبال آن انباشت در زنجیره غذایی، آنها را بدون استفاده می کند (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 می گردد. 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

در غلظت های پایین، فلزات می توانند به عنوان اجزایی مهم در فرآیندهای زیستی نقش داشته باشند و اغلب عملکردهای مهمی در تولید آنزیم دارند. با این حال در غلظت های فراتر از حد خاص، فلزات می توانند برای بسیاری از گونه ها 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 زیستگاه های آبی و خاکی شده و در محل ورود به محیط، تراکم های خیلی بالایی از آنها تشکیل می شود. انباشت فلزات سنگین و سمی در خاکهای مرغوب کشاورزی، به دلیل جذب

ژن  $rDNA$  S ۱۶ دارای تمام ویژگی مربوط به مطالعات فیولوژنی 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  $rDNA$  S ۱۶ 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 میکروارگانیسم‌های 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  $rDNA$  S ۱۶ بود.

### مواد و روش‌ها

دریاچه آران و بیدگل یکی از اکوسیستم‌های پر نمک 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: نمونه‌های جمع آوری شده بر روی محیط NA به همراه نمک‌های 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):

$NaCl: ۸۱$ ,  $MgCl_2: ۷$ ,  $MgSO_4: ۹/۶$ ,  $CaCl_2: ۰/۳۶$ ,  $KCl: ۲$ ,  $NaHCO_3: ۰/۱۰۶$ ,  $NaBr: ۰/۰۲۶$

محیط‌های کشت در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه گرماگذاری شدند. pH محیط‌های مورد استفاده در محدوده ۷/۲-۷/۴ 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 پلیت‌های شیشه‌ای ریخته شد. میزان غلظت‌های مورد آزمایش (بر حسب میلی مول) برای تمامی فلزات به صورت زیر بود:

۰/۰۰۵، ۰/۰۰۱، ۰/۰۰۵، ۰/۰۱، ۰/۰۵، ۱، ۲/۵، ۳، ۳/۵، ۴، ۴/۵، ۵، ۶، ۷، ۸، ۹، ۱۰، ۱۲، ۱۴، ۱۶، ۱۸، ۲۰ و ۴۰.

شناخته شده است. نیکل تشکیل رادیکال‌های اکسیژن را تسهیل می‌کند که نقش مهم در سرطانی‌زی آن دارند (۵).

روش‌های متنوع فیزیکو-شیمیایی در تصفیه پساب‌های حاوی فلزات سنگین و سمی وجود دارد. ولی روش‌های تصفیه موجود برای چنین پساب‌هایی، 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 سستی 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). میکروارگانیسم‌ها بر اساس بهینه رشد خود در شوری‌های مختلف، در گروه‌های گوناگون طبقه بندی شوند. گروه‌های مختلفی از نمک دوست‌ها بوسیله Kamekura و Kushner (۱۹۹۸) تعریف شده است (۸). نمک دوست‌های نسبی، میکروارگانیسم‌هایی را شامل می‌شوند که بهینه رشد را در حضور ۰/۵ تا ۲/۵ مول سدیم کلراید (۲/۹ تا ۱/۴/۶٪) دارند. تحقیقات نشان داده‌اند که این میکروارگانیسم‌ها 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 فزاینده‌ای به سمت استفاده عملی از میکروارگانیسم‌ها در تصفیه فلزات سنگین از پساب‌ها، 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 میکروارگانیسم‌های اکستروموفیل 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 داشتن ویژگی‌های فیزیولوژیک مفید، بهره برداری از آن‌ها را به منظور اهداف تجاری تسهیل می‌کند (۹). اغلب آن‌ها می‌توانند در غلظت‌های بالای نمک رشد کنند 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، طوری که اغلب آنها می‌توانند از ترکیبات مختلفی به عنوان تنها منبع کربن و انرژی استفاده کنند (۸). همچنین از باکتری‌های نمک دوست نسبی می‌توان به عنوان مدلی برای مطالعه ملکولی مکانیسم‌های تنظیم اسمزی استفاده کرد. به نظر می‌رسد که دستکاری ژنتیکی این باکتری‌ها نسبتاً ساده و راحت باشد (۹).

باکتری‌های هالوفیل پیشنهاد شده است (۱۸). تمام مواد مورد استفاده برای آزمایشات ملکولی از شرکت سینازن تهیه گشت.

توالی پرایمرها و دمای اتصال آن‌ها به شرح زیر است:

۳'→۵' AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG 5' Tm=۶۰°C  
۳'→۵' AAG GAG GTG ATC CAG CCG CA 5' Tm=۶۰°C

واکنش‌های زنجیره ای پلیمرز 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 و ۲، 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 بازراندگی 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 کربوهیدرات‌هایی چون فروکتوز و ترهالوز، گلوکز، سوربیتول و ساکاروز بود. تست آنزیم های خارج سلولی، نشاندهنده حضور آنزیم های اکسیداز، اوره از و آمیلاز در این باکتری بود.

نتایج مربوط به بررسی های فیلوژنتیکی: باند حاصل از استخراج DNA و نیز باند حاصل از تکثیر ژن S rDNA ۱۶ 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.

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 میکروبی 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<sup>۵</sup> تا ۱۰<sup>۶</sup> 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 می شود. MIC برای هر فلز، در سه آزمایش مستقل مورد بررسی قرار گرفت. محیط بدون فلز به عنوان تیمار کنترل بکار رفت که میکروارگانیسم های کشت شده روی آن قادر به رشد بودند. رشد در غلظت های مساوی یا بالاتر از ۱ میلی مولار به عنوان باکتری مقاوم به این فلز تلقی شد (۱۴ و ۱۵). 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.

بررسی های 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 حالیت 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 از، سلولاز و اکسیداز نیز بر اساس روش Smibert و Krieg (۱۹۹۴) انجام شد (۱۶). بررسی مصرف منابع کربنی بر اساس روش محیط توصیه شده ونتوزا و همکاران (۱۹۸۲) تعیین گشت (۱۲).

شناسایی ملکولی باکتری با استفاده از تکثیر ژن DNA Sr ۱۶: 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 می گرفت. 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 DNA Sr ۱۶ از پرایمرهای یونیورسال ۲۷F و ۱۴۹۲R استفاده شد. ذکر این نکته ضروری است که این پرایمرها، پرایمرهای عمومی بوده و جهت شناسایی

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

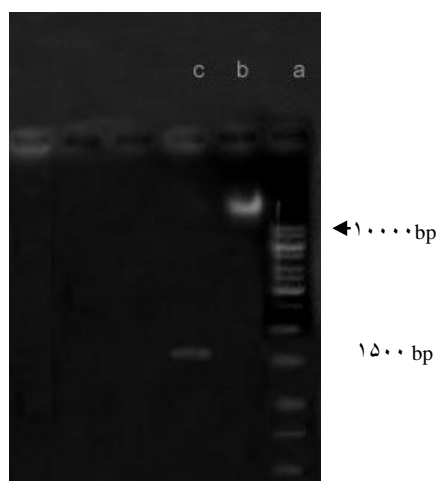
Minimum Inhibitory Concentration : MIC

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.



شکل ۱- باندی مربوط به DNA استخراج شده از باکتری نمک دوست نسبی مقاوم به نیکل *Halomonas elongate* و محصول تکثیر ژن S 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 S rDNA (۱۶).

## 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 غلظت‌های 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 ایزوله‌های 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 alvei*5-5 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 alvei*5-5 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، سپاسگزار می‌شود.

## References

- 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.
- Gadd GM, White Ch. Microbial Treatment of Metal Pollution a Working Biotechnology. *Elsevier Science Publishers LTD* 1993; **11**: 353-359.
- Babich H, Stotzky G. Toxicity of Nickel to Microbes: Environmental Aspects. *Advances in Applied Microbiology* 1983; **29**: 195-265.
- 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.
- 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 Arohic and Anaerobic Growth. *Environ Health Percept* 1994; **102**: 297-300.
- Fourest E, Roux JC. Heavy metal bio sorption by fungal mycelia by-product: mechanisms and influence of PH. *Microbiol. Biotechnol* 1992; **37**: 399-403.
- Iyer A, Mody K, Jha B. Bio sorption of heavy metals by a moderately halophilic eubacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 2005; **55**: 2385-2390.
- Kushner DJ, Kamekura M. Physiology of halophilic eubacteria. In: *Halophilic Bacteria*, (Rodriguez-Valera F, ed). 1<sup>st</sup> ed Boca Raton, CRC Press, 1998; PP: 109-140.
- Ventosa A, Nieto JJ, Oren A. Biology of moderately halophilic aerobic bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Review* 1998; **62**: 504-544.
- Bruins MR, Kapil S, Oehme FW. Microbial resistance to metals in the environment. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 2000; **45**: 198-207.
- 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.
- 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**: 1959-1968.
- Washington JAIL, 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). 3<sup>rd</sup> ed. Washington, D.C, 1980; PP: 453-458.
- Amoozegar MA, Hamed J, Dadashipour M, Shariatpanahi 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.
- 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.
- 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.
- Marmur J. A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. *J Mol Biol* 1961; **3**: 208-218.
- 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.
- 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.
- Wang S, Yang Q, Liu ZH, Sun L, Wei D, Zhang JZ, et al. Halomonas alkalitolerans sp. nov, a novel moderately halophilic bacterium isolated from soda meadow saline soil in Daqing, China. *J Microbiol* 2011; **49**(1): 24-28
- Guzman D, Quillaguaman J, Munoz M, Hatti-Kaul R. Halomonas andensis sp. nov, a moderate halophile isolated from the saline lake Laguna Colorada in Bolivia. *Int J Syst Evol Microbiol* 2010; **60**:749-753.
- 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.
- 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.
- Chen C, Shi R, Liu BB, Zhang YJ, Sun HZ, Li CT, et al. Halomonas qijiaojiangensis sp. nov. Halomonas flava sp. nov, two moderately halophilic bacteria isolated from a salt lake. *Antonie Van Leeuwenhoek* 2011; **100**(3): 365-373.
- 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.
- Osman O, Tanguichi H, Ikeda K, Park P, Tanabe-Hosoi S, Nagata S J. Copper resistance halophilic bacterium isolated from the plluted Maruit Lake, Ejjypt. *Appl Microbiol* 2010; **108**(4):1459-1470.
- 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.

28. Coronado MJ, Vargas C, Mellado E, Tegos G, Drainas C, Nieto JJ, et al. The  $\alpha$ -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 most stable  $\alpha$ -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  $\alpha$ -amylase from the moderate halophile *Halomonas meridiana*. *FEMS Microbiol Lett* 2000; **183**: 67-71.