

Halomonas sp strain MAM سویه‌ای با مقاومت بالا نسبت به اکسی‌انیونهای سمی

محمد علی آموزگار^{۱*}، محمدرضا صعودی^۲، فریدون ملک زاده^۱

دانشکده زیست‌شناسی، پردیس علوم، دانشگاه تهران، تهران، ایران

گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه الزهراء، تهران، ایران

* مسئول مکاتبات - آدرس الکترونیکی: amozegar@khayam.ut.ac.ir

(دریافت: ۸۴/۲/۳؛ پذیرش: ۸۴/۱۲/۶)

چکیده

از میان ۲۲ سویه باکتری نمک دوست نسبی جدا شده از خاکهای شور یک سویه باکتری میله‌ای گرم منفی با تحمل پذیری بالا نسبت به اکسی‌انیون‌های سمی انتخاب گشت. سویه MAM یک باکتری نمک دوست بوده و در محدوده نمک بین ۰/۵ تا ۳۲٪ توانایی رشد دارد. روش رقت در آگار برای اندازه‌گیری تحمل پذیری سویه به اکسی‌انیونهای فلزی و شبه فلزی سدیم کرومات، پتاسیم کرومات، سدیم سلنات، سدیم بی‌سلنیت، سدیم سولفات و پتاسیم تلوریت مورد استفاده قرار گرفت. همه آزمایشها در نوترینت آگار به همراه ۵، ۱۰ و ۱۵٪ نمک و در شرایط گرماگذاری ۳۲ درجه سانتی‌گراد صورت گرفت. نتایج نشان داد که سویه MAM اکسی‌انیونها را تا غلظتهای زیر تحمل می‌کند: ارسنات ۴۵۰ میلی‌مول، سلنات ۴۰۰ میلی‌مول، سلنیت ۴۵۰ میلی‌مول، بی‌سلنیت ۱۵۰ میلی‌مول، کرومات ۲۵ میلی‌مول و تلوریت ۱ میلی‌مول. نتایج نشان داد که سدیم نه تنها نقش مهمی در رشد باکتری داشته بلکه در افزایش تحمل پذیری سویه نسبت به اکسی‌انیون‌های سمی نیز مهم است. باکتری در حضور ۲۵ میلی‌مول سدیم کرومات رشد کرده در حالیکه در حضور پتاسیم کرومات حداکثر تا ۲۰ میلی‌مول رشد می‌کند. هیچ رشدی در حضور KCl به عنوان تنها منبع نمک محیط دیده نمی‌شود. لازم به یادآوری است که مقاومت به تلوریت و اکسی‌انیون‌های سلنیت در سویه MAM همراه با احیاء این ترکیبات به تلوریوم سیاه رنگ و سلنیوم قرمز رنگ می‌باشد. وقتی پتاسیم تلوریت همراه با سدیم سلنیت به محیط رشد باکتری اضافه می‌گشت تحمل پذیری به تلوریت ۲۰ برابر افزایش یافته واز ۱ میلی‌مول به ۲۰ میلی‌مول می‌رسید.

واژه‌های کلیدی: اکسی‌انیون سمی، کرومات، تلوریت، سلنیت، باکتری نمک دوست نسبی، تحمل پذیری.

مقدمه

(Kessi et al. 1999). تشخیص توانایی میکروارگانیسمها و تحمل پذیری آنها به غلظتهای بالای اکسی‌انیونها و فلزات سمی می‌تواند به ما در تعیین گونه‌ها کمک کننده باشد (Mata et al. 2002). در سالهای گذشته مقاومت به فلزات سنگین در میکروارگانیسم‌های نمک دوست بویژه در جنس هالوموناس مورد مطالعه قرار گرفته است (Ventosa et al. 1998). اما مطالعات نسبتاً کمی در زمینه مقاومت به اکسی‌انیونهای فلزی و شبه فلزی در این باکتریها صورت گرفته که می‌توان از مطالعه Souza و همکاران (Souza et al. 2001) در رابطه با شناسایی سویه‌های متعلق به جنس هالوموناس دارای مقاومت بالا نسبت به اکسی‌انیون سلنات، مطالعه Pearion و Jablonski (Pearion & Jablonski 1999) در رابطه با مقاومت بالا نسبت به تلوریت پتاسیم در باکتری *Natronococcus acealutus* (آرکی) و مطالعه Rathgeber و همکاران (Rathgeber et al. 2002) در رابطه با سویه‌های هالوتولرنت مقاوم به تلوریت و سلنیت نام برد. همچنین آموزگار و همکاران در سال ۱۳۸۳ تحمل پذیری باکتریهای گرم مثبت

اکسی‌انیونهای سمی هنگامی که در مقادیر و غلظتهای بالا در خاکهای کشاورزی، آبهای سطحی و آبهای زیر زمینی یافت شوند، بعنوان عوامل آلوده کننده اهمیت پیدا می‌کنند (Kinkle et al. 1994). محیط‌های آلوده با این ترکیبات بخاطر استفاده وسیع از آنها در فعالیتهای صنعتی گوناگون پراکندگی زیادی در جهان دارند. اکسی‌انیونهای مثل سلنیت، تلوریت و کرومات دارای سمیت بالا برای تمام اشکال حیاتی و موتاژن و کارسینوژن برای حیوانات می‌باشد (Conde & Sanz Alaejos 1997). (Losi & Frankenberger 1994, Summers & Silver 1978). میکروارگانیسم‌های مقاوم به این ترکیبات نقش مهمی را در واکنش‌های بیو ترانسفرماسیون این عناصر سمی و تبدیل آنها به عناصر کمتر سمی و یا غیر سمی به عهده دارند (Kinkle et al. 1994). سویه‌های از *Thiobacillus Pseudomonas*، *Rhodospirillum*، *Corynebacterium*، *Bacillus* و *Acinetobacter* جزء بیوترانسفرمرهای فعال هستند (McLean & Beveridge 2001).

رد، وژرپروسکوئر و تولید اندول بر اساس روش پیشنهادی (۱۹۹۴) Smibert & Krieg مطالعه گشت. هیدرولیز توئین ۸۰ و توئین ۲۰ بر اساس روش توصیف شده Harrigan & McCance (1976) انجام گرفت. مصرف منابع مختلف کربن و تولید اسید بر اساس روشهای توصیه شده (Leifson ۱۹۶۳) انجام گرفت. همه تستها با استفاده از محیط دارای ۱۰٪ (w/v) سدیم کلراید انجام گرفت.

رشد در دماهای مختلف ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵، ۳۰، ۳۵، ۴۰، ۴۵، ۵۰، ۵۵ درجه سانتی گراد مورد بررسی قرار گرفت. رشد در محدوده pH بین ۵ تا ۱۰ مورد مطالعه قرار گرفت. برای pH های بالاتر از ۶ از بافر تریس و پایین تر از ۶ از بافر استات سدیم استفاده گشت. سایر تستهای فیزیولوژی و بیوشیمیایی بر اساس مطالعات قبلاً انجام شده صورت گرفت (Quesada et al. 1984, Mata et al. 2002). (Ventosa et al. 1982).

مواد شیمیایی

اکسی آنیونهای سمی آزمایش شده عمدتاً از شرکت مرک تهیه گشت. کرومات سدیم، کرومات پتاسیم، سلنیت سدیم، بی سلنیت سدیم از شرکت مرک و ارسنات سدیم، سلنات سدیم و تلوریت پتاسیم از شرکت سیگما تهیه گشت. محلولهای استوک در آب مقطر تهیه گشته وبا فیلتراسیون از طریق فیلترهای غشایی با قطر منفذ $0.22 \mu m$ استریل گشت (میلی پور). محلولهای فلزی حداکثر برای ۵ روز در یخچال ۴ درجه سانتی گراد قرار داده شد.

آزمایش مقاومت به فلزات سمی

برای تعیین مقاومت به فلزات سمی، از روش رقت در آگار (Washington & Sutter 1980) استفاده شد. به ارلنهای ۱۰۰ میلی لیتری حاوی ۲۰ میلی لیتر از محیط نوترینت آگار ذوب شده دارای نمک، غلظت خاصی از فلز اضافه گشته و سپس داخل پلیتهای شیشه-ای به قطر ۸ سانت ریخته شد. میزان غلظت برای تمامی اکسی آنیونها مورد آزمایش بر حسب میلی مولار بصورت زیر بود:

۰/۱، ۰/۵، ۱/۵، ۲، ۴، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵، ۳۰، ۴۰، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰، ۳۰۰، ۴۰۰، ۴۵۰ و ۵۰۰.

پلیتهای آگار دار در دمای ۴۵ درجه سانتیگراد بمدت ۳۰ دقیقه قرار گرفت تا سطح مرطوبشان خشک شود و سپس بوسیله سمپلر ۱۰ میکرولیتر از محیط مایع که میکروب مورد نظر در آن رشد کرده (رشد لگاریتمی) بود و غلظت آن برابر ۰/۵ لوله مک فارلند بود بر روی محیط آگار دار قرار گرفت (میکروب تلقیح شده 10^5 تا 10^6 باکتری میلی لیتر). آزمایشات مشابه برای غلظت های ۵ و ۱۵٪ سدیم کلراید

تولید کننده اندوسپور نمک دوست را را نسبت به فلزات سمی مورد مطالعه قرار داده است.

در این مطالعه از میان جدایه های مختلف از خاکهای شور یک سویه با مقاومت بالا به اکسی آنیونهای سمی به خصوص ارسنات و سلنیت و تلوریت که متعلق به جنس هالوموناس بود شناسایی و تحت عنوان *Halomonas sp strain MAM* نامگذاری گشت.

هدف از انجام این مطالعه: ۱- شناسایی سویه های مقاوم به اکسی آنیونهای سمی فلزی سدیم کرومات و پتاسیم کرومات و شبه فلزی سدیم ارسنات، سدیم سلنیت، سدیم بی سلنیت و پتاسیم تلوریت ۲- تعیین حداقل غلظت مهار کننده رشد این اکسی آنیونها (MIC) ۳- اثر غلظت های مختلف نمک NaCl روی مقدار MIC ۴- تعیین اثر سلنیت سدیم بر افزایش مقاومت باکتری نسبت به اکسی آنیونهای سمی تلوریت پتاسیم و بی سلنیت سدیم بود.

مواد و روشها

سویه باکتری و محیط های کشت

یک باکتری نمک دوست نسبی، سویه MAM از نمونه های خاک پرشور (۲۵ w/v٪ نمک کل) کشت شده در شرایط هواری در محیط نوترینت برات دارای غلظت نمکی کل ۱۰۰ g/l جدا شد. ترکیب محلول نمکی عبارت بود از: (گرم در لیتر) NaCl ۸۱، $MgCl_2$ ۷، $MgSO_4$ ۹/۶، $CaCl_2$ ۰/۳۶، KCl ۲، $NaHCO_3$ ۰/۰۶، 0.026، NaBr ۰/۰۲۶ (Nieto et al. 1989). در موارد لزوم محیط با ۱۵ گرم آگار (مرک) جامد می گشت. نمونه های بالا از منطقه گرمسار-ایران جدا گشت. pH محیط با استفاده از KOH در ۷/۵ تنظیم گشت. کشتها در دمای ۳۴ درجه سانتی گراد روی یک انکوباتور با تکان دهنده گردشی Orbital (Stuart Scientific) Incubator SI50 در دور ۱۵۰ rpm برای ۴۸ ساعت گرماگذاری گشت. برای مطالعه مقاومت سویه به اکسی آنیونها، نوترینت آگار دارای ۱۰۰ g/l سدیم کلراید استفاده شد پلیتهای در دمای ۳۴ درجه سانتی گراد گرما گذاری شد و pH محیط قبل از اتوکلاو در ۷/۵ تنظیم گشت. اثر غلظتهای مختلف نمک سدیم کلراید (۵۰ و ۱۵۰ گرم در لیتر) مورد ارزیابی قرار گرفت.

ویژگی های تشخیصی باکتری

ویژگی های مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی سویه روی محیط نوترینت آگار و یا نوترینت برات دارای ۱۰٪ (w/v) سدیم کلراید صورت گرفت. رنگ آمیزی گرم (Burke method) انجام شد و نتایج بوسیله تست KOH تایید شد (Baron & Finegold 1990). حرکت بوسیله روش لام مرطوب و رنگ آمیزی تازه بررسی شد (Murray et al. 1994). کاتالاز، اکسیداز و فعالیت اوره ازی، احیاء نیترات، هیدرولیز اسکولین، متیل

سلنیت و ۰/۱ میلی مولار تلوریت پتاسیم متوقف نمی‌شود سویه‌های مقاوم نامیده شد.

نتایج

یک سویه باکتری نمک دوست نسبی از خاک پرشور از ۲۰ کیلومتری شهرستان گرمسار -ایران جدا شد (میزان نمک کل این خاک ۰/۲۵٪ اندازه‌گیری شد) و سویه MAM نامیده شد. باکتری سویه MAM یک کوکوباسیل گرم منفی متحرک با دو تازۀ قطبی و کناری، کاتالاز مثبت و اکسیداز مثبت ضعیف می‌باشد. سویه MAM یک باکتری نمک دوست نسبی بوده و در محدوده وسیعی از شوری بین ۰/۵ تا ۰/۳۲٪ سدیم کلراید قادر به رشد می‌باشد. این باکتری توانایی فوق العاده‌ای در مقاومت به اکسی آنیونهای سمی فلزی و شبه فلزی داشته و همچنین نسبتاً به فلزات سنگین نیز مقاوم بود. مطالعات فنوتیپی گسترده بر روی این باکتری انجام گشته که نتایج در جدول ۱ آورده شده است. بر اساس مطالعات فنوتیپی و مقایسه ویژگی‌های این باکتری با سایر باسیل‌های گرم منفی نمک دوست نسبی شناخته شده (Yoon *et al.* 2003, Mata *et al.* 2002) این باکتری در جنس *Halomonas* قرار گرفت.

نیز انجام گرفت. کنترلها شامل محیطهای بدون فلز بود که میکروارگانیزمهای کشت شده روی آن رشد می‌کرد.

پلیتها پس از گرماگذاری در ۳۴ درجه سانتی گراد در ساعت‌های ۴۸ و ۷۲ مورد مطالعه قرار گرفت. پایین ترین غلظتی از فلز که کاملاً مانع رشد باکتری می‌گشت MIC نامیده شد (حداقل غلظت مهار کننده رشد). MIC برای تمام سویه‌ها در سه بار متوالی مورد بررسی قرار گرفت. باید توجه داشت که نمکهای فلزی و ترکیبات محیط میکروبیولوژی می‌توانند با هم واکنشهای داشته باشند و در نتیجه تفسیر را مشکل می‌کنند به همین دلیل غلظتهای مورد استفاده قرار گرفت که قبلاً بوسیله سایر محققین برای انجام مطالعات روی یو باکتریها استفاده شده بود (Neito *et al.* 1989, McLean & Beveridge 2001, Rathgeber *et al.* 2002) با این تفاوت که در مورد ارسنات سدیم این مسئله لحاظ نگردید (بعلت مقاومت بسیار بالای بعضی از باکتریهای جداشده). با توجه به اینکه استاندارد مشخصی برای مقاوم بودن به غلظتهای فلزی برای محققین وجود ندارد، سویه‌های نمک دوست نسبی خود را که رشدشان بوسیله ۵ میلی مولار کرومات و بی سلنیت و ۱۰ میلی مولار ارسنات، سلنات و

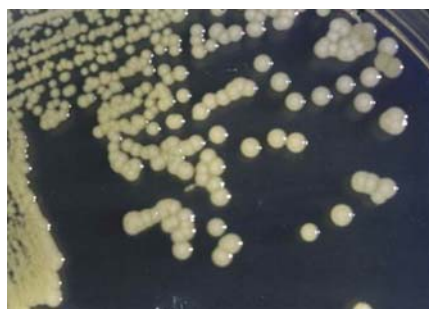
جدول ۱- ویژگی‌های فنوتیپی باکتری *Halomonas sp. strain MAM*

ویژگی	سویه MAM
شکل ظاهری	میله‌ای (کوکوباسیل)
تولید رنگدانه	سفید
حرکت (در محیط دارای ۰/۵٪ و ۱/۰٪ نمک)	+
کاتالاز	+
اکسیداز	+ ضعیف
محدوده رشد در NaCl (%)	۰/۵ تا ۰/۳۲ (بهینه رشد در نمک ۱/۰٪)
محدوده دمایی	۱۰ تا ۴۹ درجه سانتی گراد
محدوده pH	۵ تا ۱۰ (بهینه pH=۷/۸)
هیدرولیز:	
ژلاتین	-
کازئین	-
نشاسته	-
اسکولین	+
فعالیت آنزیمی	
DNase	-
اوره‌از	+
فنیل آلانین دامیناز	-
احیاء نیترات	+
تولید اسید از:	
ادونیتول	+
آرابینوز	+
د- گلوکز	+
د- فروکتوز	+
د- گالاکتوز	+
تست OF (برای گلوکز)	تخمیری
تست VP	-
متیل رد	-
تولید اندول	-
تولید H2S	-
همولیز	-

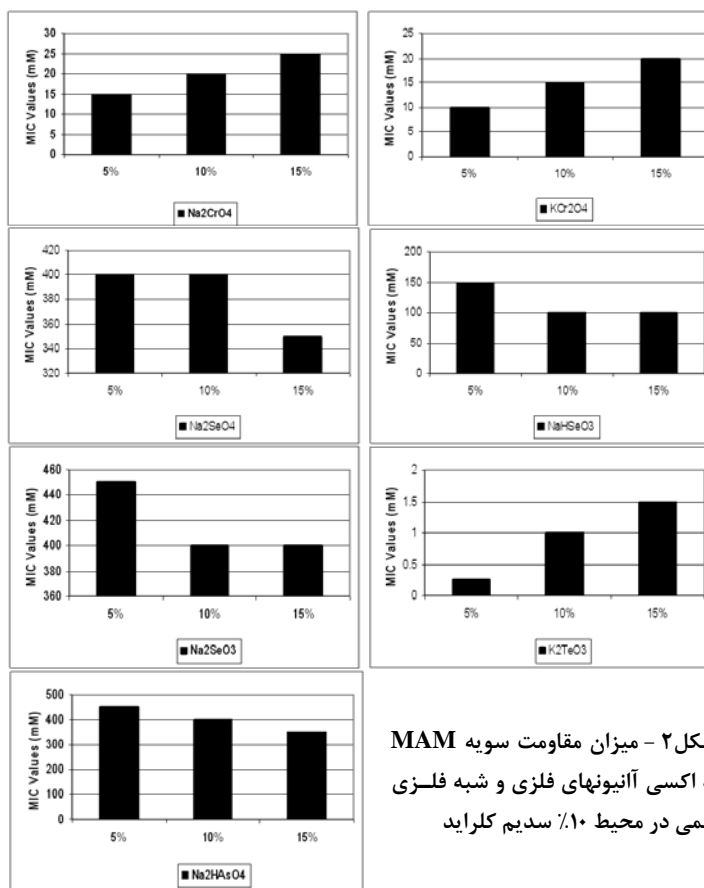
توانایی تحمل به اکسی‌آنیونهای فلزی و شبه فلزی سمی سدیم کرومات، پتاسیم کرومات، سدیم ارسنات، سدیم سلنات، سدیم سلنیت، سدیم بی سلنیت و پتاسیم تلوریت در این باکتری مورد ارزیابی قرار گرفت و مقاومت بالا نسبت به اکسی‌آنیونهای سمی سلنیت، سلنات، تلوریت، ارسنات و کرومات مشاهده شد. شکل ۱ کلنی باکتری سویه MAM را در محیط نوترینت آگار دارای ۲۵ میلی‌مول سدیم سلنیت و ۵ میلی‌مول پتاسیم تلوریت نشان می‌دهد. همانطور که در شکل مشخص است مقاومت به تلوریت همراه با احیاء آن است. میزان مقاومت سویه MAM به اکسی‌آنیونهای فلزی و شبه فلزی سمی در محیط ۱۰٪ سدیم کلراید مورد بررسی قرار گرفت. پایین‌ترین

توانایی تحمل به اکسی‌آنیونهای فلزی و شبه فلزی سمی سدیم کرومات، پتاسیم کرومات، سدیم ارسنات، سدیم سلنات، سدیم سلنیت، سدیم بی سلنیت و پتاسیم تلوریت در این باکتری مورد ارزیابی قرار گرفت و مقاومت بالا نسبت به اکسی‌آنیونهای سمی سلنیت، سلنات، تلوریت، ارسنات و کرومات مشاهده شد. شکل ۱ کلنی باکتری سویه MAM را در محیط نوترینت آگار دارای ۲۵ میلی‌مول سدیم سلنیت و ۵ میلی‌مول پتاسیم تلوریت نشان می‌دهد. همانطور که در شکل مشخص است مقاومت به تلوریت همراه با احیاء آن است.

میزان مقاومت سویه MAM به اکسی‌آنیونهای فلزی و شبه فلزی سمی در محیط ۱۰٪ سدیم کلراید مورد بررسی قرار گرفت. پایین‌ترین



شکل ۱- کلنی باکتری سویه MAM را در محیط نوترینت آگار دارای ۲۵ میلی‌مول سدیم سلنیت و ۵ میلی‌مول پتاسیم تلوریت



شکل ۲- میزان مقاومت سویه MAM به اکسی‌آنیونهای فلزی و شبه فلزی سمی در محیط ۱۰٪ سدیم کلراید

ندارد در حالیکه در هنگامی که سدیم بی سلنیت به تنهایی بکار برده می‌شد، بالاترین مقاومت در نمک ۵٪ سدیم کلراید مشاهده گشت و در درصدهای بالاتر نمک تحمل پذیری کمتری مشاهده شد.

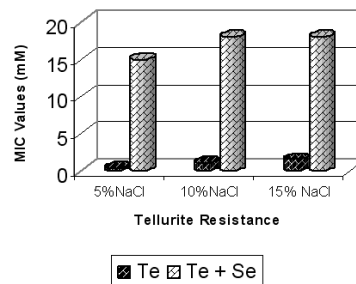
شکل ۵ (a,b,c,d) به ترتیب رنگ آمیزی گرم باکتری سویه MAM را در محیط پایه نوترینت برات دارای ۱۰٪ سدیم کلراید، نوترینت برات نمک دار (۱۰٪) دارای ۰/۵ میلی مول پتاسیم تلوریت، نوترینت برات نمک دار دارای ۴ میلی مول پتاسیم تلوریت و ۲۵ میلی مول سدیم سلنیت، نوترینت برات نمکی دارای ۲۵ میلی مول سدیم سلنیت و نوترینت برات نمک دار دارای ۱۰ میلی مول پتاسیم کرومات نشان می‌دهد. همانطور که در شکل‌ها مشخص است، شکل میکروسکوپی باکتری در حضور اکسی آنیونهای مختلف متفاوت است. باکتری در حضور پتاسیم کرومات کاملاً رشته‌ای شده و در قسمتهای از ساختار رشته بصورت قطعه قطعه دیده می‌شود. باکتری در حضور پتاسیم تلوریت به اشکال میله ای دیده شده و نسبت به باکتری رشد کرده در محیط نوترینت برات پایه باکتری لاغرتر و نازکتر مشاهده می‌شود، همچنین در سر تاسر باکتری دانه های سیاهرنگی مشاهده می‌شود که احتمالاً علت تغییر رنگ، تغییر در ساختار دیواره سلولی باکتری در حضور آنیون سلنیت می‌باشد.

بحث

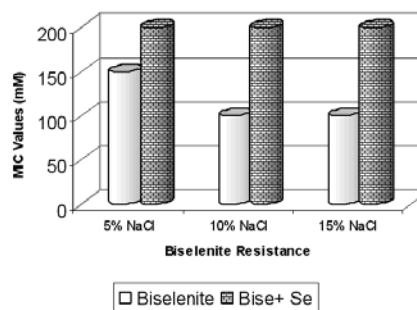
در طی مطالعه بر روی باکتریهای نمک دوست نسبی بومی ایران و مقاومت این باکتریها به اکسی آنیونهای سمی یک سویه باکتری میله‌ای شکل گرم منفی نمک دوست نسبی که از خاک پر شور گرمسار- ایران جداگشته مقاومت بسیار بالایی را نسبت به اکسی آنیونهای سمی نشان داد. براساس مطالعات فنوتیپی انجام شده باکتری در جنس *Halomonas* قرار داده شد و سویه MAM نام گذاری شد.

مقاومت سویه MAM به سدیم ارسنات در حضور ۵، ۱۰ و ۱۵٪ سدیم کلراید به ترتیب ۴۰۰، ۴۵۰ و ۳۵۰ میلی مول است (شکل ۲). این تحمل پذیری بسیار بیشتر از مقاومت ذکر شده در باکتریهای گزارش شده قبلی است که مقاومت حدود ۲۰ میلی مول را گزارش کرده‌اند (Nieto et al. 1989). اخیراً در یک سویه قارچی مقاومت تا ۲۰۰ میلی مول گزارش شده است که از رودخانه‌ای در اسپانیا با آلودگی بالای فلزات سمی جدا شده است (Cánovas et al. 2003). نکته مهم در رابطه با سویه MAM این است که این سویه بسیار مقاوم از منطقه‌ای جدا شده است که آلودگی فلزات سمی را نداشته و این شاهدهی بر این مطلب است که پراکندگی سویه‌های مقاوم به فلز محدود به مناطق آلوده به این ترکیبات سمی نیست.

اثر غلظتهای مختلف سدیم سلنیت (۵، ۱۰، ۲۰، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی مول) بر افزایش تحمل پذیری *Halomonas* سویه MAM نسبت به اکسی آنیون سمی پتاسیم تلوریت و سدیم بی سلنیت مورد بررسی قرار گرفت و از میان غلظتهای مختلف غلظت ۲۵ میلی مولار بهترین اثر را نشان داد (نتایج نشان داده نشده است). همراه کردن غلظت ۲۵ میلی مول سدیم سلنیت با پتاسیم تلوریت و سدیم بی سلنیت سبب افزایش شدید در تحمل پذیری *Halomonas* سویه MAM به این اکسی آنیونهای سمی می‌شود که در شکل‌های ۳ و ۴ نشان داده شده است. تحمل پذیری باکتری در محیط ۱۰٪ سدیم کلراید همراه با ۲۵ میلی مول سدیم سلنیت به پتاسیم تلوریت به ۲۰ میلی مول می‌رسد که ۲۰ برابر بیشتر از مقاومت در شرایطی است که پتاسیم تلوریت به تنهایی بکار برده می‌شود. افزایش درصد نمک از ۵٪ به ۱۵٪ در محیط کشت دارای ۲۵ میلی مول سدیم سلنیت سبب افزایش مقاومت نسبت به تلوریت شده، باکتری در محیط دارای نمک ۵٪ حداکثر تا ۱۵ میلی مول تلوریت را تحمل می‌کند در حالیکه در محیط نمک ۱۰ و ۱۵٪ تحمل پذیری به ۲۰ میلی مول می‌رسد که این اثر نمک مشابه الگوی است که در مورد تحمل پذیری باکتری به محیط کشت تنها دارای پتاسیم تلوریت دیده می‌شود.

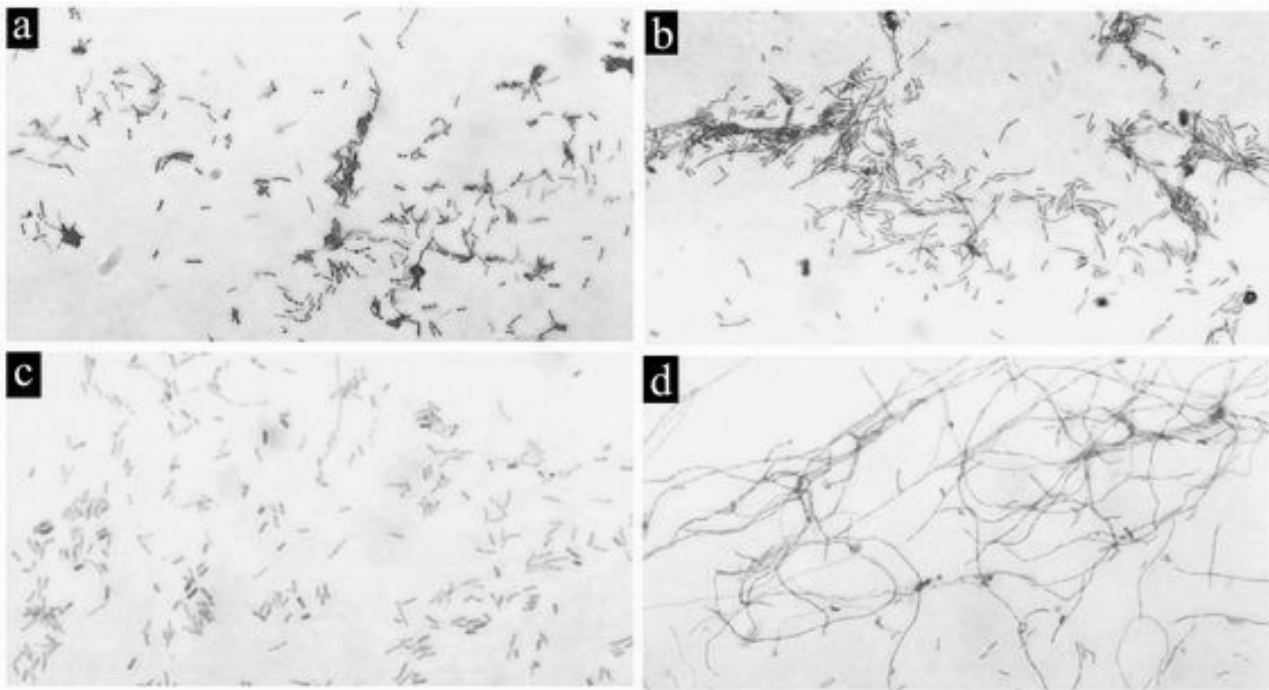


شکل ۳- اثر سلنیت سدیم بر افزایش تحمل پذیری سویه MAM نسبت به تلوریت پتاسیم



شکل ۴- اثر سلنیت سدیم بر افزایش تحمل پذیری سویه MAM نسبت به بی سلنیت سدیم

افزایش درصد نمک از ۵٪ به ۱۵٪ در محیط کشت دارای ۲۵ میلی مول سدیم سلنیت تاثیری در افزایش مقاومت به سدیم بی سلنیت



شکل ۵ - (a,b,c,d) به ترتیب رنگ آمیزی گرم باکتری سویه MAM را در محیط پایه نوترینت برات دارای ۱۰٪ سدیم کلراید، نوترینت برات نمک دار (۱۰٪) دارای ۰/۵ میلی مول پتاسیم تلوریت، نوترینت برات نمک دار دارای ۴ میلی مول پتاسیم تلوریت و ۲۵ میلی مول سدیم سلنیت، نوترینت برات نمکی دارای ۲۵ میلی مول سدیم سلنیت و نوترینت برات نمک دار دارای ۱۰ میلی مول پتاسیم کرومات

کارهای گذشته برای *Pseudomonas CRB 5* ۱۰ میلی مول بود (McLean & Beveridge 2001). در یک مطالعه دیگر مقاومت تا ۲۲ میلی مول در یک کورینه باکتریم *Corynebacterium hoagii* گزارش شده است (Viti et al. 2003). تنها مطالعه در باکتریهای نمک دوست بر روی مقاومت به کرومات، تحمل پذیری تا ۲۰ میلی مول را در یک سویه *Salinivibrio* نشان می دهد (Ríos et al. 2001).

سویه MAM پایین ترین مقاومت را به تلوریت نشان داد. در حضور ۵، ۱۰ و ۱۵٪ سدیم کلراید، MIC برای باکتری ۰/۲۵، ۱ و ۱/۵ میلی مول بود. در حالیکه در مطالعه دیگران مقاومت های نسبتاً بالای به تلوریت گزارش شده است (بین ۱ تا ۱۶ میلی مول) (Kinkle et al. 1994، Yurkov et al. 1996). اخیراً Rathgeber و همکاران سویه های از چشمه های هیدرو ترمال جدا کرده اند که همگی تحمل پذیر نمک بوده و می توانستند تا ۱۰ میلی مول تلوریت را تحمل کنند (Rathgeber et al. 2002). در تنها مطالعه روی میکروارگانسیم های هالوفیل در این رابطه Pearion و همکاران در آرکی نمک دوست *Natronococcus occulutus* مقاومت ۱۰ میلی مول را گزارش کرده است (Pearion et al. 1999).

مقاومت سویه MAM به سدیم سلنیت در ۵ و ۱۰ و ۱۵٪ سدیم کلراید بر حسب MIC به ترتیب ۴۰۰، ۴۵۰ و ۴۰۰ میلی مول است در حالیکه حداکثر مقاومت ذکر شده بر حسب MIC در *Pseudomonas stutzeri* و *Rhizobium leguminosarum* بیو وار Viceae TAL 1399 به ترتیب ۴۸/۱ و ۲۰۰ میلی مول گزارش شده است (Kinkle et al. 1994).

مقاومت سویه جدا شده نسبت به سدیم سلنات در ۵ و ۱۰ و ۱۵٪ سدیم کلراید به ترتیب ۴۰۰ و ۴۰۰ و ۳۵۰ میلی مول است و از این نظر قابل مقایسه با *Rhizobium leguminosarum* بیو وار TAL 380 می باشد (Kinkle et al. 1994) اگرچه Souza و همکاران (Souza et al. 2001) مقاومت بسیار بالا نسبت به آنیون سلنات را در یک سویه جنس *Halomonas* گزارش کرده اند (۲ مول)، ولی میزان رشد این باکتری از غلظت ۲۰ میلی مول به بالا بسیار ناچیز بوده و می توانسته اصلاً در نظر گرفته نشود. لازم به یاد آوری است که تحمل پذیری نسبت به اکسی آنیونهای سلنات و سلنیت همراه با احیا این ترکیبات بوده است.

مقاومت سویه MAM به سدیم کرومات و پتاسیم کرومات در حضور ۵، ۱۰ و ۱۵٪ سدیم کلراید به ترتیب ۱۰، ۲۰ و ۲۵ میلی مول و ۱۵ و ۲۰ میلی مول است در حالیکه حداکثر مقاومت ارائه شده در

باکتری به ۲۰ میلی مول می‌رسد که این اثر نمک مشابه الگوی است که در مورد تحمل پذیری باکتری به محیط کشت تنها دارای پتاسیم تلوریت دیده می‌شود.

افزایش نمک از ۰.۵٪ به ۱.۵٪ در محیط کشت دارای ۲۵ میلی مول سدیم سلنیت تاثیری در افزایش مقاومت به سدیم بی سلنیت ندارد در حالیکه در هنگامی که بی سلنیت به تنهایی بکار برده می‌شود بالاترین مقاومت در نمک ۵٪ مشاهده گشت و در تراکم بالاتر تحمل پذیری کمتری مشاهده گشت. تصور می‌رود همان آنزیم ردوکتازی که لازم برای احیاء سلنیت است برای احیاء تلوریت و بی سلنیت نیز مورد استفاده قرار می‌گیرد و تلوریت یا بی سلنیت و یا سلنیت می‌تواند اثر القایی بر فعالیت آنزیم داشته باشد.

تقدیر و تشکر

این مطالعه با حمایت مالی صندوق حمایت از پژوهشگران کشور با شماره طرح ۸۵۰۴۳/۱۳ انجام پذیرفت.

هنگامی که غلظت سدیم کلراید از ۰.۵٪ به ۱.۵٪ افزایش یافت تحمل سویه MAM به اکسی آنیونهای ارسنات، سلنات، سلنیت و بی سلنیت کاهش یافت در حالیکه تحمل به تلوریت و کرومات افزایش یافت. در قسمتی دیگر از کار پژوهشی اثر توام دو اکسی آنیون در رشد و تحمل پذیری باکتری انجام گرفت و اثرات مثبت اکسی آنیون سمی سدیم سلنیت بر افزایش مقاومت به اکسی آنیونهای سمی پتاسیم تلوریت و سدیم بی سلنیت نشان داده شد. هنگامی که سدیم سلنیت همراه با پتاسیم تلوریت و یا سدیم بی سلنیت استفاده می‌شود تحمل پذیری سویه MAM به شدت افزایش می‌یابد و مقاومت به پتاسیم تلوریت به ۲۰ میلی مول می‌رسد که ۲۰ برابر بیش از مقاومت در شرایطی است که پتاسیم تلوریت به تنهایی بکار برده می‌شود. در مورد سدیم بی سلنیت مقاومت به ۲۰۰ میلی مول می‌رسد که نسبت به بکار بردن اکسی آنیون به تنهایی دو برابر افزایش مقاومت مشاهده می‌گردد. افزایش درصد نمک سدیم کلراید از ۰.۵٪ به ۱.۵٪ در محیط کشت دارای ۲۵ میلی مول سدیم سلنیت سبب افزایش مقاومت نسبت به تلوریت شد. باکتری در نمک ۰.۵٪ حداکثر تا ۱۵ میلی مول آنیون تلوریت را تحمل می‌کنند در حالیکه در محیط نمک ۱۰ و ۱.۵٪ تحمل پذیری

منابع:

آموزگار، م. ع.، حامدی ملکزاده، ف.، داداشی پور، م. و شریعت پناهی، ش. ۱۳۸۳: ارزیابی مقاومت به اکسی آنیونهای سمی در باسیل های اسپوردار نمک دوست نسبی بومی ایران و اثر شوری بر این مقاومت. *مجله علوم دانشگاه تهران*. ۴۰: ۵۲۷-۵۱۷.

- Baron E.J., Finegold S.M. 1990: *Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology*. 8th edn, St. Louis: Mosby.
- Burton G.A., Gidding T.H., Debrine P., Fall R. 1987: High incidence of selenite-resistant bacteria from a site polluted with selenium. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**: 185-188.
- Cánovas D.C., Durán N., Rodríguez R., Amils V., de Lorenzo 2003: Testing the limits of biological tolerance to arsenic in a fungus isolated from the River Tinto. *Env. Microbiol.* **5**: 133-138.
- Conde J.E., Sanz Alaejos M. 1997: Selenium concentrations in natural and environmental waters. *Chem. Rev.* **97**: 1979-2003.
- Harrigan W.F., McCance M.E. 1976: *Laboratory methods in Food and Dairy Microbiology*. London: Academic press.
- Kessi J., Ramuz M., Wehrli E., Spycher M., Bachofen R. 1999: Reduction of selenite and detoxification of elemental selenium by the phototrophic bacterium *Rhodospirillum rubrum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 4734-4740.
- Kinkle B.K., Sadowsky M.J., Johnstone K., Koskinen W.C. 1994: Tellurium and selenium resistance in *Rhizobium* and its potential use for direct isolation of *Rhizobium meliloti* from soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 1674-1677.
- Leifson E. 1963: Determination of carbohydrate metabolism of marine bacteria. *J. Bacteriol.* **85**: 1183-1184.
- Losi M.E., Frankenberger W.T. 1994: Chromium-resistant microorganisms isolated from evaporation ponds of a metal processing plant. *Water Air Soil Pollut.* **74**: 405-413.
- Mata J.A., Martínez-Canovas J., Quesada E., Bejar V. 2002: A detailed phenotypic characterisation of the type strains of *Halomonas* species. *System. Appl. Microbiol.* **25**: 360-375.
- McLean J., Beveridge T.J. 2001: Chromate reduction by a *Pseudomonas* isolated from site contaminated with chromated copper arsenate. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 1076-1084.
- Murray R.G.E., Doetsch R.N., Robinow C.F. 1994: Determinative and cytological light microscopy. In *Methods for General and Molecular Bacteriology*, pp. 21-41. Edited by P. Gerhardt, R. G. E. Murray, W. A. Wood & N. R. Krieg. Washington, DC: American Society for Microbiology.
- Nieto J.J., Fernandez-Castillo R., Marquez M.C., Ventosa A., Quesada E., Ruiz-Berraquero F. 1989: Survey of metal tolerance in moderately halophilic eubacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**: 2385-2390.
- Nriagu J.O., Pacyna J.M. 1988: Quantitative assessment of worldwide contamination of air, water and soils by trace metals. *Nature* **333**: 134-139.

- Pearion, C. T., and P. E. Jablonski., (1999) High level, intrinsic resistance of *Natronococcus occultus* to potassium tellurite. *FEMS Microbiol. Lett.* **174**:19-23.
- Quesada E., Ventosa A., Ruiz-Berraquero F., Ramos-Cormenzana A. 1984: Deleya halophila, a new species of moderately halophilic bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **34**: 287-292.
- Rathgeber C., Yurkova N., Stackebrandt E., Beatty J.T., Yurkov V. 2002: Isolation of tellurite- and selenite-resistant bacteria from hydrothermal vents of the Juan de Fuca Ridge in the Pacific Ocean. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 4613-4622.
- Ríos M., García M.T., Arahal D.R. Ventosa A. 2001: *Salinivibrio kushnerii* sp. nov., a new moderately halophilic species tolerant to chromium. International conference on halophilic microorganisms. P. 9.
- Smibert R.M., Krieg N.R. 1994: Phenotypic characterization. In: *Methods for general and Molecular Bacteriology*, pp. 607-654. Edited by: P. Gerhardt P., Murray R.G.E., Wood W.A., Krieg N.R., Washington DC: *American Society for Microbiology*.
- Souza M.P., Amini A., Dojka M.A., Pickering I.J., Dawson S.C., Pace N.R., Terry N. 2001: Identification and characterization of bacteria in a selenium contaminated hypersaline evaporation pond. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 3785-3794.
- Summers A.Q., Silver S. 1978: Microbial transformation of metals. *Annu. Rev. Microbiol.* **32**: 637-672.
- Trevors J.T., Oddie K.M., Belliveau B.H. 1985: Metal resistance in bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **32**, 39-54.
- Ventosa A., Nieto J.J., Oren A. 1998: Biology of moderately halophilic aerobic bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**: 504-544.
- Ventosa A., Quesada E., Rodríguez-Valera F., Ruiz-Berraquero F., Ramos-Cormenzana A. 1982: Numerical taxonomy of moderately halophilic Gram-negative rods. *J. Gen. Microbiol.* **128**: 1959-1968.
- Viti C.A., Pace L., Giovannetti J. 2003: Characterization of Cr (VI)-Resistant bacteria isolated from chromium contaminated soil by Tannery activity. *Curr. Microbiol.* **46**: 1-5.
- Washington J.A., Sutter V.L. 1980: Dilution susceptibility test: agar and macro-broth dilution procedures, p. 453-458. In E. H. Lennette, A. Balows, W. J. Hausler, Jr., and J. P. Truant (ed.), *Manual of clinical microbiology*, 3rd ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Yoon J.H., D.Y., Shin I.G., Kim K.H., Kang Y.H., Park P. 2003: *Marinobacter litoralis* sp. nov., a moderately halophilic bacterium isolated from sea water from the East Sea in Korea. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **53**: 1369 - 1375.
- Yurkov V., Jappe J., Verme'glio A. 1996: Tellurite resistance and reduction by obligately aerobic photosynthetic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 4195-4198.