معرفی باکتری‌های مقاوم به نیکل دریاچه نمک حاج‌علی‌قلی‌خان و بررسی توان تولید ترکیبات فعال زیستی آن‌ها

معصومه جلالوند[۱]، شمس‌الضحی ابوالمعالی*[۲]، شکیبا درویش علیپور آستانه[۳]

تاریخ دریافت:۱۳۹۵/۰۳/۰۲
تاریخ تصویب:۱۳۹۵/۰۷/۱۲

چکیده

میکروارگانیسم های نمک دوست و تحمل کننده ی نمک، در تطابق با تنش محیط، توانایی تولید مولکولهای فعال زیستی را دارند. همچنین نقش میکروارگانیسمها در زیست پالایی فلزات سنگین از جمله نیکل؛ که امروزه در مناطق شهری جزء آلوده کننده های مهم آبهای سطحی و زیرسطحی به شمار میرود، شناخته شده است. هدف از این مطالعه، بررسی توانایی تولید مولکولهای فعال زیستی براساس تنوع ژن PKS در میکروارگانیسم های هالوتولرانت و هالوفیل مقاوم به فلز نیکل جدا شده از دریاچه نمک حاج علی قلی خان بود. میزان عناصر آب و خاک دریاچه به وسیله دستگاه جذب اتمی اندازه گیری شد. میکروارگانیسمها از سه محیط کشت اختصاصی نمک دوستها SWN, MH و MGM به ترتیب با ۲، ۱۰ و۲۳ درصد نمک جدا شدند. سپس میکروارگانیسمهای مقاوم به عنصر نیکل غربال گردیدند. در مرحله آخر توانایی میکروارگانیسمهای مقاوم به نیکل در تولید متابولیتهای ثانویه با کمک آغازگرهای اختصاصی درون ژنی PKS مورد بررسی قرار گرفت. از میکروارگانیسمهای کشت شده، ۵۰ جدایه از محیط کشت SWN، ۲۲ جدایه از محیط کشت MH و ۲۱ جدایه از محیط کشت

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد گروه زیست فناوری، پردیس علوم و فناوری‌های نوین، دانشگاه سمنان
*۲- استادیار گروه زیست شناسی، پردیس علوم پایه، دانشگاه سمنان
(نویسنده مسئول s_abolmaali@semnan.ac.ir)
۳- استادیار گروه زیست فناوری، پردیس علوم و فناوری‌های نوین، دانشگاه سمنان

MGM بدست آمد. آزمون مقاومت به فلز جدایه ها نشان داد که ۶۵%جدایه ها به فلز نیکل مقاوم بودند و بررسی مولکولی نشان دادکه برخی از این جدایه ها توانایی تولید ترکیبات فعال زیستی را دارند. نتایج این تحقیق نشان می دهد که در دریاچه نمک حاج علی قلی خان میکروارگانیسم هایی وجود دارندکه با توجه به مقاومت علیه فلز نیکل و توانایی در تولید محصولات پلی کتایدسنتازی میتوانند درزمینه زیست فناوری مورد استفاده قرار گیرند.

واژه های کلیدی: پلی‌کتاید، ترکیبات فعال، دریاچه حاج‌علی‌قلی‌خان، نیکل، هالوتولرنت، هالوفیل

مقدمه

امروزه در سراسر جهان، با توسعه فن‌آوری، فلزات سنگین در خاک و آب مناطق شهری، تجمع یافته‌اند. به دنبال آن در شهرهای صنعتی، آلودگی آب با فلزات سنگین نیکل، کادمیم، سرب و... به مسئله زیستی تبدیل شده است (Dixit et al., 2015). در این میان آلودگی روزافزون آب آشامیدنی و کشاورزی با نیکل دغدغه سازمان‌های مسئول سلامت انسان، دام و طیور و محصولات کشاورزی ایران به شمار میرود. نیکل از راه تنفس، خوردن و آشامیدن و حتی جذب پوستی اثرات شدیدی روی سلامت انسان و حیوانات دارد. حساسیت زایی، افزایش گلبولهای قرمز، دفع پروتئین از کلیه، و ایجاد سرطان از جمله واکنشهای بدن جانداران به جذب مقادیر در حد نانومولار تا میکرومولار نیکل می‌باشد(Nordberg et al., 2014).

اثرسمیت نیکل در میکروارگانسیم‌های خاک مناطق آلوده به این فلز نیز نشان داده شده است (Duda-Chodak and Blaszczyk 2008). با توجه به قدرت میکروارگانیسم ها در تطابق با تنش در محیط (Lushchak 2011) ، توانایی تولید مولکولهای فعال زیستی (Reddy et al., 2012) و نیز نقش شناخته شده میکرو ارگانیسم‌ها در زیست‌پالایی فلزات سنگین (Lopes et al., 2005) ، در این پژوهش، امکان تولید ترکیبات فعال در میکروارگانیسم‌های مقاوم به فلز نیکل مورد بررسی قرار گرفت.

میکروارگانیسم‌ها، خوشه‌های ژنی متنوعی برای تولید متابولیت ثانویه دارند. مطالعات برروی این خوشه‌های ژنی نشان داده است که در بین آن‌ها ژن‌های پلی‌کتاید سنتتاز (PKS) و پپتیدهای غیرریبوزومی (NRPS) پراکندگی بیشتری

دارنـد(Bode et al., 2002 Engelhardt et al., 2010).

خوشـه‌های ژنـی PKS هـا شـامل ماژول‌هـای بـا فعالیت‌هـای آنزیمـی متعـدد هسـتند. هـر مـاژول PKS حداقـل سـه حـوزه مربـوط بـه(ketosynthase (KS)، acyltransferase (AT) و پروتئیـن حامـل آسـیل (ACP) را کـد میکنـد. از معروفتریـن آنزیم‌هـای PKS می‌تـوان بـه enoylreductase ، دهیدراتـاز و ketoreductase اشـاره نمـود. ایـن آنزیم‌هـا زیرواحدهـای سـاختاری را پـی در پـی قـرار میدهنـد کـه منجـر بـه تولیـد گسـتره متنوعـی از مولکولهـای زیسـتی فعـال بـا نقش‌هـای ضـد باکتریایـی، ضـد قارچـی، ضـد ویروسـی و حتـی ترکیبـات ضـد سـرطان می‌گردنـد. بنابرایـن غربالگـری میکروارگانیسـم‌ها بـرای حضـور ژنهـای PKS می‌توانـد بیانگـر توانایـی آنهـا در تولیـد ترکیبـات فعـال زیسـتی باشـد (Ayuso-Sacido and Genilloud 2005).

جهت دسـت‌یابی بـه هـدف ایـن پژوهـش، غربالگـری باکتری‌هـای جـدا شـده از خاکهـای شـور دریاچـه نمـک حاج‌علی‌قلی‌خـان بـرای جداسـازی باکتریهـای مقـاوم بـه نیـکل انجـام گرفـت. سـپس امـکان تولیـد ترکیبـات فعـال در ایـن بـا کتریهـا، کـه احتمـالا" تـوان زیسـت پالایـی نیـکل را نیـز دارنـد، بـا اسـتفاده از آغازگرهـای اختصاصـی ژن هـای PKS بررسـی گردیـد.

ماده و روش

نمونه برداری

نمونه‌بـرداری از خـاک، نمـک و آب منطقـه جنـوب غربـی دریاچـه نمـک حـاج علی‌قلی‌خـان (دامغان-سـمنان) در طـی دو مرحلـه بـه ترتیـب در اواخـر آبـان و اوایـل اسـفندماه سـال ۱۳۹۲ انجـام و نمونه‌هـا در شـرایط سـترون و دمـای مناسـب بـه آزمایشـگاه منتقـل شـدند.

بررسی شیمیایی آب و خاک دریاچه نمک

بررسـی شـیمیایی نمونه‌هـای خـاک بـرای تعییـن مقـدار عناصـر مـس، کادمیـم، کبالـت و نیـکل در دانشـکده شـیمی دانشـگاه سـمنان بـا روش طیـف سـنجی جرمـی (Agilent Technology 200 Series AA) انجـام شـد.

کشت، جداسازی و خالص‌سازی باکتری‌ها

نمونه‌هـای خـاک دریاچـه پـس از تهیـه سـری رقـت در محلـول ۰/۹ % کلریـد سـدیم در دور rpm ۱۸۰بـه مـدت ٤ سـاعت، از رقت‌هـای 10^{-2}-10^{-4} بـرروی محیط‌هـای MGM (Vreeland 2012)، MH (Amoozegar et al., 2008) و SWN (Jookar et al., 2014) بـه ترتیـب بـا ۲۳درصـد، ۱۰ درصـد، و ۲ درصـد نمـک و PH ۷/۲ کشـت گردیدنـد. رشـد کلنی‌هـا روی محیط‌هـای جامـد در دوره‌هـای زمانـی ۲٤، ٤۸ و ۷۲ سـاعت بـه مـدت ۱٤ روز بررسـی و بدنبـال آن خالص‌سـازی صـورت گرفـت. خلـوص هـر جدایـه بـا اسـتفاده از بررسـی

ریخت‌شناسی کلنی و نیز رنگ‌آمیزی گرم تائید گردید.

بررسی ریخت‌شناسی، ویژگی‌های بیوشیمیایی جدایه‌ها و نگهداری سویه‌ها

جدایه‌ها بر اساس ویژگی‌های ماکروسکوپی (شکل ظاهری کلنی، فرم، رنگ، نوع حاشیه، بزرگی و سطح کلنی)، میکروسکوپی (شکل میکروارگانیسم، رنگ آمیزی گرم، وجود اسپور) و برخی از ویژگی‌های بیوشیمیائی ازجمله آزمایش حرکت، کاتالاز، اکسیداز و میزان نمک دوستی مورد بررسی قرار گرفتند. جدایه‌های خالص شده درگلیسرول ۲۰% در فریزر ۷۰- نگهداری شدند.

بررسی مقاومت جدایه‌ها به نیکل

برای تعیین حداکثر غلظت بازدارندگی رشد جدایه‌ها، از محلول سولفات نیکل، استفاده شد. در این روش مقاومت فلزی جدایه‌های حاصل از محیط کشت‌های(MH(10%salt و(MGM(23%salt بارروش میکروپلیت و لکه‌گذاری بررسی شدند. از جدایه‌های مورد نظر در مرحله رشد لگاریتمی با معادل OD نیم مک فارلند، سری رقت تهیه و از آن برای آزمایش استفاده گردید.

در روش میکروپلیت، تاثیر ۰، ۰/۵، ۱، ۳، ٦، ۱۲ میلی مولار سولفات نیکل بر رشد جدایه‌ها بررسی گردید. در روش لکه‌گذاری، محیط‌کشت جامد غلظت نهایی ۰، ۰/۵، ۱، ۲، ۳، ۵، ۷و ۱۰ میلی مولار سولفات نیکل رقت‌های $۱۰^{-۳}$و $۱۰^{-٦}$ از OD معادل نیم مک فارلند جدایه‌ها روی محیط کشت‌های جداگانه با غلظت‌های معین نیکل لکه‌گذاری گردید (Abolmaali et al., 2008). سپس پتری‌دیش‌ها در دمای 37 °C و به مدت ۲٤ ساعت گرمخانه گذاری و مشاهدات ثبت گردیدند.

استخراج DNA ژنومی

DNA ژنومی جدایه‌های مقاوم به فلز نیکل که در محیط کشت MH مایع رشد داشتند با کمک کیت RNX-Plus kit (RN7713C; Cinaclon) استخراج گردید. DNA استخراج شده تحت تیمار باRNAse A قرار گرفت.

بررسی توانایی تولید ترکیبات فعال زیستی در جدایه‌های مقاوم به نیکل

بررسی مولکولی توانایی تولید ترکیبات فعال زیستی در جدایه‌های مقاوم به نیکل به کمک واکنش زنجیره‌ای پلیمراز و آغازگرهای دژنره‌ی ژن‌های(SB-540F / SB-1100R Wawrik et al., 2005, Le (et al., 2014 DKR / DKF (Moffitt and Neilan 2001, Ehrenreich et al., 2005, Chau et al., 2013) PKSII: به شرح جداول ۱و۲ انجام گرفت.

جدول۱: نام و توالی آغازگرهای بکار برده شده در این پژوهش

(F : آغازگر پیشرو، R :آغازگر بازگشتی)

ژن هدف	نام آغازگر	توالی آغازگر
PKS	SB-۵۴۰F	۵′-GGX TGC ACS TCX GGX MTS GAC-۳′
	SB-۱۱۰۰R	۵′-CCG ATS GCX CCS AGX GAG TG-۳′
	DKF	۵-GTG CCG GTN CCR TGN GYY TC-۳
	DKR	۵-GCG ATG GAY CCN CAR CAR YG-۳

جدول۲: برنامه دمایی مورد استفاده در واکنش برای آغازگرهای DKR /DKF و SB–SB / F۵٤۰– ۱۱۰۰R جهت تکثیر قطعات ژن پلی کتاید سنتاز

آغازگر SB-۱۱۰۰R / SB-۵۴۰F			آغازگر DKR /DKF		
زمان	دما°C	مرحله	زمان	دما°C	مرحله
۵Min	۹۴	دناتوراسیون اولیه	۳ Min	۹۵	دناتوراسیون اولیه
۳۰ s	۹۴	دناتوراسیون	۱ Min	۹۵	دناتوراسیون
۴۵ s	۵۹	اتصال آغازگرها	۱ Min	۶۴	اتصال آغازگرها
۱/ ۱۰s	۷۲	طویل شدن	۱/۵ Min	۷۲	طویل شدن
۱۰ Min	۷۲	طویل شدن نهایی	۱۰ Min	۷۲	طویل شدن نهایی

نتایج

بررسی شیمیایی خاک دریاچه

pH نمونه‌های آب، ۷/۲ و خاک ۷/۳بود. نتایج بررسی شیمیایی خاک غلظت نیکل را ppm ۱/۰۱ نشان داد. در حالی که غلظت منگنز ۳/٤۷ و یون سدیم ppm ۸٦۹/۷۵ بود.

کشت، جداسازی و بررسی ویژگی های ریخت شناسی و بیوشیمیایی جدایه‌ها

در هر دو مرحله نمونه برداری، نمونه خاک به علت فراوانی مواد مغذی و معدنی، بیش‌ترین جدایه‌ها حدود ۷۰%، و نمونه‌های آب و نمک به ترتیب با فراوانی ۲۰ و ۱۰%، کمترین تعداد جدایه را به خود اختصاص دادند. ۹۳ میکروارگانیسم از محیط‌های SWN MH, MGM , با درصد نمک‌های متفاوت، جداسازی شدند. از این تعداد ۲۱، ۲۲ و ۵۰ جدایه به ترتیب در شرایط ۲۳%، ۱۰% . ۲% نمک توانستند رشد کنند. بیش‌ترین تعداد جدایه‌ها از محیط SWN؛ حاوی نمک کمتر(۲%)، به دست آمد. فراوانی بیشتر جدایه‌ها

شامل باکتری و فراوانی قارچ کمتر بودند. ۹۰% از باکتریهای جدا شده گرم مثبت و از جنس باسیلوس بودند. کلنی‌های به دست آمده پیگمان‌های قرمز، کرم و شیری داشتند. بررسی تکمیلی صفات بیوشیمیایی آنها نشان داد که بیشترین جدایه‌ها حرکت ندارند، کاتالاز مثبت و اکسیداز مثبت هستند.

بررسی مقاومت جدایه ها به نیکل

میزان مقاومت میکروارگانیسم‌ها به نیکل با روش میکروپلیت در جدایه‌های رشد یافته برروی محیط MGM و MH نشان داد که اکثر جدایه‌ها به نیکل مقاوم است. بطوریکه حدود ٦٥% این جدایه ها در غلظت ٦ میلی مولار نیکل توانایی رشد دارند و ٥% این جدایه‌های هالوتولرانت درغلظت۱۲ میلی مولار نیکل رشد کردند.

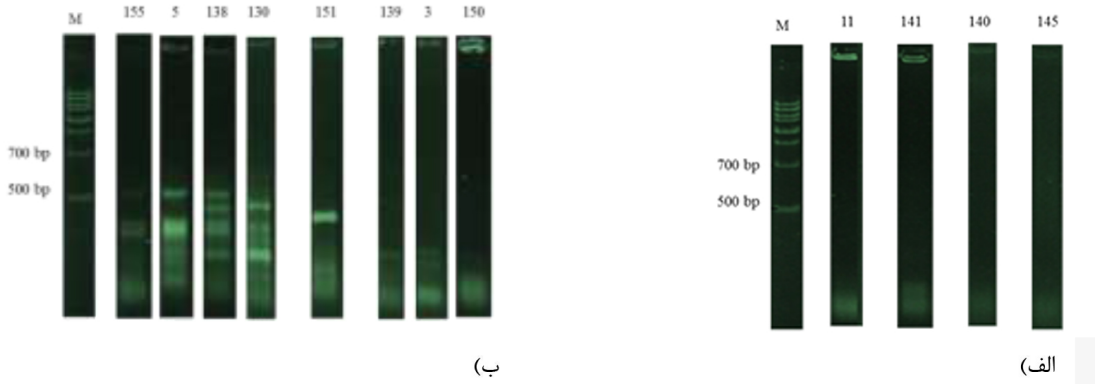
غربالگری جدایه‌های مقاوم به فلز نیکل در غلظت‌های مختلف سولفات نیکل بر اساس میلی مولار با روش لکه‌گذاری در شکل ۱ نشان داده شده است. نتایج نشان داد که ۲۷ درصد سویه‌ها تا غلظت ۷ میلی مولار نیکل را تحمل کردند. جدایه‌های شماره ۱۱، ۱۵۰، ۱٤۱، ۱٥٥و ۱٤٥ تا غلظت بیش از ٥ و کمتر از ۱۲میلی مولار نیکل را توانستند تحمل کنند ولی جدایه شماره ٥ تنها تا غلظت ۰/٥ میلی مولار و جدایه شماره ۱۳٥ تا بیش از ۱ میلی مولار نیکل را تحمل کرد. در تمامی آزمایشات جدایه‌ی کنترل، در محیط کشت فاقد نمک نیکل رشد کرده است.

بررسی توانایی ژنتیکی تولید ترکیبات فعال زیستی در جدایه‌های مقاوم به نیکل

از بین جدایه‌ها، ۱٥ جدایه مقاوم و حساس به صورت اتفاقی انتخاب شدند. نتایج حاصل از تکثیر قطعات DNA با آغازگرهای F540, R1100 پیشرو و بازگشتی تقریبا ۳ طرح متفاوت و مشخص را نشان داد (شکل ۲ الف). طرح اول در جدایه‌های شماره ۱٥٥ ، ٥، ۱۳۸و ۱۳۰ شامل قطعاتی با طول‌های متفاوت از حدود ۱٥۰ تا ٦۰۰ جفت باز ظاهر گردید. طرح دوم فقط در جدایه شماره ۱٥۱ با قطعه مشخص حدود ٤۰۰ جفت بازی و قطعات حدود ۲۰۰ جفت بازی مشاهده شد. و جدایه‌های شماره ۱۳۹، ۳، و ۱٥۰ شامل قطعاتی با طول‌های متفاوت از حدود ۱٥۰ تا ۲۰۰جفت باز، طرح سوم الکترفورزی در این مطالعه بود (شکل ۲ ب). بعلاوه، الکتروفورز قطعات DNA تکثیر شده با آغازگرهای پیشرو و بازگشتی R F٥٤۰, ۱۱۰۰ در جدایه‌های شماره ۱۱، ۱٤۱، ۱٤۰و ۱٤٥ هیچ محصول مشخصی را نشان نداد.

تکثیر DNA جدایه ها با آغازگرهای پیشرو و بازگشتی DKF DKR, فقط در جدایه‌های شماره ۱٥۰و ۱۳٥ منجر به تکثیر قطعاتی با طول‌های متفاوت از حدود ۳۰۰ تا ۲۰۰۰

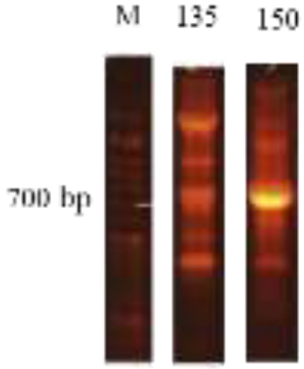
جفت باز گردید (شکل ۳). تکثیر DNA بقیه باکتری‌های مورد آزمایش با آغازگرهای پیشرو و بازگشتیDKF DKR, نتیجه‌ای به همراه نداشت.



شکل۲: الکتروفورز قطعات DNA تکثیر شده با آغازگرهای پیشرو و بازگشتی F540, R 1100 از باکتریهای مقاوم و حساس به نیکل.

الف- طرح‌های الکتروفورزی مشاهده شده در جدایه‌های ۱۵۵، ۵، ۱۳۸و ۱۳۰ شامل قطعاتی با طول‌های متفاوت از حدود ۱۵۰ تا ۶۰۰ جفت باز، جدایه ۱۵۱ قطعه مشخص حدود ۴۰۰ جفت بازی و قطعات حدود ۲۰۰ جفت بازی و جدایه‌های ۱۳۹، ۳، و ۱۵۰ شامل قطعاتی با طول‌های متفاوت از حدود ۱۵۰ تا ۲۰۰جفت باز بود ۱ (kb M شرکت کیاژن).

ب- الکتروفورز در جدایه‌های ۱۱، ۱۴۱، ۱۴۰،و ۱۴۵ هیچ محصول مشخصی را نشان نداد kb:M(۱ شرکت کیاژن).



شکل ۳: الکتروفورز قطعات DNA تکثیر شده با آغازگرهای پیشرو و بازگشتی DKF DKR, طرح‌های الکتروفورزی در جدایه‌های ۱۵۰و ۱۳۵ شامل قطعاتی با طول‌های متفاوت از حدود ۳۰۰ تا ۲۰۰۰جفت باز بود. M: kb) ۱ شرکت کیاژن).

بحث

برای جداسازی بیشترین تنوع گونه‌ها، در غربال‌گری میکروارگانیسم‌ها با توجه به مطالعه مهرشاد و همکاران، از محیط کشت‌های؛ MGM، SWN، MH، استفاده‌شد (Mehrshad et al., 2012). نتایج مطالعات نشان داد که میکروارگانیسم‌های دریاچه نمک سمنان از لحاظ دامنه تحمل نمک اکثراً بین نمک‌دوست‌های ضعیف تا قوی (۲ تا ۲۳ درصد نمک) قرار دارند. درصد بالایی از این میکروارگانیسم‌ها را باسیل گرم مثبت، هوازی تا بی‌هوازی اختیاری تشکیل می‌دهد. برخی سویه‌ها دارای توانایی تولید اسپور، تقریباً همه‌ی جدایه‌ها غیرمتحرک، کاتالاز و اکسیداز مثبت بودند. در شرایط اکولوژیکی مشابه باباولیان و همکاران (۲۰۰۷)، در مطالعه باکتری های دریاچه نمک آران و بیدگل ۸۳ سویه نمک‌دوست نسبی جدا کردند که ٤٤ سویه آن‌ها باسیل گرم مثبت بودند (Babavalian et al., 2009). در بررسی‌های بعدی که توسط دیداری خمسه مطلق و باقری (۲۰۰۹) بر روی همین دریاچه انجام شد، فراوانی بیشتری از باسیل‌های گرم مثبت گزارش شد (Didari et al., 2012). ۹۲ درصد سویه‌های جدا شده توسط Zununi Vahed و همکارانش (۲۰۱۱) از دریاچه نمک ارومیه گرم منفی بودند (Vahed, et al., 2011). ولی در مطالعه مهرشاد و همکاران (۲۰۱۱) بر روی دریاچه ارومیه نیز باسیل‌های گرم مثبت دارای بیشترین فراوانی؛ ۵۹,۹، درصد، بودند(Mehrshad et al., 2012). این نتایج با نتایج به دست‌آمده در پژوهش حاضر بخاطر شرایط محیطی بسیار مشابه، نزدیک‌تر است. Bagheri و همکاران (۲۰۱۲) یک گونه جدید از باسیلوس‌ها را به‌نام *Bacillus iranensis* sp. Nov از لجن و رسوبات شور دریاچه آران و بیدگل جدا کردند، این سویه

متعلق به جنس باسیلوس‌ها، یک نمک‌دوست متوسط میله‌ای شکل، گرم مثبت، به شدت هوازی، با توانایی تولید اسپور بود (Bagheri et al., 2012). تفاوت‌های مشاهده شده در تنوع میکروارگانیسم‌های محیط های شور مختلف را می‌توان به ویژگی‌های متفاوت زیستگاه‌ها نسبت داد. ویژگی‌های مختلف آب و هوایی هر منطقه و نوع بستر خاک، در تعیین تنوع زیستی مورد انتظار در آن ناحیه تأثیرگذار خواهد بود، به‌طوریکه تنوع زیستی هر زیستگاه از ویژگی‌های منحصربه فرد آن محسوب می‌شود (Oren 2002, Roberts 2005, Oren 2006).

درنتایج غربالگری برعلیه مقاومت به نیکل، به روش لکه‌گذاری در محیط‌کشت جامد، بیشترجدایه‌ها علاوه بر تحمل ۱۰ و ۲۳ % نمک توانستند تا غلظت ۷ میلی مولار نیکل را نیز تحمل کنند.

باکتری نمک‌دوست نسبی (*Staphylococcus* sp.) که از مصر، توسط Gaballa و همکاران (۲۰۰۳) جدا شد، قابلیت تحمل به نیکل تا ۱۰ میلی مولار را داشت (Gaballa et al., 2003). خدابخش و همکاران (۲۰۱۱) باکتری هالوفیل نسبی *Salinivibrio Costicola* را از دریاچه آران و بیدگل در کاشان جداسازی کردند که مقاوم به نیکل بود و تا غلظت ۱۰ میلی مولار نیکل را تحمل کرد (Khodabakhsh et al., 2011). براساس شواهد ارائه شده توسط آموزگار و همکاران (۲۰۰۵)، افزایش غلظت NaCl در محیط سبب افزایش مقاومت سویه‌های مورد مطالعه به فلزات سنگین از جمله نیکل می گردد (Amoozegar et al., 2005). نتایج مطالعات Rathgeber، Hedi (2009) (Hedi et al., 2009) (2002) (Rathgeber et al., 2002) ، Mohabat (Mohammadzadeh et al., 2014) نیز موید این واقعیت است که میکروارگانیسم‌های هالوفیل و یا هالوتولرانت به واسطه حضور وسیع پمپ های سدیم و پتاسیم در آنها، نه تنها توانایی تحمل کاتیون‌ها و آنیون‌های سمی را دارند بلکه حتی وجود یون‌های سمی برای رشد آن‌ها لازم است (Leung et al., 2000). بنابراین استفاده از گونه‌های بومی میکروارگانیسم‌ها (به‌ویژه باکتری‌ها) نسبت به میکروارگانیسم‌های دست‌ورزی شده، گزینه مناسب‌تری به شمار می‌رود (Davison 2005).

علاوه بر نقشی که میکروارگانیسم‌های مقاوم به فلزات سنگین در زیست پالایی دارند، به نظر می‌رسد فلزات سنگین به مثابه یک تنش برای میکروارگانیسم عمل می‌کنند و سبب تولید مولکول‌های فعال زیستی متنوعی می‌گردند. بطورمثال بررسی‌های خدابخش و آموزگار حضور آنزیم‌های مختلف از جمله آمیلاز، استراز و سلولاز در

باکتری‌های مقاوم به نیکل را نشان داد. به علت اهمیت این آنزیم‌ها در صنعت و نقش باکتری‌های هالوفیل در رفع آلودگی محیط زیست به نظر می‌رسد که شوری پسندها توانایی بالایی را برای اهداف زیست‌فنّاوری دارا باشند (Amoozegar, Salehghamari et al., 2008, Wang et al., 2009).

این در حالی است که نتایج حاصل از بررسی مولکولی برروی میکروارگانیسم های جداشده از مناطق دریایی نشان می‌دهد که تنش فلزات سنگین از جمله نیکل سبب تغییر بیان ژن‌های PKS و NRPS گردیده است (نوروزی و همکاران مقاله چاپ نشده). براین اساس در این تحقیق توانایی ژنتیکی میکروارگانیسم‌های جداشده از دریاچه حاج علیقلی خان سمنان برای تولید ترکیبات فعال زیستی مورد بررسی قرار گرفت. آغازگرهای بکار رفته در این تحقیق برای نشان دادن حضور ژن(های) PKS تولید کننده آنزیم پلی‌کتاید سنتتاز هستند. انتخاب آغازگرهای مورد استفاده در این پژوهش برای غربالگری دامنه ی گسترده ای از میکروارگانیسم های دارای این ژن ها به ویژه باکتری‌ها است (Ehrenreich et al., 2005, Wawrik et al., 2005, Pang et al., 2008). میکروارگانیسم‌ها نسبت به تنش‌های محیطی از خود عکس العمل نشان می‌دهند و تولید متابولیت ثانویه می‌کنند اما از طرفی، تأثیر تنش‌های محیطی بر تولید این ترکیبات یکسان نیست. Haferburg و همکاران (۲۰۰۹) نیز در مطالعه‌ای نشان دادند که یک تغییر در متابولیسم ثانویه‌ی اکتینوباکتری‌ها تحت شرایط تنش فلزی نیکل رخ می‌دهد و ژن‌های خاموشی تحت تاثیر این تنش فعال می‌گردند (Haferburg et al., 2009). Timsina, B.A و همکاران (2013) اثر شرایط کشت (سطوح pH و ترکیبات محیط از جمله اثر فلز) را بر روی رشد کلنی، تعداد متابولیت‌های ثانویه و بیان دو ژن PKS درگلسنگ، تشکیل شده از قارچ *Ramalina cellulose* را بررسی کردند. نتایج مطالعات آنها نشان داد که تعداد متابولیت‌های ثانویه در قارچ مذکور با فقیر کردن ترکیب محیط کشت (بدون عصاره مخمر) افزایش می یابد. همچنین بیان برخی از ژن‌های PKS در این تحقیق در pH های قلیایی ۸/۵ و محیط کشت مالت آگار بیشتر از pH های پایین‌تر و محیط های غنی‌تر بوده است. به بیان دیگر تنش‌های محیطی و pH قلیایی که می تواند نشانه‌ای از حضور نمک‌های فلزات مختلف باشد در افزایش تعداد متابولیت‌های ثانویه تاثیر مثبت دارد (Timsina et al., 2013).

در این پژوهش بررسی توانایی تولید ترکیبات فعال زیستی در برخی جدایه های هالوفیل و هالوتولرانت مقاوم و حساس به نیکل، با استفاده از آغازگرهای اختصاصی، ارتباط

بین تنوع ژنی PKS ها و مقاومت به نیکل نشان داده شده است. اما توانایی تولید ترکیبات فعال درسویه های حساس ممکن است مربوط به ساخت ترکیباتی باشد که ارتباطی با مقاومت باکتریایی به فلز نیکل ندارد. همچنین گستره وسیع ژن های PKS در باکتری‌ها، طراحی آغازگرهایی با توان معرفی تعداد بیشتری از این ماژول‌ها را ضروری می‌نماید.

نتیجه گیری

نتایج این پژوهش نشان داد که باکتری‌های مقاوم به فلز نیکل جدا شده در این پژوهش دارای توانایی ساخت ترکیبات فعال زیستی بالاتری نیز هستند. به نظر می‌رسد که میکروارگانیسم ها با سنتز متابولیت‌های ثانویه، عمل سم‌زدایی را به صورت لیگاند شدن با عناصر سنگین انجام می‌دهد. همانطور که نتایج حاصل از این پژوهش، تنوع توالی ژن‌های PKS در جدایه‌های مقاوم به نیکل این فرضیه را تایید می‌کند.

سپاسگزاری

این پژوهش با حمایت معاونت پژوهشی دانشگاه سمنان به انجام رسید. از آقای دکترعلیرضا اصغری برای همکاری در بررسی جذب اتمی انجام شده در دانشکده شیمی پردیس علوم پایه، دانشگاه سمنان قدردانی می شود.

منابع

Abolmaali, S., Mitterbauer, R. , Spadiut, O., Peruci, M.,Weindorfer, H. , Lucyshyn, D., Ellersdorfer, G., Lemmens, M., Moll, W.-D. and Adam, G. (2008) Engineered bakers yeast as a sensitive bioassay indicator organism for the trichothecene toxin deoxynivalenol. Journal of Microbiological Methods 72(3): 306-312.

Amoozegar, M., Hamedi, J., Dadashipour, M., and Shariatpanahi, S. (2005)Effect of salinity on the tolerance to toxic metals and oxyanions in native moderately halophilic spore-forming bacilli. World Journal of Microbiology and Biotechnology 21(6-7): 1237-1243.

Amoozegar, M. A., Salehghamari, E., Khajeh, K., Kabiri, M.and Naddaf, S. (2008)Production of an extracellular thermohalophilic lipase from a moderately halophilic bacterium, *Salinivibrio* sp. strain SA-2. Journal of basic microbiology 48(3): 160-167.

Amoozegar, M. A., Schumann, P., Hajighasemi, M., Fatemi, A. Z. and Karbalaei-Heidari, H. R. (2008) *Salinivibrio proteolyticus* sp. nov., a moderately halophilic and proteolytic species from a hypersaline lake in Iran. International journal of systematic and evolutionary microbiology 58(5): 1159-1163.

Ayuso-Sacido, A. and Genilloud, O. (2005) New PCR primers for the screening of NRPS and PKS-I systems in actinomycetes: detection and distribution of these biosynthetic gene sequences in major taxonomic groups. Microbial ecology 49(1): 10-24.

Babavalian, H., Amouzgar, M. and Pourbabaei, A. (2009) Isolation, Identification and Characterization of moderately halophilic bacteria producing Hydrolytic enzymes from Aran-Bidgol salt Lake. Iranian journal of biology 22(1): 24-45.

Bagheri, M., Didari, M., Amoozegar, M. A., Schumann, P., Sanchez-Porro, C., Mehrshad M.and Ventosa, A. (2012) *Bacillius iranensis* sp. nov., a moderate halophile from a hypersaline lake. International journal of systematic and evolutionary microbiology 62(4): 811-816.

Bode, H. B., Bethe, B., Höfs, R.and Zeeck, A. (2002) Big effects from small changes: possible ways to explore nature's chemical diversity. ChemBioChem-Wiley Online Library 3(7): 619-627.

Chau, R., Kalaitzis, J. A., Wood, S. A. and Neilan, B. A. (2013) Diversity and biosynthetic potential of culturable microbes associated with toxic marine animals. Marine drugs 11(8): 2695-2712.

Davison, J. (2005) Risk mitigation of genetically modified bacteria and plants designed for bioremediation. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 32(11-12): 639-650.

Didari, M., Amoozegar, M. A., Bagheri, M., Schumann, P., Spröer, C., Sánchez-Porro, C. and Ventosa, A. (2012) *Alteribacillus bidgolensis* gen. nov., sp. nov., a moderately halophilic bacterium from a hypersaline lake, and reclassification of *Bacillus persepolensis* as *Alteribacillus persepolensis* comb. nov. International journal of systematic and evolutionary microbiology 62(11): 2691-2697.

Dixit, R., Malaviya, D., Pandiyan, K., Singh, U. B., Sahu, A., Shukla, R., Singh, B. P., Rai, J.

P., Sharma P. K. and Lade, H. (2015) Bioremediation of heavy metals from soil and aquatic environment: an overview of principles and criteria of fundamental processes. Sustainability 7(2): 2189-2212.

Duda-Chodak, A. and Blaszczyk, U.(2008) The impact of nickel on human health. Journal of Elementology 13(4): 685-693.

Ehrenreich, I. M., Waterbury J. B. and Webb, E. A. (2005) Distribution and diversity of natural product genes in marine and freshwater cyanobacterial cultures and genomes. Applied and environmental microbiology 71(11): 7401-7413.

Engelhardt, K., Degnes, K. F., Kemmler, M., Bredholt, H., Fjærvik, E., Klinkenberg, G., Sletta, H., Ellingsen, T. E. and Zotchev, S. B.. (2010) Production of a new thiopeptide antibiotic, TP-1161, by a marine *Nocardiopsis* species. Applied and environmental microbiology 76(15): 4969-4976.

Gaballa, A., Amer, A., Hussein, H., Moawad, H. and Sabry, H. (2003) Heavy metals resistance pattern of moderately halophytic bacteria. Arab Journal of Biotechnology 6(2): 267-278.

Haferburg, G., Groth, I., Möllmann, U., Kothe, E.and Sattler, I. (2009) Arousing sleeping genes: shifts in secondary metabolism of metal tolerant actinobacteria under conditions of heavy metal stress. Biometals 22(2): 225-234.

Hedi, A., Sadfi, N., Fardeau, M.-L., Rebib, H., Cayol, J.-L., Ollivier B.and Boudabous, A. (2009) Studies on the biodiversity of halophilic microorganisms isolated from El-Djerid Salt Lake (Tunisia) under aerobic conditions. International journal of microbiology Volume 2009, Article ID 731786, 17 pages http://dx.doi.org/10.1155/2009/731786

Jookar, K. F., owlia, P., Amoozegar, M.and Yakhchali, B. (2014) Culturable prokaryotic diversity of urmia salt lake. Modern genetics journal 9(3): 313-328.

Khodabakhsh, F., Nazeri, S., Amoozegar, M. A. and Khodakaramian, G. R. (2011)Isolation of a moderately halophilic bacterium resistant to some toxic metals from Aran & Bidgol Salt Lake and its phylogenetic characterization by 16S rDNA gene. Feyz Journals of Kashan University of Medical Sciences 15(1): 50-57.

Le, T. H., Sivachidambaram, V., Yi, X., Li X.and Zhou, Z. (2014) Quantification of

polyketide synthase genes in tropical urban soils using real-time PCR. Journal of microbiological methods 106: 135-142.

Leung, W. C., Wong, M.-F., Chua, H., Lo, W., Yu P.and Leung, C. (2000) Removal and recovery of heavy metals by bacteria isolated from activated sludge treating industrial effluents and municipal wastewater. Water science and technology 41(12): 233-240.

Lopes, I., Baird, D. J. and Ribeiro, R. (2005) Resistance to metal contamination by historically-stressed populations of *Ceriodaphnia pulchella*: Environmental influence versus genetic determination. Chemosphere 61(8): 1189-1197.

Lushchak, V. I. (2011) Adaptive response to oxidative stress: Bacteria, fungi, plants and animals. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology 153(2): 175-190.

Mehrshad, M., Amoozegar, M., Yakhchali, B. and Shahzade-Fazeli, S. (2012)Biodiversity of moderately halophilic and halotolerant bacteria in the western coastal line of Urmia Lake. Biological Journal of Microorganism 1: 49-70.

Moffitt, M. C. and Neilan, B. A. (2001) On the presence of peptide synthetase and polyketide synthase genes in the cyanobacterial genus Nodularia. FEMS Microbiology Letters 196(2): 207-214.

Mohammadzadeh, K. R., Chorom, M., Motamedi, H. and Mohabat, A. (2014)Biosorption and bioaccumulation of cd and ni in competitive solution by three bacteria isolated from polluted soils to sewage sludge. Journal of microbial world 7(3): 241-251.

Nordberg, G. F., Fowler B. A. and Nordberg M. (2014) Handbook on the Toxicology of Metals, Academic Press.

Oren, A. (2002) Diversity of halophilic microorganisms: environments, phylogeny, physiology, and applications. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 28(1): 56-63.

Oren, A. (2006) Life at high salt concentrations. The Prokaryotes, Springer: 263-282.

Pang, M.-F., Abdullah, N., Lee, C.-W. and Ng, C.-C. (2008) Isolation of high molecular weight DNA from forest topsoil for metagenomic analysis. Asia-Pacific Journal

of Molecular Biology and Biotechnology16(2): 35-41.

Rathgeber, C., Yurkova, N., Stackebrandt, E., Beatty, J. T. and Yurkov,V. (2002)Isolation of tellurite-and selenite-resistant bacteria from hydrothermal vents of the Juan de Fuca Ridge in the Pacific Ocean. Applied and environmental microbiology 68(9): 4613-4622.

Reddy, B. V. B., Kallifidas, D., Kim, J. H., Charlop-Powers, Z., Feng, Z. and Brady,S. F. (2012) Natural product biosynthetic gene diversity in geographically distinct soil microbiomes. Applied and environmental microbiology 78(10): 3744-3752.

Roberts, M. F. (2005) Organic compatible solutes of halotolerant and halophilic microorganisms. Saline systems 1(5): 1.

Timsina, B. A., Sorensen, J. L., Weihrauch D.and Piercey-Normore, M. D. (2013)Effect of aposymbiotic conditions on colony growth and secondary metabolite production in the lichen-forming fungus . Fungal biology 117(11): 731-743.

Vahed, S. Z., Forouhandeh, H., Hassanzadeh, S., Klenk, H.-P., Hejazi M. A. and Hejazi, M. S. (2011) Isolation and characterization of halophilic bacteria from Urmia Lake in Iran. Microbiology 80(6): 834-841.

Vreeland, R. H. (2012) Advances in Understanding the Biology of Halophilic Microorganisms, Springer.

Wang, C.-Y., Hsieh, Y.-R., Ng, C.-C., Chan, H., Lin, H.-T., Tzeng W.-S. and Shyu, Y.-T.(2009) Purification and characterization of a novel halostable cellulase from Salinivibrio sp. strain NTU-05. Enzyme and Microbial Technology 44(6): 373-379.

Wawrik, B., Kerkhof, L., Zylstra G. J. and Kukor, J. J.(2005) Identification of unique type II polyketide synthase genes in soil. Applied and environmental microbiology 71(5): 2232-2238.