جداسازی باکتری‌های نمک دوست نسبی وبررسی اثر غلظت‌های مختلف نمک سدیم کلراید و حضور املاح گوناگون بر رشد آن‌ها

مریم زنجیربند[۱]، روحا کسری کرمانشاهی[۲]،

ناصر گلبانگ[۳]

چکیده

باکتری‌های نمک‌دوست نسبی گروه هتروژنی از میکروارگانیسم‌ها را تشکیل می‌دهند و قادر به رشد در دامنه‌ی نسبتاً وسیعی ازغلظت نمک سدیم کلراید هستند. باکتری‌های مذکور با تجمع غلظت بالایی از ترکیبات آلی سازگاری دهنده اسمزی (Compatible Solute) یااسمولیت ها، تعادل اسمزی را ایجاد می‌کنند.

برای جداسازی باکتری‌های نمک‌دوست نسبی نمونه‌گیری از آب خلیج فارس و بخش‌های مختلف کارخانه‌ی چرم‌سازی انجام شد. نمونه‌ها در محیط کشت اختصاصی نمک‌دوست‌ها غنی‌سازی شد و باکتری‌ها به روش استریک پلیت جداسازی و خالص‌سازی شدند. برای بررسی اثر غلظت‌های مختلف نمک سدیم کلراید و حضور یا عدم حضور املاح گوناگون بر رشد آن‌ها، از روش کدورت‌سنجی و دستگاه خواننده‌ی الایزا استفاده شد.

در این پژوهش ۸ باکتری از کارخانه و ۸ سویه از آب خلیج فارس جداسازی شد. مطالعات فنوتیپی و بیوتیپی گسترده‌ای روی این باکتری‌ها انجام شد.

در بررسی وضعیت نمک دوستی باکتری‌های جداسازی شده، ۱۰ نمونه از باکتری‌های جداسازی شده نمک دوست بودند. نتایج این تحقیق همچنین موید این است که مورفولوژی و واکنش گرم بر وضعیت نمک‌دوستی و رشد باکتری‌های جداسازی شده در غلظت‌های متفاوت نمک سدیم کلراید اثر می‌گذارد. نتایج بررسی اثر املاح موجود در محیط کشت اختصاصی نمک‌دوست‌ها بر روی رشد باکتری‌های شناسایی شده نشان داد حضور املاح سبب بهبود رشد آن‌ها می‌شود.

واژه‌های کلیدی: باکتری‌های نمک‌دوست نسبی ، نمک NaCl، املاح ، کدورت سنجی

مقدمه

باکتری‌های نمک‌دوست گروهی از اکسترموفیل‌ها هستند که قادر به رشد در محیط واجد نمک سدیم کلراید می‌باشند و برای زندگی در محیط‌های شور تطابق یافته‌اند (۶ و ۷). باکتری‌های مذکور به دو گروه نمک‌دوست و تحمل کننده‌ی نمک تقسیم می‌شوند. میکروارگانیسم‌هایی که بهینه‌ی رشد آن‌ها در محیط فاقد نمک یا غلظت‌های پایین‌تر از نمک دریا باشد ولی تراکم‌های نسبتاً بالای نمک را نیز تحمل می‌کنند، تحمل کننده‌ی نمک نامیده می‌شوند(۱۳). میکروارگانیسم‌های نمک‌دوست قادر به رشد در محیط فاقد نمک نمی‌باشند ،در محدوده‌ی شوری متفاوتی می‌توانند رشد کنند و دارای بهینه‌ی رشد در محیط‌هایی با میزان شوری نسبتاً بالا هستند. تفاوت اصلی نمک‌دوست با تحمل کننده‌ی نمک در این است که اگر چه محدوده‌ی رشد نمک‌دوست‌ها درغلظت‌های مختلف نمک می‌تواند کمتر یا بیشتر از محدوده‌ی رشد تحمل‌کننده‌ی نمک باشد، اما بهینه‌ی رشد در تراکم‌های بالاتر از شوری دریا است (بیش تر از ۳/۵٪). صفت مشترک بین تمام نمک‌دوست‌های نسبی، نیازمندی به نمک و توانایی تحمل غلظت بالای نمک است و این خصوصیت بین گونه‌های مختلف بسیار متغیر می باشد و شورپسندی به شرایط محیطی مثل دما و ترکیب محیط کشت بستگی دارد. بعضی از نمک‌دوست‌ها به جای سدیم کلراید می‌توانددر تراکم‌های بالای نمک‌های جایگزین مانند MgCl2، KCl، CsCl، RbCl2 و غیره رشد کنند. میکروارگانیسم‌های نمک‌دوست/تحمل کننده‌ی نمک، مکانیسم‌های تطابقی متنوع و متعددی را برای حفظ تعادل فشار اسمزی داخل سلول با محیط بیرون به کار می‌برند و به طور کلی به دو گروه تقسیم‌بندی می‌شوند یکی گروه KCl و دیگری گروه ترکیبات آلی سازگاری دهنده‌ی اسمزی یا اسمولیت‌ها (۴، ۵ و ۲۰).

در این تحقیق باکتری‌های نمک‌دوست نسبی از بخش‌های مختلف کارخانه‌ی چرم‌سازی (پساب، پوست نمک‌زده، روده نمک‌زده) و آب خلیج فارس جداسازی شدند و سپس اثر غلظت‌های مختلف نمک سدیم کلراید و حضور یا عدم حضور املاح گوناگون بر رشد آن‌ها مورد بررسی و تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

۱- سویه‌های باکتریایی و شرایط رشد:

برای جداسازی باکتری‌های نمک‌دوست نسبی نمونه‌گیری از آب خلیج فارس و بخش های مختلف کارخانه‌ی چرم‌سازی انجام شد. نمونه‌ها در محیط کشت اختصاصی و غنی کننده نمک‌دوست‌ها واجد محیط نوترنیت برات دارای غلظت نمکی کل $71 g L^{-1}$ غنی‌سازی شد. یک لیتر محلول نمکی

حـــاوی: Cacl (۰/۳۶ گـــرم)، KCl (۲گـــرم)، $NaHCo_3$ (۰/۰۶ گرم)، Nacl (۵۱ گرم)، $MgSo_4$ (۹/۶ گـــــرم)، $MgCL_2$ (۷ گـــــرم)، NaBr (۰/۰۲۶گرم) بود. محیط با استفاده از KOH یک مولار روی ۷/۴ تنظیم شد و محیط کشت‌ها دردمای ۳۴ درجه سانتی‌گراد باشیکر در دور ۱۳۰ rpm به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت گرماگذاری شد(۱ و ۱۶). در موارد لزوم محیط نوترنیت آگار به همراه غلظت نمکی مذکور برای محیط جامد بکار رفت.

۲. شناسایی باکتری‌های جداسازی شده:

برای شناسایی باکتری‌ها از خصوصیات ماکروسکوپی (رنگ کلونی)، میکروسکوپی (مورفولوژی و واکنش گرم) و تست‌های بیوشیمیایی استفاده شد. ویژگی‌های مورفولوژی سویه‌ها روی محیط کشت اختصاصی نمک دوست ها دارای ۱۰٪ سدیم کلراید صورت گرفت (۱ و ۱۶). رنگ‌آمیزی گرم انجام شد و نتایج به‌وسیله‌ی تست KOH تایید شد (۹). حرکت، کاتالاز، اکسیداز، احیاء نیترات، تخمیر هیدرات‌های کربن و تولید اسید، هیدرولیز ژلاتین و نشاسته انجام شد (۱، ۳، و ۱۰). تمام تست‌ها با استفاده از محیط دارای ۱۰٪ (w/v)سدیم کلراید آزمایش شد. باکتری‌های میله‌ای گرم‌منفی که قادر به رشد در دامنه وسیعی از غلظت نمک NaCl بودند، علاوه بر مطالعات فنوتیپی و بیوتیپی توسط یک جفت پرایمر (پرایمرهای اکتوئین) اختصاصی برای باکتری‌های متعلق به جنس هالوموناس (*Halomonas*) مورد شناسایی قرار گرفتند (۲۱).

طول قطعه‌ی تکثیر شونده توسط این پرایمرها ۲۷۷ جفت باز بود. توالی پرایمرها به شرح زیر می‌باشد:

Forward ectoine primer: 5'-GGTAAYTGGGAYAGYACRC-3'
Reverse ectoine primer: 5'-GBGGHGTRAAKACRCADCC-3'
y=C or T (pyrimidine) H=A, C or T K=G or T (keto)
R=A or G (purine) B= C, G or T D=A, G or T

۳. روش بررسی اثر غلظت‌های مختلف نمک سدیم کلراید بر روی میزان رشد باکتری‌های نمک‌دوست نسبی شناسایی شده و تعیین غلظت مطلوب نمک برای رشد آن‌ها:

در این قسمت از مطالعه سویه‌های جداسازی شده از دو منبع فوق تحت غلظت‌های مختلف نمک کشت داده شد و میانگین رشد باکتری‌ها در چهار بار تکرار مورد مقایسه قرار گرفت. برای انجام این آزمایش از روش کدورت‌سنجی و دستگاه خواننده‌ی الایزا استفاده شد (۸). محیط کشت نوترینت برات با غلظت‌های مختلف نمک سدیم کلراید (۰٪، ۵٪، ۱۰٪، ۱۵٪، ۲۰٪ و ۲۵٪) به‌کار رفت و pH محیط کشت در صورت لزوم به وسیله‌ی HCl یا KOH ۱ مولار روی ۷/۴ تنظیم شد. میکروپلیت‌ها در دمای ۳۴ درجه سانتی‌گراد، به مدت ۲۴-۲۰ ساعت گرماگذاری شد و پس از آن، جذب نوری چاهک‌ها در طول موج ۶۳۰ نانومتر با استفاده از دستگاه خواننده‌ی الایزا قرائت گردید و رشد یا عدم رشد در آن‌ها بررسی شد (۱۹ و ۲۰). برای جلوگیری از تغییر غلظت نمک مورد آزمایش، برای تهیه‌ی

رقت از باکتری، از محیط کشتی با غلظت نمک مشابه آن استفاده گردید.

۴. بررسی اثر املاح گوناگون و غلظت‌های مختلف نمک سدیم کلراید بر روی رشد باکتری‌های نمک‌دوست نسبی شناسایی شده و تعیین غلظت مطلوب نمک برای رشد آن‌ها:

این مرحله از کار دقیقاً مشابه مرحله‌ی ۳ انجام شد با این تفاوت که به جای محیط کشت نوترینت برات از محیط کشت اختصاصی و غنی کننده همراه با غلظت‌های مختلف نمک سدیم کلراید استفاده گردید (۸ و ۲۰).

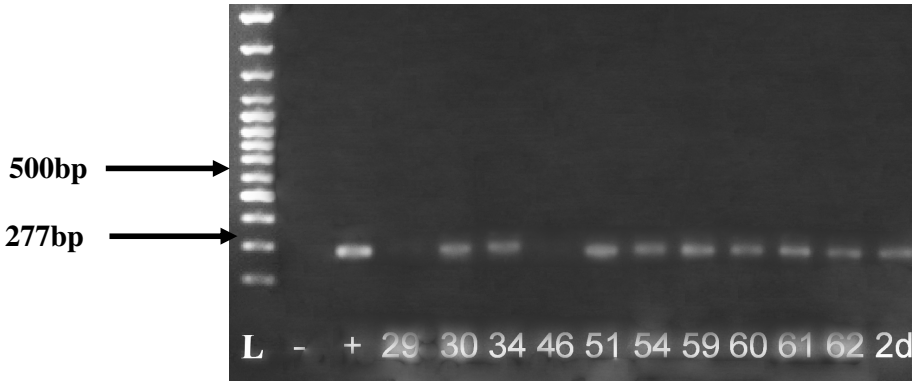
نتایج:

در این پژوهش ۸ باکتری از کارخانه‌ی چرم‌سازی و ۸ باکتری از آب خلیج فارس جداسازی شد. مطالعات فنوتیپی و بیوتیپی گسترده‌ای روی این باکتری‌ها انجام گشت و نتایج آن در جدول (۱) آمده است. باکتری‌های میله‌ای گرم‌منفی علاوه بر مطالعات فنوتیپی و بیوتیپی توسط یک جفت پرایمر (پرایمرهای اکتوئین) اختصاصی برای باکتری‌های متعلق به جنس هالوموناس (***Halomonas***) مورد شناسایی قرار گرفتند (شکل ۱).

جدول۱. خصوصیات بیوشیمیایی سویه‌های باکتریائی جداسازی شده در این تحقیق

مورفولوژی وواکنش گرم	تست / نام باکتری	حرکت	پیگمان	اکسیداز	نیترات	آرژینوز	گلوکز	لاکتوز	ترهالوز	مانیتول	هیدرولیز نشاسته	هیدرولیز ژلاتین	دامنه تحمل نمک*
میله‌ای گرم منفی	***H30***	–	کرم	+	+	–	–	–	–	–	–	–	./۵–۲۵
	H34	–	کرم	+	+	–	+	–	+	–	–	–	./۵–۲۵
	H51	+	کرم	+	+	–	+	–	+	+	–	–	۰–۲۵
	H54	+	کرم	+	+	–	+	–	+	+	–	–	./۵–۲۵
	H59	+	کرم	+	+	–	+	+	–	+	–	–	./۵–۲۵
	H60	+	کرم	+	+	+	+	+	+	+	+	–	./۵–۲۵
	H61	–	کرم	+	–	–	–	–	–	–	–	+	./۵–۲۵
	H62	+	کرم	+	+	–	+	–	–	–	+	–	./۵–۲۵
	H2d	–	کرم	+	+	–	+	–	–	–	–	–	۰–۲۵
	H8	–	کرم	+	+	–	+	–	+	–	–	–	۰/۵–۳۲
	Ar1	+	–	+	+	–	–	–	–	–	–	–	۰/۵–۲۰
میله‌ای گرم مثبت	***HB1***	–	کرم	+	+	–	–	–	–	–	+	–	۰/۵–۲۰
	B1	+	زرد	+	+	–	–	–	+	–	–	–	۰–۲۰
کوکسی گرم مثبت	***MA1***	+	–	+	+	–	–	–	–	–	+	+	۰–۲۰
	MH1	–	نارنجی	+	+	––	–	–	–	–	–	–	۰–۳۰
	NH1	–	–	+	–	–	+	–	–	–	–	+	۰–۳۲

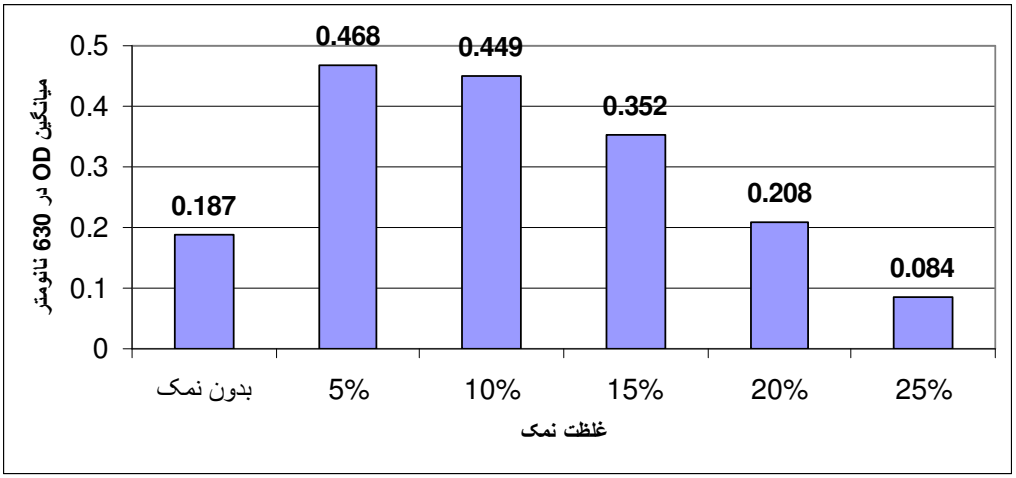
*: دامنه تحمل نمک NaCl بر حسب (٪) می باشد.



شکل ۱. تصویر ژل الکتروفورز محصولات PCR از سویه‌های *H29, H30, H34, H46, H51, H54, H59, H60, H61, H62,* و *H2d* با پرایمرهای اکتوئین

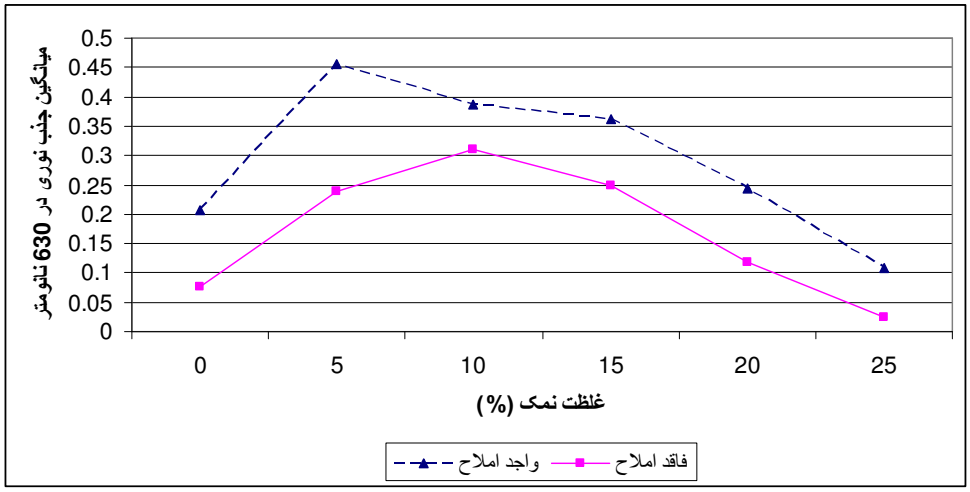
توضیح علائم: L : Ladder، - : کنترل منفی (آب مقطر)، + : کنترل مثبت *Halomonas salina* ATCC 49509)

در بررسی وضعیت نمک دوستی باکتری‌های شناسایی شده، ۴ نمونه (۵۰٪) از باکتری‌های جدا شده از آب خلیج فارس و ۶ نمونه (۷۵٪) از باکتری‌های کارخانه چرم‌سازی نمک دوست بودند. در بررسی رشد باکتری‌های جداسازی شده درحضورغلظت‌های مختلف نمک سدیم کلراید نتایج به‌دست آمده نشان داد میانگین رشد باکتری‌ها در محیط فاقد نمک، ۰/۱۸۷ ±۰/۰۲۴ و در محیط حاوی ۵٪ نمک، ۰/۴۶۸ ± ۰/۰۳۴ می باشد. همچنین نتایج مربوط به رشد باکتری‌ها در سایر غلظت‌ها در شکل (۲) نشان داده شده است.



شکل ۲. مقایسه میانگین رشد باکتری‌ها در دما ، pH مطلوب و غلظت‌های مختلف نمک سدیم کلراید

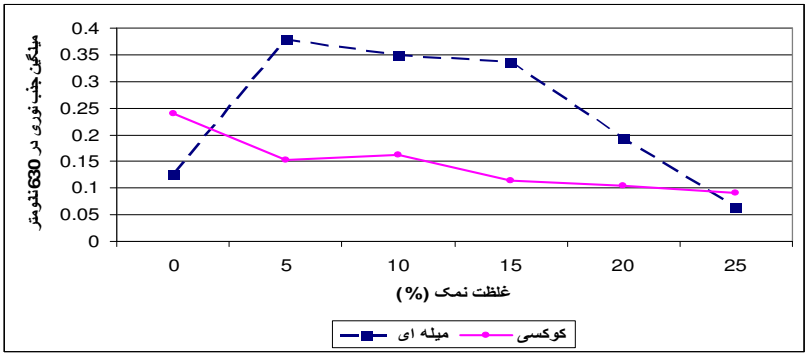
نتایج بررسی اثر املاح موجود در محیط کشت اختصاصی نمک‌دوست‌ها بر روی رشد باکتری‌های شناسایی شده نشان داد در برخی از نمک‌دوست‌های جداسازی شده نمک NaCl قابلیت جایگزینی با نمک‌های دیگر را داشته است به طوری که برخی از باکتری های نمک دوست که در محیط نوترینت برات فاقد نمک NaCl قادر به رشد نبودند، در محیط اختصاصی و غنی کننده فاقد نمک سدیم کلراید رشد کردند (H34) ولی در بعضی از آن ها حضور نمک NaCl الزامی است وبا نمک‌های دیگر موجود در محیط کشت جایگزین نمی‌شود به گونه ای که برخی از باکتری های نمک دوست که در محیط نوترینت برات فاقد نمک NaCl قادر به رشد نبودند در محیط اختصاصی و غنی کننده فاقد نمک سدیم کلراید نیز رشد نکردند(H30). نتایج مذکور همچنین نشان داد میانگین رشد باکتری‌های تحت مطالعه درغلظت‌های مختلف نمک، درصورت وجود یا عدم وجود املاح تقریباً مشابه می باشد (شکل ۳).



شکل ۳. مقایسه تغییرات رشد باکتری‌ها در دما ،pH مطلوب و غلظت‌های مختلف نمک سدیم کلراید برحسب وجود یا عدم وجود املاح

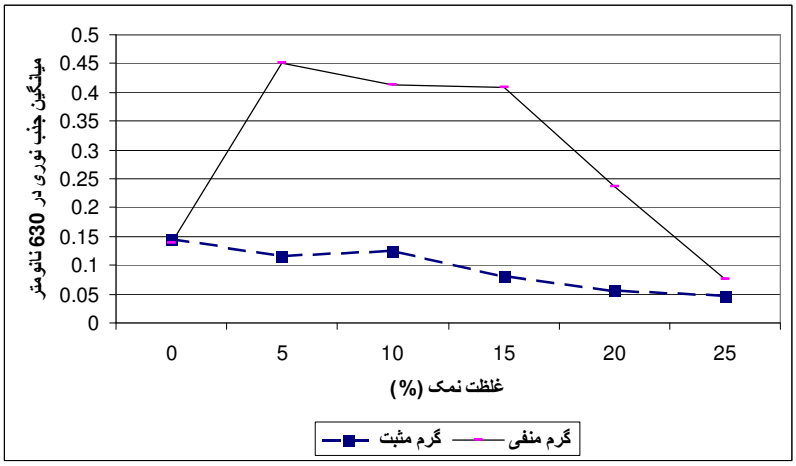
در این پژوهش همچنین اثر مورفولوژی و واکنش گرم بر وضعیت نمک‌دوستی باکتری‌های شناسایی شده،مورد بررسی قرار گرفت. از ۱۳ باکتری میله ای شکل، ۱۰ سویه نمک دوست و ۳ سویه تحمل کننده نمک بودند و ۳ باکتری کوکسی شکل، هر سه تحمل کننده نمک بودند. همچنین از ۱۱ سویه گرم منفی، ۹ سویه نمک دوست و ۲ سویه تحمل کننده بودند و از ۵ باکتری گرم مثبت جداسازی شده، ۱ سویه نمک دوست و ۴ سویه تحمل کننده نمک بودند.

نتایج این تحقیق همچنین موید این است که مورفولوژی (شکل۴)و واکنش گرم (شکل ۵) در رشد باکتری‌های شناسایی شده در غلظت‌های متفاوت نمک سدیم کلراید اثر می‌گذارد.



شکل ۴. مقایسه میانگین رشد باکتری‌های میله‌ای وکوکسی در دما،pH مطلوب و غلظت‌های مختلف نمک سدیم کلراید

همان‌گونه که از این نمودار مشخص می‌باشد، میانگین رشد باکتری‌ها دردوگروه، در غلظت‌های مختلف نمک متفاوت بوده ولی در غلظت ۲۵٪ رشد دو گروه برابر می‌باشد.



شکل ۵. مقایسه میانگین رشد باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت در دما،pH مطلوب و غلظت‌های مختلف نمک سدیم کلراید

شکل ۵ بیانگر تفاوت رشد باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی در غلظت‌های مختلف نمک می‌باشد. همان‌گونه که از شکل نمودار مشخص می‌باشد، میانگین رشد باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت درغلظت‌های ۵٪ تا ۲۰٪ نمک با هم متفاوت بوده ولی در محیط فاقد نمک و در محیط حاوی ۲۵٪ نمک رشد آن‌ها تقریباً با هم برابر می باشد.

بحث و نتیجه‌گیری

باکتری‌های نمک‌دوست نسبی پتانسیل بالایی برای بیوتکنولوژی و نانوتکنولوژی دارند و بسیاری از آن‌ها نه تنها ترکیبات صنعتی نظیر آنزیم‌ها، پلیمرها، پیگمان و غیره را تولید می‌کنند، بلکه دارای خصوصیات فیزیولوژیک خاص هستند که بهره‌وری

از آن‌ها را تسهیل می‌کند (۱۸ و ۱۹). عوامل محیطی مختلف به ویژه تراکم نمک NaCl و حضور کاتیون‌ها و آنیون‌های مختلف بر روی رشد نمک‌دوست‌ها بسیار مؤثر می‌باشد. به این دلیل، اثر عوامل فوق بررسی شد تا شرایط رشد از نظر ترکیب محیط کشت برای آن‌ها بهینه‌سازی گردد (۱۱، ۱۵، ۱۹ و ۲۰).

باکتری‌های جداسازی شده در این تحقیق بیشتر میله‌ای گرم منفی و اکثر آن‌ها متعلق به جنس هالوموناس بودند و تنها دو سویه میله‌ای گرم مثبت و سه نمونه کوکسی گرم مثبت جداسازی شد.

همان‌گونه که ذکر گردید، از باکتری‌های جداسازی شده ۱۰ سویه نمک‌دوست و ۶ سویه تحمل کننده‌ی نمک می‌باشند. لازم به ذکر است در برخی از نمک‌دوست‌های جداسازی شده نمک NaCl قابلیت جایگزینی با نمک‌های دیگر را داشته است ولی در بعضی از آن ها حضور نمک NaCl الزامی است و با نمک‌های دیگر موجود در محیط کشت جایگزین نمی‌شود.

طبق تحقیقات Ventosa در سال ۱۹۹۸ بعضی از نمک‌دوست‌ها به جای سدیم کلراید می‌توانند در تراکم‌های بالای نمک‌های جایگزین مانند MgCl2، KCl، CsCl و غیره رشد کنند. لازم به ذکر است اگر چه NaCl به طور ناقص می‌تواند در برخی نمک‌دوست‌ها به وسیله‌ی نمک‌های محلول دیگر مثل KCl برای هالوباکتری‌ها جایگزین شود (۱۹ و ۲۰). از طرفی چون بیشتر نمک‌های آزمایشگاهی با مقادیر جزئی از نمک NaCl همراه است بسیار مشکل خواهد بود که ثابت شود میکروارگانیسم‌ها به NaCl نیاز ندارند و این ماده به وسیله‌ی برخی نمک‌های دیگر می‌تواند جایگزین شود (۲۰).

نتایج مربوط به رشد باکتری‌ها در غلظت‌های مختلف نمک NaCl در شکل (۲) نشان داده شده است و بهینه‌ی غلظت نمک برای رشد باکتری‌ها به طور کلی ۵٪ یا ۱۰٪ می‌باشد. انجام آزمون آنالیز واریانس بر روی داده های فوق نشان می‌دهد رشد باکتری‌ها در غلظت‌های مختلف نمک اختلاف معنی‌دار دارد ($P<0.001$). بررسی رشد باکتری‌های جداسازی شده نشان داد میانگین رشد باکتری‌های جداسازی شده در صورت عدم وجود نمک و در حضور نمک متفاوت است. باکتری‌های نمک‌دوست بیش‌ترین رشد را در غلظت مطلوب نمک نشان می‌دهند و افزایش غلظت نمک به میزان بالاتر از غلظت مطلوب، سبب کاهش شکست مواد اولیه، افزایش زمان تولید مثل و کند شدن رشد می‌شود به.همین دلیل در غلظت ۲۵٪ نمک کاهش چشمگیری در رشد باکتری‌ها مشاهده می‌شود (۱۹ و ۲۰).

شکل (۳) میانگین رشد باکتری‌های تحت مطالعه را در غلظت‌های مختلف نمک بر حسب حضور و عدم حضور املاح نشان می‌دهد . همان‌گونه که از این نمودار نیز مشخص می‌باشد، غلظت مطلوب نمک برای رشد باکتری‌ها در حضور املاح (۵٪) و در صورت عدم حضور املاح (۱۰٪) متفاوت است. انجام آزمون آنالیز واریانس با متد پیشگفت نشان داد با حضور املاح، رشد باکتری‌ها در غلظت‌های مختلف نمک باز هم اختلاف معنی‌دار دارد ($p = 0.02$). در مقایسه با این تحقیق، طبق مطالعات Ventosa در سال ۱۸۹۸ املاح موجود در

محیط کشت اختصاصی نمک‌دوست‌ها باعث بهبود و افزایش رشد آن‌ها می‌شود (۱۹).

حضور املاح مختلف نظیر $MgSo_4$، MgCl2، CaCl2، KCl، $NaHCo_3$ و NaBr در محیط‌های شور و محیط کشت‌های اختصاصی نمک‌دوست‌ها بر اثر این کاتیون‌ها و آنیون‌ها بر رشد میکروارگانیسم‌های مذکور دلالت دارد. یون‌های پتاسیم علاوه بر این که تا حدودی در تنظیم فشار اسمزی دخالت دارند، برای ثبات و فعالیت آنزیم‌های متعددی مثل ۲و۴-دی‌آمینوبوتیرات آمینوترانسفراز لازم است (آنزیم مذکور در بیوسنتز اکتوئین دخالت دارد. اکتوئین از مهم‌ترین اسمولیت‌ها برای حفظ فشار اسمزی و تطابق با استرس شوری است.) (۲ و ۱۳). برخی از نمک‌دوست‌های نسبی برای حفظ تعادل فشار اسمزی علاوه بر ذخیره کردن اسمولیت‌ها، تراکم بالای نسبی از +Na، +K و Cl^- را درون خود تجمع می‌دهند که در بین این یون‌ها پتاسیم به دلیل داشتن اثرات مهاری جزئی بر روی فعالیت آنزیم‌ها و یا حتی فعال کردن آنزیم‌ها مثل α-آمیلاز و سیستم آنزیم ریبوزومی نمک‌دوست‌ها، ارجح می‌باشد. یون‌های Mg^{2+} و Ca^{2+} سبب تحریک فعالیت نوکلئاز نمک‌دوست جداسازی شده از باسیلوس هالوفیلوس می‌شود. تراکم Mg^{2+} برای رشد نمک‌دوست‌های شدید بسیار مهم است و غلظت پایین Mg^{2+} رشد آنها را حمایت نمی‌کند. حضور MgCl2 سبب ثبات غشاء و حتی برای نگه‌داری زنجیره‌ی تنفسی مؤثر است. کاتیون‌های دو و چند ظرفیتی، پل‌هایی بین بارهای منفی مجاور تشکیل می‌دهند و در نتیجه در خنثی‌سازی بارهای سطحی پلی‌مرها از یون‌های تک‌ظرفیتی مؤثرتر هستند. کاتیون‌های دو ظرفیتی در تشکیل کمپلکس‌ها مشارکت می‌کنند. منیزیم در پوشش نمک‌دوست‌ها می‌تواند به وسیله‌ی غلظت بالای NaCl جانشین شود، به همین دلیل در محیط فاقد املاح رشد بهینه در تراکم بالاتری از نمک (۱۰٪) نسبت به محیط واجد املاح (۵٪) رخ می‌دهد (۶، ۱۲، ۱۷ و ۱۹).

نتایج مربوط به توزیع فراوانی باکتری‌های نمکدوست بر اساس مورفولوژی و واکنش گرم در بخش نتایج آمده است.بر اساس آزمون فیشر وضعیت نمک‌دوستی برحسب مورفولوژی (p=0.036) و رنگ‌آمیزی گرم(p=0.036) تفاوت معنی‌دار دارد. به عبارت دیگر مورفولوژی وواکنش گرم باکتری در نمک‌دوست بودن آن تاثیرگذار است.

در مقایسه با این نتایج در تحقیق انجام شده توسط Ventosa در سال ۱۸۹۸ اکثر نمک‌دوست‌های نسبی، میله‌ای گرم منفی، اکثر تحمل‌کننده‌های نمک گرم مثبت و کوکسی‌های گرم مثبت نیز بیش‌تر تحمل‌کننده‌ی جزئی یا متوسط نمک هستند (۱۹) که با نتایج این پژوهش مشابه می‌باشد.

بر اساس نتایج به‌دست آمده بالاترین میانگین رشد باکتری‌های میله‌ای در غلظت ۵٪ نمک امکان پذیر گشته است، از طرف دیگر بالاترین رشد باکتری‌های کوکسی نیز در محیط فاقد نمک مشاهده گردید که نتایج مربوطه در شکل (۴) نشان داده شده است . همان‌گونه که از این نمودار مشخص می باشد، میانگین رشد باکتری‌ها در دو گروه، در غلظت‌های

مختلف نمک متفاوت بوده ولی در غلظت ۲۵٪ رشد دو گروه برابر می‌گردد. در عین حال انجام آزمون آنالیز واریانس بر روی داده‌های فوق نشان داد میـــانگین رشد بـــاکتری‌ها بر حسب مورفولوژی در غلظت‌های مختلف نمک اختلاف معنی‌دار دارد ($p = 0.001$) . به عبارت دیگر می توان گفت بین غلظت نمک و شکل باکتری اثر متقابل معنی‌دار وجود دارد.

مطابق نتایج این پژوهش بالاترین رشد باکتری‌های گرم مثبت در محیط فاقد نمک ایجاد شده است و کمترین آن مربوط به غلظت ۲۵٪ نمک می‌باشد. در خصوص باکتری‌های گرم منفی، مناسب‌ترین غلظت نمک برای رشد باکتری غلظت ۵٪ بوده است (شکل ۵). همان‌گونه که ازشکل نمودار مشخص می‌باشد، میانگین رشد باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت در غلظت‌های ۵٪ تا ۲۰٪ نمک با هم متفاوت بوده ولی در محیط فاقد نمک و در محیط حاوی ۲۵٪ نمک رشد آن‌ها تقریباً با هم برابر می باشد. در این‌جا نیز انجام آزمون آنالیز واریانس نشان می‌دهد وضعیت باکتری‌ها از نظر رنگ‌آمیزی گرم عامل تاثیرگذاری در رشد باکتری‌ها در غلظت‌های مختلف نمک می‌باشد. به عبارت دیگر بین غلظت نمک محیط و گرم منفی یا مثبت بودن باکتری یک اثر متقابل معنی‌دار وجود دارد ($p<0.001$).

در مقایسه با این نتایج طبق تحقیقات Ventosa در سال ۱۹۹۸ اکثر نمک‌دوست‌های نسبی میله‌ای گرم منفی و اکثر تحمل‌کننده‌های نمک، گرم مثبت هستند (۱۹) که با نتایج این پژوهش همخوانی دارد.

تغییر در غلظت نمک سدیم کلراید محیط کشت سبب تغییر در محتوای لیپید غشاء سلولی می‌شود. با افزایش غلظت نمک، مقدار فسفولیپیدهای منفی نسبت به فسفولیپیدهای خنثی افزایش می‌یابد. برای مثال در شوری بیشتر، مقدار فسفاتیدیل اتانول‌آمین خنثی کاهش یافته و در مقابل، میزان فسفاتیدیل گلیسرول منفی یا دی‌فسفاتیدیل گلیسرول (کاردیولیپین) افزایش می‌یابد.در واقع با افزایش غلظت نمک، بار منفی روی غشاء افزایش می‌یابد. غشاء سلولی باکتری‌های میله‌ای گرم منفی نمک‌دوست نسبی بی‌هوازی اختیاری شامل فسفاتیدیل اتانول‌آمین و فسفاتیدیل گلیسرول است که با هم بیش از ۹۰٪ لیپیدها را تشکیل می‌دهند با مقادیر کمی کاردیولیپین، گلیکولیپید و لیپیدهای دیگر و با افزایش شوری نسبت فسفاتیدیل اتانول‌آمین به فسفاتیدیل گلیسرول کاهش می‌یابد. در گونه‌های گرم مثبت، افزایش در نسبت لیپیدهای آنیونی، بیش‌تر مربوط به افزایش کاردیولیپین است. افزایش مقدار کاردیولیپین، اغلب سبب کاهش رشد سلول‌ها می‌شود و میزان رشد در غلظت بالای نمک کاهش می‌یابد. گلیکو(فسفو)لیپیدها در گرم منفی‌ها نادر است اما اغلب در گرم مثبت‌ها یافت می‌شود (۱۴، ۱۹ و ۲۰).به عبارتی افزایش میزان کاردیولیپین در گرم مثبت‌ها سبب کاهش رشد آن‌ها می‌شود.

منابع

1. Amoozegar, M. A., Malekzadeh, F. Malik, K. A. Schumann, p. and sproer, C. *Halobacillus karajensis* sp. Nov. a novel moderate halophile. Inter. J. Syst. Evolution. Microbiol 53, 1059-1063. 2003

2. Brandon, R., Litzner, T., Caton, M. And Schneegurt, A. Carbon substrate utilization, antibiotic sensitivity and numerical taxonomy of bacterial isolates from the Great salt ploains of Oklahoma. Arch. Microbial. 185: 286-296, 2006.
3. Brenner, D. J., Krieg, N. R. and Staley J. T. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Sec edition. Vol 2. Part B. Springer. 283, 298-313 and 318-321, 2005.
4. Ciulla, R. A., Diaz, M. R., Taylor, B.F and Roberts, M.F. Organic osmolytes in aerobic bacteria from Mone Lake, an alkaline, moderately hypersaline environment. Appl. Environ. Microbiol, Jan. 220-226, 1997.
5. Cummings, S.P. and Gilmour, D.J. The effect of NaCl on the growth of *Halomonas* species: accumulation and utilization of compatible solutes. Microbiology 141:1413-1418, 1995.
6. Detkova, E. N. ; Boltyanskaya, V. Yu. Relationships between the osmoadaptation strategy, amine acid composition of bulk protein, and properties of certain enzymes of haloalkaliphilic bacteria. Microbiol. 75, 259-265, (2006).
7. Deutch, C. E. characterization of a salt-tolerant extra cellular α-amylase from *Bacillus dipsosauri*. Letters. Appl. Microbiol. 35, 78-84, 2002.
8. Emtiazi G, Hassanshahyan M, Golbang N. Development of a microtitre plate method for determination of phenol utilization, biofilm formation and respiratory activity by environmental bacterial isolates. International Biodeterioration & Biodegradation, 56: 231-235, 2005.
9. Forbes, B. A.; Sahm, D. F.; Weissfeld, A. S. Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology. 11th edn. Mosby, Inc. Missouri, 2002.
10. Holt, J. g., Krieg, N. R., Sneath, P. H. A., staley, J. T. and Williams, S. T. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 9th edition. Williams & wilrins. Maryland. 529, 531 and 542, 1894.
11. Kaye, J. Z. And Baross, A.J. Synchronous effects of temperature, hydrostatic pressure and salinity on growth, phospholipids profiles, and protein patterns of four *Halomonas* species isolated from deep see hydrothermal - vent and sea surface environments. Appl. Environ. Microbiol, oct. 6220-6229, 2004.
12. Madern, D., Ebel, C. and zaccai, G. Holophilic adaptation of enzymes. Extermophiles. 4: 91-98, 2000.
13. Margesin, R., and schinner, F. Potential of halotolerant and halophilic Microorgnisms for biotechnology. Extremophiles. 5: 73-83, 2001.

14. Monteoliva-sanchez, M., Ventosa, A. and Ramos-Cormenzana, A. Cellular fatty acid composition of moderately halophilic Cocci. Syst. Appl. Microbiol. 12: 141-144, 1889.
15. Nakayama, H., Yoshia, Ono, K. H., Murooka, Y. and Shinmyo, A. Ection the compatible solute of *Halomonas elongata* confers hyperosmotic tolerance in cultured Tobacco cells. Plant. Physiol. 122: 1239-1247, 2000.
16. Nieto, J. J., Fernandez- Castillo, R., Marquez, M. C., Ventosa, A., Quesada, E. & Ruiz- Berraquero, F. Survey of metal tolerance in moderately halophilic eubacteria. Appl. Environ. Microbiol. 55: 2385-2390, 1889.
17. Ono, H., Sawada, K., Khunajakr,N. and Morooka, Y. Characterization of biosynthetic enzymes for ectoine as a compatible solute in a moderately halophilic eubacterium, *Halomonas elongata*. J. Bacteriol. Jan. 91-99, 1999.
18. Sanchez-porro, C., Martin, S., Mellado, E. and Ventosa, A. Diversity of moderately halophilic bacteria producing exteracellular hydrolytic enzymes. J. Appl. Microbiol. 94: 295-300, 2003.
19. Ventosa, A., Nieto, J. J. & Oren, A. Biology of moderately holophilic aerobic bacteria. Microbiol. Mol. Biol. Rev. June. 504-544, 1998.
20. Vreeland, R.H. and Hochstein, L.I. The biology of holophilic bacteria. Boca Raton, FL: CRC Press. 4-20, 55-60, 73-78, 86-99, 169-183, 218-243, 1993.
21. Zanjirband, M., Golbang, N. and Kermanshahi, R. K. Detection of the ectC gene in *Halomonas* strains by polymerase chain reaction. Iranian Journal of Biotecnology. July 6 (3): 181-185, 2008.