

معرفی باکتری‌های مقاوم به نیکل دریاچه نمک حاج علی قلی خان 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

میکروارگانیزم‌های نمک دوست و تحمل کننده ی نمک، در تطابق با تنش محیط، توانایی تولید مولکول‌های فعال زیستی را دارند. همچنین نقش میکروارگانیزمها در زیست پالایی فلزات سنگین از جمله نیکل؛ که امروزه در مناطق شهری جزء آلوده کننده های مهم آبهای سطحی و زیر سطحی به شمار میرود، شناخته شده است. هدف از این مطالعه، بررسی توانایی تولید مولکول‌های فعال زیستی بر اساس تنوع ژن *PKS* در میکروارگانیزم‌های 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. میکروارگانیزمها از سه محیط کشت اختصاصی نمک دوستها *MH*، *SWN* و *MGM* به ترتیب با ۱۰، ۲ و ۲۳ درصد نمک جدا شدند. سپس میکروارگانیزمهای مقاوم به عنصر نیکل غربال گردیدند. در مرحله آخر توانایی میکروارگانیزمهای مقاوم به نیکل در تولید متابولیت‌های ثانویه با کمک آغازگرهای اختصاصی درون ژنی *PKS* مورد بررسی قرار گرفت. از میکروارگانیزمهای 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 داد که 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 دارند که با توجه به مقاومت علیه فلز نیکل و توانایی در تولید محصولات پلی کتاید سنتتازی میتوانند در زمینه زیست فناوری مورد استفاده قرار گیرند.

واژه های کلیدی: پلی کتاید، ترکیبات فعال، دریاچه حاج علی قلی خان، نیکل، هالتولرنت، هالوفیل

مقدمه

امروزه در سراسر جهان، با توسعه فن آوری، فلزات سنگین در خاک و آب مناطق شهری، تجمع یافته اند. 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 سازمان های 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 می باشد (Nordberg et al., 2014).

اثر سمیت نیکل در میکروارگانیسم های 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 میکروارگانیسم ها در زیست پالایی فلزات سنگین (Lopes et al., 2005)، در این پژوهش، امکان تولید ترکیبات فعال در میکروارگانیسم های مقاوم به فلز نیکل مورد بررسی قرار گرفت.

میکروارگانیسم ها، خوشه های ژنی متنوعی برای تولید متابولیت ثانویه دارند. مطالعات بر روی این خوشه های ژنی نشان داده است که در بین آنها ژن های پلی کتاید سنتتاز (PKS) و پپتیدهای غیرریبوزومی (NRPS) پراکندگی بیشتری

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

خوشه‌های ژنی PKS ها شامل ماژول‌های با فعالیت‌های آنزیمی متعدد هستند. هر ماژول PKS حداقل سه حوزه مربوط به ketosynthase (KS)، acyltransferase (AT) و پروتئین حامل آسیل (ACP) را کد میکند. از معروفترین آنزیم‌های PKS می‌توان به enoylreductase، دهیدراتاز و ketoreductase اشاره نمود. این آنزیم‌ها زیرواحدهای ساختاری را پی در پی قرار میدهند که منجر به تولید گستره متنوعی از مولکولهای زیستی فعال با نقش‌های ضد باکتریایی، ضد قارچی، ضد ویروسی و حتی ترکیبات ضد سرطان می‌گردند. بنابراین غربالگری میکروارگانیسم‌ها برای حضور ژنهای PKS می‌تواند بیانگر توانایی آنها در تولید ترکیبات فعال زیستی باشد (Ayuso-Sacido and Genilloud 2005).

جهت دستیابی به هدف این پژوهش، غربالگری باکتری‌های جدا شده از خاکهای شور دریاچه نمک حاج‌علی‌قلی‌خان برای جداسازی باکتریهای مقاوم به نیکل انجام گرفت. سپس امکان تولید ترکیبات فعال در این باکتریها، که احتمالاً "توان زیست‌پالایی نیکل" را نیز دارند، با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن‌های PKS بررسی گردید.

ماده و روش

نمونه برداری

نمونه‌برداری از خاک، نمک و آب منطقه جنوب غربی دریاچه نمک حاج‌علی‌قلی‌خان (دامغان-سمنان) در طی دو مرحله به ترتیب در اواخر آبان و اوایل اسفندماه سال ۱۳۹۲ انجام و نمونه‌ها در شرایط سترون و دمای مناسب به آزمایشگاه منتقل شدند.

بررسی شیمیایی آب و خاک دریاچه نمک

بررسی شیمیایی نمونه‌های خاک برای تعیین مقدار عناصر مس، کادمیم، کبالت و نیکل در دانشکده شیمی دانشگاه سمنان با روش طیف سنجی جرمی (Agilent Technology AA 200 Series) انجام شد.

کشت، جداسازی و خالص‌سازی باکتری‌ها

نمونه‌های خاک دریاچه پس از تهیه سری رقت در محلول ۰/۹% کلرید سدیم در دور ۱۸۰ rpm به مدت ۴ ساعت، از رقت‌های 10^{-2} تا 10^{-6} بر روی محیط‌های SWN (Jookar et al., 2014) و MH، MGM (Vreeland 2012) (Amoozegar et al., 2008) به ترتیب با ۲۳ درصد، ۱۰ درصد، و ۲ درصد نمک و PH ۷/۲ کشت گردیدند. رشد کلنی‌ها روی محیط‌های جامد در دوره‌های زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت به مدت ۱۴ روز بررسی و بدنبال آن خالص‌سازی صورت گرفت. خلوص هر جدایه با استفاده از بررسی

ریخت‌شناسی کلنی و نیز رنگ‌آمیزی گرم تأیید 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 میکروارگانیزم، رنگ آمیزی گرم، وجود اسپور) و برخی از ویژگی‌های بیوشیمیایی از جمله آزمایش حرکت، کاتالاز، اکسیداز و میزان نمک دوستی مورد بررسی قرار گرفتند. جدایه‌های خالص شده در گلیسرول 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) با روش 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، ۶، ۱۲ میلی مولار سولفات نیکل بر رشد جدایه‌ها بررسی گردید. در روش لکه‌گذاری، محیط کشت جامد غلظت نهایی ۰، ۰/۵، ۱، ۲، ۳، ۵، ۷ و ۱۰ میلی مولار سولفات نیکل رقت‌های 10^{-3} و 10^{-6} 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 ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری 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 با RNase 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 پلیمران و آغازگرهای دژنره‌ی ژن‌های (SB-540F / SB-1100R Wawrik et al., 2005, Le (et al., 2014) (Moffitt and Neilan 2001, Ehrenreich et al., 2005, Chau et al., 2013) DKR / DKF PKSII: به شرح جداول ۱ و ۲ انجام گرفت.

جدول ۱: نام و توالی آغازگرهای بکار برده شده در این پژوهش

(F: آغازگر پیشرو، R: آغازگر بازگشتی)

| نام آغازگر | توالی آغازگر | ژن هدف |
|------------|-----------------------------------|--------|
| SB-۵۴۰F | ۵'-GGX TGC ACS TCX GGX MTS GAC-۳' | PKS |
| 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' | |

جدول ۲: برنامه دمایی مورد استفاده در واکنش برای آغازگرهای DKF/ DKR و SB-SB / ۵۴۰F-

۱۱۰۰R جهت تکثیر قطعات ژن پلی کتاید سنتاز

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

نتایج

بررسی شیمیایی خاک دریاچه

pH نمونه‌های آب، ۷/۲ و خاک ۷/۳ بود. نتایج بررسی شیمیایی خاک غلظت نیکل را ppm ۱/۰۱ نشان داد. در حالی که غلظت منگنز ۳/۴۷ و یون سدیم ppm ۸۶۹/۷۵ 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 میکروارگانیزم 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 جدایه‌ها به نیکل

میزان مقاومت میکروارگانیسم‌ها به نیکل با روش میکروپلیت در جدایه‌های رشد یافته بر روی محیط MGM و MH نشان داد که اکثر جدایه‌ها به نیکل مقاوم است. بطوریکه حدود ۶۵٪ این جدایه‌ها در غلظت ۶ میلی مولار نیکل توانایی رشد دارند و ۵٪ این جدایه‌های هالوتولرانت در غلظت ۱۲ میلی مولار نیکل رشد کردند.

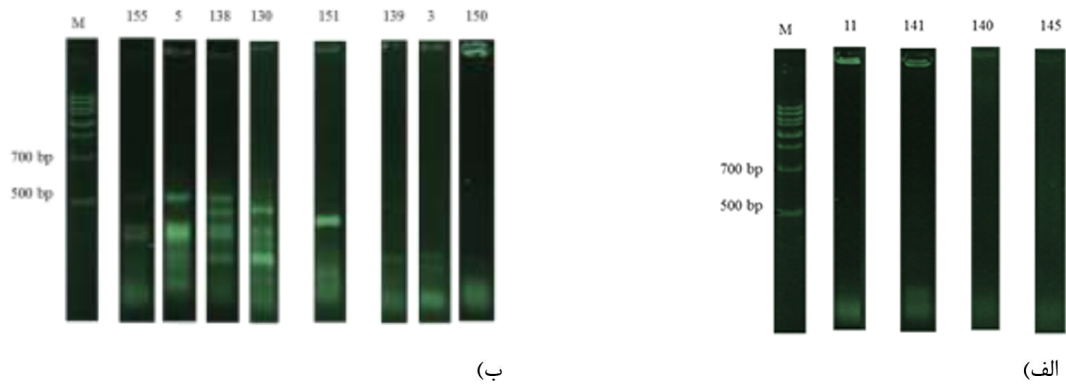
غربالگری جدایه‌های مقاوم به فلز نیکل در غلظت‌های مختلف سولفات نیکل بر اساس میلی مولار با روش لکه‌گذاری در شکل ۱ نشان داده شده است. نتایج نشان داد که ۲۷ درصد سویه‌ها تا غلظت ۷ میلی مولار نیکل را تحمل کردند. جدایه‌های شماره ۱۱، ۱۵۰، ۱۴۱، ۱۵۵ و ۱۴۵ تا غلظت بیش از ۵ و کمتر از ۱۲ میلی مولار نیکل را توانستند تحمل کنند ولی جدایه شماره ۵ تنها تا غلظت ۰/۵ میلی مولار و جدایه شماره ۱۳۵ 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، ۱۵ جدایه مقاوم و حساس به صورت اتفاقی انتخاب شدند. نتایج حاصل از تکثیر قطعات DNA با آغازگرهای F540, R1100 پیشرو و بازگشتی تقریباً ۳ طرح متفاوت و مشخص را نشان داد (شکل ۲ الف). طرح اول در جدایه‌های شماره ۱۵۵، ۵، ۱۳۸ و ۱۳۰ شامل قطعاتی با طول‌های متفاوت از حدود ۱۵۰ تا ۶۰۰ جفت باز ظاهر گردید. طرح دوم فقط در جدایه شماره ۱۵۱ با قطعه مشخص حدود ۴۰۰ جفت بازی و قطعات حدود ۲۰۰ جفت بازی مشاهده شد. و جدایه‌های شماره ۱۳۹، ۳، و ۱۵۰ شامل قطعاتی با طول‌های متفاوت از حدود ۱۵۰ تا ۲۰۰ جفت باز، طرح سوم الکتروفورزی در این مطالعه بود (شکل ۲ ب). بعلاوه، الکتروفورز قطعات DNA تکثیر شده با آغازگرهای پیشرو و بازگشتی RF۵۴۰، ۱۱۰۰ در جدایه‌های شماره ۱۱، ۱۴۱، ۱۴۰ و ۱۴۵ هیچ محصول مشخصی را نشان نداد.

تکثیر DNA جدایه‌ها با آغازگرهای پیشرو و بازگشتی DKF DKR، فقط در جدایه‌های شماره ۱۵۰ و ۱۳۵ منجر به تکثیر قطعاتی با طول‌های متفاوت از حدود ۳۰۰ تا ۲۰۰۰

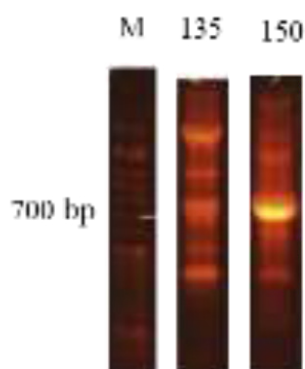
جفت باز گردید (شکل ۳). تکثیر DNA بقیه باکتری‌های مورد آزمایش با آغازگرهای پیشرو و بازگشتی DKF DKR, نتیجه‌ای به همراه نداشت.



شکل ۲: 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، ۱۳۸ و 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 ۲۰۰ جفت باز بود (۱ kb M شرکت کیاژن).

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



شکل ۳: الکتروفورز قطعات DNA تکثیر شده با آغازگرهای پیشرو و بازگشتی DKF DKR، طرح‌های الکتروفورزی در جدایه‌های ۱۵۰ و ۱۳۵ شامل قطعاتی با طول‌های متفاوت از حدود ۳۰۰ تا ۲۰۰۰ جفت 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؛ MH، SWN، MGM، استفاده شد (Mehreshad 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 باکتری‌های دریاچه نمک آران و بیدگل ۸۳ سویه نمک‌دوست نسبی جدا کردند که ۴۴ 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 (Mehreshad et al., 2012). این نتایج با نتایج به دست آمده در پژوهش حاضر بخاطر شرایط محیطی بسیار مشابه، نزدیک‌تر است. Bagheri و همکاران (۲۰۱۲) یک گونه جدید از باسیلوس‌ها را به نام *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 محیط‌های 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، به طوری که تنوع زیستی هر زیستگاه از ویژگی‌های منحصربه‌فرد آن محسوب می‌شود (Oren 2002, Roberts 2005, Oren 2006).

در نتایج غربالگری برعلیه مقاومت به نیکل، به روش لکه‌گذاری در محیط‌کشت جامد، بیشتر جدایه‌ها 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 می‌گردد (Amoozegar et al., 2005). نتایج مطالعات Rathgeber (Rathgeber et al., 2009) (Hedi et al., 2009) (Hedi 2009) (Mohabat (Mohammadzadeh et al., 2014) (Rathgeber et al., 2002) (2002) نیز موید این واقعیت است که میکروارگانیسم‌های هالوفیل و یا هالوتولرانت به واسطه حضور وسیع پمپ‌های 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 زیست‌فناوری دارا باشند (Amoozegar, Salehghamari, et al., 2008, Wang et al., 2009).

این در حالی است که نتایج حاصل از بررسی مولکولی بر روی میکروارگانیسم‌های جدا شده 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 جدا شده 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 ژن‌های (PKS) تولید کننده آنزیم پلی‌کتاید سنتتاز هستند. انتخاب آغازگرهای مورد استفاده در این پژوهش برای غربالگری دامنه‌ی گسترده‌ای از میکروارگانیسم‌های دارای این ژن‌ها 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 تأثیر این تنش فعال می‌گردند (Timsina, B. et al., 2009). Haferburg et al., 2009) 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 در گل‌سنگ، 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 می‌یابد. 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 محیط‌های غنی‌تر بوده است. به بیان دیگر تنش‌های محیطی و pH قلیایی که می‌تواند نشانه‌ای از حضور نمک‌های فلزات مختلف باشد در افزایش تعداد متابولیت‌های ثانویه تأثیر مثبت دارد (Timsina et al., 2013).

در این پژوهش بررسی توانایی تولید ترکیبات فعال زیستی در برخی جدایه‌های 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 باکتری ها، طراحی آغازگرهایی با توان معرفی تعداد بیشتری از این ماژول ها را ضروری می نماید.

نتیجه گیری

نتایج این پژوهش نشان داد که باکتری های مقاوم به فلز نیکل جدا شده در این پژوهش دارای توانایی ساخت ترکیبات فعال زیستی بالاتری نیز هستند. به نظر می رسد که میکروارگانیسم ها با سنتز متابولیت های ثانویه، عمل سم زدایی را به صورت لیگاند شدن با عناصر سنگین انجام می دهد. همانطور که نتایج حاصل از این پژوهش، تنوع توالی ژن های PKS در جدایه های مقاوم به نیکل این فرضیه را تایید می کند.

سپاسگزاری

این پژوهش با حمایت معاونت پژوهشی دانشگاه سمنان به انجام رسید. از آقای دکتر علیرضا 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.
- Amoozgar, M., Hamedi, J., Dadashpour, 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.
- Amoozgar, 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 Karbalaee-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) *Bacillus 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 Biotechnology 16(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.