Journal of Microbial World
Volume 16, No. 2, September 2023

Original Article

Isolation and characterization of heavy metal resistant halophilic and halotolerant bacteria from the Lut desert

Nazanin Tavoosi[1], Abbas Akhavan Sepahy[2], Mohammad Ali Amoozegar[3], Vahid Kiarostami[4]

[1]Ph.D student, Department of Microbiology, Faculty of Biological Sciences, Islamic Azad University, North Tehran Branch, Tehran, Iran. [2]Professor, Department of Microbiology, Faculty of Biological Sciences, Islamic Azad University, North Tehran Branch, Tehran, Iran. [3]Professor, Department of Microbiology, School of Biology and Center of Excellence in Phylogeny of Living Organisms, College of Science, University of Tehran, Tehran, Iran. [4]Associate Professor, Department of Chemistry, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University, North Tehran Branch, Tehran, Iran.

Abstract

Background & Objectives: Heavy metal pollution has increased worldwide. Bioremediation of toxic heavy metals in saline environments with conventional microbiological treatment processes is not feasible. Therefore, the use of halophilic and halotolerant bacteria need to be considered for the remediation of saline ecosystems. This study aimed to isolate and characterize toxic heavy metal-resistant and halophilic/halotolerant bacteria from the Lut desert.

Materials & Methods: After sampling, halophilic/halotolerant bacteria were isolated on Moderate Halophilic media. Morphological and biochemical characterizations of isolates were carried out. Each isolate's heavy metal resistance was identified by an agar dilution method and the Minimum Inhibitory Concentrations (MIC) of each heavy metal was determined. Then, sixteen strains were randomly selected and subjected to 16S rRNA gene identification.

Results: The least toxicities were found with selenite and arsenate on 74 selected isolates, while mercury exhibited the highest toxicity. The maximum MIC values of cadmium, copper, and chromium were the same. Although, the MIC value of zinc was significantly less. The remarkable resistance toward lead, selenite, and arsenate was reported. Phylogenetic analysis revealed that most strains belong to the Bacillaceae family and Bacillus genus.

Conclusion: Selected halophilic/halotolerant bacteria from the Lut desert had considerable resistance to heavy metals. Therefore, these strains could be considered for further investigations of the mechanisms involved in heavy metal resistance of halophilic and halotolerant bacteria or for bioremediation of polluted saline environments.

Keywords: Halophilic bacteria, Halotolerant bacteria, Toxic heavy metal resistance, MIC, Bioremediation.

Received: 9 May 2023 Revised: 19 June 2023 Accepted: 23 August 2023

Correspondence to: Abbas Akhavan Sepahy
Tel: +98 2177009800
E-mail: Akhavansepahy@gmail.com
Journal of Microbial World 2023, 16(2): 102 - 118
DOI:10.30495/jmw.2023.1968233.2039

Copyright © 2019, This article is published in Journal of Microbial World as an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License. Non-commercial, unrestricted use, distribution, and reproduction of this article is permitted in any medium, provided the original work is properly cited.

مجله دنیای میکروب‌ها
سال شانزدهم شماره دوم (پیاپی ۵۵) تابستان ۱۴۰۲
صفحات ۱۱۸-۱۰۲

Original Article

جداسازی و شناسایی باکتری‌های نمک دوست و تحمل کننده نمک مقاوم به فلزات سنگین از کویر لوت

نازنین طاوسی[۱]، عباس اخوان سپهی[۲*]، محمدعلی آموزگار[۳]، وحید کیارستمی[۴]

[۱] دانشجو دکتری، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران. [۲] استاد، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران. [۳] استاد، بخش میکروبیولوژی، دانشکده زیست شناسی، پردیس علوم، دانشگاه تهران، تهران، ایران. [۴] دانشیار، بخش شیمی، دانشکده شیمی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

چکیده

سابقه و هدف: آلودگی فلزات سنگین در سراسر جهان رو به افزایش است. پاکسازی این فلزات با روش‌های مرسوم میکروبیولوژی در محیط‌های شور مؤثر نبوده و بنابراین استفاده از باکتری‌های نمک دوست و تحمل کننده نمک برای پاکسازی این محیط‌ها مورد نیاز است. هدف از این مطالعه جداسازی و شناسایی باکتری‌های نمک دوست و تحمل کننده نمک مقاوم به فلزات سنگین از کویر لوت بود.

مواد و روش‌ها: پس از نمونه‌برداری، باکتری‌های نمک دوست و تحمل کننده نمک با استفاده از محیط کشت Moderate Halophilic جداسازی شدند. مشخصات مورفولوژیک و بیوشیمیایی بررسی و مقاومت سویه‌ها به فلزات سنگین با استفاده از روش رقت آگار برای تعیین کم‌ترین غلظتی از فلز سنگین که از رشد جلوگیری می‌نماید (MIC) سنجیده شد. سپس شانزده سویه به صورت تصادفی انتخاب و با تعیین ترادف ژن 16S rRNA شناسایی شدند.

یافته‌ها: سلنیت و آرسنات کمترین و جیوه بیشترین سمیت را بر روی ۷۴ جدایه داشتند. حداکثر مقاومت به کادمیم، مس و کروم تقریبا یکسان بود، اما حساسیت به روی بسیار بیش تر بود. مقاومت شایان توجهی نسبت به سرب، سلنیت و آرسنات در برخی سویه‌ها گزارش شد. مطالعات فیلوژنتیک مشخص نمود که اکثر سویه‌ها از خانواده باسیلاسه و جنس باسیلوس بودند.

نتیجه‌گیری: با توجه به مقاومت قابل ملاحظه برخی از سویه‌های نمک دوست به فلزات سنگین می‌توان در مطالعات آتی از آن‌ها در بررسی عوامل مقاومت و یا پاکسازی محیط‌های شور آلوده استفاده نمود.

واژگان کلیدی: باکتری‌های نمک دوست، باکتری‌های تحمل کننده نمک، مقاومت به فلزات سنگین، MIC، پاکسازی زیستی.

دریافت مقاله: ۱۴۰۲/۲/۱۹ ویرایش مقاله: ۱۴۰۲/۳/۲۹ پذیرش مقاله: ۱۴۰۲/۶/۱

مقدمه

فلزات سنگین سمی از طریق بسیاری از فعالیت‌های صنعتی مانند: احتراق سوخت‌های فسیلی، معدن کاوی، خالص‌سازی سنگ معدن، فاضلاب صنایع، زباله‌های پزشکی و خانگی و همچنین وقایع طبیعی همانند: فوران آتش فشان‌ها، هوازدگی و فعالیت‌های بیولوژیکی وارد محیط زیست شده و منجر به آلودگی‌های شدید زیست محیطی می‌گردند (۱).

با توجه به این که فلزات سنگین سمی توسط هیچ یک از روش‌های فیزیکی و شیمیایی مرسوم تجزیه نمی‌گردند، بنابراین قادرند مدت زمان زیادی در محیط زیست باقی بمانند

*) آدرس برای مکاتبه: گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، تهران، ایران
تلفن: ۰۲۱۷۷۰۰۹۸۰۰ پست الکترونیک: Akhavansepahy@gmail.com

حقوق نویسندگان محفوظ است. این مقاله با دسترسی آزاد و تحت مجوز مالکیت خلاقانه (http://creativecommons.org/licenses/bync/4.0/) در فصلنامه دنیای میکروب‌ها منتشر شده است. هرگونه استفاده غیرتجاری فقط با استناد و ارجاع به اثر اصلی مجاز است.

و در نتیجه منجر به آلودگی خاک، آب، رسوبات و هوا گردند. همچنین، تجمع زیستی فلزات سنگین سمی در زنجیره‌های غذایی می‌تواند روی فعالیت‌های فیزیولوژیکی موجودات زنده تأثیرگذار باشد (۲).

فلزات سنگین مانند: آهن، روی، مس، منگنز، نیکل و کبالت از جمله عناصر کمیاب ضروری بوده که در مقادیر کم در فعل و انفعالات بیوشیمیایی ارگانیسم‌های زنده نقش حائز اهمیتی را ایفا می‌نمایند. در حالی که سایر فلزات سنگین مانند: کادمیم، آرسنیک، سرب و جیوه به دلیل ماهیت سمی که دارند حتی در غلظت‌های بسیار کم نیز می توانند منجر به بیماری‌ها و اختلالات متعددی در موجودات زنده گردند (۳).

به طور مثال کادمیم، جیوه و آرسنیت با اتصال به گروه‌های سولفیدریل پروتین ها منجر به اختلال در عملکرد این بیومولکول‌ها و تغییر در ساختار آن‌ها می‌گردند. آرسنات نیز می‌تواند در فرایندهای ضروری سلول مانند فسفریلاسیون اکسیداتیو و سنتز ATP تداخل ایجاد نماید. به طور کلی، قرار گرفتن در معرض فلزات سنگین سمی می‌تواند منجر به بیماری‌های کشنده متفاوتی مانند: نقص سیستم ایمنی، سرطان، مشکلات تنفسی، آسیب کلیه، دیابت، اختلال در سیستم عصبی، غدد و گردش خون گردد (٤).

روش‌هایی که به طور مرسوم در پاکسازی این فلزات از محیط زیست مورد استفاده قرار می‌گیرند مانند: رسوب‌گذاری شیمیایی، استخراج حلال، تبادل یون، اسموزیس وارونه و احیاء تبخیری اغلب منجر به آلودگی‌های ثانویه گشته، از نظر اقتصادی پر هزینه بوده و در بسیاری از موارد نا کارآمد می‌باشند. از طرف دیگر، روش‌های پاکسازی زیستی که در آن‌ها میکروارگانیسم‌ها برای کاهش و یا سم زدایی آلاینده‌های سمی به اشکال بی ضرر و یا کم خطرتر مورد استفاده قرار می‌گیرند، از نظر اقتصادی مقرون به صرفه بوده، منجر به تولید آلودگی‌های ثانویه نگشته، پایدارتر بوده و همچنین به راحتی قابل انجام می‌باشند (۵).

آلودگی محیط‌های زیست شور با فلزات سنگین سمی، به طور معمول در اثر تجمع نمک در طول فرایند تبخیر و یا در نتیجه فعالیت‌های صنعتی صورت می‌گیرد. بنابراین میکروارگانیسم‌هایی که در این اکوسیستم‌ها رشد می‌نمایند تحت تأثیر استرس شوری زیاد و فلزات سنگین قرار گرفته و باید قادر به تحمل این استرس‌ها باشند (٦).

پاکسازی محیط‌های زیست شور و پرشور با میکروارگانیسم‌هایی که به طور رایج در پاکسازی زیستی مورد استفاده قرار می‌گیرند امکان پذیر نبوده، زیرا مقادیر زیاد نمک ممکن است منجر به تداخل در تعادل فشار اسمزی این میکروارگانیسم‌ها شده و یا باعث از بین رفتن ساختار آنزیم‌های متابولیکی آن‌ها گردد (۷).

لذا، با توجه به این امر که باکتری‌های نمک دوست و تحمل کننده نمک، در چرخه‌های بیوژئوشیمیایی فلزات در محیط‌های شور نقش مهمی را ایفا می‌نمایند و همچنین، قادرند در محدوده وسیعی از غلظت‌های نمک به رشد و بقاء خود ادامه دهند. جداسازی و شناسایی سویه‌های نمک دوست و تحمل کننده نمک که برای پاکسازی و بررسی‌های زیستی محیط‌های شور طبیعی و یا ساخت بشر و آلوده به فلزات سنگین سمی کارآمد باشند، به عنوان امری ضروری و کاربردی تلقی می‌گردد (٦و۷).

کویر لوت، در جنوب شرقی ایران واقع شده و دارای آب و هوای بسیار گرم و خشک می‌باشد. این کویر مساحتی بیش از ۲×۱۰^{۵} کیلومتر مربع داشته و به عنوان بیست و پنجمین کویر بزرگ دنیا محسوب می‌گردد. علاوه بر آب و هوای بسیار گرم و خشک از دیگر ویژگی‌های منحصر به فرد این منطقه وجود مقادیر بسیار زیاد نمک می‌باشد که سبب ایجاد شوره زارهای مختلف در آن شده است. همچنین، یک رودخانه شور به صورت دائمی در این کویر به نام رود شور جریان داشته که از شمال تا جنوب آن گسترده شده است. رود شور، از شورترین آب‌های جهان بوده و حاوی املاح معدنی بسیار زیادی می‌باشد (۸).

تاکنون مطالعات زیادی برای بررسی تنوع اکولوژیکی میکروارگانیسم‌ها در اکوسیستم‌های مختلف شور و پرشور ایران صورت گرفته است (۹و۱۰و۱۱). اما مطالعات در مورد تنوع

اکولوژیکی میکروارگانیسم‌ها در کویر لوت بسیار نادر بوده و تاکنون مطالعه‌ای راجع به بررسی مقاومت سویه‌های باکتریایی نمک دوست و تحمل کننده نمک این ناحیه نسبت به فلزات سنگین مختلف صورت نگرفته است (۱۲).

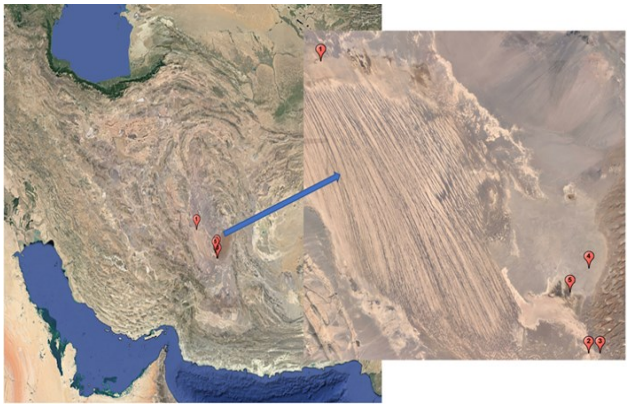
این پژوهش با هدف جداسازی باکتری‌های نمک دوست و تحمل کننده نمک از پنج ناحیه متفاوت کویر لوت، سنجش میزان مقاومت باکتری‌های جداسازی شده به غلظت‌های متفاوت هشت فلز سنگین سمی آرسنات (As^{5+})، سلنیت (Se^{4+})، سرب (Pb^{2+})، کادمیم (Cd^{2+})، جیوه (Hg^{2+})، مس (Cu^{2+})، روی (Zn^{2+})و کرومات (Cr^{6+})، شناسایی مولکولی سویه‌ها و همچنین مقایسه مقاومت به فلزات سنگین سمی در باکتری‌های جدا سازی شده صورت گرفت.

مواد و روش‌ها

الف) مواد شیمیایی: فلزات مورد نیاز برای انجام آزمایش‌ها به صورت پتاسیم کرومات (K2CrO4)، سولفات مس (CuSO4)، سولفات روی (ZnSO4.7H2O)، سدیم آرسنات (Na2HasO)، نیترات سرب (Pb(NO3)2)، کلرید جیوه (HgCl2)، نیترات کادمیم (Cd(NO3)2.4H2O) از شرکت مرک (E. Merck, Darmstadt, Germany) تهیه شد و سدیم سلنیت (Na2SeO3) نیز از شرکت سیگما (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany) خریداری شد. تهیه محلول‌های مورد نیاز از مواد شیمیایی با حل نمودن میزان مناسب از فلز در آب مقطر و سپس فیلتر کردن به وسیله فیلترهایی با منافذ ۰/۲۲ میکرومتر صورت گرفت.

پس از آن، غلظت‌های مورد نظر برای انجام آزمایشات آماده شده و در دما چهار درجه سلسیوس، در یخچال به مدت پنج روز نگه‌داری شد (۱۳).

ب) نمونه برداری: نمونه‌های خاک از پنج منطقه مختلف کویر لوت جمع‌آوری شد. انتخاب این مناطق بر اساس ویژگی‌های ظاهری خاک و نقاط قابل نمونه‌برداری بود. مشخصات جغرافیایی مناطق نمونه‌برداری با استفاده از GPS ثبت شد (شکل ۱).



شکل ۱: موقعیت جغرافیایی کویر لوت و مناطق نمونه‌برداری در نقشه گوگل.

نمونه‌های جمع‌آوری شده از هر منطقه درون کیسه‌های پلاستیکی و لوله‌های فالکون استریل ریخته و در دمای ٤ درجه سلسیوس و در کمترین زمان ممکن به آزمایشگاه منتقل شد. دما و pH نمونه‌ها در محل نمونه‌برداری اندازه‌گیری و ثبت شد. میزان شوری نمونه‌ها نیز با دستگاه مالتی متر دیجیتال شرکت متلر تولدو (Mettler Toledo) اندازه‌گیری شد.

ج) کشت، جداسازی و خالص سازی باکتری‌های نمک دوست و تحمل کننده نمک: برای جداسازی باکتری‌های نمک دوست و تحمل کننده نمک از نمونه‌های خاک، سری رقت‌های متوالی تا رقت 10^{-10} تهیه شد و از رقت‌های به‌دست آمده میزان ۱۰۰ میکرولیتر به محیط کشت تغییر یافته Moderate Halophilic Medium (MH) با ۱۰ درصد نمک شامل ترکیبات به میزان گرم بر لیتر peptone ; (2) KCl; (80) NaCl; (7) MgCl2 from meat (PM) (5) ;MgSO4 (8) agar(20) ;yeast extract (10) (YE) تلقیح و با استفاده از میله شیشه‌ای سرکج در سطح پلیت پخش شد (١٤). سپس، پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرم‌خانه‌گذاری شده و کلنی‌های رشد کرده روی محیط (١٠٪) MH در دوره‌های زمانی ٢٤، ٤٨ و ٧٢ ساعت جداسازی و خالص سازی شدند (۱۳).

د) بررسی ویژگی‌های ریخت شناسی، فیزیولوژیک و بیوشیمیایی: سویه‌های جدا سازی شده از نظر مشخصات ریخت شناسی کلنی‌ها مانند: شکل، اندازه، رنگ، قوام، حاشیه و برآمدگی سطحی بررسی شدند. رنگ‌آمیزی گرم بر اساس

روش Hucker انجام شده و شکل میکروسکوپی سویه‌ها با استفاده از میکروسکوپ نوری (OLYMPUS CX31, Japan) مطالعه شد (۱۵).

همچنین، به منظور سنجش محدوده رشد سویه‌ها از محیط‌های جامد MH با درصدهای نمک ۰، ۱، ۵، ۱۰ و ۲۳ استفاده شد.

ز) تعیین مقاومت سویه‌های نمک دوست و تحمل کننده نمک به فلزات سنگین سمی: میزان تحمل سویه‌های نمک دوست به فلزات سنگین سمی با استفاده از روش رقت آگار تعیین شد (۱۳). بدین منظور از محیط کشت جامد تغییر یافته Sea Water (SW)با ۱۰ درصد نمک شامل ترکیبات به میزان گرم بر لیتر: yeast ; (20) agar NaCl(80); (8) $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; (7) $MgCl_2 \cdot 6H_2O$; (2) KCl; (1) extract (YE) که با غلظت‌های متفاوت فلزات سنگین تکمیل شده بود استفاده شد. فلزات سنگین در غلظت‌های ۱، ۲، ٤، ۸، ۱٦، ۳۲ و ٦٤ میلی‌مولار تهیه شدند به استثناء فلز جیوه که به دلیل ماهیت بسیار سمی آن، غلظت‌های ۰/۵، ۱ و ۱/۵ میلی‌مولار از این فلز تهیه شد (۱٦و۱۷).

محیط‌های آماده شده به درون پتری دیش‌ها ریخته شدند و سپس میزان مناسبی از کشت ۲٤ ساعت سلول‌های باکتریایی تلقیح شده و در سطح هر پلیت پراکنده شدند. پس از آن پلیت‌ها به مدت ۷۲ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سلسیوس قرار داده شدند و میزان مقاومت هر سویه نسبت به هریک از فلزات سنگین سمی سنجیده شد. کمترین غلظتی از فلز سنگین سمی که به طور کامل از رشد سویه‌های باکتریایی نمک دوست و یا تحمل کننده نمک جلوگیری کرد به‌عنوان MIC (Minimum Inhibitory Concentration) در نظر گرفته شد.

برای سنجش تکرار پذیری از هر پلیت سه عدد آماده شد. همچنین، به‌عنوان کنترل مثبت، هر یک از سویه‌ها در محیط کشت (۱۰٪) SW فاقد فلز سنگین کشت داده شدند.

ح) شناسایی مولکولی و آنالیز فیلوژنتیکی سویه‌ها: برای تکثیر و تعیین توالی نوکلئوتیدی ژن 16S rRNA از بین سویه‌های جداسازی شده، شانزده سویه به صورت تصادفی انتخاب شدند. بدین منظور، استخراج DNA ژنومی سویه‌های منتخب با استفاده از روش تغییر یافته Marmur به شرح زیر صورت گرفت (۱۸).

توده زیستی فراهم شده از هر یک از سویه‌های نمک دوست و تحمل کننده نمک در بافر TEحل شد. سپس، به منظور شکستن دیواره سلولی باکتری میزان ۲۰ میکرولیتر لیزوزیم (۱میلی‌گرم در میلی‌لیتر) اضافه شده و به مدت ۳۰ دقیقه در انکوباتور ۳۷ درجه سلسیوس گرم‌خانه‌گذاری شد.

در مرحله بعد میزان ۱۰۰ میکرولیتر SDS افزوده شده و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سلسیوس قرار داده شد. سپس، ۱۰۰ میکرولیتر محلول سدیم کلرید ۵ مولار اضافه و در آون ٦۵ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ دقیقه قرار داده شد. پس از طی این دوره، به منظور خالص‌سازی DNA، در زیر هود شیمیایی هم حجم محلول به‌دست آمده فنل کلروفرم اضافه شد و پس از چند بار معکوس کردن با دور۱۱۵۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ انجام گرفت. سپس، لایه بالایی به آرامی برداشته شده و به آن ایزوپروپانول اضافه شد. پس از گذشت یک شبانه روز، در دور ۱۱۵۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ صورت گرفت و به رسوب به دست آمده ۲۰۰ میکرولیتر اتانول ۷۰ درصد اضافه شد و مجدداً در ۱۱۵۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. پس از خارج کردن مایع رویی، رسوب نهایی در دمای اتاق خشک شده و در ۲۰۰ میکرولیتر بافر TE حل شد. در نهایت، استخراج DNA ژنومی با استفاده از روش الکتروفورز ژل آگارز تأیید شد. برای تکثیر قطعه ژنومی 16S rRNA از آغازگرهای عمومی ۲۱ F (5¢-TTCCGGTTGATCCTGCCGGA-3¢) و R ۱٤۹۲ (5¢-GGTTACCTTGTTACGACTT-3¢) استفاده شد.

برای تهیه مخلوط واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز به حجم ۳۰ میکرولیتر، DNA الگو به میزان یک میکرولیتر، آغازگرهای عمومی رفت و برگشت هر کدام به میزان یک میکرولیتر، محیط بافری با غلظت نهایی 1X، ۱/۵ میلی‌مولار MgCl2، dNTP با غلظت ۰/٤ میلی‌مولار از هر کدام، آنزیم TaqDNA پلی‌مراز به میزان 1U و از آب مقطر استریل ۱۲ میکرولیتر استفاده شد.

برای حصول اطمینان از عدم آلودگی مواد نام‌برده، شاهد منفی با افزودن آب به جای DNA الگو در ویال حاوی مخلوط واکنش، مورد استفاده قرار گرفت.

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز برای سویه‌های باکتریایی نمک دوست و تحمل کننده نمک بدین شرح صورت گرفت: واسرشت اولیه به مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سلسیوس انجام شد. سپس چرخه تکثیر آغاز شد که شامل ۳۰ چرخه تکرار شونده با دمای ۹٤ درجه سلسیوس به مدت سی ثانیه، دمای اتصال ۵۷ درجه سلسیوس به مدت سی ثانیه و دمای سنتز ۷۲ درجه سلسیوس به مدت یک دقیقه بود. پس از اتمام چرخه‌ها و برای تکمیل نهایی ساختارهای تکثیر شده سنتز نهایی با دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. سپس از ژل الکتروفورز به منظور بررسی صحت واکنش و دستیابی به باند 16S rRNA سویه ها استفاده شد. پنج میکرولیتر از محصول PCR به همراه شاهد منفی PCR و شاخص وزن مولکولی با طیف ۳۰۰۰-۱۰۰ جفت باز روی ژل آگارز یک درصد بررسی شد.

خالص‌سازی و تعیین توالی محصول PCR توسط شرکت پیشگام صورت گرفت. نتایج حاصل از تعیین توالی با استفاده از نرم افزار Chromas pro ویرایش شده و با توالی‌های ثبت شده در پایگاه اطلاعات ژنومی EzBiocloud (www.ezbiocloud.net) مقایسه شد (۱۹). بدین ترتیب، نزدیک‌ترین سویه از نظر توالی 16S rRNAبا هر یک از سویه‌های توالی یابی شده، مشخص شد. انطباق توالی با استفاده از نرم افزار Clustal X2 صورت گرفت. تحلیل فیلوژنتیکی توالی‌های به‌دست آمده با یکدیگر و دیگر سویه‌ها در پایگاه اطلاعاتی Gen Bank و EzBiocloud با نرم افزار MEGA (نسخه دهم) و با روش Neighbour-joining بررسی شد.

بررسی شاخه‌های درخت با الگوریتم بوت استرپ با ۱۰۰۰ بار نمونه‌گیری انجام گرفت. توالی‌های به‌دست آمده از این پژوهش در بانک ژنی NCBI ثبت شدند و برای هر یک از سویه‌ها شماره دسترسی (Accession Number) گرفته شد.

ه) تجزیه و تحلیل داده‌ها: تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با سه بار تکرار و استفاده از نسخه بیست و پنجم نرم افزار SPSS و آزمون ANOVA انجام گرفت. مرز معنی‌داری در ($p<0/05$) محاسبه شد. نمودارها با استفاده از نرم افزار Prism نسخه هشتم رسم گردیدند.

یافته‌ها

الف) نمونه برداری و جداسازی باکتری‌های نمک دوست و تحمل کننده نمک: در نتیجه نمونه‌برداری از پنج ناحیه کویر لوت، هفتاد و چهار سویه باکتری نمک دوست و تحمل کننده نمک بر اساس تفاوت در ویژگی‌های اولیه مانند تفاوت در مشخصات کلنی و رشد جداسازی شدند. جدول ۱ ویژگی‌های خاک مناطق نمونه برداری شامل: موقعیت جغرافیایی، دما، pH، میزان شوری و فصل نمونه برداری را نشان می‌دهد.

جدول ۱: مشخصات مناطق مختلف نمونه برداری.

منطقه نمونه برداری	مختصات جغرافیایی	میانگین دما	pH میانگین	میانگین شوری (٪)	فصل نمونه برداری
۱	N 30° 53′ 10″ E 59° 04′ 05″	۳۸	۷/۱	۳	بهار
۲	N 29° 48′ 46.2″ E 59° 04′ 07″	٤۰	۷/۳	۵	بهار
۳	N 29° 48′ 46″ E 59° 06′ 52″	٤۰	۷/۳	۸	بهار
٤	N 30° 08′ 03″ E 59° 04′ 15″	٤۲	۷/٦	۱۲	تابستان
۵	N 30° 02′ 402″ E 58° 59′ 42″	٤۲	۷/۵	۲۳	تابستان

ب) شناسایی فنوتیپی سویه‌های نمک دوست و تحمل کننده نمک: هفتاد و چهار سویه جداسازی شده از نظر ویژگی‌های بیوشیمیایی و ریخت شناسی مورد مطالعه و بررسی قرار گرفتند. که از این میان ۲۲ سویه باسیل گرم منفی و ۵۲ سویه باسیل گرم مثبت بودند. و از میان ۵۲ سویه باسیل گرم مثبت، ۱۸ سویه متعلق به باسیل‌های گرم مثبت فاقد اسپور و ۳٤ سویه

به باسیل‌های گرم مثبت دارای اسپور بودند.

هفتاد و چهار سویه جداسازی شده، قادر به رشد در محیط کشت MH همراه با یک، پنج، ده و بیست و سه درصد نمک بودند. در حالی که در محیط MH فاقد نمک تنها چهل و دو سویه توانایی رشد داشتند که بر اساس طبقه‌بندی Kushner به عنوان سویه‌های تحمل کننده در نظر گرفته شدند (۲۰). و سی و دو سویه دیگر که قادر به رشد در عدم حضور نمک در محیط MH نبودند به عنوان سویه‌های نمک دوست دسته‌بندی شدند.

از میان بیست و دو سویه‌ی باسیل گرم منفی، دوازده سویه نمک دوست و ده سویه تحمل کننده نمک بودند. و از هجده سویه‌ی باسیل گرم مثبت فاقد اسپور، هشت سویه در گروه سویه‌های نمک دوست و ده سویه در گروه تحمل کننده‌های نمک دسته بندی شدند. از میان سویه‌های باسیل گرم مثبت دارای اسپور که فراوان‌ترین گروه را نیز در میان سویه‌های جداسازی شده تشکیل می‌دادند، دوازده سویه در طبقه نمک دوست‌ها و بیست و دو سویه در طبقه تحمل کننده نمک قرار گرفتند.

ج) *سنجش مقاومت به فلزات سنگین:* ترتیب مقاومت به کم ترین غلظت از فلزات سنگین (یک میلی‌مولار) میان هفتاد و چهار سویه باکتری مطالعه شده به صورت زیر بود.

$$Se^{4+} > As^{5+} > Cr^{6+} > Pb^{2+} > Cd^{2+} > Cu^{2+} > Zn^{2+} > Hg^{2+}$$

بیشترین تعداد سویه‌های مقاوم در غلظت یک میلی‌مولار، در مورد فلزات سلنیت و آرسنات مشاهده شد. به این صورت که از میان هفتاد و چهار سویه باکتری مورد بررسی، هفتاد سویه قادر به رشد در محیط MH (۱۰٪) حاوی یک میلی‌مولار سلنیت و یا آرسنات بودند. گرچه، میزان MIC به‌دست آمده در مورد فلز سلنیت نسبت به آرسنات به میزان قابل توجهی بیشتر بود و پنج سویه توانستند در حضور غلظت ۱۲۰۰ میلی‌مولار سلنیت در محیط کشت رشد نمایند. در حالی که، بیشترین میزان MIC محاسبه شده در مورد سویه‌های مقاوم به آرسنات ۸۰۰ میلی‌مولار بوده و این سویه‌ها در غلظت‌های بیشتر آرسنات در محیط کشت قادر به رشد نبودند.

در مقاومت به As^{5+} و Se^{4+} در میان باکتری‌های گرم مثبت و منفی تفاوت قابل توجهی مشاهده نشد. همچنین، از نظر نمک دوستی نیز در مورد مقاومت به فلز Se^{4+}، تفاوت قابل ملاحظه‌ای میان باکتری‌های نمک دوست و تحمل کننده نمک دیده نشد. اما، در مورد فلز As^{5+} سویه‌های تحمل کننده نمک مقاومت بیشتری را نسبت به سویه‌های نمک دوست نشان دادند.

میزان MIC به‌دست آمده در مورد شش فلز سنگین دیگر نسبت به سلنیت و آرسنات به میزان قابل ملاحظه‌ای کمتر بود. به طوری که بیشترین MIC در مورد فلز سرب چهل میلی‌مولار بود و فقط یک سویه توانایی رشد در این غلظت را داشت.

بالاترین مقادیر MIC به‌دست آمده در مورد فلزات کادمیم، مس و کرومات هشت میلی‌مولار بود که در رابطه با فلزات مس و کرومات از میان هفتاد و چهار سویه باکتری تنها یک سویه توانست در غلظت هشت میلی‌مولار هر یک از این فلزات رشد نماید. به این ترتیب که سویه LW74 در غلظت هشت میلی‌مولار مس در محیط MH (10%) رشد نمود و سویه LW46 در محیط MH (10%) به همراه هشت میلی‌مولار کرومات قادر به رشد بود. اگرچه، در مورد فلز کادمیم پنج سویه یافت شدند که قادر به رشد در محیط MH (10%) با هشت میلی‌مولار کادمیم بودند.

از نتایج به‌دست آمده در این مطالعه مشخص گردید که سویه‌های گرم منفی نمک دوست، مقاومت بسیار بیشتری را نسبت به کرومات در مقایسه با سویه‌های گرم مثبت و تحمل کننده نمک دارا می‌باشند. گرچه در مورد مقاومت به فلز سرب میان باکتری‌های گرم مثبت و منفی تفاوت چندانی مشاهده نشد و علی رغم تعداد بیش تر سویه‌های تحمل کننده نمک مقاوم به سرب، سویه‌های نمک دوست میزان مقاومت بیشتری را به این فلز نشان دادند.

مقاومت به فلز سنگین سمی کادمیم، در سویه‌های گرم مثبت و منفی تقریبا مشابه بود، اما نمک دوست‌ها مقاومت بیشتری را نسبت به تحمل کننده‌های نمک در مقاومت به Cd^{2+} نشان دادند.

در مقاومت به مس، هر دو گروه باکتری‌های گرم منفی و مثبت

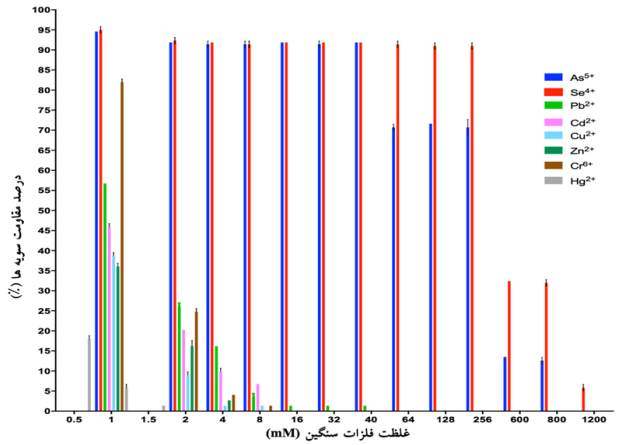
مقاومت کمی را از خود نشان دادند. همچنین، اکثر سویه‌های مقاوم به Cu^{2+} متعلق به دسته تحمل کننده‌های نمک بودند. گرچه، سویه LW73 که مقاومت قابل توجهی به Cu^{2+} داشت، یک سویه نمک دوست بود.

در مورد فلز روی، بیشترین میزان MIC گزارش شده در این مطالعه، غلظت چهار میلی‌مولار بود که فقط دو سویه باکتری LW73 و LW81 قادر به رشد در محیط کشت MH (10%) به همراه چهار میلی‌مولار فلز روی بودند. و همچنین این دو سویه باکتری که بالاترین مقاومت را نسبت به Zn^{2+} نشان دادند هر دو باسیل گرم منفی بوده و هیچ یک قادر به رشد در محیط فاقد نمک نبودند بنابراین جزء سویه‌های نمک دوست تلقی شدند. به طور کلی، باکتری‌های گرم منفی مقاومت به نسبت بیشتری را به Zn^{2+} داشته و علی رغم بیشتر بودن تعداد سویه‌های تحمل کننده نمک، سویه‌های نمک دوست میزان مقاومت بسیار بیشتری را به این فلز سنگین نشان دادند.

کمترین میزان MIC در این پژوهش در مورد فلز جیوه مشاهده شد. به‌طوری که تنها یک سویه (LW55) قادر به رشد در غلظت یک و نیم میلی‌مولار از این فلز سنگین سمی در محیط کشت MH (10%) بود. همچنین نتایج نشان داد که مقاومت باکتری‌های گرم مثبت نسبت به فلز جیوه در مقایسه با گرم منفی بیشتر بوده، به طوری که شانزده باکتری گرم مثبت از میان پنجاه و دو سویه (۳۰/۷۶ درصد) توانایی رشد در محیط MH (۱۰٪) به همراه جیوه را داشتند که از این میان شش سویه فاقد اسپور و ده سویه دارای اسپور بودند. در حالی که از میان بیست و دو سویه باکتری گرم منفی، تنها چهار سویه (۱۸/۱۸ ٪ درصد) توانستند در حضور نیم میلی‌مولار Hg^{2+} در محیط رشد نمایند. همچنین در این مطالعه مشخص شد که، سویه‌های تحمل کننده نمک مقاوم به جیوه، تقریبا دو برابر تعداد سویه‌های نمک دوست مقاوم به این فلز می‌باشند.

به طور کلی از میان هفتاد و چهار سویه بررسی شده، چهار سویه باکتری (LW62, LW78, LW104, SED1) توانایی رشد در حضور هیچ یک از فلزات سنگین را نداشتند، در حالی که هفت سویه (LW53,LW55,LW56,LW74,LW85,MHA21,MHD2) قادر به رشد در محیط MH (10%) در حضور هر یک از هشت فلز سنگین به طور جداگانه بودند.

مقاومت هفتاد و چهار سویه باکتری نمک دوست و تحمل کننده نمک به هشت فلز سنگین سمی در شکل ۲ نشان داده شده است.

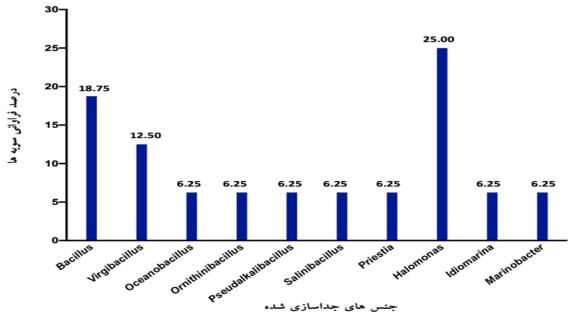


شکل ۲: نمودار میزان مقاومت جدایه‌ها به هشت فلز سنگین.

د) شناسایی مولکولی و تحلیل فیلوژنتیک سویه‌های نمک دوست و تحمل کننده نمک منتخب: در نتیجه تحلیل فیلوژنتیک شانزده سویه‌ی منتخب، ده سویه از اعضای خانواده *باسیلاسه* (*Bacillaceae*)، چهار سویه از *هالوموناداسه* (*Halomonadaceae*) و دو سویه دیگر از خانواده‌های *آلتروموناداسه* (*Alteromonadaceae*) و *ایدیومارینا‌سه* (*Idiomarinaceae*) بودند.

از خانواده *باسیلاسه* سه سویه متعلق به جنس *باسیلوس* (*Bacillus*)، دو سویه از جنس *ورجی باسیلوس* (*Virgibacillus*) و یک سویه از هر کدام از جنس‌های *اُشنوباسیلوس* (*Oceanobacillus*)، *اُرنیتینی باسیلوس* (*Ornithinibacillus*)، *سالینی باسیلوس* (*Salinibacillus*) و *پریستیا* (*Priestia*) بودند. هم چنین، هر چهار سویه از خانواده *هالوموناداسه* (*Halomonadaceae*) متعلق به جنس *هالوموناس* (*Halomonas*) بوده و از دو خانواده شناسایی شده *آلتروموناداسه* و *ایدیومارینا‌سه* به ترتیب یک سویه متعلق به جنس *ایدیومارینا* (*Idiomarina*) و دیگری *مارینوباکتر*

(*Marinobacter*) بود. درصد فراوانی سویه های شناسایی شده در شکل ۳ نشان داده شده است.

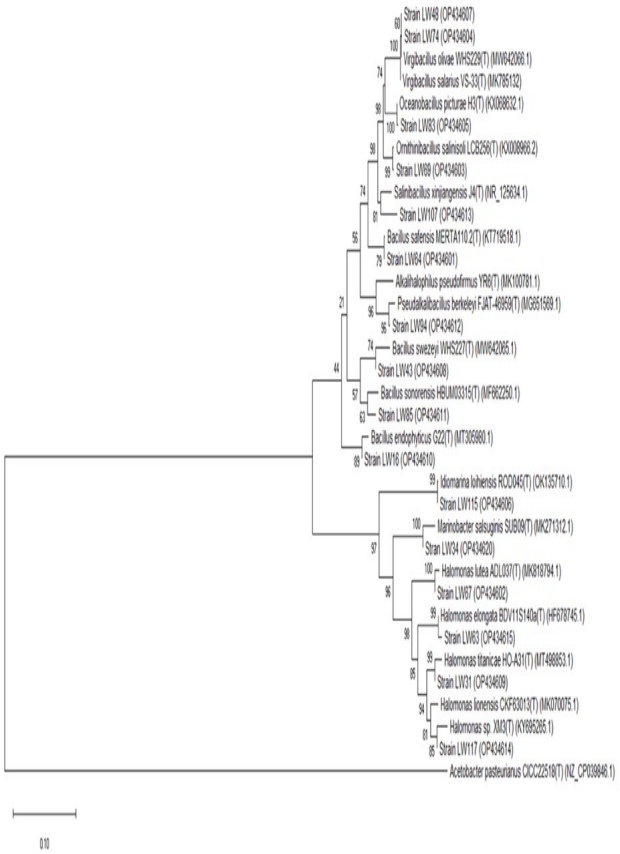


شکل ۳: درصد فراوانی حاصل از شناسایی مولکولی سویه‌ها.

نتایج حاصل از شناسایی مولکولی شانزده سویه منتخب، میزان شباهت سویه‌ها با نزدیک‌ترین گونه‌های شناخته شده، طول قطعه توالی‌یابی شده و شماره دسترسی اخذ شده برای هر سویه در جدول ۲ و همچنین، درخت فیلوژنتیک سویه‌های باکتری ترادف‌یابی شده با استفاده از روش Neighbor-joining در شکل ٤ نشان داده شده‌اند.

جدول ۲: نتایج شناسایی مولکولی شانزده سویه منتخب.

ردیف	نام سویه	سویه استاندارد با بیشترین شباهت	درصد شباهت	شماره دسترسی	طول ترادف
۱	LW64	*Bacillus safensis*	۹٦/۸٥	OP434601	۸۷۸
۲	LW67	*Halomonas lutea*	۹٤/۲۲	OP434602	۱۱۱۹
۳	LW69	*Ornithinibacillus salinisoli*	۱۰۰	OP434603	۱۰۳۰
٤	LW74	*Virginibacillus olivae*	۹٤/۹٥	OP434604	۱۰۲۰
٥	LW83	*Oceanobacillus picturae*	۹٦/۲۲	OP434605	۹۹۹
٦	LW115	*Idiomarina loihiensis*	۹۹/۸۰	OP434606	۹۹۱
۷	LW48	*Virgibacillus salaries*	۹٥/۰٤	OP434607	۹۹۱
۸	LW43	*Bacillus swezeyi*	۹۹/٥۲	OP434608	۹۸۱
۹	LW31	*Halomonas titanica*	۹٦/٥۷	OP434609	۹۲۰
۱۰	LW16	*Priestia endophytica*	۹٥/٦۱	OP434610	۸۷٥
۱۱	LW85	*Bacillus sonorensis*	۹۹/۷۱	OP434611	۹۸۰
۱۲	LW94	*Pseudalkalibacillus berkeleyi*	۸٤/۲۰	OP434612	۹۹۹
۱۳	LW107	*Salinibacillus xinjiangensis*	۹٦/۸۱	OP434613	۹۷٥
۱٤	LW117	*Halomonas lionensis*	۹۸/٥۰	OP434614	۹۳٤
۱٥	LW63	*Halomonas elongate*	۹۹/٤۷	OP434615	۷٦۰
۱٦	LW34	*Marinobacter salsuginsis*	۸۸/۳۳	OP434620	۹۱۹



شکل ٤: درخت فیلوژنتیک باکتری‌های ترادف‌یابی شده با استفاده از روش Neighbor-joining. اعداد ذکر شده در محل انشعاب، نشانگر درصد نمونه گیری بوت استرپ از ۱۰۰۰ نمونه است. سویه *استوباکتر پاستوریانس* (*Acetobacter pasteurianus* CICC22518) به‌عنوان Outgroup در نظر گرفته شده است.

بحث

با توجه به نتایج به‌دست آمده در این پژوهش، ۹۵/۰٤٪ و ۹٤/۵۹٪ از جدایه‌های نمک دوست و تحمل کننده نمک، به ترتیب قادر به رشد در حضور یک میلی‌مولار سلنیت و آرسنات بودند. همچنین مقادیر MIC به‌دست آمده از این دو فلز (۸۰۰ و ۱۲۰۰ میلی‌مولار) به مقدار قابل توجهی نسبت به شش فلز بررسی شده دیگر (حداکثر میزان MIC مرتبط با فلز سرب و ٤۰ میلی‌مولار بود) بیشتر بود. نتایج مشابه با این مطالعه در مطالعات گذشته نیز گزارش شده است، به این ترتیب که ده سویه باسیل گرم مثبت نمک دوست در تحقیق آموزگار (Amoozegar) و همکارانش در سال ۲۰۰۵، مقاومت بالا و قابل ملاحظه‌ای نسبت به آرسنات و سلنیت در مقایسه با

سایر فلزات بررسی شده در این پژوهش را دارا بودند. گرچه، سویه‌های مطالعه شده در این تحقیق میزان MIC بسیار کمتری برای آرسنات و سلنیت (۲۵۰ و ۳۰ میلی‌مولار به ترتیب) نسبت به پژوهش حاضر با مقادیر MIC هشتصد میلی‌مولار برای آرسنات و هزار و دویست میلی‌مولار برای سلنیت را نشان دادند (۱۳).

مقاومت زیاد سویه‌های نمک دوست و تحمل کننده نمک نسبت به سدیم آرسنات (Na_2HasO) و سدیم سلنیت (Na_2SeO_3) می‌تواند به دلیل حضور سدیم در ساختار شیمیایی این فلزات باشد. از آنجایی که سدیم از عناصر ضروری برای فعالیت آنزیم‌ها بوده و در میکروارگانیسم‌های نمک دوست و تحمل کننده نمک پمپ می‌شود، بنابراین می‌تواند در افزایش مقاومت باکتری‌ها نسبت به سمیت فلزات سمی نقش داشته باشد (۱۳).

در مطالعه انجام شده توسط جبلی (Jebeli) و همکارانش در سال ۲۰۱۸، باکتری *سودوموناس چنگدوئنزیز* (*Pseudomonas chengduensis* strain As-11) بیشترین میزان مقاومت را در میان باکتری‌های بررسی شده، به آرسنات (MIC ٦٥ mM) داشت. و همچنین از باکتری‌های گرم مثبت در این مطالعه سه سویه *باسیلوس لیکنی فورمیس* (*Bacillus licheniformis* strain As-2) و *باسیلوس اُشنی سدیمینیس* (*Bacillus oceanisediminis* strain As-8) و *باسیلوس فلکسوس* (*Bacillus flexus* strain As-12) شناسایی شده که بیشترین میزان مقاومت به As^{5+} در آن‌ها به ترتیب ۱۵، ۱۰ و ۱۵ میلی‌مولار برآورد شده است (۲۱). همچنین، در تحقیق صورت گرفته توسط Zhang و همکارانش در سال ۲۰۱۹، دو باکتری گرم مثبت *لیزینی باسیلوس زیلانی لایتیکوس* (*Lysinibacillus xylanilyticus strain* DS3) و *لیزینی باسیلوس ماکرولیدز* (*Lysinibacillus macrolides* strain DS15) به ترتیب دارای MIC برابر با ۱۲۰ و ۲۲۰ میلی‌مولار در محیط مایع LB مکمل شده با Se^{4+} بودند (۲۲).

در حالی که در پژوهش حاضر، از میان سویه‌های توالی یابی شده، باکتری گرم مثبت *باسیلوس سافنسیس* LW64 *safensis* *Bacillus* دارای مقاومتی برابر با ۸۰۰ میلی‌مولار در مورد As^{5+} بود. و باکتری‌های گرم مثبت *اُشنوباسیلوس پیکچرا* (*Oceanobacillus picturae* LW83) و *اُرنیتینی باسیلوس سالینیسولی* (*Ornithinibacillus salinisoli* LW69) دارای MIC برابر با ٦٠٠ میلی‌مولار برای Se^{4+} بودند.

Kalaimurguan و همکارانش در سال ۲۰۱۹ از میان سیصد سویه باکتری، دو سویه *سودوموناس فلئوروسنس* (*Pseudomonas fluorescens* YPS3) و *باسیلوس سافنسیس* (*Bacillus safensis* YKS2) را یافتند که توانایی بالایی در تخریب کرومات (K_2CrO_4) داشته و قادر به رشد در محیط MHA با غلظت ۱۰۰mg/ml کرومات بودند (۲۳).

در پژوهش دیگری که توسط Elahi و همکارنش در سال ۲۰۲۲، منتشر شده است باکتری *باسیلوس سرئوس* (*Bacillus cereus* b-525k) توانایی رشد در محیط مایع M9 تغییر یافته با ۳۲ میلی‌مولار Cr^{6+} را داشت (٢٤). همچنین، مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۵ توسط آموزگار (Amoozegar) و همکارانش صورت گرفت نشان داد که از میان ۱۰ سویه باسیلوس (*Bacillus*) بررسی شده، هشت سویه باسیلوس (*Bacillus*) می‌توانند در محیط نوترینت آگار با ۱۰ درصد سدیم کلرید، کرومات (K_2CrO_4) را تا غلظت بیست میلی‌مولار تحمل نمایند و زمانی که میزان نمک به پانزده درصد افزایش یافت، مقاومت باکتری‌های نمک دوست نیز به میزان دو تا سه برابر در برابر کرومات افزایش یافت (۱۳).

در مطالعه اخیر صورت گرفته، گرچه ۸۲/٤۳ درصد از سویه‌های جداسازی شده توانایی رشد در حضور یک میلی‌مولار کرومات را داشتند اما MIC محاسبه شده در حضور Cr^{6+} در این سویه‌ها به نسبت ضعیف بوده و اکثریت سویه‌ها تنها در محیط کشت حاوی دو و یا یک میلی‌مولار Cr^{6+} توانایی رشد داشتند. فقط در میان سویه‌های باسیل گرم منفی دو سویه LW73 و LW81 توانستند تا غلظت چهار میلی‌مولار Cr^{6+} رشد نمایند و تنها یک سویه باسیل گرم منفی LW46 قادر بود تا غلظت هشت میلی‌مولار از Cr^{6+} را نیز مقاومت نماید و هر سه سویه متعلق به باکتری‌های نمک دوست بوده و توانایی رشد در

عدم حضور نمک در محیط را نداشتند.

از پژوهش‌های انجام شده در مورد سنجش مقاومت سویه‌های باکتری نسبت به فلز سرب، سویه *هالوموناس Halomonas sp.* (WQL9) در مطالعه Abdel-Razik و همکارانش در سال ۲۰۱۹ توانست در محیط کشت نوترینت آگار حاوی ۱۰ درصد نمک سدیم کلرید، و با هشت و نیم میلی‌مولار Pb^{2+} رشد نماید (۲۵). در پژوهش حاضر نیز میزان مقاومت در برابر سرب در دو باسیل گرم منفی، سویه LW44 و *ایدیومارینا لوی‌هینزیز* (*Idiomarina loihiensis* LW115) هشت میلی‌مولار گزارش شد. گرچه سویه MHA9 که یک باسیل گرم مثبت فاقد اسپور بود توانست تا غلظت چهل میلی‌مولار سرب نیز در محیط MH (۱۰٪) رشد نماید که این میزان اختلاف بسیار زیادی با سایر سویه‌های بررسی شده در این مطالعه و سایر مطالعات گذشته داشت. به طوری که حداکثر MIC در باسیل‌های گرم مثبت در این تحقیق چهار میلی‌مولار بود و از سویه‌های شناسایی شده *سالینی باسیلوس زینجینجنزیز* (*Salinibacillus xinjiangensis* LW107)، *باسیلوس سوئزی*(*Bacillus swezeyi* LW43) و *پریستیا* (*Priestia endophytica* LW16) توانایی رشد در حضور چهار میلی‌مولار Pb^{2+} در محیط MH (10%) را داشتند.

از سایر مطالعات صورت گرفته نیز، باکتری نمک دوست *هالوباسیلوس* (*Halobacillus sp.* EG1HP4QL) در محیط مایع S-G نتوانست در حضور بیش از ۲ میلی‌مولار Pb^{2+} در محیط رشد نماید (۲۷).

بیشترین میزان مقاومت به کادمیم در میان سویه‌های جداسازی شده با حداقل غلظت مهارکنندگی هشت میلی‌مولار مشاهده شد و سویه‌های LW56، MHA14، LW101، Lw44 و MHA35 قادر به رشد در محیط MH (10%) حاوی هشت میلی‌مولار Cd^{2+} بودند، که سه سویه اول باسیل گرم مثبت بوده و دو سویه دیگر باسیل گرم منفی می‌باشند و فقط سویه LW101 در دسته سویه‌های تحمل کننده نمک قرار داشته و چهار سویه دیگر متعلق به دسته نمک دوست‌ها بودند. در پژوهش آموزگار (Amoozegar) و همکارانش در سال ۲۰۱۲، باکتری *هالوموناس* (*Halomonas sp.* strain D) قادر به رشد در محیط نوترینت آگار با حداکثر میزان پنج میلی‌مولار Cd^{2+} بود و باکتری گرم منفی *سودوموناس آئروجینوزا Pseudomonas aeruginosa* (strain S7) در مطالعه Mihdhir.A و همکارانش در سال ۲۰۱۶، توانست در حداکثر میزان ۲۳۱ ppm فلز Cd^{2+} در محیط مایع LB رشد نماید (۲۷و۲۸).

در بررسی‌های انجام شده روی مقاومت باکتری‌ها به فلز مس در این مطالعه فقط سویه LW73 که یک باکتری گرم منفی میله‌ای شکل نمک دوست بود توانست در محیط MH (10%) با غلظت هشت میلی‌مولار Cu^{2+} رشد نماید و سایر سویه‌های باسیل گرم منفی یا مقاومت بسیار کم، با حداکثر MIC یک میلی‌مولار، داشتند یا به طور کلی مقاومتی نسبت به این فلز سنگین نداشتند.

در بررسی مقاومت باکتری‌های گرم منفی، *سودوموناس* (*Pseudomonas sp.* AK1) و *سودوموناس Pseudomonas sp.* (AK9) در مطالعه Satyapal و همکارانش در سال ۲۰۱۸، مشخص شد که این سویه‌ها توانایی رشد در محیط LB جامد، به ترتیب با غلظت Cu^{2+} چهار و سه میلی‌مولار را دارند (۲۹). همچنین باکتری‌های *هالوموناس* (*Halomons sp.* strain MA2) و *هالوموناس* (*Halomonas sp.* strain WLQ9) به ترتیب در مطالعات Osman و همکارانش در سال ۲۰۱۰ و Abdel-Razik و همکارانش در سال ۲۰۱۹، توانستند در حضور یک و نیم و چهار میلی‌مولار Cu^{2+} در محیط کشت جامد نوترینت با یک میلی مولار نمک سدیم کلرید و محیط LB با ده درصد سدیم کلرید به ترتیب رشد نمایند (۲۵).

مقاومت به Cu^{2+} در میان سویه‌های باسیل گرم مثبت در مطالعه اخیر نیز میزان قابل ملاحظه‌ای نبود و حداکثر مقاومت در میان سویه‌های توالی یابی شده مربوط به سه سویه *باسیلوس سُنورنسیس* (*Bacillus sonorensis* lw85)، باسیلوس برکلی (*Bacillus berkeleyi* lw94) و *ورجی باسیلوس سالاریز* (*Virgibacillus salaries* LW48) بود که توانستند در حضور دو میلی مولار Cu^{2+} در محیط MH (10%) رشد نمایند.

گرچه میزان مقاومت باسیل‌های گرم مثبت به Cu^{2+} در سایر مطالعات گذشته نیز مقادیر محدودی گزارش شده است. به

عنوان مثال در پژوهش آموزگار (Amoozegar) و همکارانش در سال ۲۰۰۵، از ده سویه باسیلوس (*Bacillus*) بررسی شده فقط سه سویه توانستند در غلظت یک میلی مولار از Cu^{2+} در محیط نوترینت آگار با ده درصد نمک سدیم کلرید رشد نمایند (۱۳).

در میان هفتاد و چهار سویه مورد مطالعه در تحقیق اخیر، تنها دو سویه LW73 و LW46 که از باسیل‌های گرم منفی نمک دوست بودند، توانستند تا غلظت چهار میلی‌مولار فلز Zn^{2+} را تحمل نمایند. و میزان مقاومت نسبت به این فلز در میان سایر سویه‌ها به میزان قابل توجهی کم بود به طوری که چهل و هفت سویه قادر به رشد در حضور Zn^{2+} در محیط MH (10%) نبوده و بیست و پنج سویه دیگر تنها در غلظت‌های یک و دو میلی‌مولار از Zn^{2+} توانایی رشد داشتند.

به طور کلی، فلز روی برای نمک دوست‌ها بسیار سمی بوده و سمیت آن به واسطه ترکیبات آنیونی و کاتیونی غیرآلی محیط کشت و همچنین مواد آلی محلول می‌تواند به میزان قابل ملاحظه‌ای افزایش یابد. در مطالعه‌ای که توسط Xu و همکارانش در سال ۲۰۱۳ صورت گرفته، سمیت فلز روی، بر روی محیط‌های HM، MB و SW-10 شامل پنج درصد سدیم کلرید و غلظت‌های مختلف Zn^{2+} (۰، ۱، ۱۰، ۱۵، ۲۰ و ۳۰ میلی‌مولار) در مورد باکتری *هالوموناس زینسیدورانس* (*Halomonas zincidurans* B6^T) بررسی و تأیید شده است. به این ترتیب که، این باکتری توانست تا غلظت ۲۰ میلی‌مولار از Zn^{2+} را در محیط های کشت HM و SW-10 و غلظت ۳۰ میلی‌مولار از Zn^{2+} را در محیط MB تحمل نماید. اما هیچ یک از سویه‌های مرجع *هالوموناس زینجیانجنزیز* *Halomonas* (*xinjiangenesis* TRM0175^T)، *کروموهالوباکتر ایسرایلنزیز* (*Chromohalobacter israelensis* DSM6768^T) و *سالینی کُلا سُکیوس* (*Salinicola socius* DSM19940^T) نتوانستند با غلظت بیش از یک میلی‌مولار Zn^{2+} در محیط کشت رشد نمایند (۳۰).

در پژوهش دیگری از میان ۲۳۸ سویه باکتری نمک دوست معتدل، بیشترین میزان مقاومت به Zn^{2+} ۲/۵ میلی‌مولار گزارش شده است (۳۱). گرچه، در مطالعه‌ای که روی باکتری *باسیلوس سرئوس* (*Bacillus cereus* b-525k) صورت گرفت، این باکتری توانست در محیط مایع M9 تا غلظت هفده میلی‌مولار از فلز Zn^{2+} را تحمل نماید (۲٤).

در مورد مقاومت سویه‌های جداسازی شده به فلز جیوه، بیشترین میزان MIC به‌دست آمده برای یون فلزی Hg^{2+} یک و نیم میلی‌مولار بود که فقط سویه LW55 که باسیل گرم مثبت دارای اسپور و تحمل کننده نمک بود توانست در محیط MH (10%) با یک و نیم میلی‌مولار جیوه رشد نماید. در حالی که در میان باکتری‌های گرم منفی حداکثر میزان MIC به‌دست آمده نیم میلی‌مولار گزارش شد و فقط چهار سویه از بیست و دو سویه باسیل گرم منفی (۱۸/۱۸ درصد) توانستند در حضور نیم میلی‌مولار Hg^{2+} در محیط رشد نمایند. در حالی که شانزده باکتری باسیل گرم مثبت از میان پنجاه و دو سویه (۳۰/۷٦ درصد) توانایی رشد در محیط به همراه جیوه را داشتند که از این میان شش سویه فاقد اسپور و ده سویه دارای اسپور بودند.

حساسیت بسیار زیاد سویه‌های باکتری به فلز جیوه در سایر مطالعات نیز گزارش شده است، به‌عنوان مثال در پژوهش Noroozi و همکارانش نشان داده شده است که باکتری‌های باسیلوس (Bacillus strain MN8)، هالوموناس Halomonas (strain MN12)، هالوباسیلوس (Halobacillus strain MN16) و *هالوموناس* (*Halomonas* strain MN18) تنها قادر به تحمل ۰/٤، ۰/۲، ۰/۱۲۵ و ۰/۱۵ میلی‌مولار از Hg^{2+} در محیط کشت نوترینت آگار با ۵ درصد سدیم کلرید می‌باشند (۳۲). از دیگر مطالعات صورت گرفته نیز مشخص شده است که سویه *هالوموناس* (*Halomonas* sp. WLQ9) دارای میزان MIC برابر با ۰/۰۷۵ میلی‌مولار در محیط LB با ۱۰ درصد سدیم کلرید می‌باشد (۲۵).

به طور کلی در تحقیقات صورت گرفته مشخص شده است که بیشترین جنس‌های باکتریایی که مقاومت به فلز جیوه را دارا می‌باشند و یا در مناطق آلوده به جیوه یافت می‌شوند از میان جنس‌های *سودوموناس* (*Pseudomonas*) و *باسیلوس*

(*Bacillus*) می‌باشند (۳۳و۳٤).

در پژوهش حاضر نیز از میان سویه‌های توالی‌یابی شده سه سویه *باسیلوس سافنسیس* (*Bacillus safensis* LW64)، *ورجی باسیلوس سالاریوس* (*Virgibacillus salarius* LW48) و *اُرنیتینی باسیلوس سالینی سُلی* *Ornithinibacillus salinisoli* (LW69) دارای مقاومت‌های ۱/۱ و ۰/۵ میلی‌مولار به جیوه بودند.

در مطالعه Nieto و همکارانش که مقاومت ۲۳۸ سویه باکتری نمک دوست معتدل را به ده فلز سنگین بررسی کرده بودند مشخص شد که سه فلز سنگین جیوه، نقره و روی بیشترین سمیت را در میان فلزات سنگین سمی بررسی شده روی سویه‌های باکتری‌های نمک دوست دارند. این نتایج، مشابه با نتایج به‌دست آمده در تحقیق حاضر می‌باشد که نشان داد جیوه و روی بیشترین سمیت را روی باکتری‌های نمک دوست و تحمل کننده نمک دارند. علاوه‌براین، Nieto و همکارانش نشان دادند که الگوهای مقاومت به فلزات سنگین سمی در میان باکتری‌های نمک دوست مطالعه شده متفاوت بوده و حتی سویه‌های متعلق به یک جنس هم مقاومت‌های متفاوتی نسبت به فلزات سنگین مختلف داشتند که این نتایج نیز، هم راستا با نتایج به‌دست آمده در مطالعه اخیر بود (۳۱).

به طور کلی، در میان گروه‌های مختلف باکتری‌ها، باکتری‌های گرم مثبت به میزان قابل توجهی، در محیط زیست‌های شور حضور دارند و در کل، جنس باسیلوس (*Bacillus*) در این محیط‌ها جنس غالب باکتری‌ها را تشکیل می‌دهد (۳۵). در مطالعه حاضر نیز ۷۰/۲۷ درصد سویه‌های جداسازی شده از مناطق شور متعلق به باکتری‌های گرم مثبت بوده و جنس باسیلوس (*Bacillus*) هم در میان جنس‌های شناسایی شده بیشترین فراوانی را داشت.

در مطالعات متعددی بیان شده است که سمیت فلزات سنگین و یا توانایی میکروارگانیسم‌ها در مقاومت به این فلزات و یا حذف آن‌ها تحت تأثیر عوامل متعددی مانند: دما، pH، مواد آلی محلول، مواد معدنی و یا ترکیبات آنیونی و کاتیونی غیرآلی در محیط کشت قرار می‌گیرد (۲۱و۳۱). در آزمایشات گذشته نیز نشان داده شده است که ترکیبات مختلف محیط کشت مانند: پپتون‌ها، تریپتون‌ها، عصاره مخمر و کازآمینواسیدها می‌توانند با یون‌های فلزات سنگین تشکیل کمپلکس دهند و بنابراین سمیت این فلزات را کاهش دهند (٦و۳۱). در پژوهش اخیر، سنجش مقاومت باکتری‌های نمک دوست و تحمل کننده نمک در محیط تغییر یافته SW صورت گرفت که این محیط در مقایسه با سایر محیط‌های کشت ساده‌تر بوده و فقط حاوی مقادیر بسیار اندکی از عصاره مخمر با نمک‌های معدنی می‌باشد. بنابراین، می‌تواند میزان صحیح‌تری از مقاومت سویه‌های باکتری نمک دوست و تحمل کننده نمک به فلزات سنگین سمی را ارائه دهد.

نتیجه‌گیری

تحقیقات در زمینه پاکسازی فلزات سنگین و سمی از محیط زیست به دلیل اثرات نامطلوب و زیان بار این فلزات، در سال‌های اخیر اهمیت بسیار ویژه‌ای یافته است. نتایج به‌دست آمده از این مطالعه نشان داد که سویه‌های نمک دوست و تحمل کننده نمک جداسازی شده از کویر لوت دارای پتانسیل قابل توجهی در مقاومت و یا تحمل فلزات سنگین سمی در محیط‌های شور می‌باشند، بنابراین می‌توان از این سویه‌ها در پاکسازی محیط‌های زیست شور و یا فاضلاب‌های آلوده به فلزات سنگین سمی استفاده نمود.

همچنین انجام مطالعات بیشتر، مانند: بررسی مکانیسم‌های دخیل در فرایندهای مقاومت به فلزات سنگین سمی که توسط باکتری‌های نمک دوست و تحمل کننده نمک به کار گرفته می‌شوند، تعیین و بررسی ژن‌ها و فرایندهای مولکولی که در مقاومت این باکتری‌ها به فلزات سمی سنگین نقش دارند و نیز سنجش توانایی باکتری‌های نمک دوست و تحمل کننده نمک در محیط‌های زیست شور آلوده به فلزات سنگین سمی می‌تواند کمک شایانی در راستای پیشرفت و درک بیشتر فرایند پاکسازی زیستی توسط باکتری‌های نمک دوست و تحمل کننده نمک نماید.

ملاحظات اخلاقی

نویسندگان این مقاله پژوهشی تمام نکات اخلاقی شامل عدم سرقت ادبی، انتشار دوگانه، تحریف داده‌ها و داده‌سازی را رعایت کرده‌اند.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از همکاران گرامی در آزمایشگاه اکسترموفیل‌ها دانشگاه تهران، که در اجرای این پژوهش ما را یاری نموده‌اند سپاسگزاری می‌نمائیم.

تعارض منافع

وجود ندارد.

References

1. Wang J, Chen C. Biosorbents for heavy metals removal and their future. Biotechnology advances. 2009 Mar 1;27(2):195-226.
2. Yadav A, Chowdhary P, Kaithwas G, Bharagava RN. Toxic metals in the environment: threats on ecosystem and bioremediation approaches. InHandbook of metal-microbe interactions and bioremediation 2017 Apr 7 (pp. 128-141). CRC Press.
3. Fan J, Okyay TO, Rodrigues DF. The synergism of temperature, pH and growth phases on heavy metal biosorption by two environmental isolates. Journal of hazardous materials. 2014 Aug 30;279:236-43.
4. Sall ML, Diaw AK, Gningue-Sall D, Efremova Aaron S, Aaron JJ. Toxic heavy metals: impact on the environment and human health, and treatment with conducting organic polymers, a review. Environmental Science and Pollution Research. 2020 Aug;27(24):29927-42.
5. Rawat AP, Giri K, Rai JP. Biosorption kinetics of heavy metals by leaf biomass of Jatropha curcas in single and multi-metal system. Environmental monitoring and assessment. 2014 Mar;186(3):1679-87.
6. Voica DM, Bartha L, Banciu HL, Oren A. Heavy metal resistance in halophilic Bacteria and Archaea. FEMS Microbiology Letters. 2016 Jul 1;363(14).
7. Erdoğmuş SF, Mutlu B, Korcan SE, Güven K, Konuk M. Aromatic hydrocarbon degradation by halophilic archaea isolated from *Çamaltı Saltern*, Turkey. Water, Air, & Soil Pollution. 2013 Mar;224(3):1-9.

8. Yazdi A, Emami MH, Shafiee SM. Dasht-e lut in iran, the most complete collection of beautiful geomorphological phenomena of desert. Open Journal of Geology. 2014 Jun 10;2014.

9. Darabi M, Amoozegar MA, Mehrshad M, Zamani N, Shahzadeh Fazeli SA, Shavandi M. Molecular diversity of heterotrophic bacteria and archaea of Namakdan Cave in Qeshm. Journal of Microbial World. 2018 May 22;11(1):61-72. [In Persian]

10. Seyedpour Layalestani SS, Shavandi M, Haddadi A, Amoozegar MA, Dastgheib SM. Bacterial community structure in saline sediments from hypersaline wetland in south of Halghe Dare hills, Alborz province. Journal of Microbial World. 2020 Nov 21;13(13):215-27. [In Persian]

11. Kashi FJ, Owlia P, Amoozegar MA, Yakhchali B, Kazemi B. Diversity of cultivable microorganisms in the eastern part of Urmia salt lake, Iran. Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences. 2021 Jan 6;2021:36-43.

12. Shirsalimian MS, Amoozegar MA, Sepahy AA, Kalantar SM, Dabbagh R. Isolation of extremely halophilic Archaea from a saline river in the Lut Desert of Iran, moderately resistant to desiccation and gamma radiation. Microbiology. 2017 May;86(3):403-11.

13. Amoozegar MA, Hamedi J, Dadashipour M, Shariatpanahi S. Effect of salinity on the tolerance to toxic metals and oxyanions in native moderately halophilic spore-forming bacilli. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 2005 Oct;21(6):1237-43.

14. Vreeland RH, editor. Advances in understanding the biology of halophilic microorganisms. Springer Netherlands; 2012 Dec 14.

15. Vos P, Garrity G, Jones D, Krieg NR, Ludwig W, Rainey FA, Schleifer KH, Whitman WB, editors. Bergey's manual of systematic bacteriology: Volume 3: The Firmicutes. Springer Science & Business Media; 2011 Jan 28.

16. Garabito MJ, Arahal DR, Mellado E, Marquez MC, Ventosa A. Bacillus salexigens sp. nov., a new moderately halophilic Bacillus species. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 1997 Jul 1;47(3):735-

17. Baghi Sefidan H, Tarinejad A. Bioremediation of both mineral and organic mercury via the construction of recombinant vector pET28a(+)-merA-merB. Journal of Microbial World. 2018; 11(3): 230 -242. [In Persian]

18. Marmur J. A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from micro-organisms. Journal of molecular biology. 1961 Apr 1;3(2):208-IN1.

19. Yoon SH, Ha SM, Kwon S, Lim J, Kim Y, Seo H, Chun J. Introducing EzBioCloud: a taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies. International journal of systematic and evolutionary microbiology. 2017 May;67(5):1613.

20. Ventosa A, Nieto JJ, Oren A. Biology of moderately halophilic aerobic bacteria. Microbiology and molecular biology reviews. 1998 Jun 1;62(2):504-44.

21. Jebelli MA, Maleki A, Amoozegar MA, Kalantar E, Gharibi F, Darvish N, Tashayoe H. Isolation and identification of the native population bacteria for bioremediation of high levels of arsenic from water resources. Journal of environmental management. 2018 Apr 15;212: 39-45.

22. Zhang J, Wang Y, Shao Z, Li J, Zan S, Zhou S, Yang R. Two selenium tolerant *Lysinibacillus* sp. strains are capable of reducing selenite to elemental Se efficiently under aerobic conditions. Journal of Environmental Sciences. 2019 Mar 1;77:238-49.

23. Kalaimurugan D, Balamuralikrishnan B, Durairaj K, Vasudhevan P, Shivakumar MS, Kaul T, Chang SW, Ravindran B, Venkatesan S. Isolation and characterization of heavy-metal-resistant bacteria and their applications in environmental bioremediation. International Journal of Environmental Science and Technology. 2020 Mar;17(3):1455-62.

24. Elahi A, Rehman A, Hussain SZ, Zulfiqar S, Shakoori AR. Isolation and characterization of a highly effective bacterium *Bacillus cereus* b-525k for hexavalent chromium detoxification. Saudi journal of biological sciences. 2022 Apr 1;29(4):2878-85.

25. Abdel-Razik MA, Azmy AF, Khairalla AS, AbdelGhani S. Metal bioremediation potential of the halophilic bacterium, Halomonas sp. strain WQL9 isolated from Lake Qarun, Egypt. The Egyptian Journal of Aquatic Research. 2020 Mar 1;46(1):19-25.

26. Amoozegar MA, Ghazanfari N, Didari M. Lead and cadmium bioremoval by Halomonas sp., an exopolysaccharide-producing halophilic bacterium. Progress in Biological Sciences. 2012 Mar 1;2(1):1-1.

27. Ibrahim IM, Konnova SA, Sigida EN, Lyubun EV, Muratova AY, Fedonenko YP, Elbanna K. Bioremediation potential of a halophilic Halobacillus sp. strain, EG1HP4QL: Exopolysaccharide production, crude oil degradation, and heavy metal tolerance. Extremophiles. 2020 Jan;24(1):157-66.

28. Mihdhir AA, Assaeedi AS, Abulreesh HH, Osman GE. Detection, identification and characterization of some heavy metals tolerant bacteria. J Microb Biochem Technol. 2016 Jun;8(3):226-30.

29. Satyapal GK, Mishra SK, Srivastava A, Ranjan RK, Prakash K, Haque R, Kumar N. Possible bioremediation of arsenic toxicity by isolating indigenous bacteria from the middle Gangetic plain of Bihar, India. Biotechnology reports. 2018 Mar 1;17:117-25.

30. Xu L, Xu XW, Meng FX, Huo YY, Oren A, Yang JY, Wang CS. Halomonas zincidurans sp. nov., a heavy-metal-tolerant bacterium isolated from the deep-sea environment. International journal of systematic and evolutionary microbiology. 2013 Nov 1;63(Pt_11):4230-6.

31. Nieto JJ, Fernandez-Castillo R, Marquez MC, Ventosa A, Quesada E, Ruiz-Berraquero F. Survey of metal tolerance in moderately halophilic eubacteria. Applied and Environmental Microbiology. 1989 Sep;55(9):2385-90.

32. Noroozi M, Amoozegar MA, Pourbabaei AA, Naghavi NS, Nourmohammadi Z. Isolation and characterization of mercuric reductase by newly isolated halophilic bacterium, Bacillus firmus

MN8. Global Journal of Environmental Science and Management. 2017 Dec 1;3(4):427-36.

33. Kafilzadeh F, Mirzaei N. Growth pattern of Hg resistant bacteria isolated from Kor River in the presence of mercuric chloride. Pakistan Journal of Biological Sciences: PJBS. 2008 Sep 1;11(18):2243-8.

34. Ball MM, Carrero P, Castro D, Yarzábal LA. Mercury resistance in bacterial strains isolated from tailing ponds in a gold mining area near El Callao (Bolívar State, Venezuela). Current microbiology. 2007 Feb;54(2):149-54.

35. Zahran HH. Diversity, adaptation and activity of the bacterial flora in saline environments. Biology and Fertility of Soils. 1997 Sep;25(3):211-23.