

ارزیابی مقاومت به اکسی‌آنیون‌های سمی در باسیل‌های اسپور دار نمک دوست نسبی بومی ایران و اثر شوری بر روی این مقاومت

محمدعلی آموزگار^{۱*}، جواد حامدی^۱، فریدون ملکزاده^۱، محمد داداشی‌پور^۲، شقایق شریعت‌پناهی^۱

۱ دانشگاه تهران، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی، بخش میکروبیولوژی

alamoze@yahoo.com

۲ انستیتو پاستور، بخش بیوشیمی

(دریافت: ۸۳/۴/۹؛ پذیرش: ۸۳/۹/۲۵)

چکیده

میکروارگانسیم‌های نمک دوست نقش مهمی را در پاکسازی زیستی ترکیبات سمی فلزی در محیط ایفا می‌کنند و شناسایی سویه‌های تحمل‌پذیر به این ترکیبات، مرحله نخست دراستفاده از این میکروارگانسیم‌ها در فرایندهای پاکسازی زیستی است. در این راستا ۱۰ سویه باکتری تشکیل‌دهنده اسپور از خاک‌های شور در ایران جداگشت و مقاومت ذاتی بسیار بالا نسبت به اکسی‌آنیون‌های سمی، کرومات، ارسنات، سلنیت، سلنات و بی‌سلنیت در بعضی از سویه‌ها نشان داده شد. روش رقت درآگار برای تعیین تحمل‌پذیری باکتری‌ها نسبت به این ترکیبات سمی مورد استفاده قرار گرفت و حداقل غلظت مهارکننده رشد (MIC) برای هر اکسی‌آنیون در دمای ۳۴ درجه سانتی‌گراد و در زمان گرماگذاری ۷۲ ساعت تعیین گشت. براساس تعیین MIC، همه باکتری‌های مورد آزمایش بالاترین مقاومت را نسبت به اکسی‌آنیون سمی ارسنات نشان دادند. سویه‌های B2 و C2 می‌توانستند تا غلظت ۲۵۰ میلی‌مول ارسنات را تحمل کنند. یک مقاومت غیر معمول نسبت به اکسی‌آنیون‌های کرومات در بعضی سویه‌ها مشاهده گشت. سویه‌های A2، B1 و C2 سدیم کرومات را تا ۷۵ میلی‌مول تحمل می‌کردند درحالی‌که سویه C2 تحمل به پتاسیم کرومات را تا ۷۰ میلی‌مول نشان داد و سایر سویه‌ها (A1، A2، B1، C1 و C4) مقاومت را نسبت به پتاسیم کرومات را تا حداکثر ۶۰ میلی‌مول نشان دادند. سطح مقاومت سویه‌ها به سلنواکسی‌آنیون‌ها بین ۱۰ تا ۴۰ میلی‌مول بود. بالاترین مقاومت به سلنات و پایین‌ترین مقاومت به بی‌سلنیت نشان داده شد. بالاترین سمیت را در میان اکسی‌آنیون‌های مورد آزمایش را تلوریت نشان داد (حداکثر تحمل‌پذیری ۳ میلی‌مول). اثر شوری بر روی سمیت اکسی‌آنیون‌ها مورد مطالعه قرار گرفت. افزایش شوری از ۵٪ (w/v) به ۱۵٪ (w/v) بطور کلی سبب افزایش مقاومت به اکسی‌آنیون‌ها در سویه‌ها می‌گردد.

واژه‌های کلیدی: اکسی‌آنیون، باکتری نمک دوست، تحمل‌پذیری، کرومات، سلنواکسی‌آنیون.

مقدمه

اکسی آنیون‌های فلزی و شبه فلزی، هنگامی که در غلظت‌های بالا در خاک‌های کشاورزی، آب‌های سطحی و آب‌های زیرزمینی یافت می‌شوند به عنوان آلاینده زیستی مطرح شده و پاکسازی آن از محیط زیست یک امر مهم و یک اولویت محسوب می‌شود. میکروارگانیسم‌ها با واکنش‌های بیوترانسفر ماسیون و یا پاکسازی زیستی نقش مهمی را در حذف این عناصر سمی و یا تبدیل آنها به عناصر کم‌ترسمی و یا غیرسمی ایفا می‌کنند (Kinkle *et al.*, 1994). سویه‌های از *Rhodospirillum* و *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Thiobacillus*, *Pseudomonas* بیوترانس فرم‌های فعال در این زمینه هستند (McLean & Beveridge, 2001). Kessi *et al.*, 1999). تشخیص میکروارگانیسم‌ها و تحمل آنها به غلظت‌های بالاتر اکسی آنیون‌های سمی قدم اول در جهت شناسایی توان میکروارگانیسم‌های است که قادر به پاکسازی محیط زیست می‌باشند و می‌توانند ما را به انتخاب سویه برتر جهت حذف این ترکیبات سمی کمک کنند (Trevors *et al.*, 1985; Burton *et al.*, 1987). در این میان میکروارگانیسم‌های هالوفیل یا هالوتولرن‌ت یک گزینه مناسب می‌باشد چون به طور طبیعی این میکروارگانیسم‌ها خود به غلظت‌های بالای آنیونی و کاتیونی برای رشد نیاز دارند در حالیکه میکروارگانیسم‌های معمول این توانایی وجود ندارد و نه تنها اثر سمی این ترکیبات در این میکروارگانیسم‌ها لحاظ می‌باشد بلکه بالا رفتن غلظت نمک این ترکیبات سمی نیز اثر مهاری بر رشد دارد ولی این مورد را در باکتری‌های نمک دوست مشاهده نمی‌کنیم. در سال‌های گذشته مقاومت به فلزات سنگین در میکروارگانیسم‌های نمک دوست بویژه در جنس *Halmonas* مورد مطالعه قرار گرفته است (Ventosa, 1998; Nieto *et al.*, 1989). اما مطالعات نسبتاً کمی در زمینه مقاومت به اکسی آنیون‌های فلزی و شبه فلزی در این باکتری‌ها صورت گرفته که می‌توان از مطالعه Souza و همکاران (۲۰۰۱) در رابطه با شناسایی سویه‌های متعلق به جنس *Halmonas* دارای مقاومت بالا نسبت به اکسی آنیون سلنات، مطالعه Chad و همکاران (۱۹۹۹) در رابطه با مقاومت بالا نسبت به تلوریت پتاسیم در باکتری *Natronococcus acealutus* (آرکی) و مطالعه Rathgeber و همکاران (۲۰۰۲) در رابطه با سویه‌های هالوتولرن‌ت مقاوم به تلوریت و سلنیت نام برد. در این مطالعه ما تحمل پذیری نسبت به کسی آنیون‌های سمی کرومات، ارسنات، سلنیت، بی سلنیت، سلنات و تلوریت را در ۱۰ سویه باسیل اسپوردار گرم مثبت نمک دوست نسبی مورد ارزیابی قرار داده و اثر غلظت‌های مختلف نمک را بر روی مقاومت این سویه‌ها به ترکیبات سمی را نیز مورد بررسی قرار دادیم.

هدف از این مطالعه: ۱- ارزیابی باکتریهای اسپوردار نمک دوست نسبی نسبت به ترکیبات سمی فلزی ۲- شناسایی سویه های با مقاومت های بالا نسبت به اکسی آنیون های سمی ۳- بررسی اثر شوری بر روی افزایش یا کاهش مقاومت. بعلاوه در این بررسی مقاومت این باکتریها نسبت به آنتی بیوتیک ها نیز مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روشها

میکروارگانیزمها و شرایط رشد

۱۰ سویه باسیل گرم مثبت اسپور دار هوازی نمک دوست نسبی از خاک های شور و بسیار شور مناطق مختلف در ایران، قشم، گرمسار، کرج، تهران و قم جدا گشت. مقادیر کمی از نمونه های خاک به محیط نوترینت برات با غلظت حداکثر ۱۰۰ گرم نمک کل درلیتر اضافه گشت (Amoozgar *et al.*, 2003). محیطها در شیکر گردشی در دمای ۳۴ درجه سانتیگراد و در دور rpm ۱۵۰ گرما گذاری گشتند. در مرحله بعد باکتریها در محیط نوترینت آگار دارای ۱۰٪ سدیم کلراید رشد کرده و خالص گشتند. مقاومت سویه های جدا شده نسبت به فلزات سمی نیز در روی محیط نوترینت آگار به همراه ۱۰ (w/v)٪ سدیم کلراید صورت گرفت و در صورت لزوم سایر غلظت های نمک NaCl برای آزمایش اثر درصدهای مختلف نمک در محیط بر مقاومت باکتری نسبت به فلزات سمی مورد استفاده قرار گرفت. pH تمام محیطها قبل از اتوکلاو با KOH ۱ مولار بین ۷/۴ - ۷/۲ تنظیم گشت.

ویژگیهای فنوتیپی سویه ها

سویه های تازه جدا شده با استفاده از ترکیبی از روش های بیوشیمیایی و فیزیولوژی، از نظر فنوتیپی تعیین ویژگی شدند: تست گرم با استفاده از روش Burk انجام گرفت و نتایج با تست KOH تایید گشت (Baron & Finegolod, 1990). حرکت با روش لام مرطوب مورد بررسی قرار گرفت (Murray *et al.*, 1994). کاتالاز، اکسیداز، احیاء نیترات، متیل رد و VP و تولید اندول براساس روش های توصیه شده Smibert & Krieg انجام گرفت (1994). فعالیت های هیدرولیتیکی براساس روش های توصیف شده بوسیله Ventosa انجام گرفت (Ventosa *et al.*, 1982). تولید اسید از کربوهیدرات ها در محیط ارائه شده و روش توصیه شده بوسیله Parry *et al.* (1988) مورد بررسی قرار گرفت. تست حساسیت به آنتی بیوتیک ها در روی محیط مولر هینتون آگار به اضافه ۱۰٪ سدیم کلراید که دارای تلقیحی از $1/5 \times 10^6$ cfu/ml سوسپانسیون باکتریایی بود و با استفاده از دیسک های آنتی بیوتیکی (bioMérieux) و با روش انتشار در آگار انجام گرفت. پلیت ها در دمای ۳۴ درجه سانتیگراد برای مدت ۴۸ ساعت

گرماگذاری شده و هاله عدم رشد بر اساس دست نوشته‌های علمی شرکت‌های سازنده دیسک مورد تفسیر قرار گرفت.

مواد شیمیایی

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

آزمایش مقاومت به فلزات سنگین

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

۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۲۵، ۰/۵، ۱، ۲، ۴، ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۳۰، ۳۵، ۴۰، ۴۵، ۵۰، ۵۵، ۶۰، ۶۵، ۷۰، ۷۵ و ۸۰
به استثنا نمک ارسنات سدیم که در موارد لزوم تا غلظت ۳۰۰ میلی مولار نیز مورد آزمایش قرار گرفت. غلظت یک مولار برای کرومات سدیم، کرومات پتاسیم، سلنیت سدیم، بی سلنیت سدیم، ارسنات سدیم، سلنات سدیم و تلوریت پتاسیم به ترتیب ۱/۱۷۳، ۱/۱۸۶، ۱/۱۸۸ و ۱/۲۳۵ گرم در لیتر می باشد. پلیتهای آگار دار در دمای ۴۵ درجه سانتیگراد بمدت ۳۰ دقیقه قرار گرفت تا سطح مرطوبشان خشک شود و سپس بوسیله سمپلر ۱۰ میکرولیتر از محیط مایع که میکروب مورد نظر در آن رشد کرده (رشد لگاریتمی) بود و غلظت آن برابر ۰/۵ لوله مک فارلند بود بر روی محیط آگار دار قرار گرفت (میکروب تلقیح شده 10^5 تا 10^6 باکتری در میلی لیتر). آزمایشات مشابه برای غلظت های ۵ و ۱۵٪ سدیم کلراید نیز انجام گرفت. کنترلها شامل محیطهای بدون فلز بود که میکروارگانیسیمهای کشت شده روی آن رشد می کرد.

پلیتها پس از گرماگذاری در ۳۴ درجه سانتی گراد در ساعت های ۴۸ و ۷۲ مورد مطالعه قرار گرفت. پایین ترین غلظتی از فلز که کاملاً مانع رشد باکتری می گشت MIC نامیده شد (حداقل غلظت مهار کننده رشد). MIC برای تمام سویهها در سه بار متوالی مورد بررسی قرار گرفت. باید توجه داشت که نمکهای فلزی و ترکیبات محیط میکروبیولوژی می توانند با هم

واکنشهایی داشته باشند و در نتیجه تفسیر را مشکل می کنند به همین دلیل ما غلظت های را استفاده کردیم که قبلاً بوسیله سایر محققین برای انجام مطالعات روی یو باکتریها استفاده شده بود (McLean, & Beveridge, 2001. Rathgeber *et al.*, 2002, Neito *et al.*, 1989). با توجه به اینکه استاندارد مشخصی برای مقاوم بودن به غلظت های فلزی برای محققین وجود ندارد، ما سویه های از باسیلوسهای نمک دوست نسبی خود را که رشدشان بوسیله ۵ میلی مولار کرومات و بی سلنیت و ۱۰ میلی مولار ارسنات، سلنات و سلنیت و ۱/۱ میلی مولار تلوریت پتاسیم متوقف نمی شود. سویه های مقاوم نامیدیم.

نتایج

شناسایی فنوتیپی سویه های باکتریایی

تمام سویه های جدا شده باکتریهای میله ای شکل بوده و براساس واکنش گرم جزء باکتری های گرم مثبت محسوب شده و همگی دارای اسپور بودند و بر اساس رشد بهینه در درصدهای مختلف نمک سدیم کلراید به سه گروه تقسیم شدند: ۱- گروه A دارای بهینه رشد در نمک (w/v) ۱۵٪ بوده و شامل سویه های A₁، A₂ و A₃ می باشد. ۲- گروه B که بهینه رشد آن محیط نمک (w/v) ۱۰٪ بوده و دو سویه B₁ و B₂ را شامل می شود. و ۳- گروه C بهینه رشد این گروه نمک (w/v) ۵٪ بوده و شامل ۵ سویه C₁، C₂، C₃، C₄ و C₅ است. تمام این باکتریها در محیط فاقد نمک قادر به رشد نبوده و بنابراین جزء باکتریهای هالوفیل هستند. ویژگی های فنوتیپی این باکتریها در جدول ۱ آورده شده است.

حداقل غلظت مهار کننده نسبت به فلزات سنگین (MIC)

مقاومت ۱۰ سویه باسیل گرم مثبت اسپور دار نمک دوست نسبی بومی ایران نسبت به اکسی آنیون های سمی و MIC آن در غلظت نمک (w/v) ۱۰٪ در محیط مورد بررسی قرار گرفت (نمودار ۱). تمام سویه ها به سلنیت، سلنات، تلوریت و ارسنات مقاومت نشان می دهند و بالاترین مقاومت ها نیز به ارسنات دیده می شود (۲۵۰ میلی مول). ۹۰٪ سویه ها به بی سلنیت سدیم و، کرومات سدیم و کرومات پتاسیم مقاوم بودند به استثناء سویه C₅ که به این ترکیبات حساس بوده و پایین ترین مقاومت را با مقاومت ۲/۵ میلی مولار نسبت به این اکسی آنیونها نشان می دهد.

جدول ۱- ویژگی های اصلی باکتریهای میله ای گرم مثبت نمک دوست نسبی بومی ایران

ویژگی	سویه A ₁	سویه A ₂	سویه A ₃	سویه B ₁	سویه B ₂	سویه C ₁	سویه C ₂	سویه C ₃	سویه C ₄	سویه C ₅
تولید رنگدانه	سفید	کرم	ندارد	سفید	ندارد	ندارد	ندارد	ندارد	ندارد	کرم
موقعیت اسپور حرکت	مرکزی	مرکزی	مرکزی	مرکزی	مرکزی	مرکزی	مرکزی	مرکزی	مرکزی	مرکزی
اکسیداز	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
رشد در ۰٪ نمک	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
رشد در ۱٪ نمک	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-
رشد در ۲۵٪ نمک	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
بهینه رشد در نمک٪	۱۵٪	۱۵٪	۱۵٪	۱۰٪	۱۰٪	۱۰٪	۱۰٪	۱۰٪	۱۰٪	۵٪
تولید اسید از:										
گلوکز	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
گالاکتوز	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-
فروکتوز	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
سوکروز	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
هیدرولیز:										
ژلاتین	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-
کازئین	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
نشاسته	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-
توئین ۸۰	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DNA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
احیاء نیترات	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

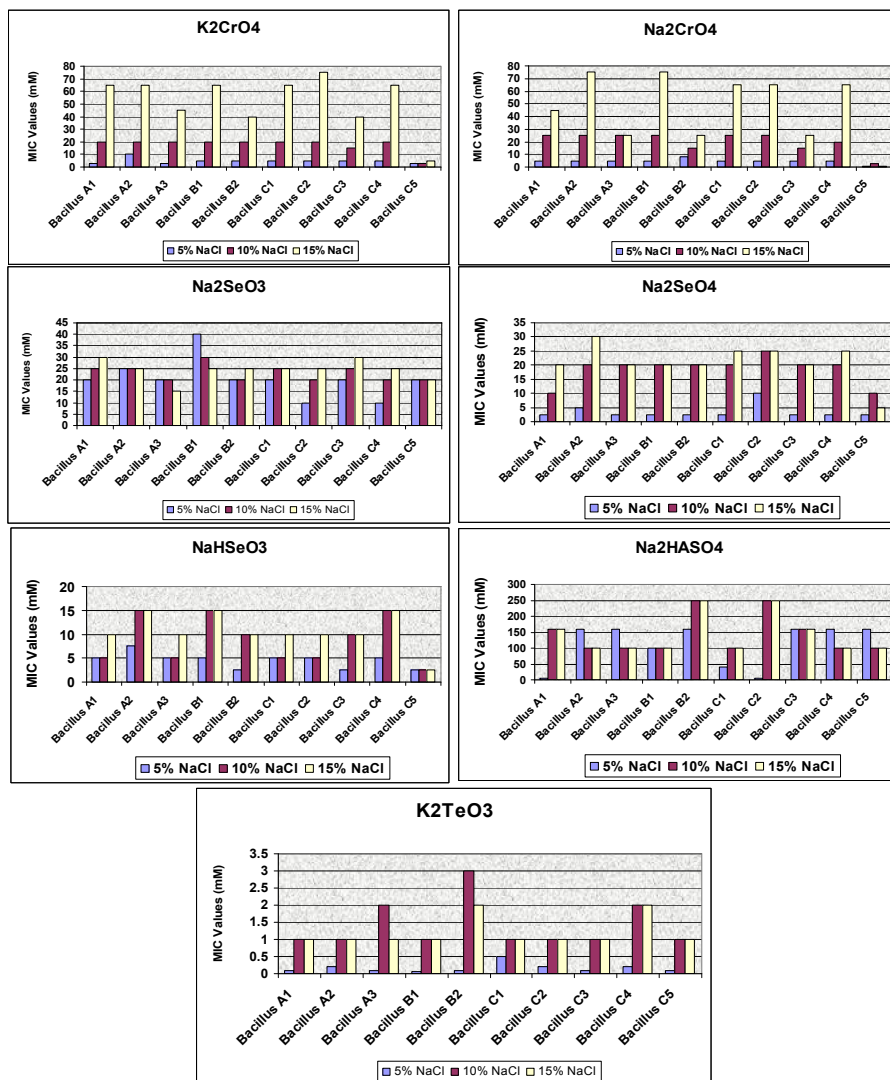
الگوی حساسیت به آنتی بیوتیک ها

ما حساسیت به آنتی بیوتیک‌ها را نیز در سویه‌های مقاوم خود با ۱۰ آنتی بیوتیک مورد بررسی قرار دادیم (جدول ۲). تمام سویه‌ها به سفالوتین حساس بوده، نسبت به پنی‌سیلین و آمپی‌سیلین بجز سویه مقاوم C₂ بقیه سویه‌ها حساس بوده و نسبت به نوویوسین ۳۰٪ سویه‌ها مقاوم بودند در حالیکه مقاومت به نالیدکسیک اسید در ۵۰٪ سویه‌ها مشاهده شد. بیشترین مقاومت در این سویه‌ها نسبت به استرپتومايسين مشاهده گشت که حدود ۷۰٪ سویه‌ها مقاومت را نشان می‌دادند.

اثر شوری بر مقاومت به اکسی آنیون های سمی در نمک دوستهای نسبی

اثر غلظت سدیم کلراید روی مقاومت به اکسی آنیون‌های سمی مورد بررسی قرار گرفت. تحمل پذیری باکتری‌ها در غلظت‌های مختلف نمک نسبت به اکسی آنیونهای سمی در نمودار ۱ نشان داده شده است. بطور کلی با افزایش غلظت نمک تحمل پذیری سویه‌ها به اکسی آنیون‌های سمی کرومات، سلنات، سلنیت و بی سلنیت افزایش یافته و بالاترین افزایش در رابطه با

آنیون کرومات دیده شده که با افزایش غلظت نمک از (w/v) ۵٪ به (w/v) ۱۵٪ در بعضی سویه‌ها (نمودار ۱) تحمل پذیری ۱۵ برابر افزایش یافته است درحالیکه در مورد اکسی آنیون- های ارسنات و تلوریت ثر میان سویه‌ها تنوع وجود دارد.



شکل ۱- الگوی مقاومت باکتریهای میله‌ای، اسپوردار نمک دوست نسبی بومی ایران به اکسی آنیونهای سمی (بر حسب MIC) در غلظت نمکهای ۵٪، ۱۰٪ و ۱۵٪.

بحث

باکتریهای میله‌ای شکل اسپوردار گرم مثبت نمک دوست نسبی و تحمل‌کننده‌های نمک گروه متنوعی را متشکل از جنس‌های مختلف تشکیل داده‌اند که در محدوده وسیعی از غلظت‌های نمک می‌توانند رشد کنند (Ventosa et al., 1998) و در مناطق بسیار شور یا شور در خاک و آب یافت می‌شوند. امروزه اطلاعات در زمینه اکولوژی و فیزیولوژی نمک دوست‌های نسبی تا حدی در دسترس می‌باشد. به منظور بررسی نقش اکولوژیکی این گروه از باکتریها در پاکسازی زیستی فلزات سمی از محیط، برای اولین بار مطالعه روی مقاومت به اکسی آنیون‌های سمی در این گروه از میکروارگانیسم‌ها صورت گرفت. سویه‌های مورد بررسی مقاومت‌های بسیار بالایی را نسبت به اکسی آنیون‌های سمی نشان می‌دادند (جدول ۲) و نکته بسیار جالب در این بررسی وجود مقاومت بسیار بالا به آنیون کرومات در بعضی سویه‌ها بود که تا بحال چنین مقاومتی در میان باکتری‌ها گزارش نشده است. به نظر می‌رسد یکی از دلایل مقاومت بالا نسبت به اکسی آنیون‌ها در این گروه از میکروارگانیسم‌ها وجود کاتیون سدیم یا پتاسیم در ترکیب این اکسی آنیون‌ها است که برای رشد و بقاء این باکتریها در محیط شور و فعالیت آنزیم‌ها و یا پمپ‌های که در تحمل پذیری نسبت به این ترکیبات در باکتریها نقش دارند، لازم می‌باشد. اثر نمک بر روی پاسخ باکتریهای نمک دوست نسبی به اکسی آنیون‌های سمی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که افزایش نمک از ۵٪ به ۱۵٪ بطور کلی سبب افزایش مقاومت به این ترکیبات سمی می‌شود.

جدول ۲- الگوی حساسیت به آنتی‌بیوتیک در باکتریهای میله‌ای گرم مثبت نمک‌دوست نسبی بومی ایران

ویژگی	سویه A ₁	سویه A ₂	سویه A ₃	سویه B ₁	سویه B ₂	سویه C ₁	سویه C ₂	سویه C ₃	سویه C ₄	سویه C ₅
حساسیت به:										
پنی سیلین G	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	مقاوم	حساس	مقاوم	حساس
آمی سیلین	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	مقاوم	حساس	مقاوم	حساس
نوو بیوسین	مقاوم	حساس	نیمه حساس	حساس	نیمه حساس	حساس	مقاوم	حساس	مقاوم	حساس
استرپتوماسین	مقاوم	نیمه حساس	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	حساس	مقاوم
کلرامفنیکل	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	مقاوم	حساس	حساس
اریتروماسین	نیمه حساس	مقاوم	نیمه حساس	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	حساس	حساس	مقاوم
تتراسیکلین	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس
سفالوتین	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	مقاوم	حساس	حساس
جنتامیسین	حساس	نیمه حساس	مقاوم	مقاوم	نیمه حساس	مقاوم	مقاوم	حساس	حساس	نیمه حساس
نالیدکسیک‌اسید	نیمه حساس	نیمه حساس	مقاوم	حساس	مقاوم	حساس	مقاوم	مقاوم	مقاوم	نیمه حساس

مقاومت به آنیون کرومات در بعضی از سویه های مورد آزمایش بطور غیر معمول بالا است. McLean و Beveridge در سال ۲۰۰۱ مقاومت ۱۰ میلی مولی را نسبت به کرومات در سویه باکتری *Pseudomonas CRB5* گزارش کرده اند. و همکاران (۲۰۰۱) در یک مطالعه دیگر مقاومت حداکثر ۲۰ میلی مول را در یک باکتری نمک دوست نسبی گرم منفی بنام *Salivibrio* گزارش کرده اند و در یک مطالعه دیگر *Viti* و همکاران (۲۰۰۳) مقاومت ۲۲ میلی مولی را در باکتری *Corynebacterium hoagie* گزارش کردند در حالیکه مقاومت به این اکسی آنیون در بعضی از سویه های مورد آزمایش در این مطالعه به ۷۵ میلی مول می رسد. مقاومت به سدیم کرومات و پتاسیم کرومات با افزایش غلظت نمک افزایش یافته و بیشترین مقاومت در نمک ۱۵٪ مشاهده شد و این میزان افزایش بسیار شدید بود. بالاترین مقاومت به سدیم کرومات در باکتریهای A_2 و B_1 و نسبت به پتاسیم کرومات در سویه C_2 و در نمک سدیم کلراید (w/v) ۱۵٪ دیده شد (۷۵ میلی مول). میزان افزایش تحمل پذیری آن دو سویه باکتریایی در نمک (w/v) ۱۵٪ نسبت به نمک (w/v) ۵٪ بیش از ۱۵ برابر می باشد.

همه سویه ها نسبت به اکسی آنیون ارسنات تحمل نسبتاً بالایی را نشان می دهند و در این میان دو سویه B_2 و C_2 با تحمل ۲۵۰ میلی مول سدیم ارسنات بالاترین مقاومت را نشان دادند. در حالیکه در یک باکتری جدید از جنس *Bacillus indicus* که مقاوم به ارسنیک در نظر گرفته شده است حداکثر مقاومت به آنیون ارسنات ۲۰ میلی مول گزارش شده است (Suresh et al., 2004). افزایش غلظت نمک سدیم کلراید از (w/v) ۵٪ به (w/v) ۱۵٪ پاسخ متنوعی را در میان سویه ها ایجاد می کند. در حالیکه در سویه های A_1 ، B_2 ، C_1 و C_2 با افزایش شوری در محیط تحمل پذیری سویه نسبت به اکسی آنیون بالا می رود، در سویه های A_2 ، A_3 ، C_4 و C_5 با افزایش شوری حساسیت باکتری نسبت به ارسنات افزایش می یابد. اما در سویه C_3 با افزایش غلظت نمک در محیط تفاوتی در مقاومت به اکسی آنیون ارسنات دیده نمی شود.

تحمل پذیری نسبت به اکسی آنیون های سلنیت، بی سلنیت و تلوریت نیز در سویه های مورد بررسی نسبتاً بالا بوده و قابل مقایسه با سویه های است که قبلاً بوسیله افراد دیگر در مقالات علمی ارائه شده است (Kinkle et al., 1994، De Souza et al., 2001، Rathgeber et al., 2002). لازم به ذکر است مقاومت به اکسی آنیون های سلنیت، بی سلنیت و تلوریت در سویه های مورد بررسی همراه با احیاء این ترکیبات بوده است.

افزایش فعالیت های صنعتی بطور روز افزون سبب افزایش فلزات و اکسی آنیون های سمی در محیط های آبی، خاکی و اتمسفر شده است که سبب آلاینده گی شدید در محیط زیست شده است. بر این اساس مطالعه بر روی میکروارگانیسم های که در پاکسازی زیستی این ترکیبات

نقش دارند و توسعه متدهای سیستم‌های پاکسازی محیطی اهمیت فراوانی پیدا کرده است و در این میان گزینه اول در پاکسازی زیستی انتخاب میکروارگانیسم‌های مقاوم به این ترکیبات سمی است. باکتریهای میله‌ای اسپوردار با توجه به پراکندگی فراوانی که در خاک دارند و همچنین پایداری بیشتری که در شرایط سخت محیطی دارند با توجه به مقاومت بالای که نسبت به بعضی آنیون‌ها مانند کرومات، ارسنات، سلنات و تلوریت در این مطالعه نشان دادند که در مورد اکسی آنیون سلنات و تلوریت همراه با احیاء بوده است، میکروارگانیسم‌های مناسب برای مطالعه بیشتر در زمینه پاکسازی زیستی هستند.

References

- Amoozegar, M.A., Malekzadeh, F., Malik, K. A., Schumann, P. and Spröer, C. (2003) *Halobacillus karajensis* sp. nov., a novel moderate halophile. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **53**, 1059-1063.
- Baron, E.J., and Finegold, S.M. (1990) *Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology*. 8th ed., St. Louis: Mosby. pp. 43-85.
- Burton, G.A., Gidding, T.H., Debrine, P., and Fall, R. (1987) *High incidence of selenite-resistant bacteria from a site polluted with selenium*. *Applied and Environmental Microbiology*, **53**, 185-188.
- Chad, T.P., and Jablonski, P.E. (1999) *High level, intrinsic resistance of Natronococcus occultus to potassium tellurite*. *FEMS Microbiol. Lett.* **174**, 19-23.
- Kessi, J., Ramuz, M., Wehrli, E., Spycher, M., and Bachofen, R. (1999) *Reduction of selenite and detoxification of elemental selenium by the phototrophic bacterium Rhodospirillum rubrum*. *Applied and Environmental Microbiology*, **65**, 4734-4740.
- Kinkle, B.K., Sadowsky, M.J., Johnstone, K. and Koskinen, W.C. (1994) *Tellurium and selenium resistance in Rhizobia and its potential use for direct isolation of Rhizobium meliloti from soil*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**, 1674-1677.
- McLean, J., and Beveridge, T.J. (2001) *Chromate reduction by a Pseudomonad isolated from site contaminated with chromated copper arsenate*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **67**, 1076-1084.
- Murray, R.G.E., Doetsch, R.N. and Robinow, C.F. (1994) *Determinative and cytological light microscopy*. In *Methods for General and Molecular Bacteriology*, pp. 21-41. Edited by P. Gerhardt, R. G. E. Murray, W. A. Wood & N. R. Krieg. Washington, DC: American Society for Microbiology.
- Nieto, J. J., Fernandez-Castillo, R., Marquez, M. C., Ventosa, A., Quesada, E. and Ruiz-Berraquero, F. (1989) *Survey of metal tolerance in moderately halophilic eubacteria*. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**, 2385-2390.
- Parry, J.M., Turnbull, P.C.B. and Gibson, J.R. (1988) *A colour atlas of Bacillus species*. London: Wolfe Medical publications.

- 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*. Appl. Environ. Microbiol. **68**, 4613-4622.
- Ríos, M., García, M.T., Arahál, D.R., and Ventosa, A. (2001) *Salinivibrio kushnerii* sp. nov., a new moderately halophilic species tolerant to chromium. Halophiles 2001, International Conference on Halophilic Microorganisms. Sevilla, Spain. P.9.
- Smibert, R.M. and Krieg, N.R. (1994) *Phenotypic characterization*. In Methods for general and Molecular Bacteriology, pp. 607-654. Edited by P. Gerhardt, R.G.E., Murray, W.A., Wood and N.R., Krieg. Washington, DC: American Society for Microbiology.
- Souza, M.P., Amini, A., Dojka, M.A., Pickering, I.J., Dawson, S.C., Pace, N.R. and Terry, N. (2001) *Identification and characterization of bacteria in a selenium contaminated hypersaline evaporation pond*. Appl. Environ. Microbiol. **67**, 3785-3794.
- Suresh, K.S.R., Prabakaran, S., Sen Gupta, and Shivaji, S. (2004) *Bacillus indicus* sp. Nov. an arsenic resistant bacterium isolated from an aquifer in West Bengal, India. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. In press.
- Trevors, J.T., Oddie, K.M., and Belliveau, B.H. (1985) *Metal resistance in bacteria*. FEMS Microbiology Review, **32**, 39-54.
- Ventosa, A., Nieto, J.J. and Oren, A. (1998) *Biology of moderately halophilic aerobic bacteria*. Microbiol. Mol. Biol. Rev., **62**, 504-544.
- Ventosa, A., Quesada, E., Rodriguez-Valera, F., Ruiz-Berraquero, F., Ramos-Cormenzana, A. (1982) *Numerical taxonomy of moderately Halophilic Gram-negative rods*. J. Gen. Microbiol., **128**, 1959-1968.
- Viti, C., Pace, A., and Giovannetti, L. (2003) *Characterization of Cr (VI)-Resistant bacteria isolated from chromium contaminated soil by Tannery activity*. Curr. Microbiol., **46**, 1-5.
- Washington, J.A., and Sutter, V.L. (1980) *Dilution susceptibility test: agar and macro-broth dilution procedures*, p. 453-458. In E. H. Lennette, A. Balows, W.J., Hausler, Jr., And J.P., Truant (ed.), Manual of clinical microbiology, 3rd ed. American Society for Microbiology, Washington, D. C.