

فصلنامه علمی- پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها
سال دوم، شماره ۵، بهار ۱۳۹۲، صفحه ۲۷-۴۲
تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۱۲/۰۶ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۰۴/۱۵

جداسازی و شناسایی مولکولی یک سویه جدید از *Microbacterium resistens* قادر به تحمل شرایط سخت

محمود غلامی: کارشناس ارشد میکروبیولوژی، دانشگاه اصفهان، ایران، mgholami783@gmail.com
زهرا اعتمادی فر: استادیار میکروبیولوژی، دانشگاه اصفهان، ایران، z_etemadifar@yahoo.com*

چکیده

مقدمه: استفاده از باکتری‌های مقاوم به اشعه، فرابنفش و دیگر شرایط سخت، برای پاک‌سازی زیستی و بازیابی فلزات موجود در زباله‌های محیطی و صنعتی به خاطر توانایی بقا و کاتالیز عملکردی مطلوب تحت شرایط استرس بالای اشعه بسیار حائز اهمیت است.

مواد و روش‌ها: پس از غربال‌گری اولیه و ثانویه به وسیله تابش اشعه با لامپ UV، یک جدایه به دست آمد که براساس ویژگی‌های ریخت‌شناسی و بیوشیمیایی، تعیین توالی ژن rRNA ۱۶S و تحلیل فیلوژنتیک، شناسایی شد. به منظور مطالعه ویژگی‌های مقاومت جدایه فوق، سویه در معرض برخی شرایط سخت از قبیل اشعه فرابنفش (۲۵ ژول)، خشکی (۲۸ روز)، هیدروژن پراکسید (۱ تا ۵ درصد)، میتوماپسین C (۱ تا ۸ میکروگرم)، غلظت‌های مختلف نمک (۵ تا ۲۵ درصد) و مقادیر مختلف اسیدپت (۱۱ تا ۱۱) گذاشته و رشد یا بقای باکتری در محیط TGY به وسیله اسپکترومتری یا فلوسیتومتری ارزیابی شد.

نتایج: جدایه MG6 باکتری میله‌ای گرم مثبت مقاوم به اشعه فرابنفش بود که توالی rRNA ۱۶S آن ۹۹/۷ درصد شباهت با *Microbacterium resistens* نشان داد. این شباهت با تحلیل فیلوژنتیک تأیید شد. رشد بهینه سویه در اسیدپت ۵ و غلظت ۵ درصد کلرید سدیم دیده شد. همچنین به غلظت ۱ تا ۴ درصد هیدروژن پراکسید و ۲ میکروگرم میتوماپسین C مقاومت نشان داد. تحلیل میزان بقا نشان داد که این سویه در مقایسه با *Deinococcus radiodurans* R1 مقاومت بالایی در برابر اشعه فرابنفش، ولی در برابر خشکی مقاومت متوسطی دارد.

بحث و نتیجه‌گیری: در این تحقیق، سویه جدیدی از *M. resistens* جداسازی شد که مقاوم به اشعه UV بود و تحمل برخی شرایط سخت مثل اسیدپت، عوامل اکسیدان و موتاژن، شوری و خشکی را نیز نشان داد. مقاومت سویه MG6 به اشعه UV قابل مقایسه با سویه مقاوم به اشعه *D. radiodurans* R1 بود. تحقیق حاضر اولین گزارش درباره مقاومت به شرایط سخت سویه جدید *M. resistens* در ایران می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: اشعه فرابنفش، *M. resistens*، تکنیک فلوسیتومتری، شرایط سخت

مقدمه

هم‌زمان با پیشرفت تکنولوژی، آلودگی‌های زیست-محیطی نیز افزایش یافته‌اند. از جمله تدابیر امنیتی در برای پاک‌سازی و حفظ محیط زیست، اجرای سیاست‌های لازم در طرح مدیریت زیستی می‌باشد. فاضلاب‌های رادیواکتیو و بازیابی فلزات مطلوب از قبیل اورانیوم، از جمله ترکیباتی هستند که امروزه نظر بسیاری از محققان را به خود جلب کرده‌اند. استفاده از روش‌های شیمیایی به منظور پاک‌سازی زیستی بسیار پر هزینه است و در بیشتر موارد فاقد اختصاصیت مورد نیاز به منظور پاک‌سازی درست و بازیابی فلزات موجود در این جایگاه‌ها می‌باشد (۱). اما میکروب‌ها درجه بالایی از اختصاصیت را نشان می‌دهند. محققان به تازگی از روش‌های بیولوژیک برای زدودن پساب‌های رادیواکتیو و بازیابی فلزات از محیط زیست بهره برده‌اند. به دنبال تحقیقات انجام شده در سال ۱۹۹۲ مشخص شد که باکتری‌هایی نظیر *Geobacter* و جنس‌های مختلف *Pseudomonas* قادر به سمیت‌زدایی از این گونه پساب‌ها می‌باشند. اما به علت این که حساسیت بالایی نسبت به پرتوهای یونیزان دارند در محیط‌های رادیواکتیو کاربرد چندانی ندارند. استفاده از باکتری‌های مقاوم به اشعه و دیگر شرایط سخت برای پاک‌سازی زیستی و بازیابی فلزات موجود در زباله‌های رادیواکتیو به خاطر توانایی بقا و کاتالیز عملکردی مطلوب تحت شرایط استرس بالای اشعه بسیار مهم است (۲). همچنین، باکتری‌های مقاوم به اشعه، مقاومت در خور توجهی به سایر شرایط سخت نشان می‌دهند که از جمله می‌توان به انواعی از استرس‌های شیمیایی و فیزیکی از قبیل خشکی، اشعه یونیزه‌کننده، میتومايسين C، هیدروژن پراکسید، شرایط اسیدی و قلیایی و غلظت بالای نمک

NaCl اشاره کرد. رادیکال‌های آزاد اکسیژن^۲ تولید شده توسط شرایط استرس به پروتئین، لیپید، نوکلئیک اسید و کربوهیدرات‌ها آسیب رسانده و باعث شکستن DNA دو رشته‌ای (DBSS)^۳ می‌شود. خانواده داینوکواسه در محیط‌های غنی از ترکیبات آلی از قبیل خاک، مدفوع حیوانات، لجن و ریزوسفر گیاهان یافت می‌شوند. علاوه بر این در شرایط محیطی سخت از قبیل بیابان‌ها، صخره‌ها، چشمه‌های آب گرم و مناطق منجمد نیز وجود دارند. همچنین، همه ۴۱ سویه‌ی رادیودورانس که برای حساسیت به اشعه یونیزه کننده بررسی شده‌اند، به تناسب حساس به خشکی نیز می‌باشند. این مطلب نشان دهنده این است که مقاومت به اشعه و خشکی دو پدیده مرتبط می‌باشند. *D. radiodurans* مقاومت در خور توجهی به عوامل مختلف ایجادکننده ROS، از جمله خشکی، اشعه یونیزان، اشعه UV، میتومايسين C و هیدروژن پراکسید، دارد و می‌تواند دوز بالای اشعه یونیزه کننده را که قادر به ایجاد تا ۲۰۰۰ قطعه در DNA ژنومی می‌باشد تحمل کند. مقاومت این باکتری به خاطر مکانیسم‌هایی می‌باشد که از پروتئین‌ها و دیگر ماکرومولکول‌های سلولی در برابر استرس محافظت می‌کنند و همچنین، فرآیندهای ترمیم DNA در این باکتری بسیار کارآمد هستند. سلول‌هایی که در معرض اشعه فرابنفش قرار می‌گیرند. علاوه بر تخریب DNA، قطعه قطعه شدن ژنوم نیز در آن‌ها اتفاق می‌افتد. همچنین، میزان سنتز پروتئین نیز در این سلول‌ها کاهش می‌یابد (۳). برخلاف اشعه یونیزه کننده، اشعه فرابنفش حتی در دوزهای بالاتر از ۱۴۸۵ ژول بر متر مربع نیز قادر به ایجاد جهش نقطه‌ای در داینوکوکوس رادیودورانس نمی‌باشد. همچنین، فقدان DNA پلیمراز TLS در داینوکوکوس رادیودورانس

سویه‌های جدید زیادی از داینوکوکوس‌های مقاوم به اشعه یافت شده است. بسیاری از این باکتری‌ها در صحراهای ساهارا و تاکیماکان یافت شده‌اند. همچنین، داینوکوکوس‌های مقاوم به اشعه در محیط‌هایی مثل اتمسفر، قطب جنوب، آب‌های تازه، خاک‌های مختلف، ماهی‌های دریایی و چشمه‌های آب داغ جداسازی شده‌اند (۱۱).

از جمله باکتری‌های دیگری که مقاوم به اشعه می‌باشند می‌توان به *Rubrobacter radiotolerans*، *Methylobacterium*، *R. xylanophilus*، *Lactobacillus plantarum*، *radiotolerans*، *Enterococcus*، *Acinetobacter radioresistens*، *Hymenobacter actinosclerus faecium* و *Kineococcus radiotolerans* اشاره کرد (۱۲). هدف از این پژوهش، جداسازی و شناسایی سویه‌هایی با مقاومت بالا در برابر اشعه فرابنفش و دیگر شرایط استرس، به منظور استفاده و کاربرد آن‌ها برای پاک‌سازی زیستی پساب‌های محیطی و صنعتی در پروژه‌های آبی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

جداسازی و غربال‌گری باکتری‌های مقاوم به اشعه

پس از جمع‌آوری نمونه‌های خاک سطحی از ناحیه صخره‌های اطراف کوه صفه در جنوب شهر اصفهان که در برابر نور مستقیم خورشید قرار داشت، به منظور غنی‌سازی اولیه باکتری‌های موجود در نمونه‌ها، ابتدا یک گرم از هر نمونه به ۵۰ میلی‌لیتر محیط TGY برات (تریپتون ۵ گرم، عصاره مخمر ۵ گرم، گلوکز ۱ گرم و K_2HPO_4 ۱ گرم در یک لیتر آب مقطر) تلقیح و به مدت سه روز در انکوباتور شیکردار در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و ۱۸۰ دور در دقیقه انکوبه شدند. به منظور

باعث صحت بیشتر ترمیم آسیب‌های ایجاد شده در اثر اشعه می‌شود (۴).

مشاهده شده است داینوکوکوس رادیودورانس در حالت خشک نسبت به سوسپانسیون آبی سه بار بیشتر مقاومت به اشعه را نشان می‌دهد زیرا شرایط با آب کمتر باعث ایجاد رادیکال هیدروکسیل کمتری می‌شود (۵). همچنین، باکتری‌های هوازی در مقابل نور UV و هیدروژن پراکسید مقاومت بیشتری نسبت به باکتری‌های میکروآئروفیل‌ها نشان داده‌اند (۶). به طور کلی در باکتری‌هایی که در معرض استرس اکسیداتیو قرار گرفته‌اند میزان کربونیل‌اسیون پروتئین‌ها افزایش می‌یابد و ارتباط معکوسی با میزان بقا دارد. با وجود این، این میزان در باکتری‌های مقاوم به اشعه فرابنفش در مقایسه با سایر ارگانیزم‌های حساس به اشعه بسیار پایین‌تر می‌باشد (۷). کربونیل‌اسیون پروتئین‌ها به عنوان یک آسیب اکسیداتیو رایج شناخته می‌شود و بیشتر به عنوان یک نشانگر زیستی استرس اکسیداتیو استفاده می‌شود. این فرآیند به تغییر فعالیت عملکردی و برهم‌کنش پروتئین‌ها منجر می‌شود که در نهایت باعث توقف فرآیندهای سلولی و مرگ سلول می‌شود (۸). طبق مطالعات انجام شده تیمار اولیه باکتری‌های مقاوم به اشعه، با میزان کمتر H_2O_2 برای مدت کوتاهی مقاومت آن را در دوزهای بالاتر اشعه افزایش می‌دهد. در واقع بیانگر آن است که باکتری‌ها می‌توانند پاسخ‌های خود را در مقابل این استرس سازگار کنند (۹). باکتری‌های مقاوم به اشعه از مکانیزم‌های متعددی برای مقاومت در برابر اثرات کشنده رادیکال‌های آزاد اکسیژن استفاده می‌کنند که از جمله این استراتژی‌ها می‌توان به آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت، کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز اشاره کرد (۱۰). در سال‌های گذشته، گونه‌ها و

شناسایی مولکولی باکتری‌های انتخاب شده با تعیین

توالی ژن ۱۶S rRNA

پس از بررسی‌های بیوشیمیایی، به منظور شناسایی دقیق باکتری جداسازی شده از روش مولکولی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز^۴ (PCR) استفاده شد. ابتدا DNA در این باکتری با روش جوشاندن استخراج شد سپس به منظور تشخیص مولکولی از یک جفت پرایمر عمومی^۵ استفاده شد. این پرایمرها به دلیل درصد مناسب بازهای G+C و همچنین، کارایی بالای آن‌ها استفاده شد. به این منظور از یک قطعه ۲۰ نوکلئوتیدی به عنوان پرایمر رفت^۶ با نام 5'AACTGGAGGAAGGTGGGGAT3' (RW01) و یک قطعه ۱۹ نوکلئوتیدی به عنوان پرایمر برگشت^۷ با نام 5'AGGAGGTGATCCAACCGCA3' (DG74) استفاده شد (۱۵). با استفاده از آب دوبار تقطیر استریل فاقد نوکلئاز، حجم آن به ۲۵ میکرولیتر رسانده شد. سپس واکنش PCR در طی ۳۰ چرخه دمایی به شکل: دمای دناتوراسیون اولیه به مدت ۵ دقیقه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد فقط در سیکل اول، دمای دناتوراسیون به مدت ۴۵ ثانیه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد، دمای اتصال پرایمرها به مدت ۳۰ ثانیه در ۵۴ درجه سانتی‌گراد، دمای تکثیر به مدت ۴۵ ثانیه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد در و در نهایت دمای تکثیر نهایی به مدت ۵ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام شد. در نهایت یک قطعه ۳۷۰ جفت بازی به وسیله PCR تکثیر و به منظور تعیین توالی به شرکت بیونیر کره جنوبی ارسال شد. نتایج حاصل از تعیین توالی، به منظور مشخص شدن جنس و گونه سویه مورد نظر با توالی‌های موجود در پایگاه اطلاعاتی NCBI و EMBL مقایسه شد و قرابت بالاتر از ۹۸ درصد به عنوان جنس و گونه باکتری مجهول در نظر گرفته شد (۲).

غربال‌گری اولیه ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه‌های غنی شده به پلیت TGY آگار تلقیح و با میله شیشه‌ای سرکج پخش شدند. سپس، پلیت‌ها پس از یک انکوباسیون اولیه در ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ تا ۴ ساعت برای رویش اسپورها، در فاصله ۱۴ سانتی‌متری از یک لامپ دارای تابش فرابنفش قرار گرفتند. میزان کل اشعه ۱۵ ژول در نظر گرفته شد (۱۳). پس از اشعه پلیت‌ها به منظور اجتناب از ترمیم وابسته به نور در داخل فویل آلومینیومی پیچیده و به مدت سه تا ده روز در ۳۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. هم‌زمان با این کار یک پلیت حاوی محیط کشت TGY آگار نیز در زیر اشعه قرار داده و پس از اشعه بر روی آن کشت داده شد، تا از اثرات مهاری اجزای محیط کشت که در معرض اشعه فرابنفش قرار گرفته‌اند، بر روی باکتری‌ها اطمینان حاصل شود. در نهایت کلونی‌های رنگی مقاوم به اشعه فرابنفش براساس مشخصات ظاهری کلونی از یکدیگر متمایز، جداسازی و خالص‌سازی شدند. شناسایی اولیه توسط واکنش گرم و خصوصیات ریخت‌شناسی و بیوشیمیایی انجام شد. به منظور غربال‌گری ثانویه کلونی‌های جداسازی شده در مرحله اول، یک بار دیگر آزمایش مقاومت به اشعه فرابنفش با دوز نهایی ۲۵ ژول برای این سویه‌ها انجام شد (۲). بدین‌منظور یک کشت شبانه از سویه‌های جداسازی شده آماده شد، سپس ۱۰۰ میکرولیتر از باکتری‌های میانه فاز لگاریتمی معادل کدورت ۰/۵ مک فارلند به پلیت TGY آگار تلقیح و در فاصله ۱۴ سانتی‌متری از اشعه فرابنفش قرار داده شدند (۱۴). در مرحله غربال‌گری ثانویه، یک سویه مقاوم به اشعه فرابنفش غربال‌گری شد که به شکل MG6 نام‌گذاری شد.

تحلیل فیلوژنتیک

به منظور تأیید نتایج بلاست، برای سویه MG6 درخت فیلوژنتیکی نیز ترسیم شد که در ابتدا ۱۲ توالی با بیشترین شباهت با سویه MG6 انتخاب شدند. پس از هم‌ردیف‌سازی توالی‌ها در نرم افزار CLC Genomic Workbench، ویرایش‌های لازم بر روی توالی‌های هم‌ردیف شده انجام شد (۱۶). در مرحله بعد درخت فیلوژنتیکی با استفاده از نرم افزار MEGA5 و برپایه روش Neighbor-Joining و با بوت استرپ^۸ ۱۰۰۰ تکرار ترسیم شد. همچنین، فاصله ژنتیکی با روش Maximum Composite Likelihood محاسبه شد (۱۷).

بررسی مقاومت به شرایط سخت در سویه‌های جداسازی شده

سنجش میزان مقاومت به اشعه فرابنفش UV-C به کمک تکنیک فلوسایتومتری

کشت شبانه‌ای از باکتری در محیط TGY برات تهیه و سپس از باکتری‌های میانه فاز لگاریتمی معادل کدورت ۰/۵ مک فارلند در PBS آماده شد، سپس دو میلی‌لیتر از هر نمونه به یک پتری‌دیش استریل اضافه و به مدت ۳ ساعت معادل ۳۰ ژول بر سانتیمتر مربع، در فاصله ۱۴ سانتیمتری از اشعه فرابنفش با طول موج ۲۵۴ نانومتر قرار گرفت (۲). پس از تابش اشعه محتویات هر پتری‌دیش در ۴۰۰۰ دور به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ و رسوب باکتریایی هر نمونه در ۰/۵ میلی‌لیتر PBS حل شد. در نهایت به منظور بررسی درصد بقا از دستگاه فلوسایتومتری استفاده شد. بدین منظور برای رنگ آمیزی سلول‌های زنده و مرده از رنگ رودامین ۱۲۳ استفاده شد (۱۸). برای تهیه محلول ذخیره این رنگ ۵ میلی‌گرم از این رنگ در ۵ میلی‌لیتر اتانول حل شد. محلول رودامین ۱۲۳ نسبت به نور حساس می‌باشد و

برای جلوگیری از انجام واکنش نوری، لوله آزمایش حاوی این محلول به وسیله فویل آلومینیومی کاملاً پوشیده و در منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. و این استوک برای هر بار استفاده به نسبت ۱ به ۱۰۰ در PBS رقیق شد. سپس ۴۰۰ میکرولیتر به ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتریایی افزوده شد و به مدت ۱۰ دقیقه در تاریکی در دمای محیط قرار داده شد در نهایت به منظور بررسی میزان بقا از تکنیک فلوسایتومتری استفاده شد (۱۹). همچنین، برای محاسبه میزان کاهش باکتری‌ها در برابر اشعه، شاهد بدون اشعه هم در نظر گرفته شد. لازم به ذکر است که طول موج تحریکی یا جذبی رودامین ۱۲۳، ۵۰۷۵۶۰ تا ۵۶۰ نانومتر می‌باشد و همچنین، طول موج نشر این رنگ در محدوده ۵۲۹ تا ۵۸۰ نانومتر می‌باشد.

سنجش میزان مقاومت به خشکی به کمک تکنیک فلوسایتومتری

برای سنجش مقاومت این باکتری نسبت به خشکی از میکروپلیت‌های ۹۶ چاهکه استفاده شد. برای این منظور برای تلقیح چاهک‌های میکروپلیت از باکتری‌های میانه فاز لگاریتمی معادل کدورت ۰/۵ مک‌فارلند استفاده شد. برای بررسی مقاومت به خشکی در هر چاهک ۵۰ میکرولیتر سوسپانسیون باکتریایی تلقیح و به مدت چهار هفته در ۳۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد (۲۰). سپس به منظور بررسی درصد بقا از دستگاه فلوسایتومتری استفاده شد. که ابتدا پس از این مدت محتویات هر چاهک میکروپلیت به طور کامل در ۵۰ میکرولیتر PBS حل شد و سپس به کمک PBS حجم آن به ۰/۵ میلی‌لیتر رسانده شد. در این مرحله برای رنگ آمیزی سلول‌های زنده و مرده از رنگ رودامین ۱۲۳ استفاده شد. که از استوک رقیق شده رودامین ۴۰۰ میکرولیتر به ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون

تمام ردیف‌ها دارای محیط کشت با غلظت یک درصد هیدروژن پراکسید می‌باشند. به همین نحو با پیشروی در هر ردیف غلظت هیدروژن پراکسید افزایش داده شد. در مرحله بعد به هر چاهک ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتریایی با کدورت معادل ۰/۵ مک فارلند اضافه شد. پس از آن درب میکروپلیت‌ها گذاشته و دور آن‌ها با پارافیلیم بسته شد و به مدت ۳۰ دقیقه بر روی شیکر قرار داده شد و سپس با توجه به دمای مطلوب رشد باکتری مورد آزمایش میکروپلیت‌ها به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت در ۳۰ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شدند. سپس جذب نوری چاهک‌ها در طول موج ۶۳۰ نانومتر با استفاده از دستگاه خواننده الایزا قرائت شد و رشد یا عدم رشد در آن‌ها بررسی شد. همچنین، به منظور بررسی مقاومت به میتومايسين C پس از آماده کردن محلول‌هایی با غلظت‌های مختلف میتومايسين C (۱، ۲، ۴، ۶ و ۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر) سایر مراحل مشابه روش بالا انجام شد (۲۱). لازم به ذکر است که برای جلوگیری از تغییر غلظت هیدروژن پراکسید و میتومايسين C برای تهیه ۰/۵ مک فارلند باکتری از سرم فیزیولوژی استفاده نشد، بلکه از محیط TSB برات با غلظت هیدروژن پراکسید و میتومايسين C مشابه استفاده شد.

بررسی اثر غلظت‌های مختلف NaCl و مقادیر مختلف اسیدیتیه بر روی رشد سویه MG6

برای انجام این آزمایش از روش کدورت سنجی و دستگاه خواننده الایزا استفاده شد. برای این کار محیط کشت تریپتیک سوی برات با غلظت‌های مختلف NaCl (۰، ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰ و ۲۵ درصد) و مقادیر مختلف اسیدیتیه (۱، ۳، ۵، ۷، ۹ و ۱۱) آماده شد و سایر مراحل کار مشابه مرحله قبلی انجام شد.

باکتریایی افزوده شد، و به مدت ۱۰ دقیقه در تاریکی در دمای محیط قرار داده شد، در نهایت به منظور بررسی درصد بقا از تکنیک فلوسایتومتری استفاده شد (۱۹).

همچنین، میزان درصد کاهش باکتری در اثر مجاورت با ماده ضد میکروبی طبق فرمول زیر محاسبه شد.

$$\text{درصد کاهش} = \frac{B-A}{B} \times 100$$

در این فرمول A درصد باکتری‌های زنده پس از استرس خشکی و اشعه و B درصد باکتری‌های زنده در نمونه شاهد می‌باشد.

سنجش میزان مقاومت به هیدروژن پراکسید و میتومايسين C

برای انجام این آزمایش از روش کدورت سنجی و دستگاه خواننده الایزا استفاده شد. برای این کار در ابتدا محلول‌هایی با غلظت‌های مختلف هیدروژن پراکسید (۱، ۲، ۳، ۴ و ۵ درصد، بترتیب معادل ۰/۳، ۰/۵۸، ۰/۸۹، ۱/۱۸ و ۱/۴۶ مولار) آماده شد و سپس اسیدیتیه بر روی ۷/۲ تنظیم شد. در ابتدا به همه چاهک‌ها ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت تریپتیک سوی برات (TSB) افزوده شد و چاهک‌های ردیف A برای اندازه‌گیری کدورت محیط کشت‌ها لحاظ شد و برای بررسی کدورت حاصل از رشد باکتری کدورت ردیف A از آن‌ها کسر شد. سپس ۵۰ میکرولیتر از غلظت‌های مختلف هیدروژن پراکسید به این ترتیب که در یک ردیف ۱۲ تایی، در چاهک شماره ۱ و ۲ مقدار ۵۰ میکرولیتر از سرم فیزیولوژی ۰/۹ درصد ریخته و به عنوان شاهد مثبت در نظر گرفته شد. به ترتیب در چاهک‌های بعدی ۵۰ میکرولیتر از غلظت‌های مذکور هیدروژن پراکسید با دو تکرار اضافه شد. به این شکل که، ستون شماره ۱ و ۲ از تمام ردیف‌ها دارای محیط کشت بدون هیدروژن پراکسید، ستون شماره ۳ و ۴ از

مطالعات آماری

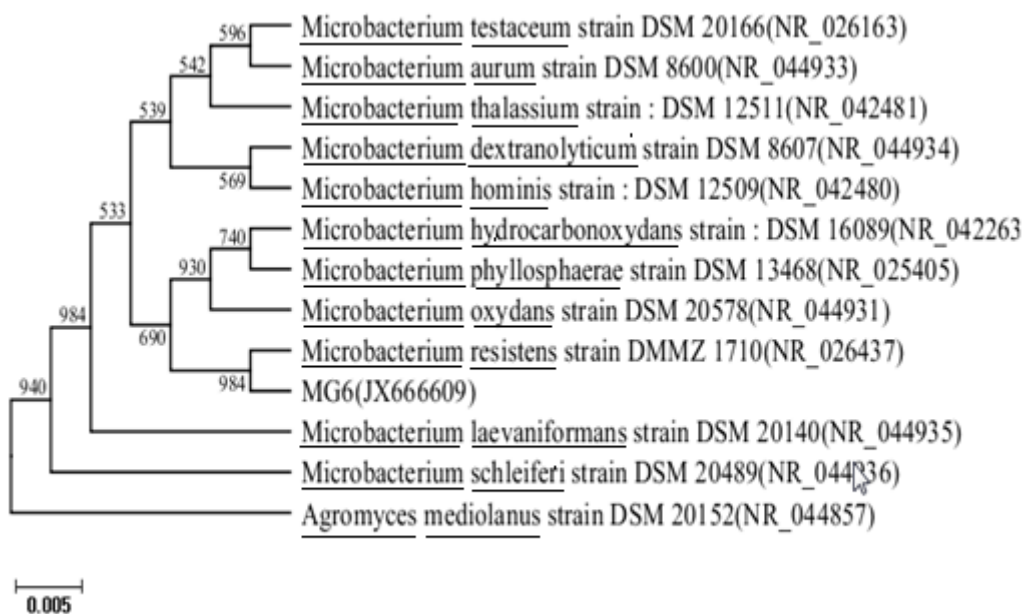
برای تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها از آزمون تحلیل واریانس (GLM-univariate) و برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون دانکن استفاده شد. اندازه کمتر از ۰/۰۵ به عنوان سطح معنی داری در نظر گرفته شد (۲۲).

نتایج

جداسازی، شناسایی مولکولی و فیلوژنتیکی سویه جداسازی شده MG6

خاک مناطق بیابانی با توجه به اینکه در معرض نور شدید آفتاب قرار دارند نمونه مناسبی برای جداسازی باکتری‌های مقاوم به اشعه فرابنفش می باشند. پس از جمع آوری نمونه‌ها، غربال‌گری اولیه و در نهایت غربال‌گری ثانویه، یک سویه با مقاومت بالا به اشعه فرابنفش جداسازی شد که به شکل MG6 نام‌گذاری شد و خصوصیات اولیه سویه جدا شده با استفاده از آزمایش‌های بیوشیمیایی و ویژگی‌های میکروسکوپی (ریخت‌شناسی و واکنش گرم) و ماکروسکوپی (رنگ کلونی) تعیین شد (۲۳). که مشخص شد یک باکتری

گرم مثبت با کلونی‌های زرد رنگ، هوازی، میله ای شکل و بدون اسپور می باشد. در مرحله بعد به منظور شناسایی مولکولی سویه مورد نظر یک قطعه ۳۷۰ جفت بازی توسط واکنش PCR تکثیر و تعیین توالی شد. سپس به منظور شناسایی جنس و گونه سویه مورد نظر، نتایج حاصل از تعیین توالی با سایر توالی‌های موجود در بانک ژنی بلاست شد و در نهایت به منظور شناسایی دقیق تر این سویه درخت فیلوژنی هم برای این سویه ترسیم شد (شکل ۱). مقیاس مربوط به درخت فیلوژنی بیانگر تعداد جایگزینی نوکلئوتیدی در هر جایگاه مقایسه شده می باشد. در نهایت، توالی ژن rRNA ۱۶S برای این سویه باکتریایی که از لحاظ مولکولی فیلوژنتیکی با باکتری *Microbacterium resistens* بیشترین شباهت (۹۹/۷ درصد) را نشان داد، با شماره دسترسی JX666609 در بانک ژنی NCBI ثبت نهایی شد.



شکل ۱- درخت فیلوژنی مربوط به سویه جداسازی شده MG6 با استفاده از نرم افزار MEGA5 و براساس روش

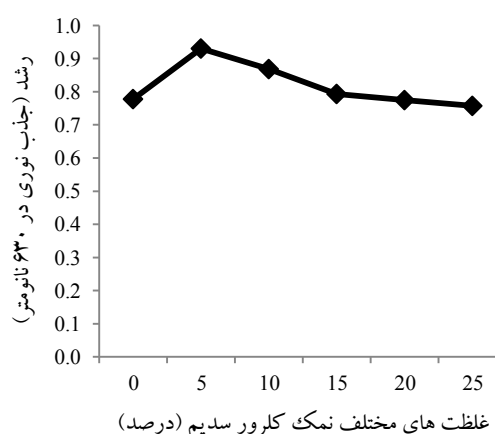
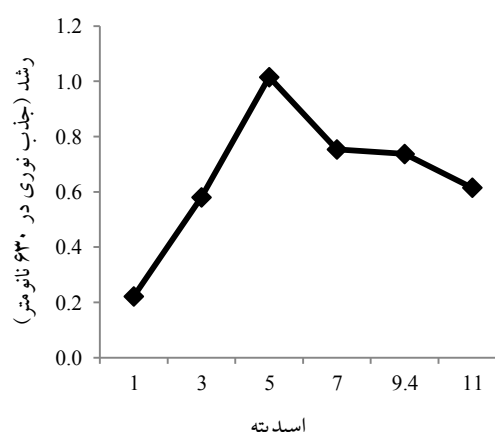
Neighbor-Joining (مقیاس بیانگر ۵ جایگزینی در هر ۱۰۰۰ نوکلئوتید می باشد).

تحلیل میزان بقا پس از تابش اشعه فرابنفش و اثر تنش خشکی به کمک تکنیک فلوسایتومتری

پس از بررسی اثر ۲۵ ژول اشعه فرابنفش بر روی باکتری جداسازی شده در این پژوهش، بر طبق نتایج بدست آمده سویه R1 و MG6 به عنوان مقاوم‌ترین سویه نسبت به اشعه فرابنفش شناخته شدند. به طوریکه نوک قله مربوط به شدت فلوروسنس در همه سویه‌ها در محدوده ۱۰۰ تا ۱۰۰۰ قرار دارد که بیانگر تعداد بیشتر سلول‌های مثبت یا زنده در مقایسه با نمونه شاهد در این دو سویه می‌باشد (شکل ۳، A, D, G). درحالی که در مورد سویه اشرشیا کلای نوک قله مربوط به شدت فلوروسنس در محدوده بین ۱۰ تا ۱۰۰ قرار دارد که بیانگر کاهش بالای تعداد سلول‌های زنده می‌باشد (شکل ۳، B, E, H). از طرفی دیگر با توجه به این که میزان کاهش بقا در سویه R1، ۲ درصد بود. بنابراین، می‌توان نتیجه گرفت که ۹۸ درصد سلول‌ها زنده مانده‌اند که این میزان برحسب شاخص D، معادل D₉₈ خواهد بود. همچنین، میزان مقاومت در سویه MG6 و سویه اشرشیا کلی برحسب شاخص D به ترتیب: D₈₈ و D₅₂ تعیین شد (شکل ۴). طبق نتایج به دست آمده سویه MG6 مقاومت بسیار بالایی را در برابر تابش فرابنفش در مقایسه با سویه اشرشیا کلی نشان داد. اما در مقایسه با سویه R1 میزان مقاومت به طور جزئی کاهش یافت. همچنین، پس از بررسی اثر تنش خشکی (۲۸ روز در ۳۰ درجه) بر روی سویه جداسازی شده در این پژوهش، نتایج نشان داد که سویه MG6 در مقایسه با سویه R1 مقاومت کمتری نسبت به تنش خشکی نشان داد و سویه اشرشیا کلی کمترین میزان مقاومت به خشکی را داشت. به طوری که نتایج حاصل از تحلیل میزان بقا به کمک فلوسایتومتری در مورد سویه شاهد R1 نشان داد که نوک قله مربوط به شدت فلوروسنس پس از تنش خشکی در محدوده ۱۰ تا ۱۰۰ قرار دارد که بیانگر کاهش

بررسی اثر غلظت‌های مختلف نمک NaCl و مقادیر مختلف اسیدیته بر روی رشد سویه MG6

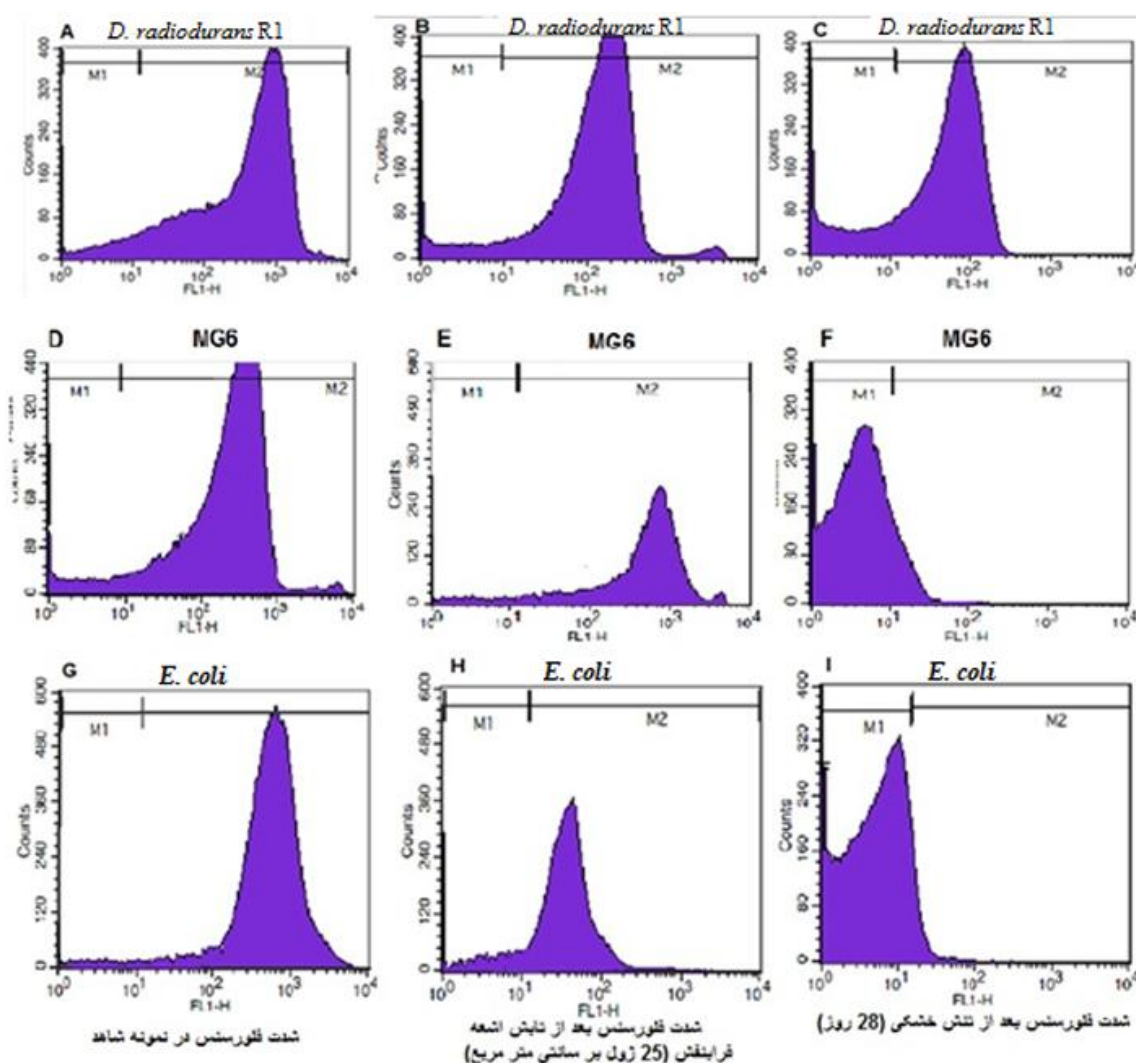
پس از بررسی اثر غلظت‌های مختلف نمک کلرید سدیم بر روی رشد این سویه نتایج نشان داد که این سویه مقاومت بسیار بالایی به نمک NaCl نشان می‌دهد به طوری که حتی غلظت ۲۵ درصد نمک هم باعث مهار رشد این سویه نشد. همچنین، طبق نتایج بدست آمده بهینه رشد این سویه در غلظت ۵ درصد نمک مشاهده شد (شکل ۲). همچنین، ملاحظه شد که این سویه در مقادیر اسیدیته ۳ تا ۱۱ قادر به رشد می‌باشد به طوری که بهینه رشد را اسیدیته ۵ نشان می‌دهد. از طرفی اسیدیته ۱ باعث مهار رشد این سویه شد.



شکل ۲- بررسی اثر غلظت‌های مختلف نمک NaCl و مقادیر مختلف اسیدیته بر روی رشد سویه MG6

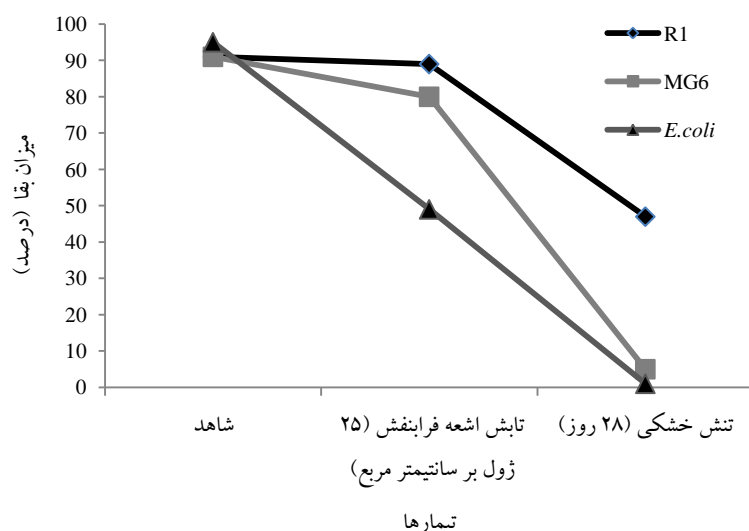
اشعه و خشکی وجود دارد بنابراین، مقاومت به خشکی نیز در سویه MG6 بررسی شد. اما برطبق نتایج بدست آمده سویه MG6 با توجه به این که مقاومت بسیار بالایی در برابر اشعه فرابنفش نشان داد اما مقاومت کمتری را نسبت به تنش خشکی در مقایسه با سویه R1 نشان داد. که این ممکن است به این علت باشد که بین سیستم‌های درگیر در مقاومت به اشعه و خشکی در سویه R1 ارتباط نزدیکی وجود دارد. درحالی که سویه MG6 با توجه به اینکه مقاومت بالاتری در برابر اشعه داشت، اما با وجود این به شدت نسبت به خشکی حساسیت نشان داد.

تقریباً ۱۰ برابری، تعداد سلول‌های مثبت یا زنده می باشد درحالی که نوک قله مربوط به نمودار شدت فلورسنس در مورد نمونه تیمار شده باخشکی در دو سویه MG6 و اشرشیا کلای در محدوده‌ی ۱۰ قرار دارد (شکل ۳، C, F, I). که بیانگر کاهش صد برابری شدت فلورسنس سلول-های زنده در مقایسه با نمونه شاهد می باشد. همچنین، میزان بقا برحسب شاخص D در سه سویه R1، MG6 و اشرشیا کلای به ترتیب معادل D52، D6 و D1 خواهد بود (شکل ۴). مطالعات اخیر نشان داده است که در سویه‌های مقاوم به اشعه ارتباط نزدیکی بین مقاومت به



شکل ۳- بررسی شدت فلورسنس پس از ۲۵ ژول اشعه فرابنفش و ۲۸ روز تنش خشکی بر روی سویه MG6 در مقایسه با دو سویه شاهد مقاوم

Deinococcus radiodurans R1 و شاهد حساس *E. coli* به کمک تکنیک فلوسایتمتری

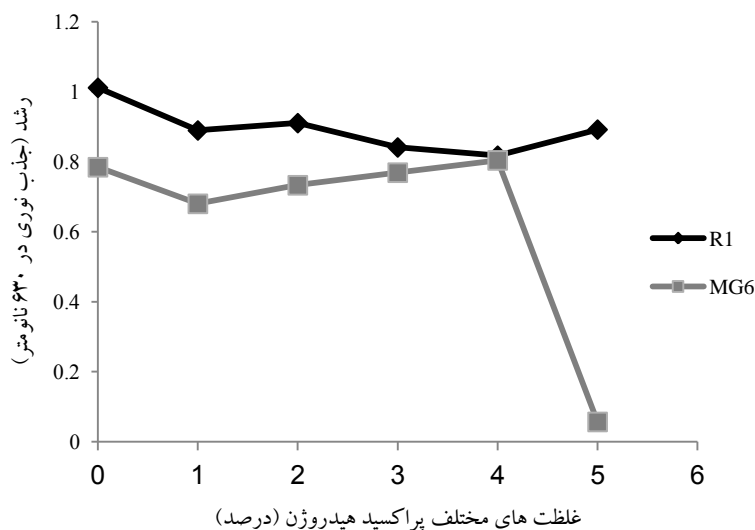


شکل ۴- بررسی درصد بقا پس از ۲۵ ژول اشعه فرابنفش و ۲۸ روز تنش خشکی بر روی سویه MG6 در مقایسه با سویه‌های شاهد *Deinococcus radiodurans* R1 و *E. coli* به کمک تکنیک فلوسایتمتری

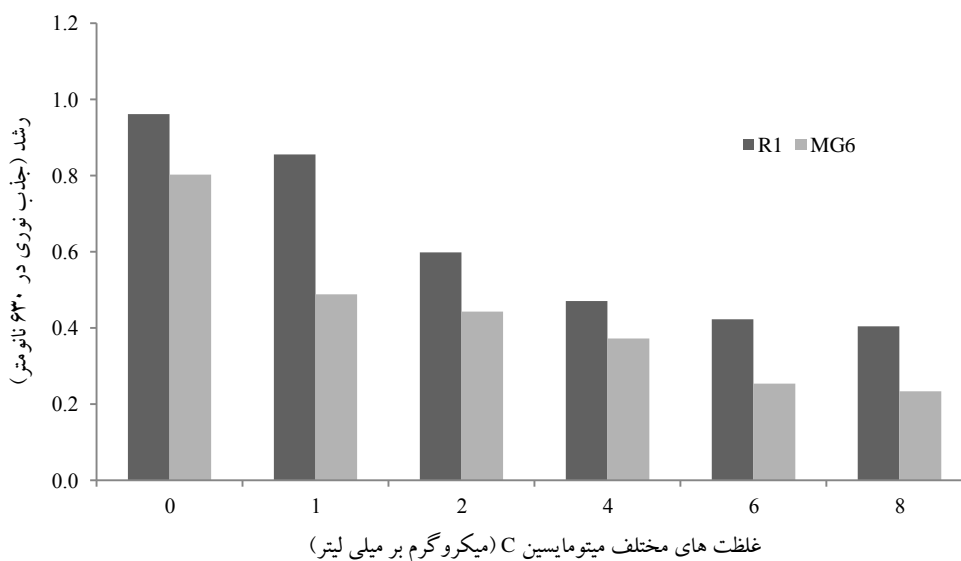
معنی‌داری دارد ($P \text{ value} < 0/05$). نتایج آماری بدست آمده برای میتومايسن C هم مشابه اثر هیدروژن پراکسید بر روی رشد باکتری‌ها بود. بر طبق این نتایج، سویه MG6 نسبت به غلظت‌های ۱ تا ۴ درصد در مقایسه با سویه *D. radiodurans* مقاومت بسیار خوبی نشان داد اما در غلظت ۵ درصد هیدروژن پراکسید مقاومت در سویه مورد نظر به شدت کاهش یافت. درحالی که سویه *D. radiodurans* در غلظت ۵ درصد هیدروژن پراکسید هم به رشد خود ادامه داد (شکل ۵). همچنین، مقاومت به میتومايسن C در این سویه مشابه داینوکوکوس رادیودورانس بود به طوری که هر دو سویه به غلظت ۲ میکروگرم از این ترکیب مقاومت نشان دادند ولی غلظت‌های بالاتر اثر مهاری بر روی رشد این دو سویه داشت (شکل ۶). مقایسه میانگین‌ها با آزمون دانکن نشان داد که در بین غلظت‌های مختلف میتومايسن C، به جز در غلظت‌های ۴ تا ۸ میکروگرم، اختلاف معنی‌داری وجود داشت ($P \text{ value} < 0/05$).

بررسی میزان مقاومت به هیدروژن پراکسید و میتومايسن C

پس از بررسی اثر غلظت‌های مختلف هیدروژن پراکسید بر روی رشد باکتری‌ها جداسازی شده، نتایج این طور نشان داد که در جذب نوری بین باکتری‌های شاهد و تیمار شده با هیدروژن پراکسید تفاوت معنی‌دار وجود دارد (شکل ۵). به طوری که باکتری‌های تیمار شده با هیدروژن پراکسید جذب نوری کمتری نسبت به شاهد نشان می‌دهند. همچنین، جذب نوری در غلظت‌های مختلف هیدروژن پراکسید و نیز در باکتری‌های مختلف متفاوت است. به طوری که نتایج حاصل از آزمون تحلیل واریانس نشان داد، که هم غلظت هیدروژن پراکسید و هم نوع باکتری در میانگین جذب نوری موثر می‌باشد و برهم کنش متقابل بین غلظت‌های مختلف هیدروژن پراکسید و باکتری‌های مختلف نیز معنی‌دار است ($P \text{ value} < 0/05$). همچنین، آزمون دانکن نیز نشان داد که میانگین جذب نوری در غلظت‌های مختلف هیدروژن پراکسید و نیز در باکتری‌های مختلف اختلاف



شکل ۵- میزان مقاومت به غلظت‌های مختلف هیدروژن پراکسید در سویه MG6 در مقایسه با *Deinococcus radiodurans* R1



شکل ۶- بررسی مقاومت به غلظت‌های مختلف میتو مایسن C در سویه MG6 در مقایسه با *Deinococcus radiodurans* R1

نمک می‌باشند که این نتایج با نتایج بدست آمده توسط شوکلا و همکاران^۹ همخوانی داشت (۱۴). در واقع می‌توان گفت بین سیستم‌های درگیر در مقاومت به اشعه و خشکی و تحمل نمک ارتباطی وجود ندارد. اما با وجود این هالوباکتریوم یک آرکنای نمک دوست است که در غلظت بالای نمک نزدیک به حد اشباع رشد

بحث و نتیجه‌گیری

بر طبق نتایج بدست آمده باکتری‌هایی که مقاومت بالایی در برابر اشعه فرابنفش و خشکی نشان می‌دهند قادر به تحمل مقادیر بالای نمک نمی‌باشند. از طرف دیگر باکتری‌هایی که مقاومت متوسطی به اشعه فرابنفش و خشکی نشان می‌دهند قادر به تحمل مقادیر بالای

باکتری‌هایی که به ۱۵ روز خشکی مقاومت بالایی نشان داده‌اند به غلظت ۵ میلی‌مولار هیدروژن پراکسید نیز در مقایسه با سوبه‌های حساس مقاومت بالاتری نشان می‌دهند (۱۴). در سال ۲۰۰۲ تسوجی و همکاران^{۱۸} دریافتند که پیش‌تیمار با غلظت‌های پایین فلزات سنگین از قبیل جیوه، سرب و کادمیم به مقاومت به غلظت‌های بالاتر هیدروژن پراکسید منجر می‌شود (۲۹). همچنین، باتوت و همکاران^{۱۹} در سال ۲۰۰۶ در تحقیقی که بر روی تغییرات فیزیولوژیکی غشا پس از تیمار با هیدروژن پراکسید انجام دادند به این نتیجه رسیدند، که یکی از عوامل موثر در مقاومت باکتری‌های مختلف به استرس اکسیداتیو اختلاف در ویژگی‌های غشا در باکتری‌های مختلف می‌باشد (۱۸).

نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که باکتری *M. resistens* در مقایسه با *D. radiodurans* R1 مقاومت بسیار بالایی در برابر اشعه فرابنفش دارد، در حالی که نسبت به خشکی در مقایسه با سوبه R1 مقاومت متوسطی را نشان می‌دهد. همچنین، مقاومت بالایی به دیگر شرایط سخت از قبیل هیدروژن پراکسید، میتوماکسین C، غلظت بالای نمک و مقادیر مختلف اسیدیته داشت. مقاومت چندگانه ممکن است به خاطر سیستم‌های ترمیمی قوی، آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت از قبیل کاتالاز و پراکسیداز و رنگیزه کاروتنوئیدی باشد. براساس نتایج بدست آمده این سوبه کاندید مناسبی برای مطالعات آینده از قبیل پاک‌سازی زیستی پساب‌های آلوده صنعتی و محیطی می‌باشد.

می‌کند و قادر به تحمل دوز بالای اشعه گاما (D_{10}) پس از ۵ کیلوگری می‌باشد و میزان بقا پس از ۲۰ روز خشکی، D_{25} می‌باشد (۲۰).

رودامین ۱۲۳ یک رنگ فلورسنت کاتیونی است که می‌تواند درون باکتری‌های زنده نفوذ کند (به علت بار منفی سطح درونی غشا) و درون سلول تجمع یابد. در این حالت سلول‌های زنده که رنگ درون آن‌ها تجمع یافته دارای جذب در محدوده ۵۲۵ نانومتر هستند و می‌توان درصد آن‌ها را با استفاده از روش فلوسیتومتری تعیین نمود.

در سال ۲۰۱۰ زهنگ و همکاران^{۱۰} یک سوبه جدید از میکروباکتریوم رادیودورانس^{۱۱} را جداسازی و شناسایی کردند که مقاومت در خور توجهی در برابر اشعه فرابنفش نشان می‌داد (۲۴). در تحقیقی دیگر که بر روی سوبه میکروباکتریوم ماریتیپیکوم^{۱۲} انجام شد، این سوبه به عنوان یک سوبه مقاوم به اشعه گاما معرفی شد (۲۵-۲۷). در مطالعه دیگری که توسط عثمان و همکاران بر روی باکتری‌های مقاوم به اشعه انجام شد، مشاهده شد که پس از ۲۰۰ ژول بر متر مربع از اشعه فرابنفش بر روی باکتری‌های اسفینگوموناس تریوپری^{۱۳} و بریوندیموناس دایمینوتا^{۱۴} میزان بقا ۶ برابر کاهش یافت، در حالی که باکتری‌های میکروباکتریوم اسکلیفری^{۱۵} و اگزیزگوباکتریوم استیلیکوم در برابر همین میزان اشعه ۳ برابر کاهش در میزان بقا نشان دادند. همچنین، نتایج نشان داد که میکروباکتریوم اسکلیفری، میکروباکتریوم آربوریکنس^{۱۶} و اگزیزگوباکتریوم استیلیکوم پس از ۱۰۰۰ ژول اشعه فرابنفش هم توانایی بقا دارند. (۲۸).

شوکلا و همکاران^{۱۷} در تحقیقی که در سال ۲۰۰۷ بر روی باکتری‌های مقاوم به اشعه انجام دادند، دریافتند،

References

- (1) Venkateswaran A, McFarlan SC, Ghosal D, Minton KW, Vasilenko A, Makarova K, et al. Physiologic determinants of radiation resistance in *Deinococcus radiodurans*. *Appl Environ Microbiol.* 2000; 66 (6) :2620-6.
- (2) Asgarani E, Soudi MR, Borzooee F, Dabbagh R. Radio-resistance in psychrotrophic *Kocuria* sp. ASB 107 isolated from Ab-e-Siah radioactive spring. *J Environ Radioact.* 2012; 113: 171-6.
- (3) Slade D, Radman M. Oxidative stress resistance in *Deinococcus radiodurans*. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2011; 75 (1) :133-91.
- (4) Agostini HJ, Carroll JD, Minton KW. Identification and characterization of *uvrA*, a DNA repair gene of *Deinococcus radiodurans*. *J Bacteriol.* 1996; 178 (23) : 6759-65.
- (5) Kilburn RE, Bellamy WD, Terni SA. Studies on a radiation-resistant pigmented *Sarcina* sp. *Radiat Res.* 1958;9 (2): 207-15.
- (6) Arrage AA, Phelps TJ, Benoit RE, White DC. Survival of subsurface microorganisms exposed to UV radiation and hydrogen peroxide. *Appl Environ Microbiol.* 1993; 59 (11): 3545-50.
- (7) Krisko A, Radman M. Protein damage and death by radiation in *Escherichia coli* and *Deinococcus radiodurans*. *Proc Natl Acad Sci.* 2010; 107 (32): 14373-7
- (8) Daly MJ, Gaidamakova EK, Matrosova VY, Vasilenko A, Zhai M, Leapman RD, et al. Protein oxidation implicated as the primary determinant of bacterial radioresistance. *PLoS Biol.* 2007; 5(4) :e92.
- (9) Slade D, Radman M. Oxidative stress resistance in *Deinococcus radiodurans*. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2011; 75(1): 133-91.
- (10) Di Capua C, Bortolotti A, Farías ME, Cortez N. UV-resistant *Acinetobacter* sp. isolates from Andean wetlands display high catalase activity. *FEMS Microbiol Lett.* 2011; 317(2): 181-9.
- (11) Mann JE. Recent advances in the development of *Deinococcus* spp. for use in

پیوست‌ها

انحراف معیار میانگین‌ها در نمودارهای مربوط به رشد

سویه‌ها در شرایط سخت مورد آزمایش

میکروباکتریوم رزیستنس MG6	سویه باکتری NaCl (درصد)
SD	۰
۰/۰۳۷	۵
۰/۰۸۲	۱۰
۰/۰۷۱	۱۵
۰/۰۳۵	۲۰
۰/۰۱۳	۲۵
۰/۰۵۱	

میکروباکتریوم رزیستنس MG6	سویه باکتری pH
SD	۱
۰/۰۴۴	۳
۰/۰۳۱	۵
۰/۰۵۷	۷
۰/۰۵۶	۹
۰/۰۶۴	۱۱
۰/۰۷۸	

میکروباکتریوم رزیستنس MG6	دینوکوکوس رادیودورانس R1	سویه باکتری H2O2 (درصد)
SD	SD	۰
۰/۰۸۶	۰/۱۲۳	۱
۰/۰۵۶	۰/۰۲۳	۲
۰/۰۲۰	۰/۰۴۲	۳
۰/۰۳۱	۰/۰۳۱	۴
۰/۰۲۰	۰/۰۱۵	۵
۰/۰۱۷	۰/۰۷۷	

میکروباکتریوم رزیستنس MG6	دینوکوکوس رادیودورانس R1	سویه باکتری MMC (mg)
SD	SD	۰
۰/۱۸۶	۰/۰۷۸	۱
۰/۰۱۶	۰/۰۲۲	۲
۰/۰۲۸	۰/۰۶۱	۴
۰/۰۴۹	۰/۰۸۳	۶
۰/۰۲۸	۰/۰۷۱	۸
۰/۰۴۴	۰/۰۱۳	

- 2009; *MMG 449 Basic Biotech.* 5 (1): 60-65.
- (12) Brooks BW, and R. G. E. Murray. Nomenclature for “*Micrococcus radiodurans*” and other radiation-resistant cocci: *Deinococcaceae* fam. nov. and *Deinococcus* gen. nov., including five species. *Int J Syst Bacteriol.* 1981; 31:353-360.
- (13) Chen M-Y, Wu S-H, Lin G-H, Lu C-P, Lin Y-T, Chang W-C, et al. *Rubrobacter taiwanensis* sp. nov., a novel thermophilic, radiation-resistant species isolated from hot springs. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2004;54 (5): 1849-55.
- (14) Shukla M, Chaturvedi R, Tamhane D, Vyas P, Archana G, Apte S, et al. Multiple-stress tolerance of ionizing radiation-resistant bacterial isolates obtained from various habitats: correlation between stresses. *Curr Microbiol.* 2007; 54(2): 142-8.
- (15) Dutta S, Narang A, Chakraborty A, Ray P. Diagnosis of neonatal sepsis using universal primer polymerase chain reaction before and after starting antibiotic drug therapy. *Arch Ped & Adol Med.* 2009; 163 (1): 6.
- (16) Gholami M, Emtiazi G. Designing a new molecular marker for detection of heavy metal resistance genes in bacteria. *Gene 3rd millennium.* 2012;10 (2) :5.
- (17) Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol.* 1987; 4 (4): 406-25.
- (18) Baatout S, De Boever P, Mergeay M. Physiological changes induced in four bacterial strains following oxidative stress. *Appl Biochem Microbiol.* 2006; 42(4): 369-77.
- (19) Sarafnejad A, Siavoshi F, Safaralizadeh R, Masarat S, Khosravi F, Malekzadeh R, et al. Assessment of *Helicobacter pylori* Viability by Flow Cytometry. *Iran J Public Health.* 2007; 36(1): 50-54.
- (20) Kottemann M, Kish A, Iloanusi C, Bjork S, DiRuggiero J. Physiological responses of the halophilic archaeon *Halobacterium* sp. strain NRC1 to desiccation and gamma irradiation. *Extremophiles.* 2005; 9(3): 219-27.
- bioremediation of mixed radioactive waste.
- (21) Holowachuk SA, Bal'a MF, Buddington RK. A kinetic microplate method for quantifying the antibacterial properties of biological fluids. *J Microbiol Meth.* 2003;55 (2): 441-6.
- (22) Kim D, Song H, Lim S, Yun H, Chung J. Effects of gamma irradiation on the radiation-resistant bacteria and polyphenol oxidase activity in fresh kale juice. *Radiat Phys Chem.* 2007; 76 (7): 1213-7.
- (23) Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA, Staley JT, Williams ST. Bergey's manual of determinative bacteriology. *Williams and Wilkins, Baltimore.* 1994: 39-63.
- (24) Zhang W, Zhu H, Yuan M, Yao Q, Tang R, Lin M, et al. *Microbacterium radiodurans* sp. nov., a UV radiation-resistant bacterium isolated from soil. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2010; 60 (11): 2665-70.
- (25) Williams PD, Eichstadt SL, Kokjohn TA, Martin EL. Effects of ultraviolet radiation on the Gram-positive marine bacterium *Microbacterium maritypicum*. *Curr Microbiol.* 2007; 55(1): 1-7.
- (26) Singh O, Gabani P. Extremophiles: radiation resistance microbial reserves and therapeutic implications. *J Appl Microbiol.* 2011; 110 (4): 851-61.
- (27) Kotelnikova SV, MacDonald R, Martine E, editors. Unusual resistance of marine *Vibrio* from Grenada to solar UV radiation. *Caribbean Academy of Sciences 2008 Conference proceedings book*; 2008.
- (28) Osman S, Peeters Z, La Duc MT, Mancinelli R, Ehrenfreund P, Venkateswaran K. Effect of shadowing on survival of bacteria under conditions simulating the martian atmosphere and UV radiation. *Appl Environ Microbiol.* 2008; 74 (4) :959-70.
- (29) Tsuji N, Hirayanagi N, Okada M, Miyasaka H, Hirata K, Zenk MH, et al. Enhancement of tolerance to heavy metals and oxidative stress in *Dunaliella tertiolecta* by Zn-induced phytochelatin synthesis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002; 293 (1): 653-9.

-
- ¹. MitomycinC
 - ². Reactive oxygen species (ROS)
 - ³. Double-strand DNA breaks (DSBs)
 - ⁴. Polymerase chain reaction
 - ⁵. Universal
 - ⁶. Forward
 - ⁷. Reverse
 - ⁸. Bootstrap
 - ⁹. Shukla et al.
 - ¹⁰. Zhang et al.
 - ¹¹. *Microbacterium radiodurans*
 - ¹². *Microbacterium maritypicum*
 - ¹³. *Sphingomonas trueperi*
 - ¹⁴. *Brevundimonas diminuta*
 - ¹⁵. *Microbacterium schleiferi*
 - ¹⁶. *Microbacterium arborescens*
 - ¹⁷. Shukla et al.
 - ¹⁸. Tsuji et al.
 - ¹⁹. Baatout et al.

Isolation and molecular identification of a new strain of *Microbacterium resistens*, capable of tolerating the extreme conditions

Mahmoud Gholami

M.Sc. of Microbiology, University of Isfahan, Iran, mgholami783@gmail.com

Zahra Etemadifar*

Assistant Professor of Microbiology, University of Isfahan, Iran, z_etemadifar@yahoo.com

Abstract

Introduction: The use of resistant bacteria to radiation and other extreme conditions for bioremediation of the environmental and radioactive waste is very important due to their survivability and catalytic efficiency under high stress conditions.

Materials and methods: After primary and secondary screening by irradiation with UV lamp, one isolate was obtained and identified on the basis of morphological and biochemical characteristics, 16S rRNA gene sequencing and phylogenetic analysis. In the next step, the isolate was exposed to extreme conditions such as: UV-radiation (25J/cm²), desiccation (28 days), %1-5 hydrogen peroxide, mitomycin C (1-8µg), salinity (%5-25 NaCl) and different pHs (pH 1.0-11) during or after culture in TGY medium. Bacterial growth or survival was analyzed by spectrometry or flow cytometry.

Results: Isolated strain MG6 was an ultraviolet-resistant, Gram-positive, and rod shaped bacterium that its 16S rDNA sequences showed %99.69 similarity with *Microbacterium resistens*. This similarity was confirmed by phylogenetic analysis. Optimal growth rate of strain MG6 occurred at pH 5, %5 (w/v) NaCl and tolerated %1- 4 H₂O₂ and 2µg of mitomycin C. Analysis of viability indicated that this strain had highly resistance to UV-C radiation but moderately resistance to showed desiccation.

Discussion and conclusion: In this study, a new strain of *M. resistens* was isolated which was UV-resistant and showed tolerance to several extreme conditions such as: low pH, oxidant and mutagen agents, salinity and desiccation. The UV resistance of strain MG6 was comparable with *Deinococcus radiodurans R1*. This research was the first study on multiple extreme resistance of *M. resistens* new isolated strain (MG6) in Iran. Also this strain could be a candidate for the future researches such as bioremediation of radioactive waste sites.

Key words: UV-resistance, *Microbacterium resistens*, Flow cytometry, Extreme conditions

* Corresponding Author

Received: February 24, 2013 / **Accepted:** July 6, 2013