Downloaded from jweb.iauahvaz.ac.ir at 12:22 +0430 on Sunday May 12th 2019

بررسی فیلوژنتیک باکتری‌های نمک دوست نسبی و تحمل‌کننده نمک قابل‌کشت در گل‌فشان گمیشان

مژگان قیاسیان[۱]
محمد علی آموزگار[۲*]
عباس اخوان سپهی[۳]
سارا سعادتمند[۴]
محمود شوندی[۵]

۱. دانشجوی دکتری، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران
۲. دانشیار گروه زیست‌شناسی، دانشکده زیست‌شناسی و قطب تبارزایی موجودات زنده، پردیس علوم، دانشگاه تهران، تهران، ایران
۳. دانشیار گروه علوم زیستی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، تهران، ایران
۴. دانشیار، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران
۵. استادیار گروه محیط زیست، پژوهشکده محیط‌زیست و بیوتکنولوژی، پژوهشگاه صنعت نفت، تهران، ایران

***مسئول مکاتبات:**
amoozegar@ut.ac.ir

کد مقاله: ۱۳۹۶۰۳۰۴۶۷
تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۰۷/۲۹
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۱۱/۲۹
این مقاله برگرفته از رساله دکتری است.

چکیده

گل‌فشان گمیشان در ۷ کیلومتری شهرستان گمیشان واقع‌شده است. نمونه‌برداری جهت انجام آزمایش در مرداد ماه سال ۱۳۹۲ از این گل‌فشان انجام گرفت. دمای گل در زمان نمونه‌برداری ۱± ۳۸ درجه سانتی گراد و pH ۱±۸ بود. میزان شوری ۳۴ گرم بر لیتر اندازه‌گیری شد. یون‌های سدیم و کلر بیشترین میزان و آهن کمترین میزان یون‌ها را در ترکیب گل به خود اختصاص داده بودند. از محیط کشت مناسب جهت جداسازی باکتری‌های نمک دوست نسبی و تحمل‌کننده نمک استفاده شد. تعداد سلول‌های به‌دست‌آمده درروش شمارش کلنی حدود $۱۰^{۶}\times ۳-۱$ سلول در هر میلی‌لیتر بود. ۱۲۲ سویه خالص‌سازی شدند و از میان این تعداد، ۴۲ سویه بر اساس صفات مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی اولیه انتخاب و با تکثیر و تعیین ترادف ژن ۱۶S rRNA شناسایی شدند. جنس‌های *Halomonas* (۲۰ درصد)، *Arthrobacter* (۵ درصد)، *Kocuria* (۵ درصد)، *Thalassobacillus* (۵ درصد)، *Marinobacter* (۲۰ درصد)، *Paracoccus* (۵ درصد)، *Roseovarius* (۵ درصد)، *Jeotgalicoccus* (۵ درصد)، *Bacillus* (۱۵ درصد)، *Staphylococcus* (۱۵ درصد) جدا شدند. آنزیم‌های اکسیداز و کاتالاز در همه سویه‌ها بررسی شدند. ۹۸/۴ درصد سویه‌ها کاتالاز مثبت و ۶۹/۷ درصد اکسیداز مثبت بودند.

واژگان کلیدی: گل‌فشان، باکتری تحمل‌کننده نمک، باکتری نمک دوست نسبی، درخت فیلوژنتیکی.

مقدمه

تنوع زیستی پروکاریوت‌ها بخش بزرگی از تنوع زیست‌کره را تشکیل می‌دهد که نسبت به سایر گروه‌های حیاتی کمتر مورد توجه قرارگرفته است. پروکاریوت‌ها انجام بسیاری از فرآیندهای چرخه زیستی مواد را در انحصار خود دارند که در حفظ حیات تمامی گروه‌های زنده تأثیرگذار هستند (Kopf, 2002). طبیعت غنی‌ترین منبع برای شناسایی ژن‌های تازه بوده و در این میان پروکاریوت‌ها بیشترین تنوع را دارند. تنوع زیستی به دلیل شناسایی گوناگونی میکروارگانیسم‌های موجود و ارائه ذخیره ژنتیکی تازه به گسترش مرزهای دانش میکروبیولوژی و علوم وابسته مانند بیوتکنولوژی می‌انجامد (Griffiths *et al*., 2016) بررسی تنوع میکروارگانیسم‌ها بدون بهره جستن از انواع روش‌های مختلف برای مشاهده

Archive of SID
www.SID.ir

Downloaded from jweb.iauahvaz.ac.ir at 12:22 +0430 on Sunday May 12th 2019

میکروارگانیسم‌ها و شناسایی تفاوت میان آن‌ها امکان‌پذیر نیست. شناسایی تفاوت‌های گسترده میان میکروارگانیسم‌ها در سطوح مختلف شکل شناسی، فیزیولوژی و فیلوژنتیکی، با کمک روش‌ها و ابزارهای قدرتمند میسر است. این روش‌ها معمولاً به دو بخش اصلی تقسیم می‌شوند. روش‌های وابسته به کشت که مرحله اول بررسی تنوع، کشت و خالص‌سازی میکروارگانیسم‌ها در آزمایشگاه است و روش‌های مولکولی که مولکول‌های ویژه‌ای از میکروارگانیسم‌ها بدون نیاز به کشت آن‌ها در آزمایشگاه، از محیط استخراج و تنوع میکروارگانیسم‌های محیط با بررسی آن‌ها مشخص می‌گردد (Sathyanarayana Reddy *et al.*, 2016) گل‌فشان‌ها یکی از اکوسیستم‌های طبیعی و بومی هستند که به دلیل ارتباط آن‌ها با ذخایر نفت و گاز در چند دهه اخیر موردتوجه زمین شناسان قرار گرفته است (Kopf, 2002). گِل‌فشان به شکل مخروط و متشکل از رسوبات و آب داغ است که به صورت جریان گل شل و آبکی از دهانه مخروط به سطح زمین راه می‌یابند و به دلیل همراه داشتن گازهای آتشفشانی و آب جوشان به‌صورت فواره به هوا پرتاب می‌شوند. گل فشان‌ها به‌عنوان منبع ژئولوژیکی کربن اتمسفر به‌ویژه گاز متان شناخته شده‌اند. گل‌فشان‌ها ساختار ژئولوژیکی دارند که عامل نشر گاز، آب و ترکیبات رسی در سطح خاکی زمین یا کف دریاها می‌باشند (Dimitrov, 2003; Bharti and Niyogi, 2015). با توجه به این که گل‌فشان عمدتاً در رسوبات حاوی نفت خام اعم از بستر دریا و یا در حاشیه محیط‌های آبی و محل گسل و فرورانش به وجود می‌آید، بنابراین به‌عنوان محیط‌زیست موجودات ذره‌بینی که با اکسایش بی‌هوازی، گاز متان را به انیدریدکربنیک تبدیل می‌کنند مناسب است (Zemskaya *et al.*, 2010). از طرف دیگر تولید انیدریدکربنیک بیش از حد باعث اختلال در زنجیره غذایی و افزایش تولید گازهای گلخانه‌ای می‌شود و تأثیر منفی آن به علت خروج گازهای متان و افزایش گازهای گلخانه‌ای، تخریب اکولوژی و زیستگاه آبزیان در دریا و خسارت‌های وارده بر جوامع انسانی را در پی دارد. گل‌فشان‌ها گازهایی نظیرمتان، اتان، پروپان، بوتان، پنتان و گازهای غیر هیدروکربنه مانند CO2, N, H2S, Ar و He منتشر می‌کنند. در حقیقت این مکان‌ها محل تجمع باکتری‌هایی هستند که از متان و یا هیدروژن سولفوره استفاده می‌کنند (Suess *et al.*,1999; Geprägs *et al.*, 2017).

از جمله گل فشان‌های ایران که در منطقه جنوب شرقی دریای خزر قرار گرفته است، گل‌فشان گمیشان می‌باشد که در ۷ کیلومتری شمال شرقی شهرستان گمیشان واقع شده است. قطر آن در حدود ۲۵ متر و به‌صورت گودال بزرگ آبی با حاشیه گل‌های بسیار نرمی است و در وسط نیز حباب‌های گازی دیده می‌شود. هدف از این پژوهش، بررسی تنوع زیستی باکتری‌های نمک دوست نسبی و تحمل‌کننده نمک ساکن در گل‌فشان گمیشان و نیز امکان دستیابی به جنس، گونه و سویه جدید از میکروارگانیسم‌های بومی این منطقه است.

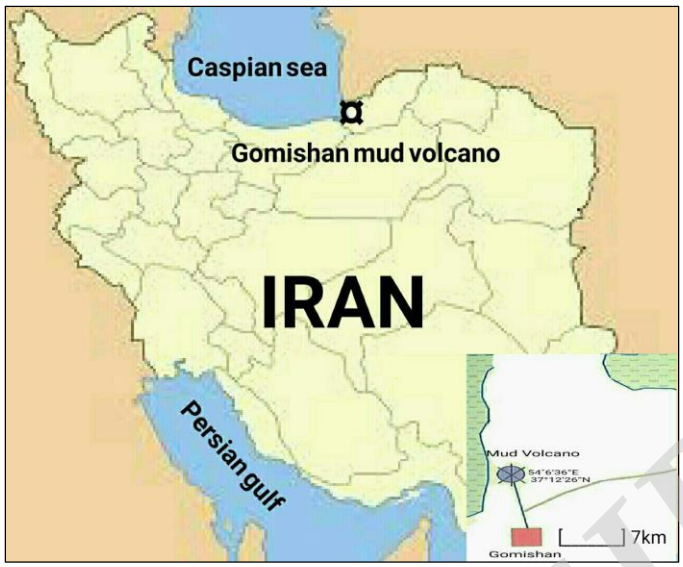
مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری جهت انجام آزمایش در مرداد ماه سال ۱۳۹۲ از گل‌فشان گمیشان (شکل ۱) انجام گرفت. ۲۰ نمونه از حاشیه و قسمت مرکزی گل‌فشان و از عمق حدود ۲۰ سانتی‌متری گرفته شد. در منطقه، مختصات جغرافیایی، pH و دمای محیط به ترتیب با GPS، pH متر و دماسنج قابل حمل در محل اندازه‌گیری و ثبت شد. نمونه‌ها در بطری‌های پلی‌پروپیلن ۵۰۰ میکرولیتری استریل، در تاریکی و دمای محیط به‌سرعت به آزمایشگاه اکسترموفیل دانشگاه تهران منتقل شد و میزان شوری آن‌ها نیز اندازه‌گیری شد. نمونه‌ها با هم مخلوط شدند و جهت انجام آزمایش‌های میکربی در دمای ۴ °C نگهداری گردیدند. آنالیز شیمیایی نمونه‌ها با روش اسپکتروسکوپی جذب اتمی (Atomic absorption spectroscopy) با دستگاه مدل (3030, Perkin-Elmer, USA) جهت اندازه‌گیری مقدار کاتیون‌ها (Ca^{2+},Mg^{2+}, K^{+}, Na^{+},Fe^{2+}) و تیتراسیون برای اندازه‌گیری آنیون‌ها (HCO^{3-}, Cl^{-}) در آزمایشگاه زمین‌شناسی دانشگاه تهران بررسی شد.

Archive of SID

www.SID.ir

Downloaded from jweb.iauahvaz.ac.ir at 12:22 +0430 on Sunday May 12th 2019



شکل ۱: موقعیت جغرافیایی گل‌فشان گمیشان.

سپس برای جداسازی باکتری‌های نمک دوست نسبی و تحمل‌کننده نمک از محیط کشت هتروتروفیک تغییریافته به ترتیب با ۵ درصد و ۰/۵ درصد نمک استفاده شد. ترکیب محیط کشت برای جداسازی باکتری‌ها شامل ترکیبات زیر می‌باشد:

sodium pyruvate, ۱۰ mL; $MgSO_4.7H_2O$, ۱۰ mL; $CaCl_2.6H_2O$, ۱۰mL; yeast extract, ۲ g/l; g peptone, ۵g/l; ammonium sulfate, ۰/۵ g/l; ۱۵g agar, distilled water ۱۰۰۰ ml.

به محیط فوق یک‌بار، NaCl ۵ g/l و بار دیگر ۵۰ g/l افزوده شد. pH محیط توسط NaOH یک مولار بر روی ۸ تنظیم گردید. از نمونه گل سری رقت تهیه و در محیط کشت تلقیح شد. محیط‌ها در دمای ۳۴ درجه سانتی‌گراد گرما گذاری شدند. کلنی‌ها پس از ۲ روز،۳ روز، ۷ روز و سپس بیش از ۷ روز برای جداسازی باکتری‌های کند رشد بررسی گردیدند و ضمن شمارش تعداد کلنی‌ها، هر کدام از جدایه‌های به دست آمده به محیط جدید مجزا منتقل گردید و کلنی‌ها جداسازی و خالص شدند. تأیید خلوص کلنی‌ها با استفاده از رنگ‌آمیزی گرم بر اساس روش Hucker (Gerhardt *et al*., 1994) و مشاهده توسط عدسی شماره ۱۰۰ میکروسکوپ نوری انجام گرفت. پس از آن با توجه به این که ویژگی‌های کلنی و میکروسکوپی جدایه‌های آرکی با باکتری مشابه می‌باشد و همچنین ضرورت افتراق این دو دسته برای مطالعات بعدی، از تست حساسیت به ماده ضد میکربی کلرامفنیکل با غلظت ۳۰ mcg/disc و اریترومایسین با غلظت ۵ mcg/disc برای تمایز دو گروه استفاده شد (Bardavid and Oren, 2008).

برای بررسی فعالیت کاتالازی از کشت ۲۴ ساعته جدایه‌ها بر روی محیط آگار دار استفاده شد. در این واکنش از H2O2 ۳ درصد به عنوان معرف استفاده شد. به این ترتیب که محلول هیدروژن پراکساید ۳ درصد روی کلنی‌های جدایه‌های رشد کرده روی محیط آگار دار ریخته شد و مشاهده حباب به‌عنوان نشانه واکنش مثبت گزارش شد. در صورت بروز مشکل در تشخیص حباب‌ها یک کلنی از باکتری‌ها توسط خلال دندان استریل بر روی لام انتقال یافته و هیدروژن پراکساید ۳ درصد به آن اضافه شده و یک لامل روی آن قرار داده شد تا تشکیل حباب‌ها با دقت بیشتری بررسی شود. از دیسک‌های آماده اکسیداز تولید شرکت HIMEDIA برای بررسی فعالیت اکسیدازی سویه‌ها استفاده شد. برای انجام این آزمایش، کلنی‌های ۲۴ ساعته سویه‌های رشد کرده روی محیط آگاردار با استفاده از یک خلال دندان استریل برداشته شد و بر روی دیسک قرار گرفت. مشاهده رنگ آبی به‌عنوان واکنش مثبت گزارش شد.

www.SID.ir

Downloaded from jweb.iauahvaz.ac.ir at 12:22 +0430 on Sunday May 12th 2019

از ۱۲۲ سویه خالص شده ۴۲ سویه به‌طور تصادفی برای تعیین ترادف ژن ۱۶S rRNA و مطالعات تکمیلی انتخاب گشت و پس از استخراج DNA ژنومی و تکثیر ژن ۱۶S rRNA با استفاده از الکتروفورز ژل آگاروز تائید شد. محصول نهایی حاصل از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز تعیین ترادف شد و نتایج حاصل از آن برای تجزیه‌وتحلیل‌های فیلوژنتیک مورد استفاده قرار گرفت.

پس از تهیه توده زیستی برای استخراج DNA ژنومی از روش دست ورزی شده استخراج DNA به روش Marmur (۱۹۹۴) استفاده شد. در این روش توده زیستی تهیه شده در ۲۰۰ میکرولیتر از بافر TE (۱۰ میلی مولار تریس)، ۱ میلی مولار EDTA، pH ۷/۵ در یک ویال ۱/۵ میلی‌لیتری حل شد و مقدار ۲۰ میکرولیتر لیزوزیم با غلظت ده میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به آن اضافه شده و به مدت ۳۰ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شد. ۲۵ میکرولیتر SDS ۱۰ درصد به آن اضافه شد، ویال به آرامی سر و ته شد و مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. مقدار ۹۰ میکرولیتر از محلول NaCl پنج مولار به ترکیب فوق اضافه شد و ویال به آرامی چند مرتبه سر و ته شد و مدت ۲۰ دقیقه در حمام آب گرم ۶۵ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شد. یک حجم کلروفرم به ترکیب فوق افزوده شد و ویال به‌آرامی تکان داده شد و در g ۱۱۵۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شد. سپس فاز آبی رویی به ویال استریل جدید منتقل گردید. به منظور افزایش دقت، مرحله پنج دو بار تکرار شد. به منظور رسوب دادن DNA به میزان ۰/۶ حجم محلول حاصل از مرحله قبل، ایزوپروپانول سرد به آن اضافه شده و مدت یک شب در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. بعد از ۱۵ دقیقه سانتریفوژ در g ۱۱۵۰۰ و دور ریختن مایع رویی، رسوب حاصل با الکل ۷۰ درصد شستشو داده شد. رسوب نهایی در دمای اتاق خشک شد و پس از خشک شدن در ۵۰ میکرولیتر از بافر TE حل شد و در دمای ۲۰ – درجه سانتی گراد نگهداری گردید. برای تکثیر ژن ۱۶ S rRNA سویه‌های منتخب باکتری‌ها از پرایمررفت

۲۷ F (5’-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3’) و پرایمر برگشت

۱۴۹۲ R (5’- GGTTACCTTGTTACGACTT-3’) جهانشمول (Lane, 1985) استفاده شد. واکنش PCR در حجم نهایی ۵۰ µl شامل ترکیبات زیر بوده است: ۱/۳ µl از هرکدام از پرایمر های رفت و برگشت، dNTP (۱۰ mM) ۰/۶ µl، بافر PCR ۳/۴µl، $MgCl_2$ (۵۰ mM) ۱µl، DNA الگو ۲µl، آنزیم ۰/۲µl و آب مخصوص PCR ۴۱/۵ µl.

برنامه PCR مورد استفاده در تکثیر این ژن شامل ۹۵ درجه ۵ دقیقه، از این مرحله به بعد ۳۰ سیکل،۹۴ درجه یک دقیقه، ۵۶ درجه یک دقیقه، ۷۲ درجه یک دقیقه و در پایان ۷ دقیقه دمای ۷۲ درجه سانتی گراد بود.

صحت تکثیر توالی‌های مورد نظر با استفاده از ژل الکتروفورز افقی بررسی گردید. محصول PCR با استفاده از کیت تخلیص PCR خالص شد. تمامی تعیین توالی‌های صورت گرفته در این پژوهش با استفاده از خدمات تعیین توالی شرکت ماکروژن در کره جنوبی تعیین گردید. توالی‌های به‌دست آمده با استفاده از نرم‌افزارهای Chromas و Bioedit ویرایش و آماده بررسی در بانک‌های اطلاعاتی گردید. با انجام جستجو در بانک اطلاعاتی Gene Bank (بلاست) و همچنین پایگاه داده EzTaxon (Chun *et al.*, 2007) توالی‌های حاصل از بررسی‌های محیطی و یا گونه‌های شناخته شده مشابه با هر سویه، شناسایی و جهت بررسی‌های بعدی ذخیره گردید. آنالیز فیلوژنتیک سویه‌های منتخب و سویه‌های مشابه آن‌ها با استفاده از نرم افزارهای ClustalX، Bioedit و Mega6 انجام شد (Tamura *et al.*, 2013) و رسم درخت فیلوژنتیک مربوط به این سویه‌ها با استفاده از روش‌های Neibour Joining Maximum Likelyhood (Kumar *et al.*, 2004) انجام گرفت. بررسی اعتبار شاخه‌ها در درخت‌های رسم شده با استفاده از الگوریتم Bootstrap Analysis و با ۱۰۰ بار نمونه‌گیری صورت گرفت (Felsenstein, 1985).

نتایج

گل فشان گمیشان در ۷ کیلومتری شهرستان گمیشان و در میان دشت وسیعی قرار دارد. دمای گل در زمان نمونه‌برداری ۱ ± ۳۸ درجه سانتی گراد و pH ۱ ± ۸ بود. میزان شوری ۳۴ گرم بر لیتر اندازه‌گیری شد. میزان کاتیون‌ها و آنیون‌های گل در جدول ۱ آورده شده است. یون‌های

Archive of SID
www.SID.ir

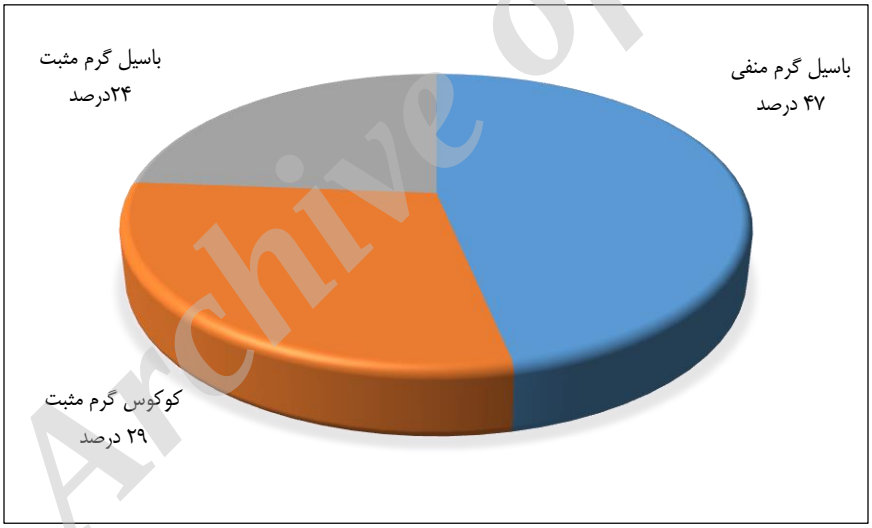
Downloaded from jweb.iauahvaz.ac.ir at 12:22 +0430 on Sunday May 12th 2019

سدیم و کلر بیشترین میزان و آهن کمترین میزان را در ترکیب گل به خود اختصاص داده‌اند. میزان کلنی‌های به دست آمده در روش کشت در محیط حاوی ۰/۵ درصد نمک به‌طور متوسط (شمارش زنده) CFU/ml ۳×۱۰۶ و در محیط حاوی ۵ درصد نمک CFU/ml ۱×۱۰۶ بود. کلیه جدایه‌ها از نظر شکل و ویژگی‌های کلنی، واکنش گرم و شکل و آرایش میکروسکوپی سلول، شکل و موقعیت اسپور، واکنش کاتالاز و اکسیداز مورد بررسی قرار گرفتند.

جدول ۱: ترکیب شیمیایی نمونه گل در گل فشان گمیشان.

ترکیب شیمیایی	Na^{+}	Mg^{2+}	K^{+}	Ca^{2+}	Fe^{2+}	Cl^{-}	$HCO3^{-}$
غلظت (g/l)	۱۸/۴	۰/۱۸	۰/۱۴	۰/۲۳	۰/۰۶	۱۵/۹۷	۰/۱۸۳

مطالعه لام و واکنش KOH ۳ درصد برای سویه‌ها نشان داد که درصد فراوانی سویه‌ها با باسیل‌های گرم منفی ۴۷ درصد، کوکوس‌های گرم مثبت ۲۹ درصد و باسیل‌های گرم مثبت ۲۴ درصد می‌باشد (شکل ۲). از نظر واکنش کاتالاز ۹۸/۴ درصد سویه‌ها کاتالاز مثبت و ۶۹/۷ درصد اکسیداز مثبت بودند. نتایج تست حساسیت به ماده ضد میکروبی کلرامفنیکل و اریترومایسین نشان داد که همه سویه‌ها نسبت به این دو آنتی بیوتیک حساس بودند. در نتیجه همه سویه‌های جدا شده باکتری بودند. سپس بر اساس ویژگی‌های فنوتیپی، سویه‌ها به چندین گروه تقسیم شدند و در هر گروه سویه‌هایی با خصوصیات مشابه قرار داده شدند. درنهایت از بین این گروه‌ها ۴۲ سویه متنوع به‌طور تصادفی برای مطالعات فیلوژنتیکی انتخاب گردید.



شکل ۲: درصد میزان سویه‌ها براساس شکل میکروسکوپی و واکنش گرم.

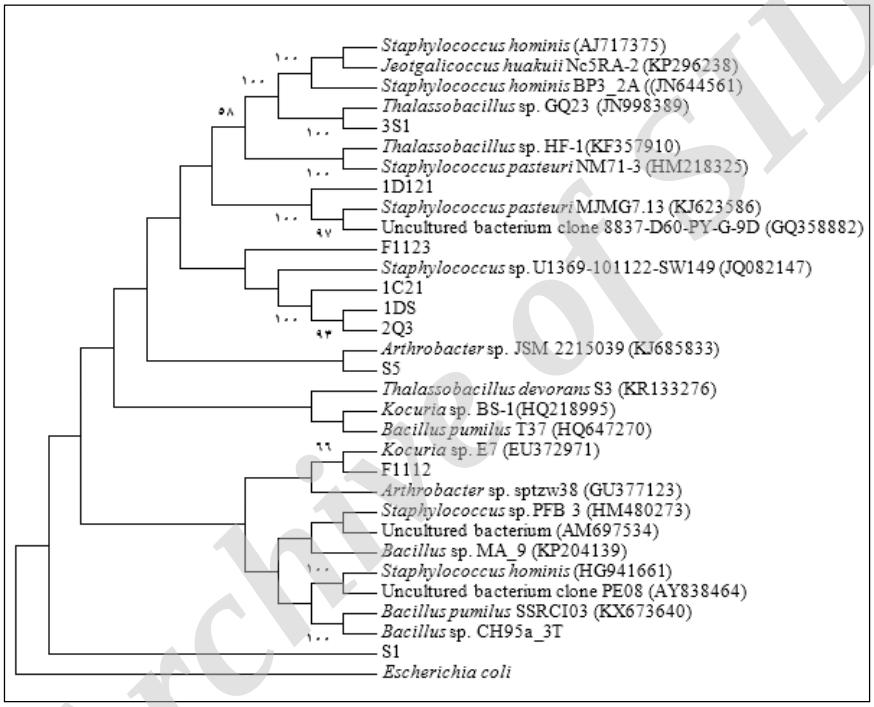
سپس در ۴۲ سویه ترادف ژن SrRNA ۱۶ مورد بررسی قرار گرفت که با توجه به نتایج به ۴ رده و ۲۰ جنس مختلف متعلق بودند. تعداد ۸ سویه (۴۰ درصد) به رده *Firmicutes* و ۸ سویه (۴۰ درصد) به رده *Gammaproteobacteria* تعلق داشتند. همچنین تعداد یک سویه (۱۰ درصد) به شاخه *Alphaproteobacteria* و یک سویه (۱۰ درصد) به شاخه *Actinobacteria* تعلق داشتند. سویه‌های تعیین ترادف شده اکثراً از جنس *Marinobacter* (۲۰ درصد) و *Halomonas* (۲۰ درصد) بوده‌اند. اکثر سویه‌ها متعلق به *Firmicutes* و *Gammaproteobacteria* بودند که درخت‌های فیلوژنی رسم شده به روش Maximum Likelihood برای هر رده و محل قرار گرفتن سویه‌های بررسی شده در آن در شکل‌های (۳ و ۴) نشان داده شده است (شکل‌های ۳ و ۴).

Archive of SID
www.SID.ir

Downloaded from jweb.iauahvaz.ac.ir at 12:22 +0430 on Sunday May 12th 2019

از ۴۲ سویه تعیین ترادف شده ۱۱ سویه که احتمالاً متعلق به گونه‌های مختلف از جنس‌های *Marinobacter*، *Paracoccus*، *Staphylococcus*، *Bacillus*، *Jeotgalicoccus*، *Geofilum* بودند شباهتی ۱۰۰ درصد در ترادف SrRNA ۱۶ داشتند که آن‌ها را از نظر ارائه به بانک میکربی به عنوان میکروارگانیسم بومی شناسایی شده حائز اهمیت می‌سازد. همچنین در دو سویه که متعلق به جنس *Roseovarius* بودند میزان شباهت بین ۹۸/۴–۹۷ درصد بود که با انجام هیبریداسیون DNA-DNA با گونه‌های نزدیک و بررسی صفات فنوتیپی ممکن است در گونه جدید قرار گیرند. ۲۹ سویه شباهتی بین ۹۹/۸– ۹۸/۵ در تعیین ترادف داشتند (Stackebrandt and Ebert, 2006).

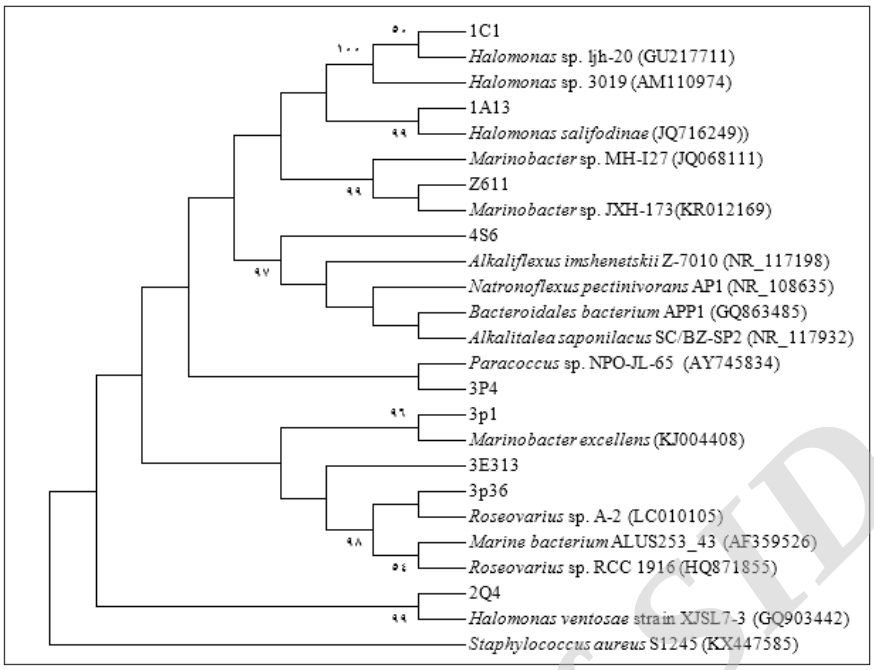
در این مطالعه درنهایت ۲۵ سویه تحمل‌کننده نمک و ۱۷ سویه نمک دوست نسبی جدا گردید که در نمک دوست‌های نسبی بیشترین فراوانی مربوط به دو جنس *Marinobacter* و *Halomonas* بود و بیشترین تحمل‌کننده‌های نمک به جنس‌های *Bacillus* و *Staphylococcus* قرابت داشتند.



شکل ۳: درخت فیلوژنتیک Maximum likelihood توالی‌های ۱٦S rRNA مربوط به باکتری‌های گرم مثبت به دست آمده در این پژوهش با استفاده از روش کشت و ضریب Boot Strap صد. Boot Strap زیر ۵۰ حذف شده است. شماره ثبت توالی‌ها در بانک ژنی NCBI داخل پرانتز آورده شده است. توالی *Escherichia coli* به عنوان گروه بیرونی آورده شده است.

www.SID.ir

Downloaded from jweb.iauahvaz.ac.ir at 12:22 +0430 on Sunday May 12th 2019



شکل ٤: درخت فیلوژنتیک Maximum likelihood توالی‌های ١٦ S rRNA مربوط به باکتری‌های گرم منفی به دست آمده در این پژوهش با استفاده از روش کشت و ضریب Boot Strap صد. Boot Strap های زیر ۵۰ حذف شده است. شماره ثبت توالی‌ها در بانک ژنی NCBI داخل پرانتز آورده شده است. توالی *Staphylococcus aureus* به عنوان گروه بیرونی آورده شده است.

بحث و نتیجه‌گیری

بررسی تنوع زیستی اکوسیستم‌های بومی و منحصر به فرد در هر منطقه به علت سازگاری‌های متفاوت در طول تکامل از ارزش بسیار بالایی برخوردار است. پروکاریوت ها انجام بسیاری از فرآیندهای چرخه زیستی مواد را در انحصار خود دارند که در حفظ حیات تمامی گروه‌های زنده تأثیرگذار هستند. تا امروز بخش عمده‌ای از پروکاریوت‌ها همچنان ناشناخته باقی‌مانده‌اند که این امر اهمیت پژوهش‌های مرتبط با شناسایی و بررسی تنوع زیستی این میکروارگانیسم‌ها را نشان می‌دهد (Torsvik *et al.*, 2002). باکتری‌های نمک دوست نسبی و تحمل‌کننده نمک متشکل از جنس‌های مختلف هستند که در محدوده وسیعی از غلظت‌های نمک قادر به رشد می‌باشند (Ventosa *et al.*, 1998). این پژوهش با توجه به روش‌های مبتنی بر کشت، صورت گرفته است در نتیجه تنها گروه‌های قابل‌کشت گل‌فشان قابل‌بحث خواهند بود.

در زمینه جداسازی از روش استفاده از محیط کشت ۰/۵ درصد و ۵ درصد نمک و گرماگذاری طولانی برای جداسازی بیشترین میزان گونه‌ها استفاده شد. جداسازی اولیه پس از ۴۸ ساعت انجام گرفت و پلیت‌های جداسازی اولیه برای چندین ماه نگهداری شد و پس از انکوباسیون طولانی، جداسازی انجام شد. با تلقیح مستقیم نمونه‌ها به محیط جامد از ایجاد رقابت میان آن‌ها جلوگیری به عمل آمده است. براساس برخی روش‌های رایج معمولاً نمونه محیطی را ابتدا در کشت مایع غنی‌سازی کرده و سپس برای جداسازی سویه‌ها از هم به کشت جامد منتقل می‌کنند، در صورتی که این کار باعث بر هم خوردن ترکیب واقعی جمعیت می‌گردد. با تلقیح مستقیم نمونه محیطی به محیط کشت جامد از تغییر ترکیب جمعیتی به دلیل رقابت جلوگیری شده است. در نهایت دوره گرما گذاری طولانی امکان ایجاد کلنی برای انواع کند رشد احتمالی را فراهم آورده است (پلیت‌ها تا شش ماه در گرمخانه نگهداری شدند).

www.SID.ir

Downloaded from jweb.iauahvaz.ac.ir at 12:22 +0430 on Sunday May 12th 2019

تعداد میکروارگانیسم‌های جدا شده از گل‌فشان گمیشان در حدود cell/ml ۱۰^۶× ۳-۱ بود که این میزان با سایر محیط‌ها با شرایط مشابه تقریباً یکسان بود.

مطالعات نشان داد بیشترین تعداد سویه‌ها در محیط کشت حاوی ۰/۵ درصد نمک (۷۳ سویه) می‌باشد و در محیط کشت حاوی ۵ درصد نمک ۴۹ سویه خالص‌سازی شد. مشاهده این نتیجه دور از انتظار نیست. در محیط ۰/۵ درصد نمک باکتری‌هایی که شرایط معمولی رشد را دوست دارند، هالوتولرانت‌ها و هالوفیل‌های اختیاری رشد می‌کنند ولی در محیط ۵ درصد باکتری‌های غیر نمک دوست و معمولی دوست‌ها حذف شده‌اند.

همچنین نتایج نشان داد که از میان سویه‌های خالص شده بیشتر آن‌ها سویه‌هایی با شکل میکروسکوپی باسیل و گرم منفی هستند. با توجه به این که این سویه ها اکثراً از جنس *Marinobacter* (۲۰ درصد) و *Halomonas* (۲۰ درصد) بوده‌اند و این دو جنس از باکتری‌هایی با منشأ دریایی و به شدت هالوتولرانت هستند، با توجه به منشأ دریایی این گل فشان و فاصله کمی که با دریا دارد این نتیجه دور از انتظار نبود. در حالی که در تحقیقی که Liu و همکارانش در سال ۲۰۱۱ در گل فشان تایوان جنوبی انجام دادند .*Clostridium* spp گرم مثبت و *Shewanella* .spp گرم منفی را جداسازی نمودند. همچنین در سال ۲۰۱۱ Heller و همکارانش در گل فشان Salse di Nirano در ایتالیا *Clostridium thiosulfatireducens* جدا نمودند و در تحقیقی که دیانسانی و همکاران در سال ۱۳۹۱ در گل‌فشان قارنیاریق انجام دادند *Bacillus* جداسازی نمودند. تفاوت در سویه‌ها می‌تواند به ساختار محیط کشت به کار رفته برای جداسازی باکتری‌ها، توزیع طبیعی میکروارگانیسم‌ها در محیط‌زیست و مشخصات بوم‌شناسی هر منطقه مرتبط باشد (Alain and Querellou, 2009). احتمال افزایش تنوع موجود با افزایش هر بار نمونه‌برداری نیز در تفاوت نوع و تعداد میکروارگانیسم‌های جداشده در هر پژوهش تأثیرگذارخواهد بود (Hughes *et al.*, 2001). در پژوهشی که صورت گرفت بر اساس توالی یابی ژن ۱۶S rRNA در مورد سویه‌های منتخب، این سویه‌ها به چهار رده *Alphaproteobacteria*، *Gammaproteobacteria*، *Actinobacteria* و *Firmicutes* و ۲۰ جنس مختلف تعلق داشتند. تعداد کم سویه‌های باکتری به دست آمده علاوه بر دلیل واقعی کم بودن آن‌ها در محیط، می‌تواند به عدم به کارگیری شرایط بهینه جداسازی آن‌ها مربوط باشد. در بین سویه‌های تعیین توالی شده تعداد ۸ سویه (۴۰ درصد) به رده *Firmicutes* و ۸ سویه (۴۰ درصد) به رده *Gammaproteobacteria*تعلق داشتند. همچنین تعداد یک سویه (۱۰ درصد) به شاخه *Alphaproteobacteria* و یک سویه (۱۰ درصد) به شاخه *Actinobacteria* تعلق داشتند. این نتایج با تحقیقی که دیانسانی و همکاران در سال ۱۳۹۱ در گل‌فشان قارنیاریق انجام دادند مشابه می‌باشد. در تحقیق دیانسانی و همکاران بیشتر سویه‌ها متعلق به شاخه *Firmicutes* بود که با نتایج تحقیق ما مشابهت داشت. با توجه به این که گل‌فشان گمیشان باگل فشان قارنیاریق در یک فاصله تقریبی ۵۰ کیلومتری در یک راستا قرار دارند (تا حدودی تأییدکننده ارتباط نزدیک بین این ساخت‌ها است)، به دست آوردن نتایج مشابه دور از انتظار نبود. همچنین در مطالعه‌ای که توسط Pachiadaki و همکاران در سال ۲۰۱۰ بر روی رسوبات گل‌فشان آمستردام در دریای مدیترانه انجام شد، نشان داده شد در لایه‌های رسوبی مجاور یکدیگر آرکی‌ها و باکتری‌ها هردو یافت شدند. بیشترین گروه باکتری‌ها *Proteobacteria* به‌خصوص *Gammaproteobacteria* بودند. این نتیجه با پژوهش ما شبیه می‌باشد. در پژوهشی که ما صورت دادیم ۵۰ درصد سویه‌ها، از *Proteobacter* ها بودند که از این میزان ۴۰ درصد *Gammaproteobacteria* بودند. در پژوهشی که Lanoil و همکارانش در سال ۲۰۰۱ انجام دادند رده *Gammaproteobacteria* با جنس *Pseudomonas*، ۶۱ درصد نمونه‌های باکتری‌های جدا شده را تشکیل دادند. این مسئله احتمالاً به این خاطر است که *Proteobacteria* بسیار متنوع هستند و عمدتاً تحت شرایط طبیعی به دست می‌آیند. در مطالعه‌ای که Zemskaya و همکارانش در سال ۲۰۱۰ انجام دادند میزان شباهت هر سویه با نزدیک‌ترین میکروارگانیسم شناخته شده و ثبت‌شده در GenBank بین ۸۹ درصد تا ۹۸ درصد بود و بیشترین درصد شباهت در جنس‌های *Pseudomonas*، *Ralstonia*، *Clostridium* یافت شده از رسوبات دریایی مشاهده شد. در مطالعه ما شباهت هر سویه با نزدیک‌ترین میکروارگانیسم شناخته‌شده و ثبت‌شده در Gen Bank بین ۹۷/۴ درصد تا ۱۰۰ درصد بود و بیشترین درصد شباهت در جنس‌های

Archive of SID
www.SID.ir

Marinobacter و *Bacillus, Paracoccus* بود. میزان شباهت اکثر سویه‌ها با نزدیک‌ترین میکروارگانیسم شناخته‌شده بین ۹۸ درصد تا ۱۰۰ درصد بود که هدف تنوع زیستی که شناسایی گونه‌های جدید است را در این پژوهش کمرنگ کرد.

منابع

دیانسانی، م.، اخوان سپهی، ع.، فصل بهار، ج. و مرادی بیدهندی، س.، ۱۳۹۱. تنوع زیستی میکروارگانیسم‌های هوازی و بی‌هوازی اختیاری گل فشان قارنیاریق (گلستان). پایان‌نامه کارشناسی ارشد، تهران، ایران، صفحات ۱۲۰-۹۳.

Alain, K. and Querellou, J., **2009**. Cultivating the uncultured: limits, advances and future challenges. Extremophiles, 13(4): 583-594.

Bardavid, R. E. and Oren, A., 2008. Sensitivity of Haloquadratum and Salinibacter to antibiotics and other inhibitors: implications for theassessmentof the contribution of Archaea and Bacteria to heterotrophic activities in hypersaline environments. FEMS Microbiology Ecology, 63: 309-315.

Bharti, P. K. and Niyogi, U. K., 2015. Plankton diversity and aquatic ecology of a freshwater lake (L3) at Bharti Island, Larsemann Hills, east Antarctica. Global Journal of Environmental Scince and Management, 2: 137-144.

Chun, J., Lee, J. H., Jung, Y., Kim, M., Kim, S., Kim, B. K. and Lim, Y. W., 2007. EzTaxon: a web-based tool for the identification of prokaryotes based on 16S ribosomal RNA gene sequences.International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 57: 2259-2261.

Dimitrov, L. I., 2003. Mud volcanoes—a significant source of atmospheric methane. Geo-Marine Letters, 23: 155-161.

Felsenstein, J., 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using bootstrap. Evolution, 39: 783-791.

Gerhardt, P., Murray, R., Wood, W. and Krieg, N., 1994. Methods for general and molecular bacteriology. Washington, D. C. American Society for Microbiology, pp. 109-158.

Geprägs, P., Torres, M. E., Römer, M., Pape, T., Mau, S., Wintersteller, P. and Bohrmann, G., 2017. Methane in the water column above an active mud volcano in the Calabrian margin, SE Italy. EGU General Assembly Conference Abstracts, 19: 12735.

Griffiths, B. S., Römbke, J., Schmelz, R. M., Scheffczyk, A., Faber, J. H., Bloem, J., Pérès, G.,Cluzeau, D., Chabbi, A., Suhadolc, M., Sousa, J. P., Martins da Silva, P., Carvalho, F.,Mendes, S., Morais, P., Francisco, R. R., Pereira, C., Bonkowski, M., Geisen, S., Bardgett, R. D., de Vries, F. T., Bolger, T., Dirilgen, T., Schmidt, O., Winding, A., Hendriksen, B. N., Johansen, A., Philippot, L., Plassart, P., Bru, D., Thomson, B., Griffiths, R. I., Bailey, M. J., Keith, A., Rutgers, M., Mulder, C., Hannula, S. E., Creamer, R. and Stone, D., 2016. Selecting cost effective and policy-relevant biological indicators for European monitoring of soil biodiversity and ecosystem function. Ecological Indicators, 69: 213-223.

Heller, C., Blumenberg, M., Kokoschka, S., Wrede, Ch., Hoppert, M., Taviani, M. and Reitner, J., 2011. Geomicrobiology of fluid Venting Structures at the Salse di Nirano Mud Volcano Area in the Northern Apennines (Italy), Advances in Stromatolite Geobiology, 131: 209-220.

Hughes, J., Hellmann, J., Ricketts, T. and Bohannan, B., 2001. Counting the uncountable: statistical approaches to estimating microbial diversity. American Society for Microbiology, 34: 4399-4406.

Kopf, A. J., 2002. Significance of mud volcanism. Reviews of Geophysics, 40: 2.

Kumar, S., Nei, M., Dudley, J. and Tamura, K., 2004. Mega4: molecular evolutionary genetics analysis mega software version 4.0. Molecular Biology and Evolution, 24: 1596-1599.

Lane, D. J., Pace, B., Olsen, G. J., StahlStahl, D., Sogin, M. and Pace, N. R., 1985. Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. Proccidings of the National Academi of Sciences of the United States of America, 82: 6955-6959

Downloaded from jweb.iauahvaz.ac.ir at 12:22 +0430 on Sunday May 12th 2019
Archive of SID
www.SID.ir

Lanoil, B. D., Sassen, R., La Duc, M. T. and Sweet, S. T., 2001. Bacteria and Archaea physically associated with Gulf of Mexico gas hydrates. Applied and Environmental Microbiology, 67: 5143–5153.

Liu, C., Maity, JP., Jean, JS., Sracek, O., Kar, S., Li., Z., Bundschuh, J., Chen, CY. and Lu, HY., 2011. Biogeochemical interactions among the arsenic, iron, humic substances, and microbes in mud volcanoes in southern Taiwan. Journal of Environmental Science and Health, 46(11): 1218-1230.

Marmur, A., 1994. Thermodynamic aspects of contact angle hysteresis. Advances in Colloid and Interface Science, 50: 121-141.

Pachiadaki, M. G., Lykousis V., Stefanou E. G. and Kormas K. A., 2010. Prokaryotic community structure and diversity in the sediments of an active submarine mud volcano (Kazan mud volcano, East Mediterranean Sea). FEMS Microbiology Ecology, 72: 429–444.

Stackebrandt, E. and Ebers, J., 2006. Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards. Microbiology today, 33: 152.

Sathyanarayana Reddy, G., Chattopadhyay, M. K. and Shivaji, S., 2016. Biodiversity, Adaptation and Biotechnological Importance of Bacteria Occurring in Cold Climates. Biotechnology of Extremophiles:Advances and Challenges. P. H. Rampelotto. Cham, Springer International Publishing, pp. 47-81.

Suess, E, Torres, ME., Bohrmann, G., Collier, RW., Greinert, J., Linke, P., Rehder, G., Tréhu, A., Wallmann, K., Winckler, G. and Zuelger, E., 1999. Gas hydrate destabilization: enhanced dewatering, benthic material turnover and large methane plumes at the Cascadia convergent margin. Earth and Planetary Scince Letters, 170: 1-15.

Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A. and Kumar, S., 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. Moecularl Biology and Evolution, 30(12): 2725–2729.

Torsvik, V., Ovreas, L., and Thingstad, T., 2002. Prokaryotic diversity-magnitude, dynamics, and controlling factors, pp. 1064-1066.

Ventosa, A., Nieto, J.J. and Oren, A., 1998. Biology of moderately halophilic aerobic bacteria. Microbiology and Molecular Biology. Reviewa, 62: 504−544.

Zemskaya, T. I., Pogodaeva, T. V., Shubenkova, O. V., Chernitsina, S. M., Dagurova, O. P., Buryakhaev, S. P., Namsaraev, B. B., Khlystov, O. M. Egorov, A. V., Krylov, A. A. and Kalmychkov, G. V., 2010. Geochemical and microbiological characteristics of sediments near the Malenky mud volcano(Lake Baikal,Russia),with evidence of Archaea intermediate between the marine anaerobic methanotrophs ANME-2 and ANME-3. Geo-Marrin Letters, 30: 411-425.

Downloaded from jweb.iauahvaz.ac.ir at 12:22 +0430 on Sunday May 12th 2019

Archive of SID

www.SID.ir