Archive of SID

فصلنامه علمی- پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها
سال پنجم، شماره ۱۹، پاییز ۱۳۹۵، صفحه ۱۵۸- ۱۴۷
تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۰۲/۲۸ – تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۰۶/۲۱

بررسی تنوع باکتریایی غالب در فلور باکتری‌های هوازی و بی‌هوازی گل‌فشان‌های جنوب شرقی دریای خزر

عباس اخوان‌سپهی *: دانشیار میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، تهران، ایران، akhavansepahy@gmail.com
قاسمعلی محبعلی: استادیارمیکروبیولوژی و بیوتکنولوژی، پژوهشگاه صنعت نفت، تهران، ایران، mohebaligh@ripi.ir
بهنام راسخ: استادیار میکروبیولوژی و بیوتکنولوژی، پژوهشگاه صنعت نفت، تهران، ایران،rasekhb@ripi.ir
جلال فصل بهار: مربی زمین‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، تهران، ایران، jfaslebahar@yahoo.com
محمدعلی آریان: دانشیار زمین‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، تهران، ایران، maa1361@yahoo.com
مهناز دیانسایی: کارشناس‌ارشد میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، تهران، ایران، mdiansaei@yahoo.com
ساره فراهانی: دانشجوی دکتری میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، تهران، ایران،sare.farahani@gmail.com
محمد فاضل فروغیان یزدی: کارشناس‌ارشد میکروبیولوژی و بیوتکنولوژی، پژوهشگاه صنعت نفت، تهران، ایران،foroughianmf@ripi.ir

چکیده

مقدمه: گِل‌فشان‌ها حاوی مواد خاکی عمق زمین مخلوط با آب هستند که به‌شکل خمیر شل و یا غلیظ به سطح زمین می‌رسند. گل‌فشان‌های حاشیهٔ جنوب شرقی دریای خزر و شمال شرقی استان گلستان از مهم‌ترین گل‌فشان‌های ایران هستند و در این پژوهش بررسی شدند.

مواد و روش‌ها: به‌منظور بررسی حضور باکتری‌ها در گل‌فشان، نمونه‌ها در محیط‌های هوازی و بی‌هوازی کشت داده شده‌اند. برای کشت انواع هوازی از محیط‌های رایج برای باکتری‌ها استفاده شد و نمونه‌های بی‌هوازی در محیط تیوگلیکولات براث در جار بی‌هوازی کشت داده شدند. علاوه بر بررسی صفت نمک‌دوستی، آنزیم‌های هیدرولازی و خصوصیات فیزیولوژیک سویه‌ها ارزیابی شد.

نتایج: طبق بررسی‌های انجام‌شده از بین ۲۲سویهٔ منتخب، ۱۷سویهٔ هوازی و ۵ سویهٔ بی‌هوازی اختیاری بودند. از بین ۱۷ سویهٔ هوازی، ۱۱ سویهٔ با موفقیت توالی‌یابی شدند. ۵ نمونهٔ بی‌هوازی اختیاری توالی‌یابی شدند و درخت فیلوژنتیکی آن‌ها رسم شد. اکثر نمونه‌ها باسیل‌های گرم‌مثبتی بودند که توانایی گسترده‌ای در تولید آنزیم‌های هیدرولازی داشتند. با توجه به رشد تمامی جدایه‌ها در محیط حاوی ۰تا۱۵درصد نمک می‌توان آن‌ها را مقاوم به نمک محسوب کرد.

بحث و نتیجه‌گیری: براساس نتایج این پژوهش می‌توان یک ارزیابی از تنوع میکروبی گل‌فشان‌های بررسی‌شده به دست داد. محیط گل‌فشان مانند محیط‌های با شرایط سخت است که امکان کشت تمامی میکروارگانیسم‌های آن مقدور نیست؛ به‌خصوص درمورد نمونه‌های بی‌هوازی اجباری که به شرایط بسیار خاصی نیاز دارند. با توجه به وجود آنزیم‌های هیدرولازی در سویه‌های جداشده از این گل‌فشان‌ها آن‌ها دارای ظرفیت استفاده در زیست‌فناوری هستند.

واژه‌های کلیدی: باکتری، تنوع زیستی، درخت فیلوژنتیکی، دریای خزر، گل‌فشان.

* نویسندهٔ مسئول مکاتبات

Copyright © 2016, University of Isfahan. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/BY-NC-ND/4.0/), which permits others to download this work and share it with others as long as they credit it, but they cannot change it in any way or use it commercially.

www.SID.ir

Archive of SID

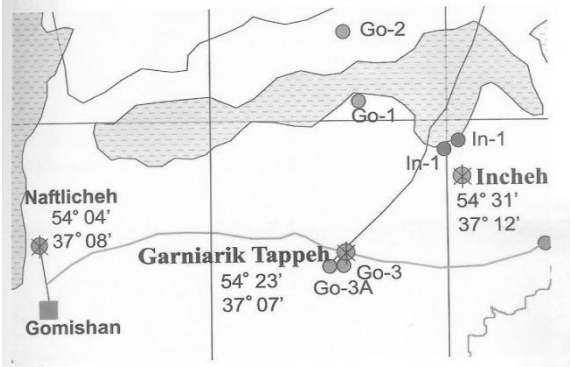
مقدمه

به‌دلیل ارتباط بین گل‌فشان‌ها با ذخایر نفت و گاز، طی چند دهۀ اخیر شرکت‌های تحقیقاتی نفت جهت دست‌یابی به مخازن هیدروکربنی در اعماق اقیانوس‌ها و دریاها در پی یافتن محل فعالیت این پدیده‌های زمین‌شناسی بوده‌اند. کاوش متخصصان شرکت‌های نفتی کشورهای حاشیۀ دریای خزر و دریای سیاه در بستر دریا، بیانگر این ادعاست. همگام با کاوشگران صنعت نفت، متخصصان سایر علوم از جمله میکروبیولوژی با بهره‌گیری ازاطلاعات به‌دست‌آمده دامنۀ فعالیت‌های پژوهشی خود را گسترش دادند و در این زمینه به نتایج قابلِ‌توجهی دست یافته‌اند.

تنوع میکروبی در گل‌فشان‌هایی که تاکنون شناخته شده‌اند، بیشتر از نوع بی‌هوازی(۳-۱) و کمتر از نوع هوازی (۱) است. متابولیسم میکروبیدر نمونه‌های به‌دست‌آمده از گِل‌فشان‌ها از نوع متانوتروف (۲) یا احیاکنندۀ سولفات (۳) است. حدود ۸۶درصد گازهای خروجی گِل‌فشان‌ها متان و به‌مقدار کمتر دی‌اکسیدکربن و نیتروژن است. میکروب‌های موجود در این مکان‌ها از سوبستراهای کربنی که سیال هیدروکربنی هستند، به‌شکل تخمیری استفاده می‌کنند (۴). بررسی رسوب گل‌فشان‌های فعال سه فیلوتیپ پروتئوباکتری‌ها، اکتینوباکتری‌ها و فوزوباکتری‌ها را نشان داده است. پس از مقایسۀ داده‌ها در بانک ژن NCBI این نتایج حاصل شد: باکتری‌های غیرقابلِ‌کشت، باکتری‌های ناشناخته، *Clostridium thiosulfatireducens*، *Frigovirgula patagoniensis* و *Pseudomonas aeruginosa* شناسایی شدند. کلوستریدیوم‌ها با تشکیل سولفات رابطه داشتند؛ در مقالات متعدد اعلام شده است که سویه‌های جداشده از گل‌فشان در تولید سوخت‌های میکروبی کاربرد دارند(۵).با هدف جداسازی باکتری‌های احیاکنندۀ سولفات، نمونه‌های برگرفته از گل‌فشان رشته‌کوه آپنین شمالی[1] واقع در ایتالیا در محیط غنی کشت داده شدند. میکروب‌های جداسازی‌شده براساس *16S rRNA* شامل *Desulfovibrio psychrotolerans* و *Clostridium thiosulfatireducens* است که ممکن است پروتئین‌هایی با منشأ میکروبی را تخمیر کنند (۵-۷). گونۀ متعلق به جنس *کلوستریدیوم* که از این گل‌فشان جدا شده، رکسارسون یا آرسنیک‌اسید را طی فرایند تغییر و تبدیل زیستی[2] به شکل آرسنیک معدنی آزاد می‌کند (۸). به‌طور کلی هدف از انجام پژوهش حاضر بررسی تنوع میکروبی به‌خصوص انواع باکتری‌های هوازی و بی‌هوازی اختیاری موجود در سه گل‌فشان مستقر در جنوب شرقی دریای خزر است. نتایج حاصل از آن می‌تواند منبع مناسبی برای سایر پژوهش‌های مشابه در آینده باشد چرا که تاکنون در این زمینه در ایران مطالعۀ مشابهی انجام نشده است.

مواد و روش‌ها

تعیین نقاط نمونه‌برداری: نمونه‌برداری از سه گل‌فشان *نفتلیچه*، *اینچه‌برون* و *قارنیاریق* انجام شد. در شکل شماره ۱ موقعیت جغرافیایی گل‌فشان‌ها نشان داده شده است.



شکل۱- موقعیت جغرافیایی سه گل‌فشان بررسی‌شده در حاشیه دریای خزر

www.SID.ir

Archive of SID

نمونه‌برداری با دو هدف بررسی حضور انواع هوازی و بی‌هوازی انجام شد. به این منظور نمونه‌برداری از سطح، مواد میانه، مناطق عمقی گل‌ولای، آب‌های غیرسطحی، رسوبات عمیق گل‌فشان و بستر دریا انجام شد. نمونه‌ها درون فلاسک‌های با دمای حدود ۴ درجه سانتی‌گراد در مدت ۲۴ ساعت از منطقهٔ نمونه‌برداری در گمیشان استان گلستان به آزمایشگاه محمودیهٔ تهران منتقل شدند. برای انتقال نمونه‌های بی‌هوازی از ظروف خاص رشد بی‌هوازی حاوی گازپک[۳] استفاده شد.

کشت نمونه‌ها و جداسازی باکتری‌ها: به‌منظور به‌دست‌آوردن میکروب‌های متنوع هوازی و بی‌هوازی اختیاری موجود در گل‌فشان، لازم است از انواع مناسب محیط‌های کشت میکروبی با درنظرگرفتن pH محیط گل‌فشان و میزان نمک آن استفاده شود. به‌منظور کشت نمونه‌های هوازی، جداسازی به‌روش پورپلیت انجام شد. پس از خالص‌سازی تک‌کلنی‌ها با کشت متوالی، رنگ‌آمیزی گِرم انجام شد. پس از مشاهده و تشخیص باسیل‌های گرم‌مثبت و اسپوردار، باسیل‌های گرم‌منفی و کوکسی‌های گرم‌مثبت، آزمایش‌های تشخیصی شامل اندول، لستیناز، احیای نیترات، کاتالاز، اوره‌آز، هیدرولیز ژلاتین، اکسیداز، MR-VP، دکربوکسیلاز، KOH، تخمیر مواد قندی، هیدرولیز نشاسته، هیدرولیز کازئین، محیط کشت OF، محیط آبگوشت ۷درصد نمک، محیط TSI و محیط سیمون سیترات آگار برای شناسایی آن‌ها تا حد جنس یا گونه انجام شد. آزمایش‌های بیوشیمیایی و استفاده از محیط‌های اختصاصی برای افتراق انواع باکتری‌های گل‌فشان با تنظیم میزان نمک و pH انجام شد(۵).

برای جداسازی باکتری‌های بی‌هوازی از محیط کشت‌های حاوی پودر جگر و تیوگلیکولاتبراث تهیه‌شده طبق دستورالعمل استاندارد کشت باکتری‌های بی‌هوازی استفاده شد. برای تهیهٔ پلیت، ۳۰ گرم بر لیتر از محیط کشت و ۱۵ گرم بر لیتر آگار با یکدیگر مخلوط شد، pH مخلوط بر روی ۷/۱ تنظیم شد و در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۵ دقیقه اتوکلاو شد. محیط‌های براث روزانه به‌طور مرتب تا ۷ روز مشاهده و بررسی شدند(۶).

پس از بررسی اولیه محیط‌های کشت، با توجه به شمارش بالای میکروبی نمونه، رقیق‌سازی انجام شد و از غلظت 10^{-8} تا 10^{-10}، رقت متوالی تهیه شد. به‌منظور رشد باکتری‌های بی‌هوازی‌اختیاری پلیت‌ها در جار بی‌هوازی قرار داده شدند و در دو دمای ۳۰ و ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شدند. با تجدید کشت و اطمینان از خلوص سویه‌ها، بررسی ملکولی کلنی‌های خالص انجام شد.

شناسایی مولکولی باکتری‌های هوازی: سویه‌های خالص‌شده از نظر ویژگی‌های میکروسکوپی، ماکروسکوپی، فیزیولوژیکی و تست‌های مختلف بیوشیمیایی دسته‌بندی شدند. پس از حذف سویه‌های تکراری و آن‌هایی که تکثیر چندانی نداشتند، تعداد ۱۷ سویه برای بررسی فیلوژنتیکی انتخاب شد. برای استخراج DNA سویه‌های منتخب، از کیت MBST[۴] متعلق به شرکت روبین‌طب‌گستر مخصوص باکتری‌های گرم‌منفی و گرم‌مثبت استفاده شد.

ابتدا هریک از باکتری‌های جداشده در محیط کشت LB در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، به‌مدت ۱۸ ساعت نگهداری شد. سپس نمونهٔ موردِنظر به لوله‌های اپندورف ۲ میلی‌لیتری انتقال داده شد و برای ۲ دقیقه سانتریفیوژ (۱۳۰۰۰rpm در دمای۳۷ درجه سانتی‌گراد) شد. سپس مایع رویی دور ریخته شد و این کار تا زمان

www.SID.ir

Archive of SID

به‌دست‌آوردن مقدار مناسب از رسوب باکتری ادامه یافت. مراحل بعدی طبق پروتکل کیت استخراج ژنوم MBST انجام گرفت.

به‌منظور تکثیر ژن *16S rRNA* در ۱۷ سویهٔ منتخب هوازی از پرایمرهای عمومی تهیه‌شده از شرکت روبین‌طب‌گستر، به ترتیب زیر برای انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز استفاده شد(۷).

Fd: 5' AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG 3'
Rd: 5' TAA GGA GGT GAT CCA GCC 3'

FM: 8F : 5' AGAGTTGGATCCTGGCTCAG 3'
RM: 1541R: 5' AAGGAGGTGATCCAGCCGCA3'

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر انجام شد. به‌منظور تکثیر ژن *16S rRNA* با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز آب دوبار تقطیر استریل (۱۸/۳ میکرولیتر)، بافر با غلظت 1X(۲/۵ میکرولیتر)، dNTPs (۱میکرولیتر)، پرایمرهای رفت و برگشت هرکدام به‌مقدار ۱ میکرولیتر، DNA ژنومی (۱ میکرولیتر)، آنزیم DNATaq پلی‌مراز (۰/۲ میکرولیتر) استفاده شد.

مراحل انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای واسرشت اولیهٔ دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۶۰ ثانیه و ۳۰ چرخهٔ تکرارشونده شامل واسرشت با دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۶۰ ثانیه، اتصال با دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد و زمان ۳۰ ثانیه و سنتز با دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد و زمان ۶۰ ثانیه و پس از پایان ۳۰ چرخه برای سنتز نهایی دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۰ دقیقه تنظیم شد.

پس از خالص‌سازی محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، محصول نهایی توسط شرکت کیاژن توالی‌یابی شد. نتایج توالی‌یابی با استفاده از نرم‌افزار Chromas Pro ویرایش و در فرمت FASTA ذخیره شد و به‌کمک نرم‌افزار BLAST در پایگاه دادهٔ NCBI، با سایر داده‌های مندرج در GenBank مقایسه و درصد تشابه سویه‌های به‌دست‌آمده با انواع شناخته‌شدهٔ آن‌ها تعیین شد و درپایان تحلیل فیلوژنتیک سویه‌ها با استفاده از نرم‌افزار MEGA (ویرایش چهارم) و درخت فیلوژنتیک با الگوریتم neighbor-joining رسم شد.

شناسایی مولکولی باکتری‌های بی‌هوازی: تودهٔ سلولی در محیط کشت حاوی پودر جگر و تیوگلیکولات براث به‌وسیلهٔ سانتریفیوژ از محیط کشت مایع جدا شد و DNA ژنومی مشابه روش‌های استفاده‌شده برای باکتری‌های هوازی خارج شد. برای نمونه‌های بی‌هوازی ۲ پرایمر طراحی شد. براین‌اساس سویه‌هایی که با پرایمر A واکنش تکثیری داشتند با مشخصهٔ akh.1-3 و نمونه‌هایی که با پرایمرB تکثیر یافتند با مشخصهٔ akh.4,5 نام‌گذاری شدند.

به‌منظور تکثیر ژن *16S rRNA* با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز بافر با غلظت 1X در ترکیب نهایی $MgCl_2$ با غلظت ۱/۵mM، dNTPs ۲۰۰ میکرومول، پرایمرهای رفت و برگشت (D1) هرکدام به‌مقدار ۵ فمتومول، DNA ژنومی ۵ میکرولیتر، آنزیم *DNATaq* پلیمراز به‌میزان ۱ میکرولیتراستفاده شد(۷).

A:
FD1: 5' AGA GTT TGA TCC TGG CTT AG 3'
RD1: 5' TAA GGA GGT GAT CCA GCC 3'
B:
9F:5'-AAG AGT TTG ATC ATG GCT-3'
1541R:5'-AGG AGG TGA TCC AAC CGC-3'

مراحل انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز نمونه‌های بی‌هوازی، با واسرشت اولیه دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۶۰ ثانیه و ۳۰ چرخه تکرارشونده شامل واسرشت با دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۶۰ ثانیه، اتصال با

www.SID.ir

Archive of SID

دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد و زمان ۳۰ ثانیه و سنتز با دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد و زمان ۹۰ ثانیه و پس از پایان یک چرخه برای سنتز نهایی دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۰ دقیقه تنظیم شد.

محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در پلاسمید pTZ57RT/A کلون شد و کلونی‌های سفید حاوی DNA خارجی روی پلیت حاوی IPTG و X-GAL انتخاب و کتابخانهٔ ژنی برای ژن *16S rRNA* ساخته شد. سپس از کتابخانهٔ موجود چند کلون انتخاب شد و پس از تأیید حضور قطعهٔ خارجی توسط واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از پرایمرهای رفت و برگشت D1 در کلون‌ها از ۵ کلون با استفاده از کیت استخراج پلاسمید، DNA پلاسمیدی خارج شد و با پرایمرهای M13 fwd و M13Rev از دو طرف تعیین توالی شد.

توالی‌های حاصل با توالی‌های موجود در پایگاه دادهٔ NCBI بخش توالی‌های *16S rRNA* توسط نرم‌افزار BLAST مقایسه شد و توالی‌های انتهای ´۳ و ´۵ آن بررسی و آنالیز شد و توالی کامل ژن *16S rRNA* به‌دست آمد. توالی مربوط به هر کلون در پایگاه دادهٔ EZtaxon از نظر شباهت با توالی‌های *16S rRNA* موجود در بانک‌های اطلاعات زیستی بررسی شد. توالی *16S rRNA* سویه‌های ثبت‌شده در پایگاه داده‌های زیستی که بیشترین قرابت را با توالی ژن مربوطه داشتند، برای رسم درخت فیلوژنی با استفاده از نرم‌افزار MEGA (ویرایش پنجم) استفاده شد.

آنالیز عنصری نمونه‌های گل‌فشان: برای آنالیز عنصری نمونه‌های جمع‌آوری‌شده از سه گل‌فشان با روش شیمی تر و به‌کمک دستگاه ICP-OES (پلاسمای جفت‌شدهٔ القایی نشرنوری) اقدام شد.

نتایج

باکتری‌های هوازی: در این پژوهش از میان محیط‌های استفاده‌شده برای نمونه‌های هوازی، محیط نوترینت آگار و BHI آگار کارایی بالاتری در جداسازی میکروب‌ها با استفاده از روش رقیق‌سازی متوالی داشتند. در محیط‌های ذکرشده تعداد کلنی‌های بیشتری رشد کردند که می‌تواند بیانگر تطابق بیشتر این محیط‌ها با شرایط فیزیکوشیمیایی گل‌فشان‌ها است. اکثر کلنی‌های به‌دست‌آمده به‌رنگ سفید کرم و یا حتی بی‌رنگ بودند. همچنین در میان سویه‌های کروی‌شکل، کلنی‌هایی به‌رنگ زرد و نارنجی مشاهده شد. از نکات قابلِ‌توجه رشد سریع اکثر کلنی‌ها به‌مدت ۴۸-۲۴ ساعت بود. در محیط‌های مک‌کانکی آگار و ENDO Agar هیچ‌گونه کلنی ظاهر نشد. در محیط سابورودکستروزآگار به‌جای رشد قارچ و کپک، کلنی‌های باکتریایی به‌رنگ‌های قرمز، صورتی، سبز، قهوه‌ای، سیاه و بنفش مشاهده شد که اکثریت دارای اشکال باسیلی و چندشکلی بودند. در مجموع، ۱۲۷ سویهٔ باکتری از نمونه‌های هوازی جدا شد. بیشترین تعداد باکتری‌های هوازی از منطقهٔ گل‌فشان *قارنیاریق* جدا شد که معادل ۸۹ سویه بود و حدود ۷۲درصد کل جدایه‌ها را شامل می‌شود. در شکل ۲ نمودار مقایسه‌ای تعداد باکتری‌های هوازی جداشده از گل‌فشان‌ها رسم شده است.

شکل ۲- مقایسهٔ تعداد سویهٔ باکتری هوازی جداشده از ۳ گل‌فشان و ذکر نسبت آن‌ها (٪)

www.SID.ir

Archive of SID

از میان جدایه‌های به‌دست‌آمده از محیط‌های کشت، تفکیک جدایه‌ها براساس رنگ‌آمیزی گرم و مشاهدهٔ لام میکروسکوپی نشان داد که گل‌فشان *قارنیاریق* دارای فراوانی باکتریایی بیشتری در میان سایر مناطق گل‌فشانی است.

تمامی جدایه‌ها از نظر شکل و ویژگی‌های کلنی، واکنش گِرم و شکل و آرایش میکروسکوپی سلول، شکل و موقعیت اسپور، حرکت، واکنش کاتالاز و اکسیداز بررسی شدند. در پایان بررسی لام و مشاهدهٔ واکنش KOH 3% برای جدایه‌ها نشان داد که درصد فراوانی جدایه‌ها به این ترتیب است: باسیل‌های گرم‌مثبت ۴۵درصد، باسیل‌های گرم‌منفی ۳۶درصد و کوکوس‌های گرم‌مثبت ۱۹درصد. همچنین مشاهدهٔ لام نشان داد که باسیل‌های گرم‌مثبت اسپوردار با تعداد ۴۶ عدد (۳۷درصد) بیشترین فراوانی را در میان جدایه‌ها دارند. از نظر واکنش کاتالاز اکثر باسیل‌های گرم‌مثبت و کوکوس‌های جداشده، کاتالازمثبت و اکسیدازمثبت(بیشتر در باسیلوس‌ها) بودند.

براساس ویژگی‌های فنوتیپی، جدایه‌های بی‌هوازی به چندین گروه تقسیم شدند. با توجه به آزمایش‌های بیوشیمیایی از بین سویه‌های گرم‌منفی اکثراً جنس‌های *سودوموناس*، *سالمونلا* و *سیتروباکتر* و نیز *اشرشیا کلی* مشاهده شد و از بین کوکوس‌ها از استافیلوکوک‌ها بیشتر نمونه‌ها مربوط به *استافیلوکوک اورئوس* و از استرپتوکوک‌ها بیشتر نمونه‌ها مربوط به *انتروکوک* بود. ویژگی‌های ریخت‌شناختی، فیزیولوژیک و بیوشیمیایی سویه‌های منتخب در جدول‌های ۱ و ۲ نشان داده شده است.

جدول ۱- خصوصیات ظاهری ۱۷ سویهٔ باکتری‌های هوازی جداشده

ردیف	سویه	شکل سلول	رنگ کلنی	رنگ آمیزی گرم	KOH (3%)	کاتالاز	اکسیداز	اسپور
۱	*B1a*	باسیل کوتاه	شیری	+	−	+	+	+
۲	*B3c*	باسیل گوانول‌دار	کرمی	+	−	−	+	+
۳	*B5a*	باسیل	کرمی	+	−	+	+	+
۴	*B6a*	باسیل	کرمی	+	−	+	+	+
۵	*B8a*	باسیل	کرمی	+	−	+	+	+
۶	*B9a*	باسیل	کرمی	+	−	+	+	+
۷	*B10a*	باسیل	کرمی	+	−	+	+	+
۸	*B12a*	باسیل	بی رنگ	+	-	+	−	+
۹	*B14c*	باسیل گرانول‌دار	کرمی	+	-	−	+	+
۱۰	*B16a*	باسیل دراز رشته‌ای	کرمی	+	−	+	+	+
۱۱	*B18a*	باسیل کوتاه	کرمی	+	−	+	+	+
۱۲	*B19a*	باسیل کوتاه	کرمی	+	−	+	+	+
۱۳	*B21a*	باسیل	سفید	+	−	+	+	+
۱۴	*B22a*	باسیل	سفید	+	−	+	+	−
۱۵	*B23a*	باسیل رشته ای	کرمی	+	−	+	−	+
۱۶	*B25b*	باسیل	کرمی	+	−	−	+	+
۱۷	*B31b*	کوکوباسیل	سفید	+	−	+	+	−

a: نمونهٔ گل‌فشان *قارنیاریق*؛b: نمونهٔ گل‌فشان *نفتلیجه*؛ c: نمونهٔ گل‌فشان *اینچه‌برون*

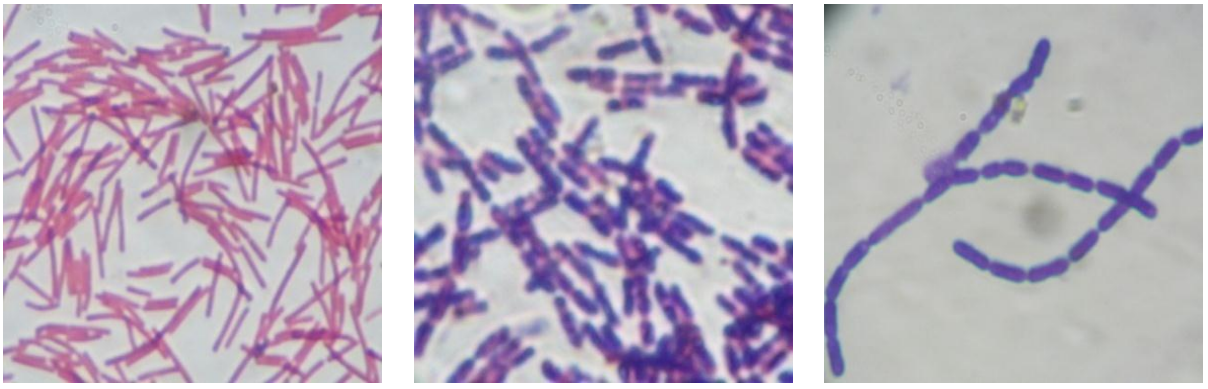
www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۲-آزمایش‌های تشخیصی مربوط به ۱۷ سویهٔ باکتری هوازی جداشده

ردیف	سویه	آنزیم آمیلاز	آنزیم کازئیناز	آنزیم لستیناز	Urea	VP	MR	سیترات	NaCl 7%	نیترات	M	I	S	گلوکز	زایلوز	مالتوز	ژلاتین
۱	*B1a*	+	+	+	–	+	–	–	+	–	+	+	–	+	+	+	+
۲	*B3c*	-	+	-	+	–	+	–	+	+	+	–	–	+	–	+	–
۳	*B5a*	+	+	-	–	–	+	–	+	–	–	–	–	+	–	+	–
۴	*B6a*	+	-	-	–	+	–	+	+	+	+	–	–	+	+	+	–
۵	*B8a*	–	+	-	+	–	+	+	+	–	–	–	–	+	–	+	–
۶	*B9a*	+	+	-	–	+	–	+	+	+	+		–	+	–	+	+
۷	*B10a*	+	+	-	–	+	–	+	+	+	–	–	–	+	+	+	+
۸	*B12a*	+	+	-	+	–	+	+	+	-	+	-	–	+	-	+	-
۹	*B14c*	-	+	-	+	–	+	–	+	-	–	–	–	+	-	+	-
۱۰	*B16a*	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	–	+	-	+	-
۱۱	*B18a*	+	+	-	–	-	+	+	+	–	+	–	–	+	–	+	–
۱۲	*B19a*	-	-	-	–	-	+	+	+	–	+	–	–	+	–	+	–
۱۳	*B21a*	+	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-	–	+	-	+	-
۱۴	*B22a*	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	–	+	+	+	-
۱۵	*B23a*	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	–	+	-	+	-
۱۶	*B25b*	–	+	-	–	–	+	+	+	–	-	-	–	+	-	+	–
۱۷	*B31b*	+	–	-	+	–	+	–	+	–	+	-	–	+	-	+	–

a: نمونهٔ گل‌فشان *قارنیاریق*؛b : نمونهٔ گل‌فشان *نفتلیجه*؛ c: نمونهٔ گل‌فشان *اینچه‌برون*



شکل ۳- رنگ‌آمیزی گرم برخی از نمونه‌های باکتری‌های گل‌فشان‌ها. اشکال باسیلی غالب هستند.

www.SID.ir

Archive of SID

باکتری‌های بی‌هوازی اختیاری: نمونه‌های بی‌هوازی اختیاری در محیط‌های حاوی پودر جگر و تیوگلیکولات براث به‌طور جداگانه بررسی شدند. کدورت محیط تیوگلیکولات بیشتر از محیط حاوی پودر جگر بود و این می‌تواند نشان‌دهندهٔ تعداد باکتری بیشتری در این محیط باشد. به‌همین‌دلیل نمونه‌های کشت‌شده در محیط تیوگلیکولات براث برای رنگ‌آمیزی گرم و همچنین آنالیز مولکولی انتخاب شدند. رنگ‌آمیزی گرم نمونه‌های بی‌هوازی اختیاری اشکال باسیلی را بیشتر از سایر شکل‌ها نشان داد. به‌علت محدودیت در کشت باکتری‌های بی‌هوازی و همچنین آزمایش‌های بیوشیمیایی در رابطه با این باکتری‌ها پس از طی زمان استاندارد کشت آن‌ها، درخت فیلوژنتیکی برای تشخیص سویه‌های بی‌هوازی اختیاری موردِنظر رسم شد.

مشاهدات میکروسکوپی: برای بررسی شکل‌های باکتریایی پس از رنگ‌آمیزی گرم نمونه‌ها ازطریق میکروسکوپ نوری مشاهده شدند که در شکل۳ نشان داده شده است.

شناسایی سویه‌های منتخب: نمونه‌های هوازی: از بین ۱۷ سویه منتخب هوازی فقط ۱۱ نمونه با موفقیت توالی‌یابی شد. جدول ۳ میزان شباهت هر سویه با نزدیک‌ترین باکتری شناخته‌شده را نشان می‌دهد.

نمونه‌های بی‌هوازی: پس از انجام آزمایش‌های مولکولی، توالی‌یابی و بلاست نمونه‌های کشت‌شده در محیط‌های بی‌هوازی، ۵ سویهٔ بی‌هوازی اختیاری شناسایی شد. جدول ۴ میزان شباهت هر سویه با نزدیک‌ترین باکتری شناخته‌شده را نشان می‌دهد.

جدول۳- میزان شباهت سویه‌های منتخب هوازی با نزدیک‌ترین گونهٔ ثبت‌شده در پایگاه NCBI

ردیف	نام سویه	نزدیک‌ترین سویه	درصد شباهت	شماره دستیابی نزدیک‌ترین سویه
۱	*B1a*	*Brevibacterium halotolerans* DSM8802	99%	AM747812.1
۲	*B3c*	*Bacillus* sp. B2005	99%	JX266373.1
۳	*B8a*	*Bacillus* sp. A2095	100%	JX266343.1
۴	*B12a*	*Bacillus oceanisediminis* CCMM B618	100%	JN208067.1
۵	*B16a*	*Chlamydophila pneumoniae* TW-183	97%	AE009440.1
۶	*B19a*	Uncultured bacterium 0502TCLN265	100%	AB695997.1
۷	*B21a*	*Bacillus megaterium* IAM 13418	100%	D16273.1
۸	*B22a*	*Bacillus simplex* JP44SK31	100%	JX144721.1
۹	*B23a*	*Enterobacter cloacae* Y219	100%	JQ086381.1
۱۰	*B25b*	*Bacillus cereus* UI28	98%	JX133203.1
۱۱	*B31b*	*Uncultured bacterium clone ncd97b12c1*	99%	JF010371.1

جدول۴- میزان شباهت سویه‌های بی‌هوازی با نزدیک‌ترین گونهٔ ثبت‌شده در پایگاه NCBI

ردیف	نام سویه	نزدیک‌ترین سویه	درصد شباهت
۱	*akh1*	*Bacillus niacini*	99.61%
۲	*akh2*	*Clostridium bifermentas*	99.74%
۳	*akh3*	*Clostridium ultunense*	94.9%
۴	*akh4*	*Proteiniborus ethanoligene*	95.7%
۵	*akh5*	*Clostridium methylpentosum*	91.14%

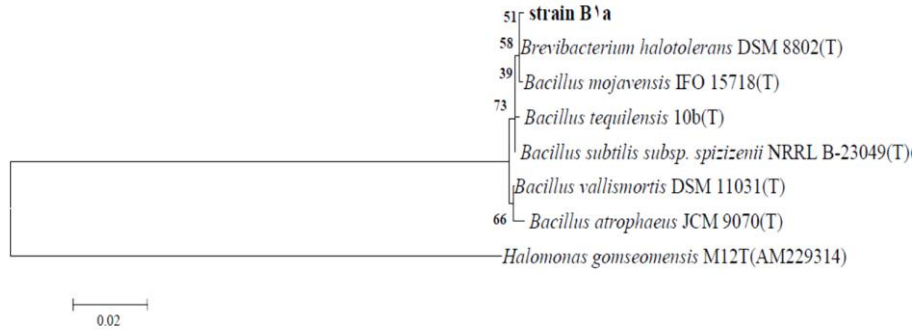
www.SID.ir

Archive of SID

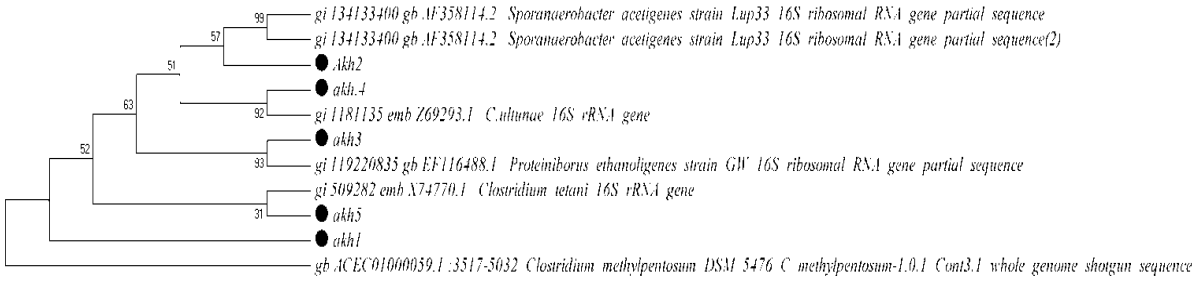
رسم درخت فیلوژنتیکی: از بین سویه‌های به‌دست‌آمده از نمونه‌های هوازی، به‌صورت انتخابی درخت فیلوژنتیکی برای سویهٔ *B1a* رسم شد که موقعیت این سویه در شکل شماره ۴ نشان داده شده است.

از بین سویه‌های بی‌هوازی اختیاری هر ۵ سویه توالی یابی شدند و برای آن‌ها درخت فیلوژنتیکی رسم شده است که در شکل شماره ۵ رسم شده است.

آنالیز عنصری سه گل‌فشان: برای آگاهی از ماهیت شیمیایی نمونه‌های بررسی‌شده سه گل‌فشان، ترکیبات آن‌ها از نظر کاتیون‌ها وآنیون‌ها آنالیز عنصری انجام شد که نتایج این بررسی در جدول ۴ آورده شده است.



شکل ۴- درخت فیلوژنتیکی سویهٔ *B1a*



شکل ۵- درخت فیلوژنتیکی مربوط به ۵ سویهٔ بی‌هوازی اختیاری

جدول۴- ترکیبات موجود در سه گل‌فشان

نام گل‌فشان	میزان ترکیبات معدنی				
	سولفات	فسفات	نیترات	برومید	کلرید
نفتلیجه	۰/۹	بسیار جزیی	۰/۰۶	۰/۱۷	۳۳/۶
قارنیاریق	۱/۳	بسیار جزیی	۰/۰۸	۰/۱۸	۳۶/۱
اینچه‌برون	۱۱/۲	بسیار جزیی	۰/۰۲	۰/۱۶	۴۹/۶

www.SID.ir

Archive of SID

بحث و نتیجه‌گیری

گل‌فشان‌ها حفره‌های مخروطی شکل به عمق ۱ تا ۲ متر هستند که حاوی مخلوطی از آب داغ و رسوبات هستند. به‌دلیل همراه‌داشتن گازهای آتش‌فشانی و آب جوشان به‌صورت فواره به هوا پرتاب می‌شوند(۹). از دیدگاه میکروبیولوژی گل‌فشان‌ها به‌دلیل محتویات و شرایط خاص به‌عنوان مناطق سخت در نظر گرفته می‌شوند.

با توجه به اینکه تاکنون گل‌فشان‌ها از دیدگاه میکروبی در ایران بررسی نشده‌اند، این پژوهش می‌تواند نقطهٔ آغازی در این زمینه باشد. در پژوهش حاضر مانند مطالعه‌ای که به‌منظور بررسی میکروارگانیسم‌های چشمه‌های اردبیل انجام شده است از روش‌های رایج ریخت‌شناسی، فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و روش فیلوژنتیکی *16S rRNA* استفاده شد(۱۰). مقایسهٔ نتایج این بررسی با پژوهش‌های مشابه سایر نقاط جهان تأمل‌برانگیز است و تاکنون در این زمینه پژوهشی در ایران صورت نگرفته است. با توجه به نتایج حاصل‌شده انواع باکتری‌های جداشده اغلب از گروه پروتئوباکتری‌ها و فیرمیکوت‌ها است. نکتهٔ قابل‌توجه در این مطالعه این است که اکثر نمونه‌ها غیرقابلِ‌کشت بودند و تنها با روش‌های مولکولی قابلِ‌تشخیص هستند(۱۱). براساس نتایج مولکولی، حضور کلوستریدیوم‌ها در گل‌فشان‌های جنوب شرقی دریای خزر اثبات شد که با نتایج حاصل از بررسی گل‌فشان‌های *اپنیاین* در ایتالیا و کوه‌های هیمالیا مشابهت داشت(۵، ۸، ۱۲ و ۱۳). علاوه بر این، گل‌فشان‌ها از نظر میکروارگانیسم‌های بی‌هوازی مثل متانوتروف‌ها و احیاکنندهٔ گوگرد مهم هستند(۵، ۸ و ۱۱). در پژوهش حاضر چون امکانات کشت بی‌هوازی‌های اجباری مقدور نبود، میکروارگانیسم‌های هوازی و بی‌هوازی اختیاری شناسایی شدند و سویه‌های جداشده در محیط صفر تا۱۵درصد نمک و دمای ۴تا۴۵ درجه سانتی‌گراد در مدت ۴۸ ساعت رشد کردند. مشابه با نتایج به‌دست‌آمده از گل‌فشان دریاچهٔ بایکال اکثر سویه‌ها غیرقابلِ‌کشت بودند(۵ و ۱۱). حاصل این پژوهش باکتری‌های متعددی بودند که علاوه بر تشخیص بیوشیمیایی، شناسایی مولکولی آن‌ها هم انجام شد. در ضمن، آنالیز عنصری میزان ترکیبات معدنی به‌دست‌آمده در سه گل‌فشان با استفاده ازروش ICP-OES (پلاسمای جفت‌شدهٔ القایی نشرنوری) نشان داد علاوه بر آگاهی از محتویات معدنی محیط می‌توان با توجه به حضور این ترکیبات، محیط کشت میکروبی مناسب میکروارگانیسم‌های گل‌فشان را تهیه کرد. با توجه به فعالیت بالای آنزیمی سویه‌های جداشده از گل‌فشان‌ها یکی از مهم‌ترین نتایج آنالیز عنصری علاوه بر تهیهٔ محیط کشت، به‌دست‌آوردن محیطی مناسب برای ایجاد فعالیت آنزیمی این باکتری‌ها است. براین‌اساس می‌توان محیطی ساخت که علاوه بر رشد باکتری فعالیت آنزیمی آن هم به حداکثر مقدار خود برسد و برای اهداف زیست‌فناوری استفاده شود. با وجود استقرار گل‌فشان‌های متعدد در ایران تاکنون هیچ پژوهش میکروبی روی این محیط‌های با شرایط سخت انجام نشده است و این مطالعه می‌تواند نقطهٔ آغازی برای پژوهش‌های آتی باشد.

References

(1) Lösekann T, Knittel K, Nadalig T, Fuchs B, Niemann H, Boetius A, et al.. Diversity and abundance of aerobic and anaerobic methane oxidizers at the Haakon Mosby Mud Volcano, Barents Sea. *Applied and Environmental Microbiology*. 2007; 73(10): 3348-3362.

www.SID.ir

Archive of SID

(2) Blumenberg M, Seifert R, Reitner J, Pape T, Michaelis W. Membrane lipid patterns typify distinct anaerobic methanotrophic consortia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004; 101(30): 11111–11116

(3) NauhausK, Boetius A, KrugerM& WiddelF. In vitro demonstration of anaerobic oxidation of methane coupled to sulphate reduction in sediment from a marine gas hydrate area. *Environmental Microbiol* 2002; 4(5): 296–305.

(4) Alperin MJ, Blair NE, Albert DB, Hoehler TM, and Martens CS. Factors that control the stable carbon isotopic composition of methane produced in an anoxic marine sediment. *Global Biogeochemical Cycles* 1992; 6(3): 271-291.

(5) Grünke S, Lichtschlag A, Beer D, Kuypers M, Lösekann-Behrens T, Ramette A, et al..Novel observations of Thiobacterium, a sulfur-storing *Gammaproteobacterium* producing gelatinous mats. *The ISME Journal*. 2010; 4: 1031–1043.

(6) Atlas RM. *Handbook of microbiological media*. 3rd ed. United States of America: CRC Press LLC; 2004.

(7) Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ. "16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study". *Journal Bacteriol*. 1991; 173(2): 697–703.

(8) Heller C, Blumenberg M, Kokoschka S, Wrede C, Hoppert M, Taviani M, et al.. Geomicrobiology of fluid venting structures at the Salse di Nirano mud volcano area in the Northern Apennines.*LectureNotes Earth Sciences*. 2011; 131: 189-200.

(9) Fasl-e-bahar J. *Mud volcano*. First ed. Tehran: Arianzamin; 2011.

(10) Salamian N, Ebrahimipour G, Ghasemi M, Fakhari J. Isolation and characterization of a Facultative chemolithotrophic sulphur and iron oxidizing bacterium from Ardabil acidic springs. *Biological Journal of Microorganism* 2012; 1(1): 1-10

(11) Zemskaya TI, Pogodaeva TV, Shubenkova OV, Chernitsina SM, Dagurova OP, Buryukhaev SP, et al.. Geochemical and microbiological characteristics of sedimentsnear the Malenky mud volcano (Lake Baikal, Russia),with evidence of Archaea intermediate between the marineanaerobic methanotrophs ANME-2 and ANME-3.*Geo-Mar Lett*. 2010; 30: 411-425.

(12) Ona-Nguema G,Morin G, Wang YH,Menguy N,Juillot F, Olivi L, et al.. Arsenite sequestration at the surface of nano-Fe(OH)(2), ferrous-carbonate hydroxide, and green-rust after bioreduction of arsenic-sorbed lepidocrocite by Shewanella putrefaciens. *Geochimica et Cosmochimica Acta*. 2009; 73: 1359-1381.

(13) Stolz JF, Perera E, Kilonzo B, Crable B, Fisher E, Ranganathan M, et al.. Biotransformation of 3-nitro-4-hydroxybenzene arsonic acid (Roxarsone) and release of inorganic arsenic by Clostridiumspecies. *Environmental Science & Technology*. 2007; 41(3): 818-823.

[1]- Northern Apennines
[2]- Biotransformation
[3]- GasPak
[4]- Molecular Biological System Transfer (MBST)

www.SID.ir