مجله دنیای میکروب‌ها
سال دهم شماره دوم (پیاپی ۳۱) تابستان ۱۳۹۶
صفحات ۱۴۴-۱۳۴

Original Article

جداسازی و شناسایی باکتری های کمولیتوتروف اکسید کننده گوگرد از غار نمکی قشم

نینا زمانی[۱]، محمد علی آموزگار[۲*]، ملیحه مهرشاد[۳]، محبوبه دارابی[۱]، سید ابوالحسن شاهزاده فاضلی[۴]، محمود شوندی[۵]

[۱]دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشگاه تهران، تهران، [۲] استاد، دانشگاه تهران، تهران، [۳]دانشجوی دکتری، دانشگاه تهران، تهران، [۴] دانشیار مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران، تهران، [۵] استادیار، گروه میکروب شناسی و بیوتکنولوژی، پژوهشگاه صنعت نفت، تهران.

چکیده

سابقه و هدف: باکتری های کمولیتوتروف نقش مهمی را در چرخه عناصر در محیط های طبیعی ایفا می کنند. برای مثال بخش اکسیداتیو چرخه گوگرد توسط باکتری های اکسید کننده گوگرد صورت می گیرد. همچنین این باکتری ها نقش مهمی را در صنایع مختلف از جمله فروشویی زیستی ایفا می کنند. هدف از این پژوهش جداسازی و شناسایی باکتری های کمولیتوتروف اکسید کننده گوگرد از غار نمکدان قشم بود.

مواد و روش ها: در این مطالعه مقطعی-توصیفی پس از نمونه برداری از غار نمکدان قشم و انتقال نمونه های آب، نمک و رسوب به آزمایشگاه تلقیح به درون محیط های غنی سازی با سه غلظت از NaCl انجام شد. میزان اسیدیته و دمای نمونه ها اندازه گیری شد. سپس نمونه ها به محیط جامد و محیط دو فاز منتقل شدند. شناسایی تکمیلی سویه های منتخب توسط تکثیر ژن *16S rRNA* صورت گرفت. آزمون های مربوط به تشخیص اتوتروف یا هتروتروف بودن انجام شد. سنجش توده سلولی نیز با روش متداول کدورت سنجی انجام پذیرفت.

یافته ها: بر اساس تفاوت در ویژگی های اولیه مانند شکل کلنی یا سرعت رشد، ۳۹ جدایه از نمونه های مختلف جداسازی گردید و ۵ نمونه برای مطالعه بیشتر انتخاب شدند. بر اساس آنالیزهای فیلوژنتیک این سویه ها به جنس *هالوتیوباسیلوس* تعلق داشتند.

نتیجه گیری: با توجه به شوری ۳۰ درصدی و pH خنثی این غار، جداسازی باکتری های کمولیتوتروف اکسید کننده گوگرد به جنس های معدودی محدود گردید. باکتری های کمولیتوتروف در مقایسه با باکتری های هتروتروف از رشد بسیار کندتری برخوردارند و زمان تقسیم برخی از آن ها به سی روز نیز می رسد.

واژگان کلیدی: کمولیتوتروف، اکسید کننده گوگرد، باکتری هالوفیل، غار نمکدان.

دریافت مقاله: دی ماه ۹۵ پذیرش برای چاپ: اسفند ماه ۹۵

مقدمه

پروکاریوت ها از روش های متابولیکی متنوعی مانند فتوتروفی، لیتوتروفی و هتروتروفی برای به دست آوردن انرژی استفاده می کنند. پروکاریوت ها همچنین قادرند از ترکیبی از این روش ها نیز برای تامین انرژی استفاده نمایند (۱).

کمولیتوتروفی (استفاده از مواد معدنی به عنوان منبع انرژی) به دلیل اینکه به طور اختصاصی تنها در پروکاریوت ها شناسایی شده اند، مورد توجه بسیار بوده است (۲). باکتری های کمولیتوتروف غالباً در شاخه پروتئوباکتری ها قرار گرفته اند و به دو نوع اجباری و اختیاری تقسیم می شوند (۱).

تمامی کمولیتوتروف ها توانایی استفاده از مواد معدنی به عنوان منبع انرژی و منبع کربن غیر آلی (عموماً به شکل دی اکسید کربن) به عنوان کربن سلولی را دارا می باشند. کمولیتوتروف های اجباری برای بقا وابسته به متابولیسم اتوتروفی هستند. در حالی که انواع اختیاری قادر به رشد صورت هتروتروفی نیز می باشند. باکتری های کمولیتوتروف

*) آدرس برای مکاتبه: تهران، خ انقلاب، دانشگاه تهران، گروه میکروب شناسی.
تلفن: ۰۲۱۶۱۱۱۳۵۵۹ پست الکترونیک: amoozegar@ut.ac.ir

Archive of SID
www.SID.ir

نقش مهمی را در چرخه عناصر و به ویژه بخش اکسیداتیو چرخه گوگرد بر عهده دارند (۳). باکتری های اکسید کننده گوگرد، شامل لیتوتروف های هوازی و فتوتروف های بی هوازی هستند (۳). پروکاریوت های اکسید کننده گوگرد قادرند هیدروژن سولفید، سولفور، سولفیت، تیوسولفات و پلی تیونات های مختلف را در شرایط قلیایی، خنثی و اسیدی به سولفات و سایر ترکیبات اکسید نمایند (٤).

با مطالعاتی که بر روی جمعیت های باکتری های کمولیتواتوتروف صورت گرفته مشخص شده است که این باکتری ها نقش مهمی در اکوسیستم غار ایفا می کنند. به این ترتیب که نقش تولید کننده اولیه را بر عهده دارند و رشد باکتری های هتروتروف را حمایت می کنند (۵).

ایران دارای تنوعی از محیط های پرشور می باشد. این محیط ها شامل معادن نمکی، بیابان های پرشور، رودخانه های نمکی، غارهای نمکی و دریاچه نمک است. غارها محیط های منحصر به فردی به لحاظ کمبود یا عدم نور، مقدار بسیار کم مواد آلی، غلظت های بالای مواد معدنی و شرایط فیزیکوشیمیایی ثابتی هستند که نیچ های اکولوژیکی ثابتی را برای ارگانیسم های بسیار اختصاصی به وجود می آورند.

غار نمکدان در موقعیت جغرافیایی N263704 E553100 در استان هرمزگان و جزیره قشم، در ۹۰ کیلومتری ساحل غربی شهر قشم، در بطن گنبد نمکی قشم به ارتفاع ۲۳۷ متر از سطح دریا قرار دارد. از دل کوه نمکدان یک جریان زیرزمینی دائمی می جوشد که دریاچه کوچکی به عمق یک متر در غار ایجاد کرده و در ادامه به بیرون غار راه پیدا کرده است. پس از حل کردن نمک در مسیر حرکت خود به صورت چشمه نمک در دامنه کوه ظاهر می شود و در گودال مقابل خود حوضچه ای طبیعی به رنگ سفید به وجود می آورد (۹).

دلیل انتخاب غار نمکدان قشم برای جداسازی باکتری های کمولیتوتروف اکسید کننده گوگرد، پتانسیل های شناخته نشده این غار به عنوان بزرگترین غار نمکی در سطح جهانی و باقی ماندن ژئوپارک قشم در لیست یونسکو می باشد. به دلیل نقش مهم باکتری های کمولیتوتروف اکسید کننده گوگرد به عنوان تولید کننده اولیه در محیط تاریک و فقیر غارها و نیز در بخش اکسیداتیو چرخه گوگرد، این گروه از میکروارگانیسم ها برای جداسازی از غار نمکدان قشم انتخاب شدند. پس از جداسازی امکان بررسی اثرات بیوتکنولوژیک این گروه از میکروارگانیسم ها نیز وجود دارد.

از جمله فرایند هایی که توسط باکتری های اکسید کننده گوگرد انجام می شود می توان به حذف گوگرد و ترکیبات احیا شده گوگردی اشاره نمود. این ترکیبات گوگردی علاوه بر اینکه موجب ایجاد بوی بسیار بدی می شوند، هنگام ورود به جریانات آب ، میزان اکسیژن محلول در آب را کاهش داده و حیات موجودات زنده در محیط های آبی را تهدید می کنند (٦). بنابراین باکتری های اکسید کننده گوگرد در تصفیه پساب ها نقش بسیار عمده ای دارند و به طور گسترده مورد استفاده قرار می گیرند. از موارد دیگر کاربرد باکتری های اکسید کننده گوگرد می توان به فروشویی زیستی اشاره کرد. از مزایای فروشویی زیستی می توان به استخراج فلزات از معادن با عیار پایین، کاهش هزینه های استخراج، امکان بهره برداری از منابع زیرزمینی و دور از دسترس، بازیابی فلزات از ضایعات صنعتی و کمتر شدن آلودگی محیطی اشاره نمود (۷).

بنابراین با جداسازی باکتری های اکسید کننده گوگرد امکان استفاده از آن ها در تصفیه زیستی پساب ها و نیز فروشویی زیستی وجود دارد (۸). این امر موجب انتخاب این گروه از میکروارگانیسم ها برای جداسازی از غار نمکدان قشم گردید.

از جمله سویه های جداسازی شده نمک دوست اکسید کننده گوگرد می توان به *هالوتیوباسیلوس هالوفیلوس* (*Halothiobacillus halophilus*) و برخی از گونه های جنس *تیومیکروسپورا* (*Thiomicrospora* spp.) اشاره کرد. در مورد جداسازی باکتری های کمولیتوتروف اجباری می توان به *تیوباسیلوس تیوپاروس* (*Thiobacillus thioparus*)، *تیوباسیلوس نئوپولیتنس* (*T. neapolitans*) اشاره نمود (٢٤).

تا کنون هیچ گونه گزارشی مبنی بر جداسازی باکتری های نمک دوست اکسید کننده گوگرد در ایران منتشر نشده است. هدف از این مطالعه جداسازی باکتری های نمک دوست اکسید کننده

Archive of SID

www.SID.ir

گوگرد اجباری از غار نمکدان قشم بود.

مواد و روش ها

الف) نمونه برداری: در این مطالعه مقطعی-توصیفی نمونه برداری از غار نمکدان قشم در آبان ماه ۱۳۹۲ انجام شد. نمونه های آب داخل و خارج غار، نمک های غار و رسوبات داخل غار جمع آوری شدند. نمونه برداری در شرایط استریل انجام و در مدت ٢٤ ساعت به آزمایشگاه منتقل شدند. میزان اسیدیته و دمای نمونه ها به ترتیب توسط pH متر و دماسنج اندازه گیری گردید. میزان شوری نمونه ها نیز با استفاده از دستگاه مالتی متر شرکت متلر تولدو (MettlerToledo) مدل مالتی سون (Multiseven) پس از انتقال به آزمایشگاه اندازه گیری شد. تحلیل شیمیایی ترکیبات نمونه ها برای سنجش عناصر موجود در نمونه ها در دانشکده زمین شناسی دانشگاه تهران با استفاده از روش طیف سنجی شعله ای دستگاه شیمادز (Shimadzu) انجام شد. نمونه ها در آزمایشگاه در دمای ٤ درجه سلیسیوس نگهداری شدند.

ب) محیط کشت جداسازی: به منظور جداسازی باکتری های اکسید کننده گوگرد با مطالعه مقالات مختلف و با توجه به مقدار عناصر موجود در محیط و شوری بالای محیط غار و به منظور جداسازی حداکثری انواع سویه های نمک دوست (نمک دوست ضعیف، نمک دوست نسبی و نمک دوست افراطی) محیط کشت موجود در جدول ۱ طراحی و در سه غلظت نمکی ۰/۲، ۲، ٤ مولار ساخته شد. برای جداسازی باکتری های کمولیتوتروف اکسید کننده گوگرد از محیط شیب دار نیز استفاده شد. این محیط شامل دوفاز جامد و نیمه جامد (J_1+J_2) در یک لوله آزمایش بود (۱۰). چند سانتی متری پایین لوله ی آزمایش شامل تیوسولفات آگار J_1 شامل تیوسولفات (۲۰ میلی مولار) و آگار (۱/۵ درصد) بود. در بالای لوله نیز محیط نیمه جامد J_2 شامل سایر اجزای محیط کشت به علاوه ۰/۲ درصد آگار افزوده شد. بنابراین در فاز بالایی محیط نیمه جامدی قرار دارد که اکسیژن و تیوسولفات به راحتی از آن عبور می کند. همچنین از پایین به بالا شیب کاهشی تیوسولفات و از بالا به پایین شیب کاهشی اکسیژن وجود خواهد داشت (۱۰). با توجه به هدف جداسازی این پروژه، محیط های S جدول ۱ ابتدا به صورت مایع به منظور غنی سازی باکتری های اکسید کننده گوگرد و حذف نسبی سایر باکتری ها ساخته شدند. برای تلقیح نمونه های آب، از رسوب حاصل از سانتریفیوژ آب برای تلقیح مستقیم به محیط کشت استفاده شد. در مورد نمونه های رسوب و نمک، پس از تهیه نمونه شاخص، مقدار ۱ گرم از نمونه درون ۹ میلی لیتر آب نمک ۰/۲، ۲، ٤ مولار تلقیح شد. سپس ۱ میلی لیتر از آن به ۱۰۰ میلی لیتر محیط کشت مایع موجود در ارلن ۲۵۰ سی سی تلقیح گردید. تمامی ارلن ها در شیکر انکوباتور با دمای ۳۰ درجه سلیسیوس و دور همزن ۱۲۰ rpm قرار داده شدند. ارلن ها از قبل به منظور حذف هر نوع ماده آلی به مدت ٢٤ ساعت در مایع شستشوی اسیدی قرار داده شده بودند. میزان pH نمونه ها به صورت هفتگی اندازه گیری و با

جدول ۱: اجزای محیط کشت مورد استفاده در مطالعه.

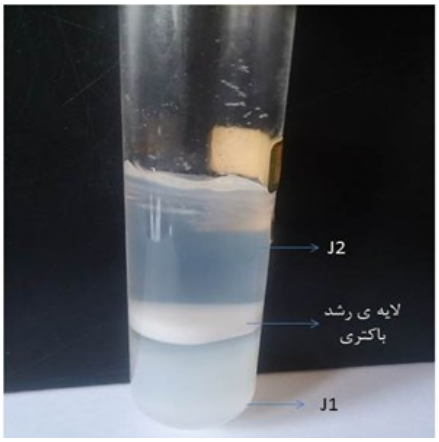
نام محیط کشت	اجزای محیط کشت	مقدار برحسب g/l	pH
$S_{0/2}$ S_2 S_4	K_2HPO_4	۰/۵	۷ -۷/۵
	NH_4Cl	۱	
	$MgCl_2$*	۰/۷	
	$CaCl_2$*	۰/۵	
	$NaHCO_3$*	۰/۸٤	
	KCl	۲	
	Thiosulfate*	۲۰mM	
	NaCl	۱۹۸، ۱۱٦، ۸	
J_1	Thiosulfate	۲۰mM	۸
	Agar	۱۵	
J_2	تمام اجزای محیط کشت S به جز تیوسولفات به همراه آگار (۲ گرم در لیتر)		۷-۷/۵

* موارد ستاره دار به صورت جداگانه اتوکلاو و به محیط اضافه شدند.

Archive of SID

www.SID.ir

$NaHCO_3$ استریل تنظیم شد. پس از گذشت ۸ هفته و با بررسی میکروسکوپی رشد باکتری ها، از این ارلن ها به میزان ۵ میلی لیتر به درون ارلن های واجد محیط کشت تازه تلقیح گردید. پس از سه هفته، از ارلن های سری دوم مجدداً به همین نحو کشت مجدد تهیه شد. این عمل برای نمونه های آب و نمک هر سه هفته ۱ تا ۳ بار، و برای نمونه رسوب هر سه هفته ۱ تا ۸ بار انجام شد. به طور هم زمان از ارلن های سری یک تا سه برای نمونه آب و نمک و ارلن های سری یک تا هشت برای نمونه رسوب به میزان ۱۰۰ میکرولیتر بر روی محیط جامد (محیط های S جدول ۱ به اضافه ۱/۵ درصد آگار) تلقیح شد. از کشت مجدد دوم نمونه های رسوب و آب و نمک با سرنگ استریل به داخل محیط (J_1+J_2) تلقیح انجام گرفت. پس از گذشت ۳ ماه لایه ای از باکتری ها داخل لوله ها مشاهده شد (۱۱). محیط های تلقیح شده در دمای ۳۰ درجه سلسیوس گرماگذاری شدند. کلنی های رشد کرده بر روی محیط جامد در دوره های زمانی ١٤، ٢١ و ٢٨ روزه جداسازی و خالص سازی شدند. به منظور دسترسی به بیشترین میزان تنوع و جداسازی انواع کند رشد، پلیت ها با استفاده از تامین رطوبت در محیط نگهداری و استفاده از پارافیلم دور پلیت ها به مدت ٦ ماه نگهداری شدند و در بازه زمانی ۲ هفته ای بررسی و کلنی های جدید جداسازی شدند. برای جداسازی باکتری ها از محیط دو فاز، پس از مشاهده لایه رشد در لوله حاوی محیط، محتوای لوله ها زیر هود میکروبی و در شرایط سترون خارج شدند



شکل ۱: محیط J و لایه رشد باکتری.

(شکل ۱). لایه رشد که در بخش بالایی نیمه جامد شکل گرفت با پنس استریل به یک لوله درب دار حاوی محیط کشت منتقل و به مدت یک هفته در دمای ۳۰ درجه سلسیوس قرار داده شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از مایع به محیط کشت جامد منتقل گردید. در هر مرحله کلنی های دارای ویژگی های متفاوت ریخت شناسی (شکل، اندازه، رنگ، قوام، حاشیه و برآمدگی سطحی) جداسازی شدند (۱۲).

ج) خالص سازی، نگهداری و نامگذاری سویه ها: به منظور خالص سازی جدایه ها، کشت متوالی از تک کلنی ها انجام شد. کلنی هایی که پس از پنج بار کشت متوالی بر روی محیط های با مشخصات ثابت از نظر واکنش گرم و ریخت شناسی رفتار ثابتی از خود نشان دادند، به عنوان کلنی خالص در نظر گرفته شدند (۱۳).

د) توصیف اولیه سویه ها: در این مطالعه سویه ها بر اساس تعیین صفات اولیه ماکروسکوپی، میکروسکوپی و فیزیولوژیک توصیف شدند. برای مشاهده ویژگی های ماکروسکوپی کلنی، از محیط جامد با ترکیب مورد استفاده برای جداسازی استفاده شد. شکل، ارتفاع، حاشیه، سطح و رنگ کلنی سویه ها مورد توجه قرار گرفت. شکل میکروسکوپی سویه ها توسط میکروسکوپ نوری و بزرگنمایی ۱۰۰۰ مشاهده شد. برای تایید نتایج حاصل از رنگ آمیزی گرم از روش پتاسیم هیدروکسید سه درصد توصیه شده توسط بارون (Baron) استفاده شد (١٤). حرکت سلول با استفاده از روش لام مرطوب و با بزرگنمایی ٤٠٠ میکروسکوپ نوری بررسی گردید. به منظور بررسی فعالیت کاتالازی، از کشت ٢٤ ساعته سویه ها و پراکسید هیدروژن ۳ درصد به عنوان معرف استفاده شد. و تولید حباب به عنوان واکنش مثبت در نظر گرفته شد. برای بررسی فعالیت اکسیدازی از دیسک های آماده اکسیداز استفاده شد (۱۵).

ه) شناسایی مولکولی سویه ها: برای این منظور، ابتدا از سویه ها توده زیستی تهیه شد و پس از استخراج DNA ژنومی سویه ها (١٦)، تکثیر ژن مربوط به زیر واحد کوچک ریبوزومی (*16S rRNA*) انجام شد. این تکثیر با استفاده از پرایمرهای عمومی باکتریایی ٢٧F با توالی

Archive of SID

www.SID.ir

5’-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3’ و پرایمر 1492R با توالی 5’-GGTTACCTTGTTACGACTT-3’ انجام شد (۱۲). واکنش PCR در حجم ۵۰ میکرولیتر شامل ٤ میکرولیتر از هر کدام از پرایمرها (۰/٤ تا ۰/۵ میلی مولار)، آنزیم Taq پلی مراز (۲/۵ واحد در میکرولیتر)، ٤ میکرولیتر dNTPs (۰/٤ میلی مولار از هر نوکلئوتید)، بافر آنزیم (1X)، ۳ میکرولیتر کلرید منیزیم (۰/۵ تا ۲/۵ میلی مولار) و DNA الگوی باکتریایی به میزان مناسب انجام گرفت. در این مطالعه از نمونه فاقد DNA الگو به عنوان کنترل منفی استفاده گردید. واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر SensQuest (آلمان) با شرایط دمایی ۵ دقیقه واسرشت شدن ابتدایی در دمای ۹۵ درجه سلیسیوس و در ادامه ۳۰ چرخه شامل واسرشت شدن در دمای ۹۵ درجه سلیسیوس به مدت ٦۰ ثانیه، اتصال در دمای ٥٦ تا ۵۸ درجه سلیسیوس به مدت ٦۰ ثانیه، گسترش در دمای ۷۲ درجه سلیسیوس به مدت ٦۰ ثانیه و در نهایت گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سلیسیوس به مدت ۷ دقیقه انجام شد. محصول نهایی حاصل از واکنش زنجیره ای پلی مراز توسط خاتمه سنتز DNA به شکل رفت و برگشت توسط شرکت ماکروژن کره جنوبی توالی یابی گردید. نتایج حاصل با استفاده از نرم افزار Chromas Pro2.4.1 ویرایش شد و با استفاده از نرم افزار BLAST با توالی های معتبر ثبت شده در پایگاه داده EzTaxon (۱۷) مقایسه گردید. نزدیک ترین سویه استاندارد مشابه با سویه های مورد بررسی از نظر توالی ژن *16S rRNA* مشخص گردید. به منظور رسم درخت فیلوژنی نیز از نرم افزار MEGA6 استفاده شد.

و) بررسی رشد هتروتروفی سویه های جداسازی شده: برای تشخیص اتوتروف یا هتروتروف بودن باکتری جداسازی شده، آزمون رشد باکتری در محیط پایه معدنی به اضافه ۰/۱ گرم در لیتر عصاره مخمر انجام شد. سویه ها بر روی این محیط کشت داده شدند و تا ۱۰ روز، هر ۲ روز یک بار برای مشاهده رشد بررسی گردیدند (۱۸). سویه های جداسازی شده برای نگهداری موقت به مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران فرستاده شدند.

ز) سنجش توده سلولی به روش کدورت سنجی و رسم منحنی رشد: برای این منظور میزان جذب نوری سوسپانسیون باکتری در طول موج ٦۰۰ نانومتر در برابر محیط کشت تلقیح نشده به عنوان شاهد در دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد. به منظور رسم منحنی رشد سویه های اتوتروف اجباری اکسید کننده گوگرد، محیط S_2 تهیه شد. از غلظت معادل ۰/۵ مک فارلند نمونه ها به میزان ۱ میلی لیتر داخل محیط تازه تلقیح شد. نمونه ها در شیکر انکوباتور با دمای ۳۰ درجه سلیسیوس و دور ۱۵۰rpm قرار داده شدند. ۲٤ ساعت پس از تلقیح، هر ۱۲ ساعت جذب نمونه ها تا ٤ روز خوانده شد. سپس به مدت ٤ روز هر ۸ ساعت یک بار جذب خوانده شد و بدین ترتیب منحنی رشد رسم گردید (۱۹).

یافته ها

در جدول ۲ ویژگی های فیزیکی نمونه های آب، رسوب و نمک در داخل و خارج از غار نمکدان قشم آورده شده است. در این مطالعه مقدار یون های Na^{+}، K^{+}، Mg^{++} و Ca^{++} موجود در نمونه شاخص آب غار به ترتیب ۱۲/۸٤، ۱۱/٦۵، ۰/۱ و ۳/۲٦ گرم در هر لیتر و مقدار یون Fe^{++} ۰/۱۱٦ میلی گرم در لیتر اندازه گیری گردید. بر اساس تفاوت در ویژگی های اولیه از قبیل تفاوت در شکل کلنی و رشد، تعداد ۳۹ جدایه از نمونه ها و محیط های مختلف به دست آمد. بر اساس سرعت رشد، ۵ سویه برای مطالعات بیشتر انتخاب شدند. جدول ۳ ویژگی های ریخت شناسی، فیزیکوشیمیایی و بیوشیمیایی سویه های جدا شده را نشان می دهد.

جدول ۲: مشخصات نمونه های شاخص مناطق نمونه برداری.

منطقه نمونه برداری	نمونه آب	نمونه نمک	نمونه رسوب	دما (درجه سلیسیوس)	درصد شوری	اسیدیته	TDS
خارج غار	√			۲۸	۳۲/۲۹	۷/۳	۲٤/۹
داخل غار	√	√	√	۲۷/۵	۲۸/۹۵	۷/۱	۲۲/۳

Archive of SID
www.SID.ir

بر اساس آنالیزهای فیلوژنتیک این سویه ها به جنس *هالوتیوباسیلوس* (*Halothiobacillus*) تعلق داشتند.

در شکل ۲ درخت فیلوژنتیک سویه های جداسازی شده نشان داده شده است. نتایج حاصل از مقایسه سویه های منتخب از نظر میزان شباهت در توالی ژن *16S rRNA* با سویه های استاندارد ثبت شده در پایگاه داده Eztaxon در جدول ٤ آورده شده است. در نمودار ۱ منحنی رشد پنج سویه منتخب از میان سویه های جداسازی شده رسم شده است. با وجود یکسان بودن جنس و گونه چهار مورد از سویه ها زمان نسل آن ها متفاوت بود.

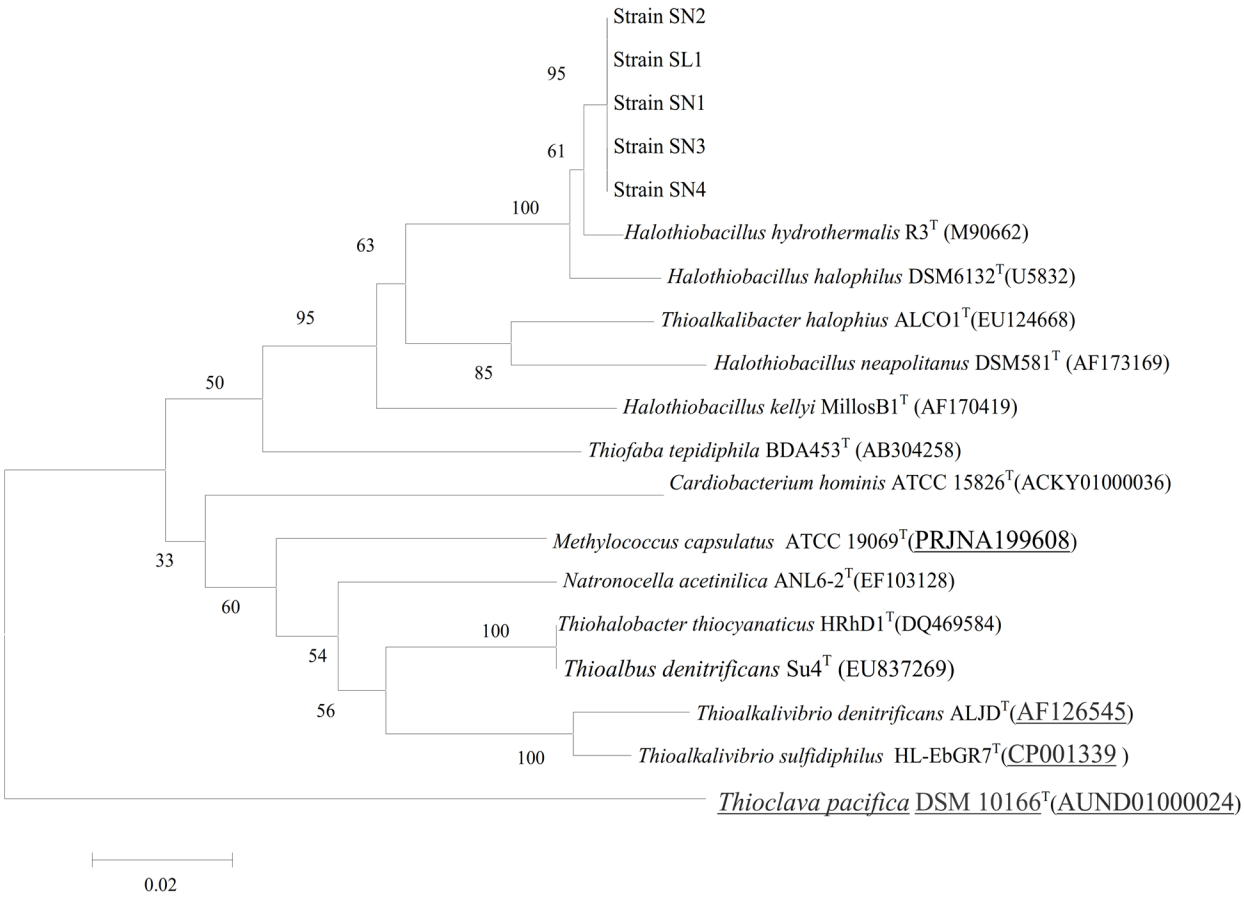
به طور کلی با توجه به شرایط بهینه دما، pH، هوادهی و درصد نمک برای رشد، این سویه ها نیاز به زمان نسبتاً طولانی تری برای رشد در مقایسه با باکتری های دیگر داشتند.

جدول ۳: خصوصیات ریخت شناسی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی سویه های جدا شده از غار نمکدان قشم.

آزمایش شناسایی	SL1	SN4	SN3	SN2	SN1
شکل	باسیل	باسیل	باسیل	باسیل	باسیل
واکنش گرم	–	–	–	–	–
حرکت	+	+	+	+	+
اکسیداز	+	+	–	+	–
کاتالاز	–	–	–	–	+
رشد اتوتروفی	+	+	+	+	+
رشد هتروتروفی	–	–	–	–	–
اسیدیته بهینه	۷/۵	۷/٤	۷/٤	۷/٤	۷/٤
دمای بهینه	۳۵	۳٤	۳٤	۳٤	۳٤

بحث

باکتری های کمولیتوتروف در مقایسه با باکتری های هتروتروف از رشد بسیار کندتری برخوردارند و زمان تقسیم برخی از آن ها به سی روز نیز می رسد (۷). کلنی برخی از این باکتری ها بسیار شفاف و ریز است (۱).



شکل۲: درخت فیلوژنتیک سویه های جداسازی شده برای نمایش روابط فیلوژنتیک با استفاده از روش neighbor joining و ضریب Boot Strap هزار.

www.SID.ir
of SID

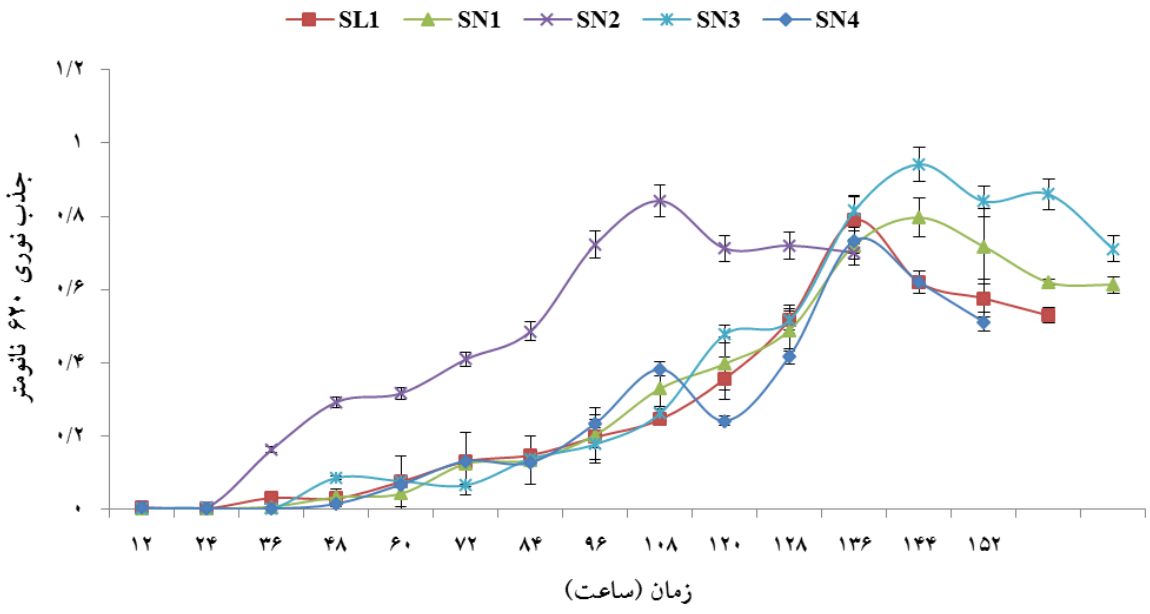
جدول ٤: مقایسه میزان شباهت ژن *16S rRNA* سویه های منتخب با سویه استاندارد.

ردیف	نام سویه منتخب	سویه استاندارد با بیشترین میزان شباهت	درصد شباهت
۱	SN1	*Halothiobacillus hydrothermalis*R3(T) *Halothiobacillus halophilus* DSM6132(T) *Thioalkalibacter halophilus* ALCO1(T)	۹۸/۸ ۹۸/۲ ۹۳/٤
۲	SN2	*Halothiobacillus hydrothermalis*R3(T) *Halothiobacillus halophilus* DSM6132(T) *Thioalkalibacter halophilus* ALCO(T)	۹۹/۲ ۹۸/۸ ۹٤/٤
۳	SN3	*Halothiobacillus hydrothermalis*R3(T) *Halothiobacillus halophilus* DSM6132(T) *Thioalkalibacter halophilus* ALCO(T)	۹۸/۹ ۹۸/٤ ۹٤/۲
۴	SN4	*Halothiobacillus hydrothermalis*R3(T) *Halothiobacilus halophilus* DSM6132(T) *Thioalkalibacter halophilus* ALCO(T)	۹۸/٦ ۹۸/٦ ۹۳/٤
۵	SL1	*Halothiobacillus halophilus* DSM6132(T) *Halothiobacillus hydrothermalis*R3(T) *Thioalkalibacter halophilus* ALCO(T)	۹۸/۸ ۹۸/٦ ۹٤/۸

این مسائل جداسازی و خالص سازی این باکتری ها را بسیار دشوار می سازد. در مراحل جداسازی باکتری های کمولیتوتروف اکسید کننده گوگرد از غار نمکدان قشم مسائل مختلفی مشاهده شد. از این میان می توان به طولانی بودن مراحل غنی سازی اشاره نمود. به طوری که هر بار ۸ هفته به طول انجامید و ۳ بار متوالی این غنی سازی صورت گرفت. در مجموع ٢٤ هفته زمان صرف غنی سازی نمونه ها شد. در مورد نمونه های رسوب این مدت زمان به منظور حذف بار آلی رسوبات مدت زمان بیشتری را به خود اختصاص داد. در ادامه به منظور جداسازی باکتری ها، مقداری از محیط غنی سازی به محیط کشت جامد منتقل گردید.

جداسازی اولیه با توجه به ریز بودن و شفافیت کلنی ها به سختی صورت گرفت. زیرا تمایز کلنی های شفاف از یکدیگر بسیار دشوار بود. در هر مرحله از خالص سازی این مشکلات وجود داشت و با توجه به کند رشد بودن این باکتری ها زمان زیادی صرف خالص سازی شد.

به منظور استخراج DNA ژنومی سویه ها تعداد زیادی پلیت از هر سویه کشت شد. زیرا این باکتری ها زیست توده بسیار اندکی را تولید می نمایند. با توجه به اینکه در آزمایشگاه برای جداسازی شرایط هوازی اعمال شد، بنابراین جداسازی فتوتروف ها دور از انتظار بود. با توجه به شوری ۳۰ درصدی و شرایط نوتروفیل غار نمکدان قشم، جداسازی باکتری های کمولیتوتروف اکسید کننده گوگرد به تعداد کمی از جنس های این گروه محدود گردید. به طور کلی تعداد جنس های هالوفیل و هالوتولرانت باکتری های اکسید کننده گوگرد محدود است (۱). باکتری های لیتوتروف جداسازی شده در این پژوهش در شرایط بهینه زمان تقسیم در حدود ۵ تا ۷ روز دارند. منحنی



نمودار ۱: منحنی رشد رسم شده برای پنج سویه کمولیتوتروف اکسید کننده گوگرد جداشده از غار نمکدان قشم.

www.SID.ir

رشد رسم شده برای پنج سویه جدا شده موید کند رشد بودن این سویه ها است. همانگونه که مشخص شده است جذب هیچ یک از سویه ها در طول موج ٦٢٠ نانومتر به ١ نرسید و این مورد نشان دهنده زیست توده بسیار کمی است که توسط این سویه ها تولید می گردد. هر پنج سویه اتوتروف اجباری، هوازی، مزوفیل و از جنس *هالوتیوباسیلوس* بودند. این جنس جزو رده گاما از شاخه پروتئوباکتری ها هستند (۲۰).

این جنس شامل گستره ای از باکتری های گرم منفی، میله ای و اکسید کننده گوگرد است که می توانند به صورت اتوتروفی رشد نمایند. در سال ۲۰۰۰ این جنس از جنس *تیوباسیلوس* (*Thiobacillus*) جدا شد و به تنهایی به عنوان یک جنس جداگانه در نظر گرفته شد (۲۱). باکتری های *هالوتیوباسیلوس هالوفیلوس* (*Halothiobacillus halophilus*) و *هالوتیوباسیلوس هیدروترمالیس* (*Halothiobacillus hydrothermalis*) از نظر فیزیولوژیکی و فیلوژنتیکی شباهت بسیار زیادی به یکدیگر دارند (۲۱).

با توجه به مصرف کم مواد غذایی توسط این سویه ها و متابولیسم منحصر به فرد کمولیتوتروفی و اکسید کنندگی گوگرد توسط آن ها و در نتیجه پتانسیل های بالقوه بیوتکنولوژیک این باکتری ها، می توان از آن ها در مطالعات کاربردی استفاده نمود (۲۲). به لحاظ جداسازی کمولیتوتروف های اکسید کننده گوگرد تاکنون فعالیت های بسیاری صورت گرفته که از آن جمله می توان به جداسازی هایی که توسط سوروکین (Sorokin) و همکاران صورت گرفته اشاره کرد (۲۲ و ۲۳).

تا کنون گزارشی مبنی بر جداسازی جنس *هالوتیوباسیلوس* از غارها منتشر نگردیده است. حال آنکه این جنس به وفور از محیط های اقیانوسی جداسازی گردیده است (۱۹ و ۲۳). به طور کلی تا کنون تنها چند مورد جداسازی باکتری کمولیتوتروف اکسید کننده گوگرد از غارها گزارش گردیده است. به طوری که جداسازی باکتری های جنس *بگیاتوآ* (*Beggiatoa*)، *تیوتریکس* (*Thiotrix*) و *تیوباسیلوس* (از غار ماویل (Mavile) در شیلی از جمله آن ها می باشد (۵). از این نظر جداسازی جنس *هالوتیوباسیلوس* از یک غار نمکی کاملاً جدید بوده و تا کنون مورد مشابهی برای این کار یافت نشده است. نتایج این مطالعه نشان می دهد که میزان بهینه نمک برای رشد ۵ سویه اتوتروف اجباری حدود ۰/٤ مولار می باشد. در حالی که این سویه ها از محیطی با شوری در حدود ۳ مولار جداسازی شده اند. این امر نشان دهنده تحمل درصد نمکی بالای این سویه ها می باشد که در جداسازی و شناسایی های اولیه این جنس در موارد مشابه گزارش شده است (۲۳).

نتیجه گیری

در این مطالعه سویه های شناسایی شده از غار نمکدان قشم با استفاده از روش های مرسوم وابسته به کشت جداسازی شدند و با استفاده از آنالیز فیلوژنی مبتنی بر توالی یابی ژن *16S rRNA* بررسی شدند. برخلاف مطالعاتی که در غارهای دیگر صورت گرفته بود، سویه های اکسید کننده گوگرد جدا شده از این غار متعلق به جنس *هالوتیوباسیلوس* بودند و از این منظر یافته های پژوهش فوق منحصر به فرد می باشد. این جنس تا کنون بیشتر در مناطق اقیانوسی جداسازی شده است.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران به دلیل حمایت های مالی از این پروژه کمال امتنان را دارند.

References

1. Muyzer G, Rosenberg E, De Long EF, Lory S, Stackebrandt E, Thompson F. The prokaryotes 4th ed. Berlin. Springer Berlin Heidelberg. 2013
2. Luo J, Tian G, Lin W. Enrichment, isolation and identification of sulfur-oxidizing bacteria from sulfide removing bioreactor. J Environ Sci. 2013; 25(7): 1393-1399.

Archive of SID

www.SID.ir

3. Muyzer G, Dynamics E. 15 colorless sulfur bacteria. In: Muyzer G, Rosenberg E, De Long EF, Lory S, Stackebrandt E, Thompson F. The Prokaryotes.4th ed. Berlin. Springer Berlin Heidelberg. 2013: 555-589.

4. Vreeland RH. Advances in understanding the biology of halophilic microorganisms. 1st ed. Pennsylvania. Springer. 2012

5. Kumaresan D, Wischer D, Stephenson J, Hillebrand A, Murrell JC. Microbiology of Movile cave a chemolithoautotrophic ecosystem. Geomicrobiol J. 2014; 31(11): 37-41.

6. Sorokin DY, Kuenen JG, Muyzer G. The microbial sulfur cycle at extremely haloalkaline conditions of soda lakes. Front Microbiol. 2011; 21(3): 44-59.

7. Theil V. Chemolithotrophy.1st ed. Gronigen. Springer Netherlands. 2010.

8. Schippers A, Breuker A, Blazejak A, Bosecker K, Kock D, Wright TL. The biogeochemistry and microbiology of sulfidic mine waste and bioleaching dumps and heaps, and novel Fe(II)-oxidizing bacteria. Hydrometallurgy. 2010; 104(3-4): 342-350.

9. Marlen B, Jedlicki, Holmes D. Identification of a gene cluster for the formation of extracellular polysaccharide precursors in the chemolithoautotroph *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Appl Environ Microbiol. 2004; 71(6): 902-909.

10. Nelson D, Jannasch H. Chemoautotrophic growth of marine *Beggiatoa* in sulfide-gradient cultures. Arch Microbiol. 1983; 136(4): 262-269.

11. Sorokin DY, Tiourova TP, Lysenko A, Muyaer G. Diversity of culturable sulfur-oxidizing bacteria in hypersaline habitats. Microbiol. 2006; 152(10): 3013-3023.

12. Friedrich CG. Physiology and genetics of sulfur-oxidizing bacteria. Adv Microbiol Physiol. 1998; 39(2): 235-289.

13. Sorokin DY, Kuenen JG. Haloalkaliphilic sulfur oxidizing bacteria in soda lakes. FEMS Microbiol Rev. 2005; 29(4): 685-702.

14. Auld RR, Myre M, Mykytczuk NCS, Leduc LG, Merritt TJS. Characterization of the microbial acid mine drainage microbial community using culturing and direct sequencing techniques. J Microbiol Methods. 2013; 93(2): 108-115.

15. Park BJ, Park SJ, Yoon DN, Schouten S, Damsté JSS, Rhee SK. Cultivation of autotrophic ammonia-oxidizing archaea from marine sediments in co-culture with sulfur-oxidizing bacteria. Appl Environ Microbiol. 2010; 76(22): 7575-7587.

16. Kodama Y, Watanabe K. *Sulfuricurvum kujiense* gen. nov., sp. nov., a facultatively anaerobic, chemolithoautotrophic, sulfur-oxidizing bacterium isolated from an underground crude-oil storage cavity. Int J Syst Evol Microbiol. 2004; 54(6): 2297-2300.

17. Makhdoumi-Kakhki A, Amoozegar MA, Kazemi B, Pašić L, Ventosa A. Prokaryotic diversity in Aran-Bidgol salt lake, the largest hypersaline playa in Iran. Microbes Environ. 2012; 27(1): 87-93.

18. Kuenen JG, Beudeker RF, Shively JM, Codd GA. Microbiology of thiobacilli and other sulphur-oxidizing autotrophs, mixotrophs, and heterotrophs. Philos Trans R Soc B Biol Sci.

Archive of SID

www.SID.ir

2010; 298(1093): 473-497.

19. Sievert SM, Heidorn T, Kuever J. *Halothiobacillus kellyi* sp . nov ., a mesophilic , obligately chemolithoautotrophic, sulfur-oxidizing bacterium isolated from a shallow-water hydrothermal vent in the Aegean Sea, Halothiobacillus. Int J Syst Evol Microbiol. 2000; 3: 1229-1237.

20. Chen Y, Wu L, Boden R, Hillebrand A, Kumaresan D. Life without light : microbial diversity and evidence of sulfur- and ammonium-based chemolithotrophy in Movile Cave. Int Soc Microb Ecol. 2009; 3(9): 1093-1104.

21. Kelly DP, Wood AP. Reclassification of some species of *Thiobacillus acidithiobacillus* gen. nov ., Halothiobacillus. Int J Syst Evol Microbiol. 2000; 50: 511-516.

22. Sorokin DY, Lysenko AM, Mityushina LL, Tourova TP, Jones BE, Rainey FA. *Thioalkalimicrobium sibericum* sp . nov ., and *Thioalkalivibrio versutus* gen . nov ., sp . nov ., *Thioalkalivibrio nitratis* sp . nov . and *Thioalkalivibrio denitrificans* sp . nov ., novel obligately alkaliphilic and obligately chemolithoautotroph. Int J Syst Evol Microbiol. 2001; 51: 565-580.

23. Foti M, Sorokin DY, Lomans B, Mussman M, Zacharova EE, Pimenov NV, Kuenen JG, Muyzer G. Diversity, activity and abundance of sulfate-reducing bacteria in saline and hypersaline Soda Lakes. Appl Environ Microbiol. 2007; 73(7): 2093-2100.

24. Vidyalakshmi R, Paranthaman R, Bhakyaraj R. Sulfur oxidizing bacteria and pulse nutrition. World J Agr Sci. 2009; 5(3): 270-278.

Archive of SID

www.SID.ir

Journal of Microbial World
Volume 10, No. 2, June 2017

Original Article

Isolation and identification of sulfur-oxidizing chemolithotrophic bacteria from Qeshm salt cave

Nina Zamani[1], Mohammad Ali Amoozegar[2], Maliheh Mehrshad[3], Mahboobeh Darabi[1], Seyed Abolhasan Shahzadeh Fazeli[4], Mahmood Shavandi[5]

[1]M.Sc. student, University of Tehran, Tehran, Iran. [2]Professor, University of Tehran, Tehran, Iran. [3]Ph.D. student, University of Tehran, Tehran, Iran. [4]Associate Professor, Iranian Biological Resource Centre (IBRC), ACECR Tehran, Iran. [5]Assistant Professor, Microbiology and Biotechnology Group, Research Institute of Petroleum Industry (RIPI), Tehran, Iran.

Abstract

Background & Objectives: Chemolithotrophic bacteria have an important role in the biogeochemical cycle in natural ecosystems. For instance, the oxidative part of the sulfur cycle is handled by sulfur-oxidizing bacteria. Moreover, these bacteria have an important role in various industrial fields including bioleaching. The aim of this study was isolation and identification of chemolithotrophic sulfur-oxidizing bacteria from the Namakdan cave Qeshm, Iran.

Materials & Methods: In this cross-sectional study, after sampling from the Namakdan cave in Qeshm and transferring the samples (salt, water, and sediment) to the lab, sample inoculation into enrichment media was carried out with three concentrations of NaCl. Following pH and temperature measurement, samples were transferred into solid and two-phase media. Further characterization of the isolates was performed using *16S rRNA* gene amplification. Further analysis was performed to characterize the autotrophic or heterotrophic features of the isolates. Biomass was examined using classical turbidity method.

Results: Totally, 39 strains were isolated from samples, based on differences in primary features such as colony form or growth rate. A total of 5 isolates were selected for further studies. Phylogenetic analysis showed that these isolates belong to *Halothiobacillus* genus.

Conclusion: Due to 30% salinity and neutral pH of this cave, isolation of chemolithotrophic sulfur-oxidizing bacteria was limited to few genera. Chemolithotrophic bacteria have longer growth time in comparison to heterotrophic ones, increasing generation time to 30 days.

Keywords: Chemolithotroph, Sulfur-oxidizing, Halophilic bacteria, Namakdan cave.

Correspondence to: Mohammad Ali Amoozegar

Tel: +98 2161113559

E-mail: amoozegar@ut.ac.ir

Journal of Microbial World 2017, 10(2): 134-144.

Archive of SID

www.SID.ir