

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 مجعلی: استادیار میکروبیولوژی 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 آریین: دانشیار زمین‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، تهران، ایران، maa1361@yahoo.com
مهناز دیانسایی: کارشناس ارشد 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: کارشناس ارشد میکروبیولوژی و بیوتکنولوژی، پژوهشگاه صنعت نفت، تهران، ایران، foroughianmf@ripi.ir

چکیده

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

مواد و روش‌ها: به منظور 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 ۲۲ سویه منتخب، ۱۷ سویه هوازی و ۵ سویه بی‌هوازی اختیاری بودند. از بین ۱۷ سویه هوازی، ۱۱ سویه با موفقیت توالی‌یابی شدند. ۵ نمونه 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 ۰ تا ۱۵ درصد 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؛ به خصوص در مورد 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.

* نویسنده مسئول مکاتبات

مقدمه

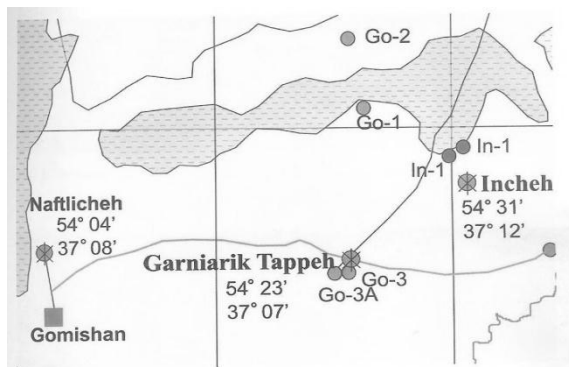
به دلیل ارتباط بین گل‌فشان‌ها با ذخایر نفت و گاز، طی چند دهه اخیر شرکت‌های تحقیقاتی نفت جهت دستیابی به مخازن هیدروکربنی در اعماق اقیانوس‌ها و دریاها در پی یافتن محل فعالیت این پدیده‌های زمین‌شناسی بوده‌اند. کاوش متخصصان شرکت‌های نفتی کشورهای حاشیه دریای خزر و دریای سیاه در بستر دریا، بیانگر این ادعاست.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

تنوع میکروبی در گل‌فشان‌هایی که تاکنون شناخته شده‌اند، بیشتر از نوع بی‌هوازی (۱-۳) و کمتر از نوع هوازی (۱) است. متابولیسم میکروبی در نمونه‌های به دست آمده از گل‌فشان‌ها از نوع متانوتروف (۲) یا احیاکننده سولفات (۳) است. حدود ۸۶ درصد گازهای خروجی گل‌فشان‌ها متان و به مقدار کمتر دی‌اکسید کربن و نیتروژن است. میکروب‌های موجود در این مکان‌ها از سوبستراهای کربنی که سیال هیدروکربنی هستند، به شکل تخمیری استفاده می‌کنند (۴). بررسی رسوب گل‌فشان‌های فعال سه فیلو تیپ پروتئوباکتری‌ها، اکتینوباکتری‌ها و فوزوباکتری‌ها را نشان داده است. پس از مقایسه داده‌ها در بانک ژن NCBI این نتایج حاصل شد: باکتری‌های غیرقابل کشت، باکتری‌های ناشناخته، *Clostridium thiosulfatireducens*، *Pseudomonas aeruginosa* شناسایی شدند. کلوستریدیوم‌ها با تشکیل سولفات رابطه داشتند؛ در مقالات متعدد اعلام شده است که سویه‌های جدا شده از گل‌فشان در تولید سوخت‌های میکروبی کاربرد دارند (۵). با هدف جداسازی باکتری‌های

احیاکننده سولفات، نمونه‌های برگرفته از گل‌فشان رشته کوه آبنابین شمالی^۱ واقع در ایتالیا در محیط غنی کشت داده شدند. میکروب‌های جداسازی شده براساس *Desulfovibrio psychrotolerans* شامل *16S rRNA* و *Clostridium thiosulfatireducens* است که ممکن است پروتئین‌هایی با منشأ میکروبی را تخمیر کنند (۵-۷). گونه متعلق به جنس کلوستریدیوم که از این گل‌فشان جدا شده، رکسارسون یا آرسنیک‌اسید را طی فرایند تغییر و تبدیل زیستی^۲ به شکل آرسنیک معدنی آزاد می‌کند (۸). به طور کلی هدف از انجام پژوهش حاضر بررسی تنوع میکروبی به خصوص 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 مطالعه مشابهی انجام نشده است.

مواد و روش‌ها

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



شکل ۱- موقعیت جغرافیایی سه گل‌فشان بررسی شده در حاشیه

دریای خزر

تهیه شده طبق دستورالعمل استاندارد کشت باکتری‌های بی‌هوازی استفاده شد. برای تهیه 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 به مدت 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 بی‌هوازی اختیاری 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 خالص شده 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 جدا شده در محیط کشت LB در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، به مدت ۱۸ ساعت نگهداری شد. سپس نمونه مورد نظر به لوله‌های اپندورف ۲ میلی‌لیتری انتقال داده شد و برای ۲ دقیقه سانتریفیوژ (۱۳۰۰۰ rpm) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد شد. سپس مایع رویی دور ریخته شد و این کار تا زمان

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 منطقه نمونه‌برداری در گمیشان استان گلستان به آزمایشگاه محمودیه تهران منتقل شدند. برای انتقال نمونه‌های بی‌هوازی از ظروف خاص رشد بی‌هوازی حاوی گازپک^۳ استفاده شد.

کشت نمونه‌ها و جداسازی باکتری‌ها: به‌منظور

به‌دست آوردن میکروب‌های متنوع هوازی و بی‌هوازی اختیاری موجود در گل‌فشان، لازم است از انواع مناسب محیط‌های کشت میکروبی با در نظر گرفتن 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 گرم 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، دکربو کسیلاز، KOH، تخمیر مواد قندی، هیدرولیز نشاسته، هیدرولیز کازئین، محیط کشت OF، محیط آبگوشت ۷ درصد نمک، محیط TSI و محیط سیمون سترات 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

ویرایش و در فرمت FASTA ذخیره شد و به کمک نرم‌افزار BLAST در پایگاه داده NCBI، با سایر داده‌های مندرج در GenBank مقایسه و درصد تشابه سویه‌های به دست آمده با انواع شناخته شده آن‌ها تعیین شد و در پایان تحلیل فیلوژنتیک سویه‌ها با استفاده از نرم‌افزار MEGA (ویرایش چهارم) و درخت فیلوژنتیک با الگوریتم neighbor-joining رسم شد.

شناسایی مولکولی باکتری‌های بی‌هوازی: توده سلولی در محیط کشت حاوی پودر جگر و تیوگلیکولات براث به وسیله سانتریفیوژ از محیط کشت مایع جدا شد و DNA ژنومی مشابه روش‌های

استفاده شده برای باکتری‌های هوازی خارج شد. برای نمونه‌های بی‌هوازی ۲ پرایمر طراحی شد. براین اساس سویه‌هایی که با پرایمر A واکنش تکثیری داشتند با مشخصه akh.1-3 و نمونه‌هایی که با پرایمر B تکثیر یافتند با مشخصه akh.4,5 نام گذاری شدند.

به منظور تکثیر ژن *16S rRNA* با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز بافر با غلظت 1X در ترکیب نهایی $MgCl_2$ با غلظت ۱/۵mM، dNTPs ۲۰۰ میکرومول، پرایمرهای رفت و برگشت (D1) هر کدام به مقدار ۵ فمتومول، DNA ژنومی ۵ میکرولیتر، آنزیم DNATaq پلیمرز به میزان ۱ میکرولیتر استفاده 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 پلیمرز نمونه‌های بی‌هوازی، با واسرشت اولیه دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه و ۳۰ چرخه تکرار شونده شامل واسرشت به دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه، اتصال با

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

به منظور تکثیر ژن *16S rRNA* در ۱۷ سویه منتخب هوازی از پرایمرهای عمومی تهیه شده از شرکت روبین طب گستر، به ترتیب زیر برای انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمرز 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'

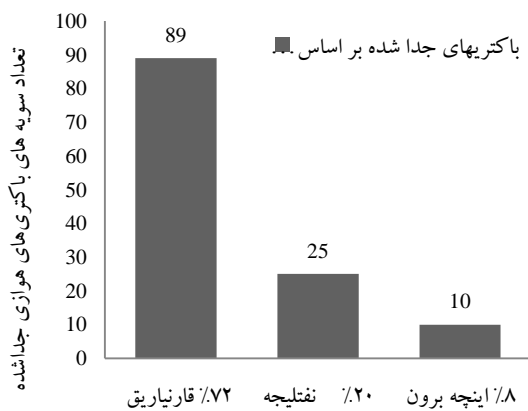
واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر انجام شد. به منظور تکثیر ژن *16S rRNA* با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز آب دوبار تقطیر استریل (۱۸/۳ میکرولیتر)، بافر با غلظت ۲/۵)IX (میکرولیتر)، dNTPs (۱ میکرولیتر)، پرایمرهای رفت و برگشت هر کدام به مقدار ۱ میکرولیتر، DNA ژنومی (۱ میکرولیتر)، آنزیم DNATaq پلی‌مرز (۰/۲ میکرولیتر) استفاده شد.

مراحل انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمرز برای واسرشت اولیه دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه و ۳۰ چرخه تکرار شونده شامل واسرشت با دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه، اتصال با دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد و زمان ۳۰ ثانیه و سنتز با دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و زمان ۶۰ ثانیه و پس از پایان ۳۰ چرخه برای سنتز نهایی دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه تنظیم شد.

پس از خالص‌سازی محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمرز، محصول نهایی توسط شرکت کیاژن توالی‌یابی شد. نتایج توالی‌یابی با استفاده از نرم‌افزار Chromas Pro

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 فیزیکی‌وشیمیایی گل‌فشان‌ها است. اکثر کلنی‌های به‌دست آمده به‌رنگ سفید کرم و یا حتی بی‌رنگ بودند. همچنین در میان سویه‌های کروی‌شکل، کلنی‌هایی به‌رنگ زرد و نارنجی مشاهده شد. از نکات قابل‌توجه رشد سریع اکثر کلنی‌ها به‌مدت ۴۸-۲۴ ساعت بود. در محیط‌های مک‌کانکی آگار و ENDO Agar هیچ‌گونه کلنی ظاهر نشد. در محیط سابورود کستروز آگار 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. مجموع، ۱۲۷ سویه باکتری از نمونه‌های هوازی جدا شد. بیشترین تعداد باکتری‌های هوازی از منطقه گل‌فشان قارنیاریتی جدا شد که معادل ۸۹ سویه بود و حدود ۷۲ درصد کل جدایه‌ها را شامل می‌شود. در شکل ۲ نمودار مقایسه‌ای تعداد باکتری‌های هوازی جداشده از گل‌فشان‌ها رسم شده است.



شکل ۲- مقایسه تعداد سویه باکتری هوازی جداشده از ۳ گل‌فشان و ذکر نسبت آن‌ها (%).

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 پلیمرز در پلاسمید pTZ57RT/A کلون شد و کلونی‌های سفید حاوی DNA خارجی روی پلیت حاوی IPTG و X-GAL انتخاب و کتابخانه ژنی برای ژن *16S rRNA* ساخته شد. سپس از کتابخانه موجود چند کلون انتخاب شد و پس از تأیید حضور قطعه خارجی توسط واکنش زنجیره‌ای پلیمرز 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 داده 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 داده 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 شیمی‌تر و به‌کمک دستگاه ICP-OES (پلاسمای جفت‌شده القایی نشرنوری) اقدام شد.

عدد (۳۷ درصد) بیشترین فراوانی را در میان جدایه‌ها دارند. از نظر واکنش کاتالاز اکثر باسیل‌های گرم‌مثبت و کوکوس‌های جداشده، کاتالاز مثبت و اکسیداز مثبت (بیشتر در باسیلوس‌ها) بودند.

بر اساس ویژگی‌های فنوتیپی، جدایه‌های بی‌هوازی به چندین گروه تقسیم شدند. با توجه به آزمایش‌های بیوشیمیایی از بین سویه‌های گرم‌منفی اکثر جنس‌های *Sodomonas*، *Salmoula* و *Sitroba* و نیز *Aerobacter* مشاهده شد و از بین کوکوس‌ها از استافیلوکوک‌ها بیشتر نمونه‌ها مربوط به *Staphylococcus aureus* و از استرپتوکوک‌ها بیشتر نمونه‌ها مربوط به *Streptococcus* بود. ویژگی‌های ریخت‌شناختی، فیزیولوژیک و بیوشیمیایی سویه‌های منتخب در جدول‌های ۱ و ۲ نشان داده شده است.

از میان جدایه‌های به دست آمده از محیط‌های کشت، تفکیک جدایه‌ها بر اساس رنگ آمیزی گرم و مشاهده لام میکروسکوپی نشان داد که گل‌فشان *Farinaria* دارای فراوانی باکتریایی بیشتری در میان سایر مناطق گل‌فشانی است.

تمامی جدایه‌ها از نظر شکل و ویژگی‌های کلنی، واکنش گرم و شکل و آرایش میکروسکوپی سلول، شکل و موقعیت اسپور، حرکت، واکنش کاتالاز و اکسیداز بررسی شدند. در پایان بررسی لام و مشاهده واکنش ۳٪ KOH برای جدایه‌ها نشان داد که درصد فراوانی جدایه‌ها به این ترتیب است: باسیل‌های گرم‌مثبت ۴۵ درصد، باسیل‌های گرم‌منفی ۳۶ درصد و کوکوس‌های گرم‌مثبت ۱۹ درصد. همچنین مشاهده لام نشان داد که باسیل‌های گرم‌مثبت اسپوردار با تعداد ۴۶

جدول ۱- خصوصیات ظاهری ۱۷ سویه باکتری‌های هوازی جداشده

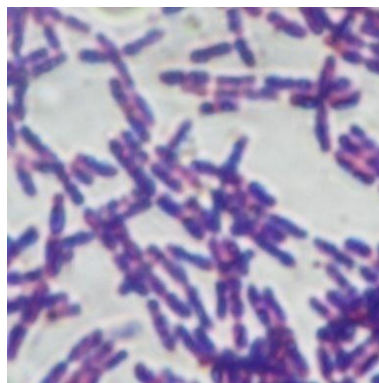
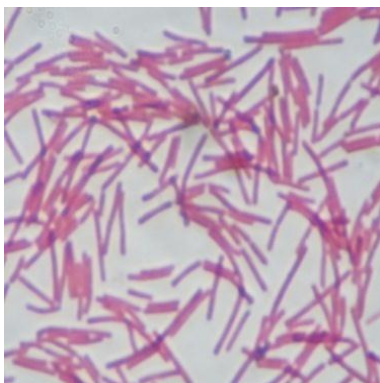
ردیف	سویه	شکل سلول	رنگ کلنی	رنگ آمیزی گرم	KOH (3%)	کاتالاز	اکسیداز	اسپور
۱	B1a	باسیل کوتاه	شیری	+	-	+	+	+
۲	B3c	باسیل گوانول‌دار	کرمی	+	-	-	+	+
۳	B5a	باسیل	کرمی	+	-	+	+	+
۴	B6a	باسیل	کرمی	+	-	+	+	+
۵	B8a	باسیل	کرمی	+	-	+	+	+
۶	B9a	باسیل	کرمی	+	-	+	+	+
۷	B10a	باسیل	کرمی	+	-	+	+	+
۸	B12a	باسیل	بی رنگ	+	-	+	-	+
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 رشته‌ای	کرمی	+	-	+	-	+
۱۶	B25b	باسیل	کرمی	+	-	-	+	+
۱۷	B31b	کوکوباسیل	سفید	+	-	+	+	-

a: نمونه گل‌فشان *Farinaria*؛ b: نمونه گل‌فشان *Neftlijeh*؛ c: نمونه گل‌فشان *Yinche* برون

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

ردیف	سویه	آنزیم آمیلاز	آنزیم کازیناز	آنزیم لستیناز	Urea	VP	MR	سیترات	NaCl 7%	نترات	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: نمونه گل‌فشان قارنباریتی؛ b: نمونه گل‌فشان نفتلیجه؛ c: نمونه گل‌فشان / اینچه‌برون



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

باکتری‌های بی‌هوازی اختیاری: نمونه‌های

بی‌هوازی اختیاری در محیط‌های حاوی پودر جگر و تیوگلیکولات برات 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. به‌همین دلیل نمونه‌های کشت‌شده در محیط تیوگلیکولات برات 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 موردنظر رسم شد.

مشاهدات میکروسکوپی: برای بررسی شکل‌های

باکتریایی پس از رنگ‌آمیزی گرم نمونه‌ها از طریق میکروسکوپ نوری مشاهده شدند که در شکل ۳ 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 سویه بی‌هوازی اختیاری شناسایی شد. جدول ۴ میزان شباهت هر سویه با نزدیک‌ترین باکتری شناخته‌شده را نشان می‌دهد.

جدول ۳- میزان شباهت سویه‌های منتخب هوازی با نزدیک‌ترین گونهٔ ثبت‌شده در پایگاه NCBI

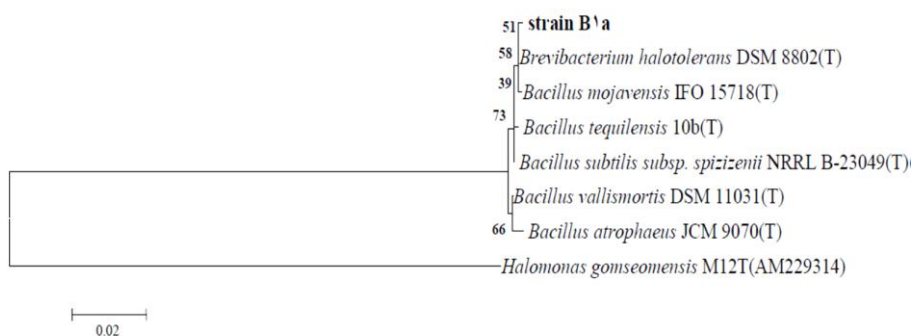
ردیف	نام سویه	نزدیک‌ترین سویه	درصد شباهت	شماره دستیابی نزدیک‌ترین سویه
۱	B1a	<i>Brevibacterium halotolerans</i> DSM8802	99%	AM747812.1
۲	B3c	<i>Bacillus</i> sp. B2005	99%	JX266373.1
۳	B8a	<i>Bacillus</i> sp. A2095	100%	JX266343.1
۴	B12a	<i>Bacillus oceanisediminis</i> CCMM B618	100%	JN208067.1
۵	B16a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

جدول ۴- میزان شباهت سویه‌های بی‌هوازی با نزدیک‌ترین گونهٔ ثبت‌شده در پایگاه NCBI

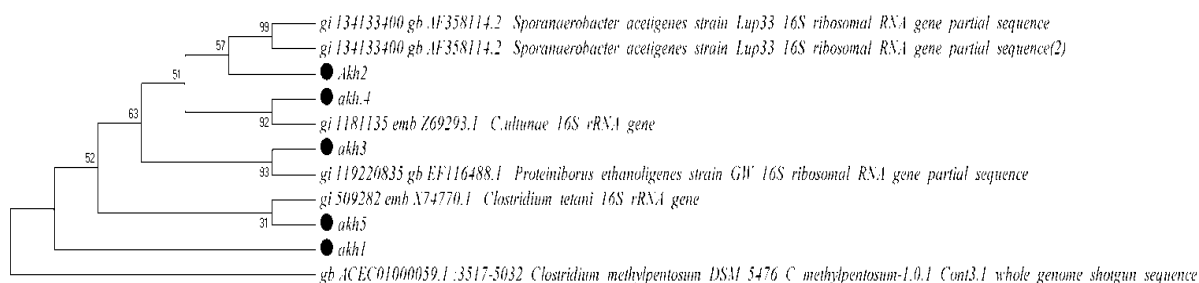
ردیف	نام سویه	نزدیک‌ترین سویه	درصد شباهت
۱	akh1	<i>Bacillus niacini</i>	99.61%
۲	akh2	<i>Clostridium bifermentans</i>	99.74%
۳	akh3	<i>Clostridium ultunense</i>	94.9%
۴	akh4	<i>Proteiniborus ethanolicus</i>	95.7%
۵	akh5	<i>Clostridium methylpentosum</i>	91.14%

از بین سویه‌های بی‌هوازی اختیاری هر ۵ سویه توالی‌یابی 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 بررسی شده سه گل‌فشان، ترکیبات آن‌ها از نظر کاتیون‌ها و آنیون‌ها آنالیز عنصری انجام شد که نتایج این بررسی در جدول ۴ آورده شده است.

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



شکل ۴- درخت فیلوژنتیکی سویه *Bla*



شکل ۵- درخت فیلوژنتیکی مربوط به ۵ سویه بی‌هوازی اختیاری

جدول ۴- ترکیبات موجود در سه گل‌فشان

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

بحث و نتیجه‌گیری

گل فشان‌ها حفره‌های مخروطی شکل به عمق ۱ تا ۲ متر هستند که حاوی مخلوطی از آب داغ و رسوبات هستند. به دلیل همراه داشتن گازهای آتش‌فشانی و آب جوشان به صورت فواره به هوا پرتاب می‌شوند (۹). از دیدگاه میکروبیولوژی گل فشان‌ها به دلیل محتویات و شرایط خاص به عنوان مناطق سخت در نظر گرفته می‌شوند.

با توجه به اینکه تاکنون گل فشان‌ها از دیدگاه میکروبی در ایران بررسی نشده‌اند، این پژوهش می‌تواند نقطه‌آغازی در این زمینه باشد. در پژوهش حاضر مانند مطالعه‌ای که به منظور بررسی میکروارگانیسم‌های چشمه‌های اردبیل انجام شده است از روش‌های رایج ریخت‌شناسی، فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و روش فیلوژنتیکی *16S rRNA* استفاده شد (۱۰). مقایسه 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 حاصل شده انواع باکتری‌های جدا شده اغلب از گروه پروتوباکتری‌ها و فیرمیکوت‌ها است. نکته قابل توجه در این مطالعه این است که اکثر نمونه‌ها غیرقابل کشت بودند و تنها با روش‌های مولکولی قابل تشخیص هستند (۱۱). براساس نتایج مولکولی، حضور کلستریدیوم‌ها در گل فشان‌های جنوب شرقی دریای خزر اثبات شد که با نتایج حاصل از بررسی گل فشان‌های /پنپاین در ایتالیا و کوه‌های هیمالیا مشابهت داشت (۵، ۸، ۱۲ و ۱۳). علاوه بر این، گل فشان‌ها از نظر میکروارگانیسم‌های بی‌هوازی مثل متانوتروف‌ها و احیاکننده‌گوگرد 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 جدا شده در محیط صفر تا ۱۵ درصد نمک و دمای ۴ تا ۴۵ درجه سانتی‌گراد در مدت ۴۸ ساعت رشد کردند. مشابه با نتایج به دست آمده از گل فشان دریاچه بایکال اکثر سویه‌ها غیرقابل کشت 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 به دست آمده در سه گل فشان با استفاده از روش ICP-OES (پلاسمای جفت‌شده القایی نشرنوری) نشان داد علاوه بر آگاهی از محتویات معدنی محیط می‌توان با توجه به حضور این ترکیبات، محیط کشت میکروبی مناسب میکروارگانیسم‌های گل فشان را تهیه کرد. با توجه به فعالیت بالای آنزیمی سویه‌های جدا شده از گل فشان‌ها یکی از مهم‌ترین نتایج آنالیز عنصری علاوه بر تهیه محیط کشت، به دست آوردن محیطی مناسب برای ایجاد فعالیت آنزیمی این باکتری‌ها است. براین اساس 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 گل فشان‌های متعدد در ایران تاکنون هیچ پژوهش میکروبی روی این محیط‌های با شرایط سخت انجام نشده است و این مطالعه می‌تواند نقطه‌آغازی 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.

- (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) Nauhaus K, Boetius A, Krüger M & Widdel F. 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. *Lecture Notes 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 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-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 *Clostridium* species. *Environmental Science & Technology*. 2007; 41(3): 818-823.

¹- Northern Apennines

²- Biotransformation

³- GasPak

⁴- Molecular Biological System Transfer (MBST)

