مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی - مولکولی
دوره ششم، شماره بیست و سوم - تابستان ۱۳۹۵

Research Article
مقاله تحقیقی

دسولفوتوماکولوم، یک باکتری بی هوازی، گرمادوست و احیاکننده سولفات، جداشده از چشمه آب گرم معدنی ساری سو در استان اردبیل

سرور عالی پناه[۱]، میترا السادات طباطبائی[۲*] ، نازیلا ارباب سلیمانی [۳]

۱- گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات،تهران ، ایران

۲- گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران مرکزی ،تهران ، ایران

۳- گروه میکروبیولوژی ، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد دامغان، دامغان، ایران

چکیده

زمینه و هدف: از آن جاکه مطالعه های زیادی روی باکتری های سخت رشد بی هوازی گرمادوست احیاکننده سولفات در چشمه های گرم استان اردبیل صورت نگرفته است، در این تحقیق به بررسی احتمال حضور این باکتری در ساری سو پرداخته شد.

مواد و روش ها: در این تحقیق از چشمه گرم ساری سو در شرایط بی هوازی نمونه گیری انجام شد. غنی سازی، جداسازی و خالص و شناسایی اولیه باکتری با آزمون های بیوشیمیایی متداول انجام شد و به منظور تایید، شناسایی مولکولی انجام شد.

یافته ها: نتایج حاصل از آزمون ها نشان داد که چشمه ی مورد مطالعه دارای باکتری های احیاکننده ی سولفات به صورت گرم مثبت، میله ای، متحرک و دارای اندوسپور بودند. این باکتری ها حاوی پیگمان دسولفوویریدین نبودند.

نتیجه گیری: یافته های این تحقیق منجربه تایید وجود باکتری های احیاکننده سولفات بومی ایران از نوع دسولفوتوماکولوم در چشمه گرم ساری سو بود. تا پیش از این هیچ منبعی حاکی از وجود این نوع باکتری در چشمه های گرم ایران نبوده است.

واژه های کلیدی: دسولفوتوماکولوم، چشمه های آب گرم، باکتری های گرمادوست احیاکننده سولفات، باکتری های بی هوازی

مقدمه

چشمه های آب گرم علی رغم داشتن شرایط دشوار برای حیات از جمله دمای بالا، غلظت نمک بالا، pH قلیایی یا اسیدی دارای شرایط زندگی بوده و انواعی از میکروب ها درون آن ها در حال زیست هستند.

زیست بوم استان اردبیل و آب گرم های آن منحصر به فرد بوده و تاکنون مطالعه های کمی بر روی آن ها صورت گرفته است. شرایط چشمه منحصربه فرد بوده چرا که شرایط زمین شناختی و عناصر موجود در اعماق زمین در جاهای مختلف دنیا متفاوت است بنابراین مطالعه برروی آن جدید و جالب توجه است.

از طرفی چون باکتری های احیاکننده سولفات در شرایط دشوار (بی هوازی مطلق، دمای بالای و...) رشد می کنند کار برروی آن ها دشوار بوده و نیازمند وقت و زمان و هزینه ی بیش تری است که باعث شده پژوهش های کمتری در این زمینه صورت گیرد.

بررسی آب های معدنی ایران از نیمه دوم قرن نوزدهم شروع شده است. این مطالعه هایی که توسط سیاحان و هیأت های علمی خارجی در ایران انجام گرفته بدین صورت بوده که آن ها مقداری از آب چشمه ها را به خارج از کشور برده و پس از مدت زیادی که از نمونه برداری آن گذشته مورد آزمایش قرار داده اند. (۵) از سال ۱۳۰۶ شمسی بررسی آب های معدنی ایران به طور علمی شروع شد و در سال ۱۳۲۸ به موجب طرحی توسط سازمان برنامه، مطالعه ی آب های معدنی محلات و اردبیل به مرحله اجرا درآمد. (۵)

برای چشمه آب گرم تعاریف مختلفی ارائه شده است که تقریبا هیچ کدام از آن ها تعریف کامل و جامعی نبوده و دارای اشکال هایی است. درویش زاده در کتاب زمین شناسی ایران چشمه آب گرم را این گونه تعریف کرده است: «هنگامی که درجه حرارت آب چشمه ای لااقل در حدود ۵ تا ۶ درجه سلسیوس گراد از درجه حرارت متوسط سالیانه هوای محیط یک منطقه بیش تر باشد، چشمه مزبور را چشمه ی آب گرم می گویند». (۴) آب

نویسنده مسئول :
دانشگاه آزاد اسلامی، واحدتهران - مرکزی، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی
پست الکترونیکی: Mit.Tabatabaee@iauctb.ac.ir
تاریخ دریافت: ۹۴/۰۵/۲۰
تاریخ پذیرش: ۹۴/۰۷/۲۱

معدنی در کشورهای مختلف جهان و در مقاله های ارائه شده دارای تعریف های مختلفی می باشد. ولی این تعریف ها دارای وجه اشتراک هایی هستند. بر اساس تعریف موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی، «آب معدنی به آب هایی گفته می شود که دارای املاح معدنی، عناصر جزئی و یا دیگر ترکیب ها باشد و به طور مستقیم از چشمه یا نقاط حفر شده از طبقات زیر زمینی به دست آمده و دارای خواص بهداشتی و درمانی باشد و سرانجام مورد تأیید و بررسی متخصصان ذی صلاح قرار گرفته باشد». (۶) آب های معدنی دارای سه منشا سطحی، عمقی و مخلوط می باشند. (۵)

از جمله باکتری هایی که احتمال حیات آن ها در چشمه های آب گرم وجود دارد باکتری های احیاکننده سولفات[1] می باشند این باکتری ها به طور شدید بی هوازی و تولیدکننده سولفیدهیدروژن[2] می باشند و از ۴ زیر گروه تشکیل شده اند:

الف. باکتری های اسپوردار

ب. باکتری های تولیدکننده استات از مواد آلی

ج. باکتری هایی که تولیدکننده سولفید هیدروژن بوده و ترکیبات آلی را به دی اکسیدکربن تبدیل می کنند.

د. باکتری های تولیدکننده سولفیدهیدروژن و ترموفیل

چشمه های معدنی با توجه به ساختار اکولوژیک و فیزیکوشیمیایی خود دارای فلور باکتریایی مخصوص خود هستند. در ایران به عنوان مثال باکتری باسیلوس استئاروترموفیلوس[3] از آب گرم گاومیش گلی (۲) و باکتری باسیلوس کالدوتناکس[4] از آب گرم قینرچه مشگین شهر (۳) پیش از این جداسازی شده اند که از باکتری های گرم مثبت گرما دوست اسپور دار و در نتیجه با مقاومت بالا می باشند که در نقاط اکولوژیک دیگر نیز یافت می شوند. اما در این مطالعه علاوه بر لحاظ کردن اصلی ترین فاکتور محیطی در چشمه های آب گرم یعنی دمای بالا، وجود گوگرد در این آبها در نظر گرفته شده است که در نهایت منجر به جداسازی و شناسایی گروه جدیدی از باکتری های بومی ایران شد.

مواد و روش‌ها

پس از مطالعه دقیق بر روی چشمه های آب گرم طبیعی استان اردبیل، چشمه های با شرایط ترموفیلیک (بالاتر از ۴۵ درجه سلسیوس) برای نمونه گیری انتخاب شد. بر این اساس چشمه آب گرم ساری سو واقع در شهر سرعین در ۲۶ کیلومتری مرکز استان (بین °۳۸ و ′۷ و ″۵۰/۷۳ و °۳۸ و ′۱۰ و ″۱۶/۸۰ عرض شمالی و °۴۸ و ′۲ و ″۵۲/۴۹ و °۴۸ و ′۵ و ″۵۸/۲۳ طول شرقی) با دمای ۴۶ درجه سلسیوس انتخاب شد.

دمای چشمه با دماسنج اندازه گیری شد. نمونه گیری بی هوازی به این صورت انجام شد که مقدار ۲۰ میلی لیتر از آب چشمه در ۲ ویال سرمی پلمپ شده ۱۰ میلی لیتری مجزا به وسیله سرنگ استریل ۱۰ میلی لیتری در شرایط عدم حضور اکسیژن نمونه برداری شد. به علت لزوم بی هوازی بودن نمونه گیری از ویال های پنی سیلین پلمپ شده و استریل که هوای درون آن تخلیه شده و با گاز نیتروژن پر شده بود استفاده شد. نمونه گیری به وسیله سرنگ استریل انجام گرفت و ویال های سرمی در زیر آب با سرنگ پر شدند. دقت شد که هیچ حباب هوایی درون ویال های سرمی مشاهده نشود. علاوه بر این به طور جداگانه از سنگ کف چشمه مخلوط با آب چشمه در فالکن ۵۰ میلی لیتری در عمق نمونه برداری شد. سپس نمونه ها به یخچال (۴ درجه ی سلسیوس) انتقال یافت.

در کل فرآیند حقیق از دو نوع محیط کشت Postgate B و Hungate به صورت مایع و جامد استفاده شد. (۱۰)

برای ساخت محیط کشت Postgate B ، ۰/۵ گرم دی پتاسیم فسفات، ۱ گرم آمونیوم کلراید، ۱ گرم سدیم سولفات، ۰/۱ گرم کلسیم کلرید ۲ آبه، ۲ گرم منیزیوم سولفات ۷ آبه، ۲ گرم سدیم لاکتات، ۱ گرم عصاره مخمر، ۱میلی گرم رزازورین، در ۹۸۰ میلی لیتر آب مقطر مخلوط کرده سپس به طور جداگانه ۰/۵ گرم سولفات آهن[5] در ۱۰ میلی لیتر آب مقطر سرد و ۰/۱ گرم اسید اسکوربیک و سدیم تیوگلیکولات در ۵ میلی لیتر آب مقطر حل کرده و بعد از سرد شدن به محلول فوق اضافه شد. (۱۰)

در دمای ۵۰ درجه سلسیوس، pH محیط معادل ۷/۸ تنظیم شد. (۱۰)

پس از آماده شدن محیط کشت در ظروف مورد نیاز (ویال سرمی یا لوله هانگیت) تقسیم شد. در صورت استفاده از ویال سرمی وای درون آن با سرنگ خالی و به وسیله گاز نیتروژن جایگزین شد. این کار به منظور بی هوازی کردن انجام شد. محیط کشت در دمای ۱۲۱ درجه ی سلسیوس به مدت ۱۵ دقیقه اتوکلاو شد. (۸) برای ساختن محیط کشت Postgate B Agar به محیط بالا در مرحله ی اول و قبل از جوشاندن محیط کشت ۱۴ گرم آگار[6] اضافه شد. محیط جامد در ویال های سرمی۵۰ میلی لیتری و بصورت شیب دار و فالکن های ۱۵ میلی لیتری تقسیم شد.

برای ساخت محیط کشت Hungate، ۰/۳ گرم دی پتاسیم فسفات، ۰/۳ گرم مونوپتاسیم فسفات، ۱ گرم آمونیوم کلراید، ۱ گرم سدیم کلراید، ۳ گرم سدیم سولفات، ۰/۱ گرم پتاسیم کلراید، ۰/۱ گرم کلسیم کلرید ۲ آبه، ۲ گرم منیزیم کلراید ۶ آبه، ۰/۱ گرم عصاره مخمر، ۰/۵ گرم سیستئین هیدروکلراید و ۱میلی گرم رزازورین ۱٪ در ظرف تمیز باهم مخلوط و پس از

1 Sulfate Reducing Bacteria(SRB)
2 H_2S
3 *Bacillus stearothermophilus*
4 *Bacillus caldotenax*
5 $FeSo_4. 2H_2O$
6 Agar-Agar

تنظیم میزان حجم محیط و جوشاندن آن pH محیط در دمای ۵۰ درجه ی سلسیوس۷/۲ تنظیم و در دمای ۱۱۰ درجه ی سلسیوس به مدت ۴۵ دقیقه اتوکلاو شد. بعد از خنک شدن محیط کشت ۰/۱ گرم سدیم سولفید ۹ آبه ۲٪ و ۰/۱ گرم سدیم هیدروژن کربنات ۱۰٪ با فیلتر استریل شد و به محیط اضافه و محیط کشت در شرایط بی هوازی درون ویال سرمی استریل تقسیم شد. (۱۰،۱۵)

محیط کشت های آماده شده اعم از Postgate B و Hungate در ویال های سرمی ۱۰ میلی لیتری تقسیم شد. برای کشت به نسبت ۲۵٪ محیط کشت نمونه با سرنگ کشت داده شد. از سنگ کف چشمه ها به همراه ۰/۵ میلی لیتر نمونه ی آب چشمه و ۹/۵ میلی لیتر محیط کشت در ویال سرمی کشت داده و درپوش آلومینیومی را با پلمپ کننده[7] محکم بسته شد. نمونه ها در دمای ۴۰ درجه ی سلسیوس به مدت ۷۲ ساعت گرماگذاری شد (۱۰،۱۶).

کشت جامد به دو روش تکان دادن آگار[8] و کشت مورب درون ویال سرمی ۵۰ میلی لیتری انجام گرفت.

در کشت به روش تکان دادن آگار برای به دست آوردن تک کلنی از نمونه های رشد کرده به روش تکان دادن آگار به محیط جامد انتقال پیدا کردند. در این روش رقت سریالی تا 10^{-5} از نمونه های مثبت در محیط کشت Postgate B Agar تهیه شد. نمونه ها درون جار بی هوازی در دمای ۴۰ درجه سلسیوس به مدت ۷۲ ساعت گرماگذاری شدند. (۱۲)

در روش کشت جامد در ویال سرمی برای جدا کردن کلنی تک از روش کشت بر روی سطح شیب دار در ویال سرمی ۵۰ میلی لیتری استفاده شد. این ویال ها در دمای ۴۰ درجه سلسیوس به مدت ۷۲ ساعت گرماگذاری شدند.

برای خالص سازی چندین بار کلنی ها به محیط جدید منتقل شدند تا باکتری ها بطور کامل خالص شوند. (۱۲)

برای اطمینان از خالص شدن کامل باکتری ها از تک کلنی رشد کرده در محیط جامد لام تهیه و رنگ آمیزی گرم انجام گرفت.

باکتری های احیاکننده سولفات بدلیل شرایط خاص رشد نمی توانند در محیط های افتراقی معمولی رشد کنند. بنابراین نمی توان آن ها را در این محیط ها کشت داد و از تست های دیگری برای افتراق آن ها استفاده می شود. به همین دلیل تست منبع کربن و کاتالاز و بررسی پیگمان دسولفوویریدین[9] انجام گرفت.

به منظور بررسی توانایی باکتری های احیاکننده سولفات جدا شده، در استفاده از منابع مختلف کربن آزمون بررسی منبع کربن انجام شد. منبع کربن محیط کشت Postgate B سدیم لاکتات می باشد. برای انجام این آزمایش سدیم لاکتات از محیط کشت حذف و به ترتیب چهار منبع کربن اتانول ۹۶٪، سدیم استات و سدیم فورمات و تریپتوفان به تنهایی و به عنوان تنها منبع کربن به محیط اضافه و محیط های مایع و جامد تهیه شد. نمونه های مثبت از مرحله ی قبل به هر یک از این ۴ محیط کشت جدید تلقیح و درون جار بی هوازی در ۴۰ درجه سلسیوس گرمخانه گذاری شدند. (۱۰،۱۲)

از دیگر آزمایش های انجام شده آزمون کاتالاز بود. برای انجام تست کاتالاز بر روی تک کلنی های جدا شده پراکسید هیدروژن[10] ۳٪ ریخته تا وجود آنزیم کاتالاز در صورت مثبت بودن واکنش با ظاهر شدن حباب اثبات شود. (۱)

بررسی تولید پیگمان دسولفوویریدین به عنوان آزمون اختصاصی شناسایی احیاکننده های سولفات انجام گرفت.

این آزمون به منظور تمییز جنس های مختلف احیا کننده های سوافات به کار گرفته می شود. برای این کار بر روی کلنی های جدا شده چند قطره سود دو نرمال اضافه و درون کابینت UV در طول موج ۳۶۵ نانومتر قرار داده شد. این کار به منظور بررسی تولید پیگمان دسولفوویریدین انجام شد. (۱۰،۱۲)

درنهایت ذخیره سازی باکتری‌ها به دو صورت ذخیره‌سازی برای مدت‌زمان کوتاه با کشت‌های مکرر روی محیط کشت مایع استفاده شد که هر ۲ هفته یک‌بار تکرار می شدند و ذخیره‌سازی برای مدت‌زمان طولانی که از روش ذخیره ی گلیسرول[11] ۳۰٪ استفاده شد. (۱۳)

به منظور شناسایی قطعی سویه باکتریایی از روش شناسایی ژنتیکی 16S rDNA استفاده شد. برای استخراج DNA از کیت استخراج شرکت زیست دانشیاران استفاده شد و به منظور اطمینان از استخراج DNA، سه میکرولیتر از DNA به همراه لودینگ بافر[12] به چاهک‌های ژل الکتروفورز ۱٪ منتقل و با ولتاژ ۱۲۰ ولت و عمل تفکیک ۳۰ دقیقه الکتروفورز شد. محصول الکتروفورز به دستگاه نشان گر منتقل شد. DNA استخراج شده در دمای منفی ۲۰ درجه سلسیوس نگهداری شد.

جهت تکثیر ناحیه S rDNA۱۶ از پرایمرهای یونیورسال fD1 و rD1 با توالی نوکلئوتیدی1:5′CCGAATTCGTCGACAACA GAGTTTGATCCTGGCTCAG3’rD1:5′CCCGGGATC CAAGCTTAAGGAGGTGATCCAGCC-3’ استفاده شد(۱۴).

واکنش حرارتی PCR با برنامه حرارتی که در جدول ۱ آمده است انجام گرفت(۷). محصول PCR به همراه اندازه نشان گرها روی

7 crimper
8 Shaking Agar
9 Desulfoviridin
10 H_2O_2
11 Glycerol Stock
12 Loading Buffer

ژل ۱٪ در ناحیه bp ۸۰۰ مشاهده شد. بعد از مشاهده‌ی باند قوی مورد نظر و عدم وجود باند اضافی، محصولات PCR برای تعیین توالی به شرکت تکاپو زیست ارسال شدند. نتایج تعیین توالی‌ها توسط نرم‌افزار BioEdit و Chromas pro بررسی شدند و برای شناسایی از پایگاه اینترنتی NCBI[13] استفاده شد و توالی‌ها بلاست شدند و میزان شباهت آن با گونه‌های موجود در پایگاه های اطلاعات ژنتیکی بررسی شد.

جدول ۱- برنامه ی حرارتی واکنش PCR

۱ سیکل	**۲ دقیقه**	**۹۴ °C**
۳۰ سیکل	۴۵ ثانیه	۹۴ °C
	۱ دقیقه	۵۲ °C
	۳۰ ثانیه	۷۲ °C
۱ سیکل	۴ دقیقه	۷۲ °C

نتایج

در محیط کشت Hungate پس از ۳ هفته، نمونه ها مثبت شدند و رشد به صورت سیاه شدن رسوب محیط کشت در ویال های سرمی مشاهده شد. باکتری ها در مدت زمان رشد خود گاز سولفید هیدروژن تولید می کردند و تولید H_2S پس از ۲۱ روز در نمونه ها شدت یافت.

نمونه های مثبت دوباره به محیط کشت Postgate B منتقل شده و در آن رشد مشاهده شد. درشکل ۱ رشد باکتری ها نشان داده شده است.

شکل ۱- نمونه های رشد کرده درون ویال پنی سیلین حاوی محیط کشت Hungat

برای جداسازی و خالص سازی در محیط کشت Postgate B Agar پس از ۴۸ تا ۷۲ ساعت کلنی هایی از باکتری درون محیط کشت ها ظاهر شد. کلنی ها به صورت لکه های سیاه درون محیط کشت مشاهده شدند. در روش کشت در سطح شیب دار محیط جامد در ویال پنی سیلین ۵۰ میلی لیتری نیز کلنی های باکتری ایجاد شدند. در شکل ۲ رشد باکتری ها در لوله های در پیچ دار و ویال های پنی سیلین به صورت سیاه شدگی محیط ناشی از احیا سولفات نشان داده شده است.

شکل ۲- کلنی های رشد کرده در محیط کشت Postgate B Agar و ویال های سرمی

رنگ آمیزی گرم: میکروارگانیسم های جدا شده به صورت باکتری های گرم مثبت، میله ای شکل،دارای اندوسپور و متحرک بودند که در شکل۳ نتایج رنگ آمیزی گرم باکتری های احیا کننده سولفات جدا شده نشان داده شده است.

شکل ۳- باکتری احیاکننده سولفات ترموفیل گرم مثبت اندوسپوردار در نمونه ی چشمه ی ساری سو

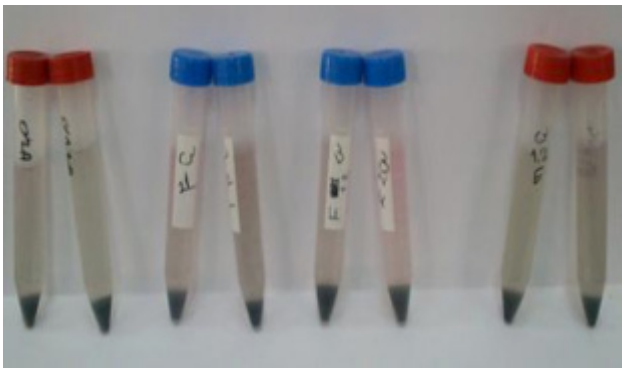
13 National Center for Biotechnology Information (NCBI)

آزمایش های بیوشیمیایی

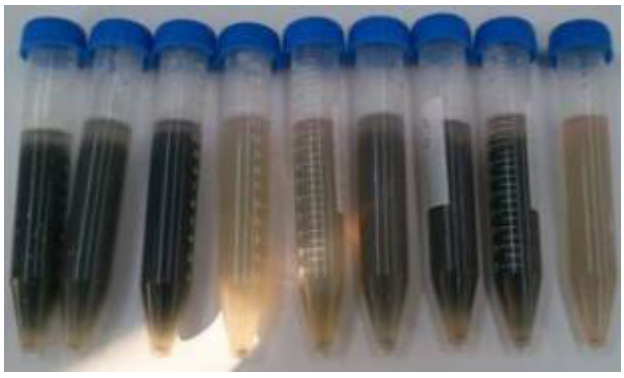
باکتری ها پس از ۲۴ ساعت در تمام منابع کربن مثبت بود و رسوب سیاه رنگ در محیط های مایع و کلنی های تیره رنگ در محیط کشت جامد مشاهده شد. بوی سولفید هیدروژن کاملا مشهود بود. در جدول ۲ نتایج مربوط به تست بیوشیمیایی منابع کربن آمده است. در شکل ۴ رشد باکتری ها در محیط کشت مایع نشان داده شده است. در شکل ۵ رشد باکتری های جدا شده با منابع مختلف کربن در محیط کشت جامد نشان داده شده است.

منابع کربن	سدیم لاکتات	اتانول ۹۶٪	سدیم استات	سدیم فورمات	تریپتوفان
توانایی استفاده باکتری جدا شده از منبع کربن خاص	+	+	+	+	+

جدول۲- نتایج بدست آمده از تست بیوشیمیایی منابع کربن



شکل ۴- نمونه ی مایع چشمه ساری سو در محیط کشت مایع با منابع کربن مختلف

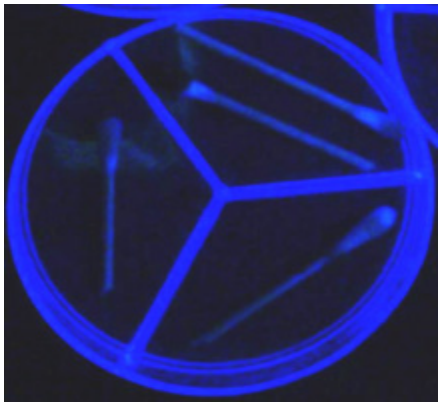


شکل ۵- نمونه ی کشت داده شده در محیط کشت جامد

نمونه ها همگی فاقد آنزیم پراکسیداز و کاتالاز منفی بودند که در شکل ۶ نشان داده شده است.

شکل۶- تست کاتالاز (سمت راست باکتری استافیلوکوکوس اورئوس شاهد مثبت و سمت چپ نمونه ی مورد مطالعه کاتالاز منفی)

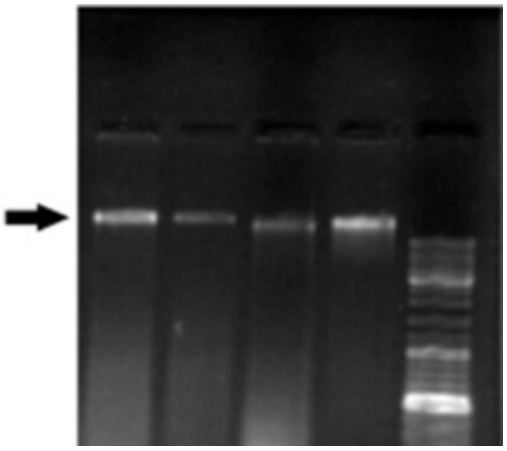
رشد باکتری ها در محیط کشت اختصاصی، مشاهده های میکروسکوپی و آزمون های بیوشیمیایی نشان داد که باکتری های جدا شده احیاکننده ی سولفات هستند. بررسی تولید پیگمان دسولفوویریدین انجام گرفت که یکی از آزمایش های تشخیصی مهم در تمایز بین یوباکتری های احیاکننده ی سولفات جنس دسولفوویبریو از دسولفوتوماکولوم است. جنس دسولفوویبریو حاوی این پیگمان است که در زیر نور UV با طول موج ۳۶۵ نانومتر به رنگ قرمز مشاهده می شود در حالی که جنس دسولفوتوماکولوم فاقد این پیگمان بوده و تغییر رنگی نشان نمی دهد. این ویژگی اصلی ترین عامل تشخیصی بین باکتری های احیاکننده ی سولفات می باشد.(۱۰و ۱۲) باکتری جدا شده در این تحقیق فاقد دسولفوویریدین بود که تاییدکننده این نکته بود که باکتریوم گرم مثبت اسپور دار احیا کننده سولفات در این تحقیق از جنس دسولفوتوماکولوم می باشد. در شکل ۷ نتایج تولید پیگمان دسولفوویریدین نشان داده شده است که در تمام نمونه ها عدم تغییر رنگ دیده شد.



شکل ۷- بررسی تولید پیگمان دسولفوویریدین

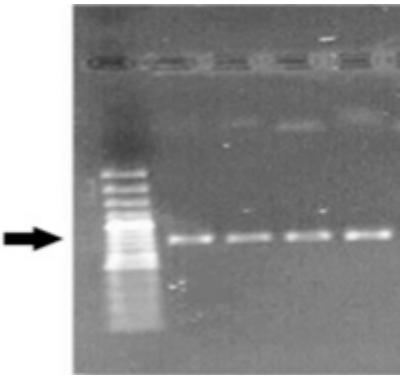
با توجه به رشد باکتری ها در محیط کشت اختصاصی و مشاهدات میکروسکوپی و نتایج حاصل از آزمون های بیوشیمیایی خود به تنهایی دسولفوتوماکولوم بودن این باکتری ها را تایید می کند با این حال شناسایی مولکولی برای تایید نتایج حاصل از تحقیق انجام گرفت. در فرایند شناسایی مولکولی برای تعیین غلظت DNA از اسپکتروفتومتری استفاده شد. نسبت جذب ۲۶۰ نانو متر به ۲۸۰ نانومتر محاسبه و غلظت DNA ۱/۸ گزارش

شد. وجود باند قوی روی ژل آگارز ۱٪ پس از الکتروفورز ، نشان‌دهنده‌ی استخراج مناسب DNA بود. در شکل ۸ نتیجه استخراج DNA نشان داده شده است.



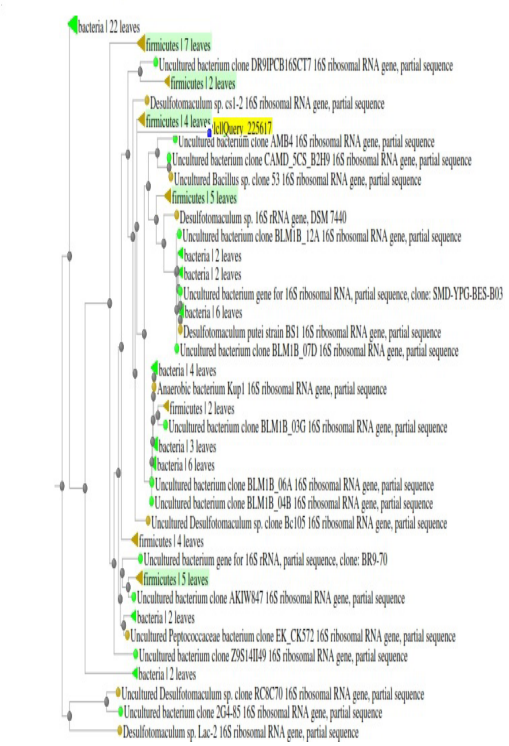
شکل ۸- محصول ژل الکتروفورز استخراج DNA

با استفاده از پرایمرهای یونیورسال، ناحیه‌ی ژنومی استخراج‌شده، تکثیر شد. پس از الکتروفورز، باند در ناحیه‌ی bp ۸۰۰ مربوط به نمونه قابل‌مشاهده بود که در شکل ۹ قابل مشاهده است.



شکل ۹- محصول PCR بر روی ژل الکتروفورز

درنهایت محصول PCR مورد توالی یابی قرار گرفت، نتایج حاصل از بررسی ملکولی و بلاست توالی‌ها، تایید کننده نتایج آزمون های بیوشیمیایی و شباهت ژنتیکی باکتری‌های شناسایی شده در چشمه آب گرم ساری سو با باکتری دسولفوتوماکولوم بود(شکل ۱۰).



شکل ۱۰- درخت فیلوژنی دسولفوتوماکولوم به روش Neighbor joining

بحث

چشمه های آب گرم علی رغم داشتن شرایط خاص برای حیات از جمله دمای بالا، غلظت نمک بالا، pH قلیایی یا اسیدی دارای حیات منحصربه فرد بوده و انواع میکروب ها (باکتری ها، قارچ ها، انگل ها و ویروس ها) درون آن ها زندگی می کنند. انواع یوباکترها و آرکیای احیاکننده سولفات در درون چشمه های آب گرم زندگی می کنند. از جمله آن ها می توان متانوژن ها، دسولفوویبریوها و دسولفوتوماکولوم ها اشاره کرد. در بین این باکتری ها دسولفوتوماکولوم ها اسپوردار بوده ولی متانوژن ها و دسولفوویبریوها بدون اسپور می باشند. (۱۰،۱۲)

برای غنی سازی و جداسازی باکتری های بی هوازی احیاکننده سولفات چشمه های آب گرم از محیط های کشت مختلف استفاده می شود که محیط کشت اختصاصی و غنی بوده و علاوه بر جداسازی نوع خاصی از باکتری ها نیاز غذایی طیف وسیعی از آن ها را فراهم می کند و محیط کشت آن بر اساس چشمه های مختلف متفاوت بوده و معمولا منحصر به خود چشمه می باشد. Jeanthon و همکاران در سال ۲۰۰۲ طی مطالعه هایی بر روی هیدروترمال ونت اعماق دریا در مناطق Guaymas Basin مکزیک موفق به جداسازی باکتری احیاکننده سولفات ترموفیل شیمیولیتوتروف ترمودسولفوباکتریوم هیدروژنیفیلوم[۱۴] شدند. برای جداسازی باکتری ها از محیط کشت حاوی ۳۰ گرم نمک دریا (Sigma)، ۱ گرم آمونیوم کلرید، ۰/۳۵ گرم پتاسیم دی

14 *Thermodesulfobacterium hydrogeniphilum*

هیدروژن فسفات، ۳/۴۶ گرم PIPES، ۱ گرم سدیم هیدروژن کربنات، ۲ گرم عصاره مخمر، ۲ گرم پپتون، ۱ گرم سدیم استات، ۰/۵ گرم سیستئین هیدروکلراید، ۱ میلی لیتر مخلوط عناصر کمیاب، ۳۰ میلی گرم تنگستن، ۰/۵ میلی گرم سدیم سلنات، ۱ میلی لیتر مخلوط ویتامین، ۱ میلی لیتر محلول تیامین، ۰/۵ میلی گرم ویتامین ب، ۱ میلی گرم فاکتور تحریک کننده رشد و ۱ میلی گرم رزازورین استفاده کردند که وجود ویتامین های گروه ب باعث تسهیل در رشد باکتری ها گردید. pH محیط ۶/۵ تنظیم شده و باکتری ها در حضور گاز دی اکسیدکربن و هیدروژن به نسبت ۲۰ به ۸۰ در ۶۵ درجه سلسیوس گرماگذاری شده بودند. در این مطالعه برای خالص سازی نمونه ها با اضافه کردن فیتاژل[15] به این محیط کشت رقت سریالی تهیه شده و تا به دست آمدن کشت خالص این کار را ادامه دادند. برای اطمینان کامل از خالص سازی از کشت به صورت بی هوازی در محیط کشت مرین براث[16] استفاده کردند و نمونه ها را در ۶۵ درجه سلسیوس گرماگذاری کردند. (۱۲)

Haouari و همکاران در سال ۲۰۰۸ با مطالعه بر روی چشمه آب گرم تونس موفق به جداسازی باکتری گرم مثبت اسپوردار احیاکننده سولفات شدند. آن ها برای جداسازی باکتری ها از محیط کشت Hungate به همراه ۲۰ میلی مول استات و ۲۰ میلی مول لاکتات به عنوان منبع کربن استفاده کردند و در دمای ۵۵ و ۷۰ درجه سلسیوس گرماگذاری شدند که موفق به شناسایی باکتری احیاکننده سولفات دسولفوتوماکولوم هیدروترمال[17] شدند. این باکتری باسیل گرم مثبت اندوسپور دار و متحرک بود. آن ها برای شناسایی باکتری های یاد شده از روش مولکولی استفاده کردند. باکتری ها پس از ۲ هفته در محیط Postgate رشد کردند. (۱۰)

در این تحقیق از محیط Hungate برای جداسازی باکتری ها استفاده شد و نمونه ها در دمای ۴۰ و ۵۰ درجه سلسیوس که مشابه دمای محل در زمان نمونه گیری بود گرماگذاری شدند. ترکیبات محیط کشت برای جداسازی باکتری های احیاکننده سولفات تا حدودی مشابه محیط های استفاده شده توسط محققین ذکر شده بود. در سایر مراحل از محیط Postgate B نیز استفاده شد.

Haouari و همکاران در سال ۲۰۰۸ در مطالعه های خود برای کشت های افتراقی از آزمون منبع کربن استفاده کردند. برای این کار از منابع کربن لاکتات، پیرووات، اتانول، بوتانول، گلیسرول و پروپانول استفاده شده است. (۱۰)

Jeanthon و همکاران در سال ۲۰۰۲ طی مطالعه های خود رشد باکتری ها را توسط چندین ترکیب آلی تحریک کردند و نتیجه ی جالبی بدست آمد که نشان می داد پیروات، لاکتات و مالات رشد تخمیری را پشتیبانی نمی کند. (۱۲)

در این تحقیق باکتری های جدا شده که احیاکننده سولفات بودند توانستند از چهار منبع کربن اتانول ۹۶٪، فرمات، استات و تریپتوفان به عنوان تنها منبع کربن استفاده کنند و در همه محیط های کشت رشد کنند.

نمونه مورد مطالعه ی Jeanthon و همکاران در سال ۲۰۰۲ متحرک و دارای تاژک مونو تریش قطبی بوده و باکتری ها به صورت ۲ تایی بودند. در تحقیق Haouari و همکاران در سال ۲۰۰۸ باکتری ها متحرک و دارای تاژک پری تریش و اندوسپور بودند. در این پژوهش باکتری های احیاکننده سولفات جداسازی شده همگی متحرک و اسپوردار بودند. (۱۰،۱۲)

از آزمون کاتالاز برای شناسایی میکروارگانیسم هایی که دارای آنزیم کاتالاز بوده و قادرند با استفاده از آن، پراکسیدهیدروژن را تجزیه نمایند استفاده می شود. در این تحقیق تست کاتالاز در باکتری های جداسازی شده انجام شد و نمونه ها همه کاتالاز منفی بوده و فاقد آنزیم این آنزیم بودند. (۱)

Haouari و همکاران در سال ۲۰۰۸ در بررسی های خود تولید پیگمان دسولفوویریدین را مورد بررسی قرار دادند و باکتری هایشان فاقد پیگمان دسولفوویریدین بود. دسولفوویبریوها دارای دسولفوویریدین بوده و در کابینت UV ۳۶۵ نانومتر قرمز رنگ می شوند ولی دسولفوتوماکولوم ها فاقد دسولفوویریدین بوده و رنگ خاصی را نشان نمی دهند. (۱۰)

Jeanthon و همکاران در سال ۲۰۰۲ در بررسی های خود تولید دسولفوویریدین را به عنوان معیاری برای اطمینان از دسولفوویبریو بودن باکتری ها انجام دادند (۱۲).

در بررسی ها و مطالعه های این پژوهش، باکتری ها فاقد دسولفوویریدین بودند و در زیر UV رنگ خاصی را نشان ندادند. تولید پیگمان دسولفوویریدین اصلی ترین تست تشخیصی تمایزی میان جنس دسولفوویبریو و دسولفوتوماکولوم می باشد. (۱۲)

در نهایت شناسایی مولکولی بیانگر وجود جنس دسولفوتوماکولوم در چشمه آب گرم ساری سو بود.

نتیجه گیری:

یافته های این تحقیق تایید کننده وجود اکستریموفیل های گرمادوست بی هوازی احیاکننده سولفات بومی ایران در چشمه آب گرم منطقه اردبیل بود که برای اولین بار جداسازی و شناسایی باکتری احیاکننده سولفات از جنس دسولفوتوماکولوم

15 Phytagel
16 Marine broth
17 *Desulfotomaculum hydrothermale*

را گزارش می کند. جداسازی و شناسایی این باکتریوم گستره ی جدیدی برای مطالعه های بیش تر را پیش رو محققان در این عرصه باز خواهد کرد.

سپاسگزاری

از مساعدت های شبانه روزی اساتید عزیزم خانم دکتر طباطبایی و ارباب سلیمانی و دوست خوب و مهربانم خانم دکتر هنرمند تشکر و قدردانی می شود..

منابع

۱. اشرفی ف. میکروب شناسی عملی همراه با اصول بیوشیمیایی واکنش ها. احسن. ۱۳۹۰.

۲. اصغرزاده م. حسین پورفیضی م. رفیع ع. استخراج و خالص سازی آنزیم DNA پلیمراز باسیلوس استیروترموفیلوس جدا شده از آب گرم استخر گاومیش شهر سرعین. ۱۳۸۲. علوم دارویی . دوره ۲ . شماره ۲ . ۶۱ تـا ۶۸.

۳. اصغرزاده م. حسین پورفیضی م. رفیع ع. محمدی ع. ارجمند م. عزیزی م. استخراج و خالص سازی آنزیم DNA پلیمراز باسیلوس کالدوتناکس از آب گرم قاینارجه اردبیل. ۱۳۸۰. اسرار مجله ی دانشکده علوم پژشکی و خدمات بهداشتی، درمانی سبزوار. سال هشتم. شماره ۲. ۵۲-۵۹.

۴. درویش زاده ع. زمین شناسی ایران. دانش امروز. ۱۳۷۱. ۷۷۱

۵. زند مقدم م. پورنقی ل. بررسی و مطالعه توان های محیطی منطقه لاریجان با تاکید بر توان مندی های آب های معدنی در جذب گردشگری. ۱۳۹۰. فصلنامه علمی پژوهشی جغرافیای انسانی. سال سوم. شماره دوم. ۱۲۷-۱۴۲.

۶. غفوری اصل م. ۱۳۶۶. شناخت آب های معدنی و چشمه های معدنی ایران. ۱۳۶۶. انتشارات دانشگاه تهران، ص۱

7. Assareh R., Shahbani Zahiri. H., Akbari Noghabi K & Aminzadeh S. Characterization of the newly isolated Geobacillus sp. T1, the efficient cellulase-producer on untreated barley and wheat straws. Bioresource technology, 2012. 120, 99-105.
8. Bernardeza L.A., Andrade Limab L.R.P. de. Improved method for enumerating sulfate-reducing bacteria using optical density. Water Research . 2015. 6)1(:249–255.
9. Charbonnier, F. Forterre, P. Comparison of plasmid DNA topology among mesophilic and thermophilic eubacteria and archaebacteria. J Bacteriol. 1994. 176, 1251-1259.
10. Haouari, O.,Fardeau, M. L., Cayol, J. L., Casiot, C. Desulfotomaculum hydrothermale sp. nov., a thermophilic sulfate reducing bacterium isolated from a terrestrial Tunisian hot spring. Int. J. Syst. Evolutionary. Microbiology.2008. 58: 2529–2535
11. Jeanthon, C., L'Haridon, S., Cueff, V., Banta, A., Reysenbach, A. L., and Prieur, D. Thermodesulfobacterium hydrogeniphilum sp. nov., a thermophilic, chemolithoautotrophic, sulfate-reducing bacterium isolated from a deep-sea hydrothermal vent at Guaymas Basin, and emendation of the genus Thermodesulfobacterium. Int. J Syst. and Evolutionary Microbiology. 2002. 52: 765–772
12. Krieg, N. R., A. Parte, W. Ludwig, W. B. Whitman, B. P. Hedlund, B. J. Paster, J. T. Staley, N. Ward & D. Brown. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Volume 4: The Bacteroidetes, Spirochaetes, Tenericutes (Mollicutes), Acidobacteria, Fibrobacteres, Fusobacteria, Dictyoglomi, Gemmatimonadetes, Lentisphaerae, Verrucomicrobia, Chlamydiae, and Planctomycetes. Springer. 2011
13. Mochimaru H., Yoshioka H., Tamaki H, Nakamura K., Kaneko N., Sakata S., Imachi H., Sekiguchi Y., Uchiyama H., Kamagata Y. Microbial diversity and methanogenic potential in a high temperature natural gas field in Japan. Extremophiles. 2007. 11 (3). 453-461.
14. Neelam M. Nathani, Srinivas M. Duggirala, Vaibhav D. Bhatt, Jay KaPatel, Chaitanya G. Joshi. Genomic analysis of a novel strain of Bacillus nealsonii, isolated from Surti buffalo rumen. Advances in Bioscience and Biotechnology. 2014. 5:235-245 .
15. Ochynski, F. W., and J. It. Postgate. Some biochemical differences between fresh and salt water strains of sulphate-reducing bacteria. 1963. 426-441. In C. H. Oppenheimer [ed.], Symposium on marine microbiology. Hungate, R. E.: A roll-tube method for cultivation of strict anaerobes. Methods microbiol3. 1969. 117.
16. Sonne-Hansen, J., Westermann, P., Ahring, B. K.: Kinetics of sulfate and hydrogen uptake by the thermophilic sulfate reducing bacteria Thermodesulfobacterium sp. strain JSP and Thermodesulfovibrio sp. strain R1Ha3. Appl. Environ. Microbiol.1999. 65, 1304.