

مقاله پژوهشی

شناسایی سویه هوازی اجباری *Aeribacillus pallidus* Gh1 جدا شده از چشمه آب گرم قینرجه در استان اردبیل

مهدی رسا^{۱*}

تاریخ دریافت: آبان ۹۷

تاریخ پذیرش: دی ۹۷

چکیده

نمونه‌های آب از چشمه آب معدنی گرم قینرجه استان اردبیل در اطراف کوه سبلان جمع‌آوری شد. پس از کشت، از میان باکتری‌های رشد داده شده، باکتری Gh1 به دلیل رشد سریع‌تر در محیط‌های انتخابی و بازه دمایی مورد نظر، برای بررسی‌های بیشتر انتخاب شد. ویژگی‌های باکتری با استفاده از کشت روی محیط‌های کشت اختصاصی در شرایط هوازی و بی‌هوازی، آزمایش‌های بیوشیمیایی، تعیین هویت برخی لیپیدها، تعیین توالی بازی 16S rDNA و ترسیم درخت فیلوژنتیک به دست آمد. باکتری Gh1، گرم مثبت، اسپوردار و غیرمتحرک بود. طول و عرض سویه ۳-۴ × ۱ میکرومتر بود و اسپوره‌های آن مستطیل شکل و انتهایی بودند. دمای مطلوب رشد ۶۰-۵۸ درجه سانتی‌گراد و حداقل و حداکثر دمای رشد به ترتیب ۳۰ و ۷۲ درجه سانتی‌گراد بود. pH مطلوب رشد ۸/۰ بود و باکتری در pH بین ۶ تا ۱۰ رشد می‌کرد. غلظت ۱/۰-۵/۰ درصد NaCl سرعت رشد را بالا برد، اما غلظت ۲/۰ درصد NaCl رشد را مهار کرد. تنها منبع هیدروکربنی با اثر مثبت روی رشد باکتری، نشاسته بود. علاوه بر فعالیت آمیلازی، باکتری دارای فعالیت‌های ژلاتینازی، کاتالازی و اکسیدازی نیز بود. سویه Gh1 هوازی بود و روی محیط کشت بی‌هوازی رشد نکرد. بررسی لیپیدهای قطبی نشان داد سویه حامل فسفاتیدیل اتانول آمین، دی‌فسفاتیدیل گلیسرول، فسفاتیدیل گلیسرول و چندین لیپید و فسفولیپید شناسایی نشده بود. دی‌آمینو پیملیک اسید در دیواره باکتری موجود نبود. بررسی توالی 16S rDNA نشان داد این توالی ۹۹/۷۲ درصد با باکتری *Aeribacillus pallidus* یکسانی داشت. ویژگی‌های مهم دیگر باکتری، مانند تحرک و تنفس بی‌هوازی، با گزارش‌های پیشین متفاوت بودند. نتایج به دست آمده همچنین نشان داد که نمی‌توان از وجود فسفاتیدیل اتانول آمین به عنوان معیاری برای تفکیک *Aeribacillus* از *Geobacillus* استفاده کرد.

واژگان کلیدی: چشمه آب گرم، ترموفیل، آمیلاز، *Gh1*، *Aeribacillus*، *16S rRNA*، دی‌آمینو پیملیک اسید، فسفولیپید.

۱- مربی گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان، رشت، ایران.

* نویسنده مسئول: rassa9@yahoo.com

مقدمه

مورد بررسی در این مطالعه نوعی *Aeribacillus pallidus* است.

باکتری *Aeribacillus pallidus* نخستین بار توسط Scholz و همکاران (۱۹۸۷) و با نام *Bacillus pallidus* گزارش شد. از نظر فنوتیپی و معیارهای کموتاکسونومی، این باکتری دارای ویژگی‌های مشترک با باسیلوس‌های دیگر است. منتهی بررسی 16S rDNA این باکتری به وسیله Banat و همکاران (۲۰۰۴)، آن‌ها را به این نتیجه رساند که این باکتری باید در جنس *Geobacillus* و به عنوان *Geobacillus pallidus* شناخته شود. برای تغییر نام *Bacillus pallidus* به *Geobacillus pallidus*، Banat و همکاران (۲۰۰۴) از معیارهای دیگری مانند میزان G+C، تجزیه کربوهیدرات‌ها و تولید آنزیم‌های هیدرولیتیک مختلف استفاده کردند. بر اساس نتایج به دست آمده پیشنهاد شده است که سویه‌های دارای یکسانی 16S rDNA بین ۹۶-۹۹/۴ درصد، احتمالاً گونه‌های متفاوتی هستند و آن‌هایی که یکسانی حدود ۹۹/۴ درصد یا بالاتر دارند، زیرگونه‌های یک گونه هستند (Coorevits et al., 2012). به غیر از 16S rDNA، میزان GC، دورگه‌ای کردن DNA،

استفاده گسترده از روش‌های ژنومیک، به ویژه استفاده از توالی‌های 16S rDNA، برای طبقه‌بندی خانواده Bacillaceae منجر به تغییرات اساسی در این طبقه‌بندی شده است. خانواده Bacillaceae بزرگ‌ترین خانواده در رده Bacilli است. در اوایل دهه ۸۰ میلادی خانواده Bacillaceae از حدود ۳۵ گونه تشکیل شده بود (Schleifer, 2008)، اما اکنون این خانواده شامل حدود ۹۵ جنس مختلف می‌شود (Parte, 2018). از بین جنس‌های شناخته شده، برخی از اعضای ۹ جنس یا ترموفیلیک هستند و یا ترموتولرانت (دارای دمای مطلوب رشد بالای ۴۵ درجه سانتی‌گراد). اعضای ۴ جنس *Geobacillus* (Nazina et al., 2001)، *Anoxybacillus* (Pikuta et al., 2003)، *Aeribacillus* (Minana-Galbis et al., 2010) و *Caldibacillus* (Coorevits et al., 2012) از نظر تاکسونومی به یکدیگر نزدیک هستند. دو جنس اخیر هر کدام شامل فقط ۱ گونه هستند: *Aeribacillus pallidus* (Scholz et al., 1987; Banat et al., 2004;) و *Caldibacillus debilis* (Minana-Galbis et al., 2010; Banat et al., 2012). باکتری

دانشکده علوم پایه دانشگاه گیلان حمل شوند. در آزمایشگاه در محیط بی‌هوازی مایع (MSBA Meat Extract, Soy Peptone, Broth,) (Anaerobic) یا هوازی جامد کشت داده شدند. تمام مواد شیمیایی مورد استفاده در این آزمایش از شرکت Merck (آلمان) خریداری شدند، به جز در مواردی که نام برده شده است. اجزای محیط بی‌هوازی MSBA شامل عصاره گوشت ۰/۳ درصد، پپتون سویا ۰/۵ درصد، عصاره مخمر ۰/۲ درصد، سولفید سدیم ۰/۰۵ درصد و رسازورین (Resazurin) ۰/۰۱ درصد بود. محیط کشت بی‌هوازی در لوله‌های Hungate تهیه و اکسیژن درون لوله، با گاز آرگون جایگزین شد. در مواردی که به محیط کشت هوازی مایع نیاز بود، از همان اجزای محیط کشت بی‌هوازی استفاده شد، منتها بدون سولفید سدیم و رسازورین. این محیط کشت MSB نامیده شد. در مواردی که لازم بود pH محیط ثابت نگه داشته شود، از بافر استفاده شد. برای pH ۸/۰-۶/۰ از بافر فسفات ۰/۱ مولار و برای pH ۱۰/۰-۹/۰ از بافر Glycine-NaOH ۰/۱ مولار با همان اجزای MSB استفاده شد. برای تشخیص pH بهینه، باکتری‌ها زیر میکروسکوپ روی لام نوبوئر (Neubauer) شمارش شدند. در این مطالعه از دو نوع محیط

اسیده‌های چرب سلولی اصلی و لیپیدهای قطبی نیز برای تفکیک کردن چهار جنس نام برده شده مورد استفاده قرار می‌گیرند (Pikuta et al., 2000; Minana-Galbis et al., 2010). Coorevits و همکاران (۲۰۱۲) پیشنهاد کرده‌اند می‌توان با استفاده از میزان لیپیدهای قطبی و اسیده‌های چرب، *Aeribacillus* را از *Anoxybacillus* و *Caldibacillus* تفکیک کرد.

با مقایسه مطالعات انجام شده در مورد *Aeribacillus pallidus* به نظر می‌رسد تفاوت‌های عمده‌ای بین سویه‌های این گونه وجود داشته باشد. در این مطالعه برخی ویژگی‌های فنوتیپی و ژنوتیپی یک سویه جدید از گونه *Aeribacillus pallidus* بومی ایران مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

محیط‌های کشت و جداسازی

نمونه‌های آب از چشمه‌های آب گرم در اطراف کوه سبلان در استان اردبیل (سرعین، قینرجه، قزل داغی و موئیل) توسط سرنگ استریل به لوله‌های استریل دردار انتقال داده شدند و لوله‌ها درون فلاسک ۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند تا به آزمایشگاه میکروبیولوژی

نظر، تصمیم گرفته شد که ادامه کار با سویه Gh1 انجام شود. این سویه از چشمه قینرجه جدا شده بود.

بررسی برخی ویژگی‌های میکروبی و بیوشیمیایی

به منظور شناسایی تقریبی سویه مورد نظر، تعدادی آزمایش مقدماتی انجام شد. پس از رنگ‌آمیزی گرم و اسپور (Baron and Finegold, 1990)، تحرک یا غیرمتحرک بودن باکتری زیر میکروسکوپ مشاهده شد. نتیجه با مشاهده شکل رشد با کشت سوزنی روی محیط SIM مورد تایید قرار گرفت (Baron and Finegold, 1990).

برای تعیین میزان بهینه NaCl برای رشد باکتری، به محیط کشت MSA بین ۷-۰ درصد (وزنی/حجمی) NaCl اضافه شد و پلیت‌های کشت شده درون گرمخانه قرار گرفتند. پس از هر ۲۴ ساعت میزان رشد باکتری بررسی شد.

برای بررسی اثر مشتقات کربوهیدراتی، قندهای آرابینوز، سترات، لاکتوز، مالتوز، مانیتول، میو- اینوزیتول، ساکرز و گزیلوز به محیط کشت حداقلی اضافه شد و سپس باکتری در آن کشت داده شد. اجزای محیط کشت حداقلی شامل پپتون سویا ۰/۱ درصد، عصاره

کشت هوازی جامد استفاده شد: محیط آگار مغذی (Nutrient Agar) و محیط پیچیده‌ای که MSA نامیده شد و دارای همان اجزای MSB به همراه ۲/۰ درصد آگار بود. نمونه‌های آب در محیط‌های هوازی کشت داده شدند و در گرمخانه (Heraeus، آلمان) با دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت چهار روز نگهداری شدند. در مورد محیط بی‌هوازی، از سرنگ برای تزریق نمونه از در پلاستیکی مخصوص لوله Hungate استفاده شد تا از ورود هوا جلوگیری شود.

پس از رشد باکتری‌ها روی محیط هوازی جامد، با استفاده از روش کشت ایزوله روی محیط جامد (کشت سه مرحله‌ای یا Streak Plating Technique) سویه‌های رشد کرده از یکدیگر جدا شدند. سپس باکتری مورد نظر جدا شده روی محیط هوازی، با شستشوی سطح پلیت با محیط مایع، به حجم ۱۰۰ میکرولیتر رسانده شد و به محیط بی‌هوازی انتقال داده شد تا رشد آن مورد بررسی قرار گیرد.

برای بررسی بازه دمایی رشد، باکتری در دماهای بین ۳۰ تا ۸۰ درجه سانتی‌گراد برای مدت حداکثر یک هفته در گرمخانه نگهداری شد. دمای بهینه از روی پلیت مشخص شد.

از بین باکتری‌های هوازی، به دلیل رشد سریع‌تر و همچنین رشد در بازه دمایی مورد

گوشت ۰/۱ درصد، NaCl ۰/۵ درصد، آگار- آگار ۲/۰ درصد و کربوهیدرات ۱/۰ درصد بود.

بررسی فعالیت‌های آنزیمی

در مطالعه حاضر فعالیت چهار آنزیم ژلاتیناز، آمیلاز، کاتالاز و اکسیداز در باکتری مورد بررسی قرار گرفت. برای تعیین وجود فعالیت ژلاتیناز، باکتری روی محیط کشت MSA کشت داده شد که حاوی ۱/۵ درصد آگار و ۱۰/۰ درصد ژلاتین بود. مایع شدن محیط پس از رشد باکتری مشخص می‌کرد باکتری ژلاتیناز تولید می‌کند. وجود فعالیت آمیلازی با کشت سویه روی محیط MSA که حاوی ۱/۰ درصد نشاسته بود، تعیین شد. پس از رشد، به پلیت محلول ید اضافه شد تا میزان هیدرولیز نشاسته مشخص شود. بنفش نشدن پلیت نشان دهنده فعالیت آمیلازی بود. فعالیت کاتالازی با اضافه کردن یک کلنی باکتری به H_2O_2 روی لام مشخص شد. تولید حباب مشخص کننده تولید کاتالاز توسط باکتری است. فعالیت اکسیداز با استفاده از عامل Tetramethyl-P- TMPD (Phenylene Diamine) و بر اساس روش Jurtschuck و Mcquitty (۱۹۷۱) انجام و مشخص شد. ایجاد رنگ ارغوانی نشان دهنده فعالیت اکسیداز است.

بررسی DPA و لیپیدهای قطبی

شناسایی DPA (دی‌آمینو پیملیک اسید) در پپتیدوگلیکان سلول به روش هیدرولیز در اسید و شناسایی توسط کروماتوگرافی روی کاغذ انجام شد (Becker et al., 1964).

برای تشخیص لیپیدهای قطبی از روش کروماتوگرافی لایه نازک (TLC) استفاده شد. برای TLC دو بعدی از دو حلال کلروفرم-متانول-آب با نسبت ۴:۲۴:۶۵ (در جهت اول) و کلروفرم-استیک اسید-متانول-آب با نسبت ۴:۱۲:۸۰ (در جهت دوم) استفاده شد. سپس برای نمایان شدن لیپیدهای قطبی از عوامل ظاهر ساز مولیبدو فسفوریک اسید، مولیبدونوم آبی و نینهایدرین استفاده شد (Minnikin et al., 1984).

واکنش PCR برای بررسی توالی 16S rDNA

DNA ژنومی توسط روش Brown (۲۰۰۰) به دست آمد. واکنش PCR (-96 BioRad, Well Thermal Cycler, آمریکا) با استفاده از دو آغازگر B27F و U1492R (جدول ۱) انجام شد. آغازگرها توسط شرکت Bio Basic (کانادا) تولید شدند. آنزیم تک پلیمرز به شکل Master Mix (بکتا تجهیز آزما، ایران) تهیه شد.

جدول ۱: توالی آغازگرهای مورد استفاده در مطالعه حاضر

| توالی | آغازگر |
|----------------------------|---------------|
| 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' | B27F |
| 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3' | U1492R |

BLAST در بانک نوکلئوتیدی NCBI استفاده شد.

برای کشیدن درخت فیلوژنتیک 16S rDNA سویه مورد نظر با باکتری‌هایی که بیشترین یکسانی را نشان دهند از نرم‌افزار Clustalw2 در پایگاه داده EMBL استفاده شد.

نتایج

ویژگی‌های میکروبی

باکتری Gh1 کلنی‌های زرد کم‌رنگ گرد و کوچک محدبی را روی محیط MSA ایجاد کرد. زیر میکروسکوپ، باکتری به شکل میله‌ای و گرم مثبت با ابعاد ۴-۳×۱ میکرومتر و غیرمتحرک دیده شد. رنگ‌آمیزی اسپور، نشانگر اسپورهای مستطیل‌شکل انتهایی بود. شمارش تعداد باکتری‌ها زیر میکروسکوپ مشخص کرد که باکتری توان رشد بین دمای ۷۲-۳۰ درجه سانتی‌گراد را داشت؛ اما دمای مطلوب رشد بین ۶۰-۵۸ درجه سانتی‌گراد بود (جدول ۲).

اجزای واکنش PCR عبارت بودند از ۱۲/۵ میکرولیتر Master Mix، ۱ میکرولیتر B27F، ۱ میکرولیتر U1492R، ۱ میکرولیتر gDNA و ۹/۵ میکرولیتر H₂O مخصوص PCR. غلظت هر کدام از آغازگرها ۱ نانومول در هر ۲۵ میکرولیتر بود.

چرخه دمایی مورد استفاده در این واکنش شامل ۹۲ درجه سانتی‌گراد به مدت سه دقیقه، ۹۴ درجه سانتی‌گراد در ۴۵ ثانیه، ۵۸ درجه سانتی‌گراد در ۴۵ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد در ۴۵ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد در ۱۰ دقیقه بود. مراحل دو تا چهار ۳۰ بار تکرار شدند. توالی‌یابی به روش Sanger و همکاران (۱۹۹۷) با استفاده از دستگاه Applied Biosystems DNA Analyser (3730/3730x1, Thermo Fisher Scientific, آمریکا) در مرکز ذخائر ژنتیک جهاد دانشگاهی انجام شد. برای تشخیص میزان همولوژی توالی با توالی‌های موجود در بانک نوکلئوتیدی از نرم‌افزار

جدول ۲: برخی ویژگی‌های *Aeribacillus pallidus* Gh1

| شاخص‌ها | دمای رشد (°C) | دمای بهینه (°C) | pH رشد | pH بهینه | NaCl موثر بر رشد (%) | بی‌هوازی/هوازی | تحرك |
|---------|---------------|-----------------|--------|----------|----------------------|----------------|------|
| مقدار | ۷۲-۳۰ | ۵۸-۶۰ | ۶-۱۰ | ۸ | ۰-۱ | هوازی | - |

چهار آنزیم توسط سویه Gh1 تولید شدند (جدول ۳).

بررسی اثر مشتقات کربوهیدراتی روی رشد باکتری

بررسی اثر مشتقات کربوهیدراتی روی رشد باکتری Gh1 مشخص کرد تنها کربوهیدراتی که اثر مثبت قوی روی رشد آن می‌گذاشت، نشاسته بود. از سوی دیگر، آزمایش‌ها با استفاده از منابع کربنی مشتق شده از پروتئین، مانند عصاره مخمر، پیتون سویا و منابع مشابه روی رشد سویه اثر مثبت داشتند (جدول ۳).

بررسی DPA و لیپیدهای قطبی

آنالیز پپتیدوگلیکان سویه Gh1 نشان داد DPA در دیواره این باکتری، با روش‌های مورد استفاده، قابل تشخیص نبود. بررسی لیپیدهای قطبی باکتری وجود فسفاتیدیل اتانول آمین (Phosphatidyl Ethanolamine: PE)، دی‌فسفاتیدیل گلیسرول (Diphosphatidyl Glycerol: DPG) و فسفاتیدیل گلیسرول

سویه Gh1 در pH بین ۶ تا ۱۰ رشد می‌کرد و pH مطلوب رشد ۸ بود. pH در انتهای دوره نگهداری هم سنجش شد تا از ثبات آن اطمینان حاصل شود. آزمایش‌ها حداقل سه بار تکرار شدند.

سویه Gh1 در محیط بی‌هوازی رشد نکرد. هنگام رشد باکتری در محیط مایع مشخص شد که در صورت کاهش سرعت حرکت گرمخانه از ۱۸۰ rpm به ۱۳۰ rpm، رشد باکتری با مشکل روبرو می‌شد.

سویه Gh1 در غلظت‌های ۰-۷ درصد NaCl در محیط MSA کشت داده شد. نتایج نشان داد که در عدم حضور NaCl، این سویه رشد کرد، اما در غلظت‌های ۱/۰-۵/۰ درصد میزان رشد آن افزایش پیدا یافت. با افزایش غلظت NaCl به ۲ درصد رشد باکتری متوقف شد (جدول ۱).

فعالیت آنزیمی

آزمایش‌های مقدماتی روی تولید چهار آنزیم ژلاتیناز، آمیلاز، کاتالاز و اکسیداز نشان داد هر

توالی‌یابی شد، در جدول ۵ آورده شده است. بررسی میزان همولوژی توالی به دست آمده با توالی‌های موجود در بانک نوکلئوتیدی NCBI با استفاده از نرم‌افزار BLAST نشان داد که توالی به دست آمده با توالی 16S rDNA از باکتری *Aeribacillus pallidus* strain DSM 3670 ۹۹ درصد همولوژی داشت. بررسی دقیق‌تر مشخص کرد که ۴ باز در توالی 16S rDNA این دو باکتری با هم متفاوت بود (۹۹/۷۲ درصد همولوژی).

(Phosphatidyl Glycerol: PG) را تایید کرد (جدول ۴ و شکل ۱). همچنین، پنج نوع لیپید غیرفسفات شده (L1-6) و شش نوع فسفولیپید (PL1-6) در *Aeribacillus pallidus* Gh1 شناسایی شد.

بررسی توالی 16S rDNA

واکنش PCR تحت شرایط و با آغازگرهای گفته شده منجر به تولید فرآورده‌ای با طول حدود ۱۵۰۰ bp شد. توالی فرآورده PCR که با استفاده از روش Sanger و همکاران (۱۹۹۷)

جدول ۳: فعالیت آنزیمی و نحوه استفاده از منابع مختلف کربوهیدراتی در سویه *Aeribacillus pallidus* Gh1

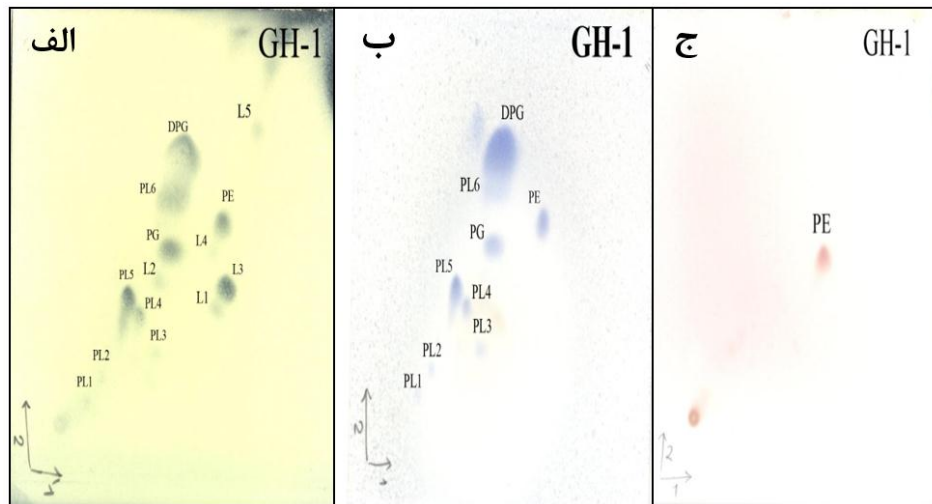
| Gh1 | شاخص‌ها |
|-----|----------------|
| + | ژلاتیناز |
| + | آمیلاز |
| + | کاتالاز |
| + | اکسیداز |
| - | آرابینوز |
| - | سیترات |
| - | لاکتوز |
| W | مالتوز |
| - | مانیتول |
| W | میو- اینوزیتول |
| W | ساکرز |
| - | گزیلوز |

W: نشانگر مثبت ضعیف است.

جدول ۴: وجود لیپیدهای مختلف در غشای سویه *Aeribacillus pallidus* Gh1

| Gh1 | لیپید |
|-----|------------|
| + | PG |
| + | PE |
| + | DPG |
| + | PL |
| + | UPL |

PG: فسفاتیدیل گلیسرول؛ PE: فسفاتیدیل اتانول آمین؛
 DPG: دی فسفاتیدیل گلیسرول؛ PL: فسفولیپید؛ UPL:
 چربی های غیر فسفولیپیدی.



شکل ۱: لیپیدهای قطبی سویه *Aeribacillus pallidus* Gh1 دی فسفاتیدیل گلیسرول (DPG)، فسفاتیدیل گلیسرول (PG)، فسفاتیدیل اتانول آمین (PE)، فسفولیپیدها (PL1-6) و لیپیدهای (L1-5) ناشناخته در نتیجه دیده می شوند.

جدول ۵: توالی 16S rDNA سویه *Aeribacillus pallidus* Gh1

```

GCAGTCGAGCGGACCGAAGGGAGCTTGCTCCTTTAGGTTAGCGGCGGACGGGTG
AGTAACACGTGGGCAACCTGCCCTGCAGACTGGGATAACTTCGGGAAACCGGAG
CTAATACCGGATAACACCGAAAACCGCATGGTTTTTCGGTTGAAAGGCGGCTTTTA
GCTGTCACTGCAGGATGGGCCCGCGGCATAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCT
CACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGACCGGCCACACTGGGAC
TGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATG
GACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGCGAAGAAGGTCTTCGGATCGTA
AAGCTCTGTTGTCAGGGAAGAACAAGTACCGTTGCAACAGGGCGGTACCTTGAC
GGTACCTGACGAGGAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACG
TAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTTTC
CTTAAGTCTGATGTGAAATCTCGCGGCTCAACCGCGAGCGGCCATTGGAACTGG
GGAACCTGAGTGACAGGAGAGGGGAGCGGAATTCACGTGTAGCGGTGAAATGCG
TAGAGATGTGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGCCTGTAAGTAC
GCTGAGGCGCGAAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCAC
GCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTATCCACCCTTTAGTGCTGCAGC
AAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAAACCAAAG
GAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAAC
GCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCCCTGACAACCCTAGAGATAGGGCGTT
CCCCTTTTCGGGGACAGGGTGACAGGTGGTGATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGCTG
GAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCTTGACCTTAGTTGCCAGCA
TTCAGTTGGGCACTTAAGGTGACTGCCGGCTAAAAGTCGGAGGAAGGTGGGGA
TGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGG
TGGTACAAAGGGCAGCGAAAACCGCGAGGTGGAGCGAATCCCAAAAAACCCTCT
CAGTTCGGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATC
GCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGTCTTGTACACACCGCCCGTC
ACACCACGAGAGTTTGTAAACACCCGAAGTCGGTGGGGTAACCCTTACGGAGCCA
GCCGCCG

```

توالی به دست آمده، در بانک نوکلئوتیدی NCBI با شماره دسترسی (Accession Number) KR262713 بایگانی شد.

درخت فیلوژنتیک برای سویه‌هایی که میزان همولوژی بالاتری را نشان می‌دادند، کشیده شد (شکل ۲).



شکل ۲: درخت فیلوژنتیک به دست آمده با استفاده از نرم افزار Clustalw2 و توالی های 16S rDNA که همولوژی بالایی با یکدیگر دارند. هر چقدر میزان شباهت بیشتر باشد، عدد اعشار کوچکتر است. سویه *Aeribacillus pallidus* Gh1 همولوژی بیشتری با *Aeribacillus pallidus* 3670 نسبت به باسیلوس های دیگر داشت.

بحث
 R-35634T سویه ای بی هوازی اختیاری است (Coorevits et al., 2012). بر خلاف گزارش های قبلی (Minana-Galbis et al., 2010; Coorevits et al., 2012) *Aeribacillus pallidus* Gh1 غیرمتحرک بود. عدم تحرک این سویه هم زیر میکروسکوپ قابل مشاهده بود و هم روی محیط کشت SIM. گزارش های دیگر نشان داده اند که حساسیت سویه های مختلف *Aeribacillus pallidus* به NaCl تفاوت دارد. در حالی که سویه TD-1 در غلظت ۱۰ درصد رشد می کند (Yasawong et al., 2011)، سویه R-35634 در غلظت ۵ درصد هم رشد نمی کند (Coorevits et al., 2010).

نتایج به دست آمده در این بررسی و مقایسه آن با مطالعات پیشین نشان داد که چند ویژگی عمده پیچیده، مانند تحرک و تولید انرژی، به مفهوم هوازی یا بی هوازی بودن، در بین سویه های مختلف *Aeribacillus* تفاوت دارند. تحرک و نوع تولید انرژی پدیده هایی چندژنی هستند. با این وجود به نظر می رسد حتی این نوع صفت های پیچیده نیز امکان دارد به وسیله انتقال افقی ژن از یک نوع باکتری به نوع دیگری انتقال داده شوند. در ارتباط با بررسی حاضر، در حالی که سویه های Gh1 و 3670T (Minana-Galbis et al., 2010)، هوازی هستند، سویه

جدول شماره ۶ این تفاوت‌ها را نشان می‌دهد. (2012). آزمایش‌های مقدماتی روی تولید چهار آنزیم ژلاتیناز، آمیلاز، کاتالاز و اکسیداز توسط سویه Gh1 و مقایسه آن با بررسی‌های پیشین روی سویه‌های نام برده شده الگوی مشابهی را برای هر سه سویه نشان داد. هر چهار آنزیم توسط سویه Gh1 تولید شدند. بررسی اثر مشتقات کربوهیدراتی روی رشد Gh1 مشخص کرد این سویه و سویه R-35634T از این نظر مشابه هستند که کربوهیدرات‌های خالص، ماده کربنی مورد علاقه این باکتری‌ها نیستند. Coorevits و همکاران (۲۰۱۲) پیشنهاد کرده‌اند وجود یا عدم وجود فسفاتیدیل اتانول آمین (PE) می‌تواند به عنوان معیاری برای تفکیک *Geobacilli* از *Aeribacilli* قرار گیرد. نتایج گزارش شده در اینجا (جدول ۷) نشان می‌دهد PE در *Aeribacillus pallidus* Gh1 هم وجود دارد. در مواردی مشابه، گمان می‌رفت بتوان از نوع اسید چرب موجود در باکتری، گونه‌های مختلف را از یکدیگر تشخیص داد. اما بررسی نتایج گزارش شده مشخص کرد که این نتایج نمی‌توانند دقت بالایی داشته باشند. برای مثال، وجود اسید چرب Iso-C_{15:0} در *Aeribacillus* ۲۲/۳ درصد گزارش شده است (Coorevits et al., 2012)، در حالی که Scholz و همکاران (۱۹۸۷) مقدار آن را ۶/۲ درصد و Yasawong و همکاران (۲۰۱۱) مقدار آن را ۱۶/۳ درصد گزارش کردند. نتایج مشابه دیگری در مورد Iso-C₁₇ و Anteiso-C₁₇ گزارش شده است.

جدول شماره ۶: مقایسه برخی ویژگی‌های سویه‌های *Aeribacillus pallidus*

| سویه | دمای رشد (°C) | دمای بهینه (°C) | pH بهینه | NaCl موثر بر رشد (%) | بی‌هوازی | تحرك |
|----------------------|---------------|-----------------|----------|----------------------|----------|------|
| Gh1 | ۷۲-۳۰ | ۵۸-۶۰ | ۸ | ۰-۱ | - | - |
| TD1* | ۶۷-۴۵ | ۵۵-۶۰ | ۸-۷ | ۰-۱۰ | ND | + |
| R-35634 ^T | ۶۵-۳۷ | ۵۰ | ۸-۷ | ۰-۵ | + | ND |
| 3670 ^T | ۷۰-۳۰ | ۶۰+ | ۸-۷ | ND | - | + |

*: سویه TD-1 توسط Yasawong و همکاران (۲۰۱۱)، سویه R-35634^T توسط Coorevits و همکاران (۲۰۱۲) و سویه 3670^T توسط Minana-Galbis و همکاران (۲۰۱۰) گزارش شد. ND: نامشخص (Not Determined).

جدول شماره ۷: مقایسه لیپیدهای موجود در سه سویه *Aeribacillus pallidus*

| 3670 ^T | R-35634 ^T | Gh1 | لیپید |
|-------------------|----------------------|-----|-------|
| + | + | + | PG |
| - | - | + | PE |
| + | + | + | DPG |
| ND | - | + | PL |
| + | - | + | UPL |

PG: فسفاتیدیل گلیسرول؛ PE: فسفاتیدیل اتانول آمین؛ DPG: دی فسفاتیدیل گلیسرول؛ PL: فسفولیپید؛ UPL: چربی‌های غیر فسفولیپیدی.
 ND: نامشخص (Not Determined).
 *: سویه R-35634^T توسط Coorevits و همکاران (۲۰۱۲) و سویه 3670^T توسط Minana-Galbis و همکاران (۲۰۱۰) گزارش شد.

cited in: Lebedinsky et al., 2007; Koonin and Wolf, 2008) مانند پروتئین‌های درگیر در همانندسازی اسیدهای نوکلئیک و یا زنجیره تنفسی. برای مثال، ژن‌های کد کننده پروتئین‌های Rec (Zeigler, 2005;) و par (Rossi et al., 2006) و gyr (Kasai et al., 1998; Tourova et al., 2010) به همین منظور مورد بررسی قرار گرفتند.
 باکتری *Aeribacillus pallidus* تولید کننده انواع آنزیم‌هایی است که از نظر صنعتی اهمیت بالایی دارند. علاوه بر آمیلاز و پروتئاز، این باکتری پکتات‌لیاز (Yasawong et al., 2011) و لیپاز (Lokre and Kadam, 2014) هم تولید می‌کند. لیپاز گزارش شده توسط

ویژگی‌های مونوژنیکی مانند تولید آنزیم‌های هیدرولیتیک مختلف (آمیلاز، پروتئاز، لیپاز و غیره) ارزش تشخیصی برای تعیین گونه و جنس و حتی تاکسون‌های بالاتر، ندارند. گزارش این نوع صفت‌ها، که در گزارش فعلی هم آمده، صرفاً به منظور فراهم کردن اطلاعات بیشتر در مورد سویه مورد نظر است.
 در نتیجه مشخص است که برای تعیین ارتباط فیلوژنتیک به شکلی دقیق‌تر بین سویه‌های مختلف باکتریایی لازم است یا از صفت‌هایی استفاده کرد که پیچیده هستند و یا همان طور که Woese نشان داد، باید صفت‌هایی را بررسی کرد که در میانکنش با اجزای دیگر یک سیستم پیچیده عمل می‌کنند

Kadam و Lokre (۲۰۱۴) دارای فعالیت مطلوب در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد است. همچنین نوعی امولسیفایر زیستی نیز توسط Zheng و همکاران (۲۰۱۲) کشف شده است. نتایج به دست آمده در این بررسی نشان داد که باکتری توانایی رشد در بازه نسبتاً گسترده‌ای از دما و pH را دارد. با توجه به انواع آنزیم‌هایی که در این باکتری تولید می‌شوند و پتانسیل استفاده در صنایع را دارند، به نظر می‌رسد ژنوم این باکتری منبع مناسبی برای ژن این نوع آنزیم‌ها باشد. همچنین می‌توان نتیجه‌گیری کرد برای طبقه‌بندی اعضای خانواده Bacillaceae نیاز به بررسی‌های بیشتری باشد.

منابع

- Banat I.M., Marchant R. and Rahman T.J. 2004.** *Geobacillus debilis* sp. nov., a novel obligately thermophilic bacterium isolated from a cool soil environment, and reassignment of *Bacillus pallidus* to *Geobacillus pallidus* comb. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 54: 2197–2201.
- Baron E.J. and Finegold S.M. 1990** Diagnostic Microbiology. Mosby USA. 861P.
- Becker B., Lechevalier M.P., Gordon R.E., Lechevalier H.A. 1964.** Rapid differentiation between *Nocardia* and *Streptomyces* by paper chromatography of whole-cell hydrolysates. Applied Microbiology, 12: 421–423.
- Brown T.A. 2000.** Essential Molecular Biology, A Practical Approach. Oxford University Press, UK. 243P.
- Coorevits A., Dinsdale A.E., Halket G., Lebbe L., De Vos P., Van Landschoot A. and Logan N.A. 2012.** Taxonomic revision of the genus *Geobacillus*: Emendation of *Geobacillus*, *G. stearothermophilus*, *G. jurassicus*, *G. toebii*, *G. thermodenitrificans* and *G. thermoglucosidans* (nom. corrig., formerly '*thermoglucosidasius*'); transfer of *Bacillus thermantarcticus* to the genus as *G. thermantarcticus* comb. nov.; proposal of *Caldibacillus debilis* gen. nov., comb. nov.; transfer of *G. tepidamans* to *Anoxybacillus* as *A. tepidamans* comb. nov.; and proposal of *Anoxybacillus caldiproteolyticus* sp. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 62: 1470–1485.
- Jurtshuk, P. Jr and McQuitty D.N. 1976** Use of a Quantitative Oxidase Test for Characterizing Oxidative Metabolism in Bacteria. Applied and Environmental Microbiology. 31(5): 668–679.
- Kasai H., Watanabe K., Gasteiger E., Bairoch A., Isono K., Yamamoto S. Harayama S. 1998.** Construction of the gyrB database for the identification and classification of bacteria. Genome Informatics, 9: 13–21.
- Koonin E.V. and Wolf Y.I. 2008.** Genomics of bacteria and archaea: The emerging dynamic view of the prokaryotic world. Nucleic Acids Research, 36(21): 6688–6719.
- Lebedinsky A.V., Chernyh N.A. and Bonch Osmolovskaya E.A. 2007.** Phylogenetic systematics of microorganisms inhabiting thermal environments. Biochemistry (Moscow), 72(12): 1299–1312.

- Lokre S.S. and Kadam D.G. 2014.** Production and characterization of thermostable lipase from *Aeribacillus* sp. SSL096201. GERF Bulletin of Biosciences, 5(2): 1–7.
- Minana-Galbis D., Pinzon D.L., Loren J.G., Manresa A., Oliart-Ros R.M. 2010.** Reclassification of *Geobacillus pallidus* (Scholz et al. 1988) Banat et al. 2004 as *Aeribacillus pallidus* gen. nov., comb. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 60: 1600–1604.
- Minnikin D.E., O'Donnell A.G., Goodfellow M., Alderson G., Athalye M., Schaal A. and Parlett J.H. 1984.** An integrated procedure for the extraction of isoprenoid quinones and polar lipids. Journal of Microbiological Methods, 2: 233–241.
- Nazina T.N., Tourova T.P., Poltarau A.B., Novikova E.V., Grigoryan A.A., Ivanova A.E., Lysenko A.M., Petrunyaka V.V., Osipov G.A., Belyaev S.S. and Ivanov M.V. 2001.** Taxonomic study of aerobic thermophilic bacilli: Descriptions of *Geobacillus subterraneus* gen. nov., sp. nov. and *Geobacillus uzenensis* sp. nov. from petroleum reservoirs and transfer of *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus stercorarius*, *Bacillus thermocatenulatus*, *Bacillus thermoleovorans*, *Bacillus kaustophilus*, *thermoglucosidasius* and *Bacillus thermodenitrificans* to *Geobacillus* as the new combinations *G. stearothermophilus*, *G. thermocatenulatus*, *G. thermoleovorans*, *G. kaustophilus*, *G. thermoglucosidasius* and *G. thermodenitrificans*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 51: 433–446.
- Parte A.C. 2018.** LSPN- List of prokaryotic names with standing in nomenclature. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 68(6): 1825–1829.
- Pikuta E., Cleland D. and Tang J. 2003.** Aerobic growth of *Anoxybacillus pushchinoensis* K1T: Emended descriptions of *A. pushchinoensis* and the genus *Anoxybacillus*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 53: 1561–1562.
- Pikuta E., Lysenko A., Chuvilskaya N., Mendrock U., Hippe H., Suzina N., Nikitin D., Osipov G. and Laurinavichius K. 2000.** *Anoxybacillus pushchinensis* gen. nov., sp. nov., a novel anaerobic, alkaliphilic, moderately thermophilic bacterium from manure, and description of *Anoxybacillus flavithermus* comb. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 50: 2109–2117.

- Rossi F., Dellaglio F. and Torriani S. 2006.** Evaluation of recA gene as a phylogenetic marker in the classification of dairy propionibacteria. *Systematic and Applied Microbiology*, 29: 463–469.
- Sanger F., Nicklen S. and Coulson A.R. 1977.** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of National Academy of Sciences USA*, 74(12): 5463–5467.
- Schleifer K.H. 2008.** The low G + C Gram-positive Bacteria. P: 19–328. In: De Vos P., Garrity G., Jones D., Krieg N.R., Ludwig W., Rainey F.A., Schleifer K.H. and Whitman W.B. (Eds.). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 3: The Firmicutes. Springer, New York.
- Scholz T., Demharter W. Hensel R. and Kandler O. 1987.** *Bacillus pallidus* sp. nov., a new thermophilic species from sewage. *Systematic and Applied Microbiology*, 9: 91–96.
- Tourova T.P., Korshunova A.V., Mikhailova E.M., Sokolova D.S., Poltarau A.B. and Nazina T.N. 2010.** Application of gyrB and parE sequence similarity analyses for differentiation of species within the genus *Geobacillus*. *Microbiology*, 79: 356–369.
- Yasawong M., Areekit S. Pakpitchareon A., Santiwatanakul S. and Chansiri K. 2011.** Characterization of thermophilic halotolerant *Aeribacillus pallidus* TD1 from Tao Dam Hot Spring, Thailand. *International Journal of Molecular Sciences*, 12: 5294–5303.
- Zeigler D.R. 2005.** Application of a recN sequence similarity analysis to the identification of species within the bacterial genus *Geobacillus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55: 1171–1179.
- Zheng C., Li Z., Su J., Zhang R., Liu C. and Zhao M. 2012.** Characterization and emulsifying property of a novel bioemulsifier by *Aeribacillus pallidus*. *Journal of Applied Microbiology*, 113(1): 44–51.



Research Paper

Identification of a strictly aerobic *Aeribacillus pallidus* strain Gh1 from a hot water spring in Gheynarjeh, Ardebil Province

Mahdi Rasa^{1*}

Received: November 2018

Accepted: January 2019

Abstract

Water samples were collected from Gheynarjeh hot water spring, around Sabalan Mountain in Ardebil province. One isolate (Gh1), isolated from the hot water spring was chosen for further studies. This selection was based on the isolates ability to grow faster and within the temperature limits chosen. Isolate characteristics were determined by culture on various selective aerobic and anaerobic media, biochemical assays, identification of typical lipids, 16S rDNA sequencing and drawing the phylogenetic tree. Isolate Gh1 was 1µm wide and 3-4µm in length and an endospore-forming non-motile Gram positive bacillus with rectangular terminal spores. The optimal growth temperature was 58-60°C, with T_{min} and T_{max} at 30°C and 72°C, respectively. The optimal pH for growth was 8.0 and it grew between pH 6 and 10. NaCl concentrations of 0.5–1.0% encouraged growth, but at 2% NaCl, growth was inhibited. The only carbohydrate source with a positive effect on bacterial growth was starch. The isolate exhibited amylolytic as well as gelatinolytic, catalase and oxidase activities. The isolate was aerobic and no growth was observed on anaerobic medium. Cell wall fatty acid analysis showed the presence of phosphatidyl ethanolamine, diphosphatidyl glycerol, phosphatidyl glycerol and several unidentified lipids and phospholipids. Diaminopimelic acid could not be detected in the peptidoglycan. The 16S rDNA sequence analysis exhibited 99.72% identity with *Aeribacillus pallidus*. Other important characteristics, such as movement and anaerobiosis were different from those previously reported isolates. In addition, the results showed that the presence/absence of phosphatidyl ethanolamine cannot be used as a variable for differentiating between *Geobacillus* and *Aeribacillus*.

Key words: *Hot Spring, Thermophile, Amylase, Gh1, 16S rRNA, Aeribacillus, Diaminopimelic Acid, Phospholipid.*

1- Scientific Member in Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran.

*Corresponding Author: rassa9@yahoo.com