

## جداسازی و تشخیص دو گونه استافیلوکوس از آب‌های شور استان گلستان

### چکیده

دریاچه‌های شور با محدوده شوری نزدیک به آب دریا، محیط‌های پرشور بوده اما اغلب دارای طیف وسیعی از عوامل میکروبی می‌باشند. هدف از این مطالعه جداسازی باکتری‌های هالوفیل و بی‌نهایت هالوفیل از آب‌های شور اینچه‌برون، آماگل، آجی گل با دو روش بیوشیمیایی و مولکولی و همچنین مقایسه کارایی این دو روش می‌باشد. سال ۱۳۹۴، از ۳ دریاچه اینچه‌برون، آماگل و آجی گل، تعداد ۵۱ نمونه (هرکدام ۱۷ نمونه) از مناطق مختلف با EC و pH متفاوت جمع‌آوری شد. این ایزوله‌ها بر روی محیط کشت انتخابی Saline nutrient broth کشت داده شدند. ایزوله‌ها براساس مورفولوژی کلنی و سلول بررسی شدند. مورفولوژی کلنی‌ها با تأکید بر تولید پیگمان، اندازه کلنی و کدورت تعیین شدند. این خصوصیات از طریق رشد کشت‌ها در EC، pH و غلظت نمک ایتیم انجام شد. تست‌های بیوشیمیایی کاتالاز، ژلاتیناز، آمیلاز، اکسیداز، سیترات، اوره آز، ایندول، وژسپروسکوئر، تخمیر اکسیداسیون (لاکتوز، سوکرز، دکستروز) و روش مولکولی (PCR ژن کروموزومی tuf) انجام شد. براساس تست‌های بیوشیمیایی و روش مولکولی تعداد ۲۰ ایزوله هالوفیل و بی‌نهایت هالوفیل از آب‌های شور اینچه‌برون، آماگل، آجی گل جداسازی شد که فراوان‌ترین گونه استافیلوکوکوس اپیدرمایدیس با ۹ مورد، پس‌از آن استافیلوکوکوس کپیتیس مشاهده شد. با مقایسه روش بیوشیمیایی و مولکولی مشاهده شد که تست‌های بیوشیمیایی در ۹ مورد قادر به تشخیص گونه نبودند و بر این اساس، روش مولکولی به نسبت روش بیوشیمیایی از کارایی بالاتری برخوردار می‌باشد. محیط‌های پرشور به علت سختی شرایط زندگی، از تنوع زیستی کمتری نسبت به محیط‌های معتدل برخوردارند؛ اما از نظر حضور میکروارگانیسم‌های نمک دوست و تحمل‌کننده نمک، تنوع بالایی دارند و انواعی از نمک دوست‌های نسبی و تحمل‌کننده‌های نمک در این محیط‌ها وجود دارند.

**واژگان کلیدی:** اینچه‌برون، آجی گل، آماگل، tuf، استافیلوکوکوس اپیدرمایدیس،

استافیلوکوکوس کپیتیس.

### مقدمه

هالوفیل‌ها ارگانیسم‌های نمک دوستی می‌باشند که در محیط‌های بسیار نمکی زندگی می‌کنند. هالوفیل‌ها عمدتاً شامل میکروارگانیسم‌های پروکاریوتی و یوکاریوتی با ظرفیت ایجاد توازن در فشار اسمزی محیط و مقاومت به اثرات دنا توره‌کنندگی نمک‌ها می‌باشند. در بین میکروارگانیسم‌های هالوفیل، تنوعی از آرکی‌های هتروتروف و متانوژنیک؛ باکتری‌های فتوسنتتیک، لیتوتروف و هتروتروف؛ و یوکاریوت‌های فتوسنتتیک و هتروتروفیک مشاهده می‌شوند. نمونه‌ای از میکروارگانیسم‌های هالوفیل با انتشار وسیع و سازگاری خوب شامل گونه‌های آرکی هالوباکتریوم، سیانوباکتریایی مانند *Aphanothece halophytica* و جلبک سبز *Dunaliella salina* می‌باشد. در بین یوکاریوت‌های چندسلولی، گونه‌هایی از میگو آب‌شور و مگس آب‌شور معمولاً محیط‌های بسیار شور یافت شده‌اند (Arora and et al., 2014).

### الهام خواستار<sup>۱</sup>

### آی‌ر جمالی<sup>۲</sup>

### فرهاد نیک‌نژاد<sup>۳\*</sup>

۱. کارشناسی ارشد گروه میکروبیولوژی، واحد دامغان، دانشگاه آزاد اسلامی، دامغان، ایران.
۲. استادیار گروه میکرب‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران.
۳. استادیار گروه قارچ‌شناسی، مرکز تحقیقات علوم آزمایشگاهی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران.

### \*مسئول مکاتبات:

fniknezhad@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۰۶/۲۶

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۴/۲۹

کد مقاله: ۱۳۹۷۰۱۰۴۴۶

این مقاله برگرفته از پایان‌نامه کارشناسی

ارشد است.



باکتری هالوفیل پتانسیل بالایی برای فعالیت‌های زیست فن‌آورانه برای حداقل دو دلیل دارند: ۱. فعالیت‌های آن‌ها در محیط‌های طبیعی با توجه به مشارکت آن‌ها در پروسه‌های بیوشیمیایی C، N، S و P، تشکیل و انحلال کربنات‌ها، ایموبیلیزاسیون فسفات‌ها و تولید فاکتورهای رشد و مواد مغذی می‌باشد و ۲. نیازهای تغذیه‌ای آن‌ها ساده می‌باشند. اکثراً می‌توانند از طیف وسیعی از ترکیبات به‌عنوان مخزن انرژی و کربن استفاده کنند. بیشتر آن‌ها می‌توانند در غلظت‌های بالای نمک رشد کرده و خطر آلودگی را کاهش دهند. علاوه بر این، چندین ابزار ژنتیکی برای باکتری‌های غیرهالوفیل گسترش یافته که می‌تواند برای هالوفیل‌ها بکار گرفته شوند و بدین ترتیب دستکاری ژنتیکی آن‌ها امکان‌پذیر می‌باشد (Wackett and *et al.*, 2012).

هالوفیل‌ها در بین سیانوباکتری‌ها، شاخه فلاوو باکتریوم- سیتوفاکا، اسپروکت‌ها و اکتینومایست‌ها یافت می‌شود. در دودمان باکتری‌های گرم مثبت (Firmicutes)، هالوفیل‌ها در هر دو شاخه باکتری‌های هوازی (باسیلوس و ارگانوسم‌های وابسته) و همچنین بی‌هوازی یافت می‌شود. به‌طور کلی، این‌طور بیان می‌شود که انواع باکتریایی نسبت به انواع دیگر بی‌نهایت نمک دوست‌ها، متوسط می‌باشند (Jacob and *et al.*, 2012).

مهرشاد و همکاران در سال ۱۳۹۱، تنوع زیستی باکتری‌های نمک دوست و تحمل‌کننده نمک سواحل غربی دریاچه ارومیه را مورد مطالعه قرار دادند. در روش مبتنی بر کشت، باکتری‌های نمک دوست و دارای تحمل نسبت به وجود نمک در شرایط هوازی در چهار محیط کشت MH، SWN، SWNLN و MHLN جداسازی شدند. جدایه‌ها بر اساس تفاوت‌های کلونی، واکنش گرم، رنگ‌آمیزی اسپور و ویژگی‌های بیوشیمیایی اولیه تفکیک شدند (Mehrshad and *et al.*, 2012).

زرپرور و همکاران در سال ۱۳۹۳، بررسی تنوع زیستی باکتری‌های نمک دوست نسبی و تحمل‌کننده نمک قابل کشت در تالاب پرشور اینچه برون را انجام دادند. تالاب اینچه برون در شمال ایران در نزدیکی مرز ترکمنستان واقع شده و شوری و تغییرات pH آن قابل توجه است. در شهریور ۱۳۸۹ از آب، خاک و نمک ۴ منطقه تالاب نمونه‌برداری شد. ۴۰۰ جدایه خالص‌سازی و ۵۵ سویه PCR گردید (Zarparvar and *et al.*, 2014).

استافیلوکوک‌ها سطوح بالایی از نمک را تحمل می‌کند. سویه‌های استافیلوکوک عموماً در ۱۰-۷ درصد نمک رشد می‌کنند. اما مقاومت تا ۲۰ درصد نمک در برخی سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس مشاهده شده است. به‌طور کلی فعالیت آبی (water activity) ۰/۸۶ به‌عنوان محدوده رشد استافیلوکوکوس اورئوس در نظر گرفته می‌شود. در طی فشار اسمزی، استافیلوکوک‌ها فشار تورگر را از طریق افزایش غلظت محلول‌های رقابتی در سیتوپلاسم، افزایش می‌دهند. گلاسیسین بتائین و پرولین محلول‌های رقابتی اصلی در استافیلوکوکوس اورئوس هستند. همچنین در طی فشار اسمزی بالا تولید توکسین متوقف می‌شود. بیوفیلیم نیز در طی فشارهای محیطی، ممکن است از باکتری محافظت کند. سدیم کلراید تشکیل بیوفیلیم را در استافیلوکوک‌ها افزایش می‌دهد. همچنین بیان ژن‌های ica توسط سدیم کلراید القاء می‌شود. ژن rbf یک پروتئین ۸۰ کیلودالتونی را کد می‌کند که توسط سدیم کلراید القاء می‌شود و یک تنظیم‌کننده مهم برای القاء تشکیل بیوفیلیم توسط نمک و کلوز می‌باشد (Rode and *et al.*, 2012).

تالاب اینچه برون در شمال ایران در نزدیکی مرز ترکمنستان واقع شده و شوری و تغییرات pH آن قابل توجه است. آلاگل، آلاگل و آجی گل سه تالاب بین‌المللی بخش مرزی داشلی برون گنبدکاووس می‌باشند. برای رسیدن به این تالاب‌ها باید مسیر ۸۰ کیلومتری را از شهر گنبدکاووس تا بخش مرزی داشلی برون طی کرد. هدف از این مطالعه جداسازی باکتری‌های نمک دوست و متحمل نمک از آب‌های شور اینچه برون، آلاگل، آجی گل با دو روش بیوشیمیایی و مولکولی و همچنین مقایسه کارایی این دو روش می‌باشد.

## مواد و روش‌ها

نمونه برداری به مدت ۴ ماه (هفته‌ای یکبار)، از بهمن‌ماه سال ۱۳۹۳ تا اردیبهشت‌ماه سال ۱۳۹۴ از مناطق مختلف با EC و pH متفاوت دریاچه‌های اینچه برون و آماگل (از نقاط عمیق) و آجی گل (از محل کم عمق به علت باتلاقی بودن تالاب) جداسازی شد. تعداد ۱۷ نمونه از دریاچه اینچه برون، ۱۷ نمونه از آماگل و ۱۷ نمونه از آجی گل از سطوح، EC و pH متفاوت جمع‌آوری شد. این ایزوله‌ها بر روی محیط کشت انتخابی Saline nutrient broth رشد کرده و شوند و پس از گذشت ۷ روز، بر روی محیط کشت نوترینت آگار ۱۰ درصد کشت داده شدند. برای تشخیص بیشتر انتخاب شدند. نمونه‌ها براساس مورفولوژی کلنی‌ها و سلول در رنگ‌آمیزی گرم، بررسی شدند. مورفولوژی کلنی با تأکید بر تولید پیگمان، اندازه کلنی و کدورت تعیین شدند. این خصوصیات از طریق رشد کشت‌ها در EC، pH و غلظت نمک ایتیمم انجام شد. رنگ آمیزی گرم و تست‌های بیوشیمیایی کاتالاز، ژلاتیناز، آمیلاز، اکسیداز، سترات، اوره آز، ایندول، وژسپروسکوئر، تخمیر/اکسیداسیون (لاکتوز، سوکرز، دکستروز) انجام شد. در رنگ‌آمیزی گرم کوکسی‌های گرم مثبت خوشه‌ای مشاهده شدند (Azhar, 2014).

**تست کاتالاز:** از کشت نمونه بر روی لام حاوی ۳ درصد پراکسید هیدروژن قرار داده شد. ظهور حباب نشان‌دهنده واکنش مثبت بوده و حضور آنزیم کاتالاز تأیید می‌شود. اگر گاز تولید نشود، این واکنش منفی می‌باشد (Azhar, 2014).

**تست آمیلاز:** در این تست، ایزوله‌ها بر روی پلیت Starch agar تلقیح و در ۳۷ درجه برای ۲ روز انکوبه می‌شوند. بعد از انکوباسیون، محلول یدی بر روی آگار ریخته شده و هیدرولیز نشاسته از طریق بررسی ناحیه فاقد رشد، مورد ارزیابی قرار می‌گیرد (Azhar, 2014).

**مایع سازی ژلاتین:** ژلاتین پروتئینی است که از طریق هیدرولیز کلاژن تولید می‌شود. هیدرولیز ژلاتین توسط میکروارگانسیم‌هایی که قادر به تولید اگزوانزیم پروتولیتیک بنام ژلاتیناز هستند، انجام می‌شود. تجزیه نشاسته در محیط کشت توسط یک اگزوانزیم انجام شده که می‌تواند از طریق مشاهده مایع شدن ژلاتین تعیین شود (از طریق روان شدن محیط کشت ژلاتین آگار با محلول مرکوریک کلراید و مشاهده ناحیه شفاف خط رشد) زیرا ژلاتین با مواد شیمیایی رسوب کرده و تشکیل پروتئین کوآگوله می‌دهد اما محصول انتهایی تجزیه (آمینواسیدها) توسط همان مواد شیمیایی رسوب نمی‌کند (Azhar, 2014).

**تست اوره آز:** این تست از طریق رشد ارگانسیم بر روی محیط کشت اوره برات یا اوره آگار حاوی ایندیکاتور pH فنلرد (pH 6.8) انجام شد. در طول انکوباسیون، میکروارگانسیم‌های دارای اوره آز، تولید آمونیاک کرده که pH محیط کشت را بالا می‌برد. در pH بالاتر، فنل رد از زرد (pH برابر با ۶/۸) به قرمز صورتی پررنگ تغییر می‌کند. عدم تغییر رنگ، نشان‌دهنده فقدان تولید آنزیم اوره آز می‌باشد (Azhar, 2014).

**تست اکسیداز:** تست اکسیداز یک تست استفاده شده در میکروبیولوژی به منظور تعیین باکتری‌های تولیدکننده سیتوکروم C اکسیداز استفاده می‌شود. در این تست از دیسک‌های آغشته به موادی مانند N,N'-dimethyl-p-phenylenediamine (DMPD) یا tetramethyl-p-phenylenediamine (TMPD) یا هنگامی که اکسید می‌شود سیاه-آبی تا مارون (خرمایی) و هنگامی که احیاء می‌شود، بی‌رنگ می‌گردد. باکتری اکسیداز مثبت، دارای سیتوکروم اکسیداز با ایندوفنول اکسیداز (یک هموپروتئین حاوی آهن) می‌باشند. هر دوی این آنزیم‌ها، انتقال الکترون‌ها از ترکیب دهنده (NADH) به پذیرنده الکترون (معمولاً اکسیژن) را کاتالیز می‌کنند. معرف تست، TMPD dihydrochloride به‌عنوان یک الکترون دهنده مصنوعی برای آنزیم اکسیداز استفاده می‌شود. معرف اکسید شده موجب ایجاد رنگ آبی ترکیب ایندوفنول می‌شود. سیستم سایتوکرومی معمولاً فقط در ارگانسیم‌های هوازی وجود دارد که می‌توانند از اکسیژن به‌عنوان پذیرنده‌های نهایی هیدروژن استفاده کنند. محصول انتهایی این متابولیسم آب یا پراکسید هیدروژن (که توسط کاتالاز می‌شکند) می‌باشد. باکتری زنده کشت داده شده بر روی Trypticase soy agar ممکن است با استفاده از یک تکنیک استریل از طریق تلقیح خطی فراهم شود. پلیت‌های تلقیح شده در ۳۷ درجه برای ۲۴ تا ۴۸ ساعت برای کلنی‌های پایدار انکوبه

می‌شوند. باکتری‌های تازه تولیدشده، استفاده می‌شوند. سپس کلنی‌ها بر روی محیط کشت رشد کرده، ۲ تا ۳ قطره از معرف DMPD به سطح هر ارگانیسیم، استفاده می‌شود. واکنش مثبت (OX+) به صورت تغییر رنگ از بنفش به ارغوانی طی ۱۰ تا ۳۰ ثانیه مشاهده می‌شود. واکنش منفی (OX-) به صورت صورتی کمرنگ یا عدم مشاهده رنگ گزارش می‌گردد (Azhar, 2014).

**تست ایندول:** تریپتوفان یک آمینواسید ضروری است که می‌تواند از طریق فعالیت آنزیمی باکتری‌ها، اکسید شود و به محصولات متابولیکی (ایندول، پیرویک اسید و آمونیاک) تبدیل شود که حد واسط‌های آنزیم تریپتوفاناز می‌باشد. حضور ایندول از طریق افزودن معرف Kovac تعیین می‌شود که ایجاد رنگ قرمز آلبالویی می‌کند. رنگ توسط معرف تولید می‌شود که متشکل از p-dimethylaminobenzaldehyde می‌کند که ایجاد رنگ قرمز آلبالویی می‌کند. عدم ایجاد رنگ قرمز نشان‌دهنده این است که سوبسترای تریپتوفان هیدرولیز نشده و واکنش ایندول منفی خواهد بود (Azhar, 2014).

**تست Methyl red:** تمام میکروارگانیسیم‌های روده‌ای گلوکز را تخمیر کرده و تولید اسیدهای آلی می‌کند. نامه‌نا متیل رد استفاده شده در این تست، محدوده pH حدود ۴ قرمز شده که نشان‌دهنده واکنش مثبت می‌باشد. در pH برابر با ۶، هنوز نشان‌دهنده اسید بوده اما غلظت یون هیدروژن کمتر بوده که ایندیکاتور زرد شده و واکنش منفی می‌باشد (Azhar, 2014).

**تست Voges Proskauer:** این تست توانایی بعضی از میکروارگانیسیم‌ها در تولید محصول انتهایی غیر اسیدی یا خنثی مانند استیل متیل کرینول از اسیدهای آلی حاصل از متابولیسم گلوکز را نشان می‌دهد. معرف استفاده شده در این تست، معرف Baritt حاوی مخلوطی از محلول‌های آلفا- نفتول کلکی و پتاسیم هیدروکسید می‌باشد. تعیین استیل متیل کرینول، به اکسید شدن محصول انتهایی به یک ترکیب دی استیل نیاز دارد. این واکنش در حضور کاتالیست آلفا- نفتول و یک گروه گوآنیدین که در پیتون محیط کشت MR-VP وجود دارد، رخ می‌دهد. در نتیجه، یک کمپلکس صورتی تشکیل می‌شود و ایجاد یکرنگ گل رز ایجاد می‌کند (Azhar, 2014).

**تست مصرف سیترات:** در غیاب گلوکز تخمیرپذیر یا لاکتوز، بعضی از میکروارگانیسیم‌ها قادر به استفاده از سیترات به عنوان منبع کربن برای انرژی هستند. این توانایی به حضور سیترات پرمه از وابسته است که انتقال سیترات به سلول را تسهیل می‌کند. در طی این واکنش، محیط قلیایی شده؛ دی‌اکسید کربن در ترکیب با آب و سدیم، تشکیل کربنات سدیم می‌دهد که یک ترکیب قلیایی می‌کند. حضور کربنات ایندیکاتور Bromomethyl blue تغییر داده و منجر به تغییر محیط کشت از سبز به آبی پروس می‌شود. بعد از انکوباسیون کشت مثبت سیترات از طریق حضور رشد بر روی سطح اسلنت که با ایجاد رنگ آبی همراه است، تشخیص داده می‌شود. واکنش منفی سیترات با عدم رشد و عدم تغییر رنگ محیط (سبز باقی می‌ماند) مشخص می‌شود (Azhar, 2014).

**تخمیر کربوهیدرات:** تخمیر کربوهیدرات‌ها (گلوکز، سوکروز و لاکتوز) توسط میکروارگانیسیم‌ها تحت شرایط بی‌هوازی لوله دورهام که برای دام انداختن حباب‌های حاصل از تولید گاز به‌طور وارونه قرار گرفته انجام می‌شود. برات تخمیری حاوی مواد نوترینت برات، یک کربوهیدرات ویژه و ایندیکاتور pH (فنل رد) می‌باشد که این اندیکاتور در pH خنثی (۷) بوده و در pH برابر با ۶/۸ ناشی از تولید اسیدهای آلی، ایجاد رنگ زرد می‌کند (Azhar, 2014).

رشد در غلظت‌های مختلف نمک (۰، ۲/۵، ۵، ۷/۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵ و ۳۰ درصد w/v) بر روی نوترینت برات در pH برابر با ۷/۵ آزمایش می‌شود. رشد توسط کدورت در OD<sub>600</sub> با استفاده از روش اسپکتروسکوپی مشخص می‌شود. ایزوله‌هایی که در غلظت ۳-۱۵ درصد از NaCl رشد می‌کنند، به‌عنوان سویه‌های هالوفیل متوسط شناخته می‌شوند. اما سویه‌هایی که در غلظت ۱۵-۲۵ درصد از NaCl رشد می‌کنند به‌عنوان اکستریم هالوفیل می‌باشند (Rohban, 2009).

رشد در غلظت‌های مختلف نمک (۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵ و ۳۰ درصد w/v) بر روی نوترینت برات در pH برابر با ۷/۵ آزمایش و رشد توسط کدورت در OD<sub>600</sub> با استفاده از روش اسپکتروسکوپی (Ependorf, Germany) مشخص شد. ایزوله‌هایی که در غلظت ۳-۱۵ درصد از

NaCl رشد کردند، به عنوان سویه‌های هالوفیل متوسط اما سویه‌هایی که در غلظت ۲۵-۱۵٪ از NaCl رشد نمودند، به عنوان اکستریم هالوفیل شناخته شدند (Rohban and et al, 2009).

سپس به منظور آنالیز PCR ژن *tuf* مختص به جنس، استخراج DNA برای باکتری‌های گرم مثبت به روش لیزوزیم و برای ارگانیسیم‌های گرم منفی با روش جوشاندن انجام شد. برای اطمینان از استخراج DNA، ۱۰ میکرولیتر از آن را در ژل الکتروفورز ۱ درصد قرار داده و وجود باند در ژل داکت ارزیابی شد. اگر نمونه فاقد باند بود یا باند ضعیفی مشاهده می‌شد، استخراج مجدداً تکرار می‌گردید. با استفاده از DNA ی ژنومی استخراج شده، ژن *tuf* با استفاده از پرایمر طراحی شده توسط Hwang و همکاران انجام شده که شامل توالی فوروارد 5'-GCCAGTTGAGGACGTATTCT-3' و پرایمر ریورس 3'-CCATTTTCAGTACCTTCTGGTAA-5' می‌باشد. واکنش تکثیر در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۱۰ پیکومول از هر پرایمر، dNTP به مقدار ۲/۵ میلی مولار، Taq polymerase به مقدار ۰/۶ U، بافر ۲/۵ میکرولیتر و ۱۵ میلی مولار MgCl<sub>2</sub> انجام شد. سیکل دمایی و زمانی ترموسایکلر (Peqlab, USA) در جدول ۱ نشان داده شده است (Hwang and et al., 2011).

جدول ۱: برنامه دمایی و زمانی ترموسایکلر.

Secondary Extention	Primary Extention	Annealing	Secondary Denaturation	Primary Denaturation
72°C 10 min	35			95°C 15 min
	72°C 45sec	56°C 30sec	95°C 30sec	

محصول PCR بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد الکتروفورز شد. محصول PCR در ناحیه ۴۱۲ bp برای تأیید نتایج به دست آمده از تست‌های بیوشیمیایی، برای سکونسنینگ به شرکت پیشگام ارسال گردید. نتایج حاصل از تعیین توالی در سایت NCBI بلاست شد و براساس آن تعیین گونه انجام شد.

## نتایج

به منظور شناسایی ایزوله‌ها ابتدا از رنگ‌آمیزی گرم و تست‌های بیوشیمیایی کاتالاز، آمیلاز، ژلاتیناز، اکسیداز، اوره آز، IMViC و تخمیر کربوهیدرات استفاده شد که نتایج تست‌های بیوشیمیایی و رنگ‌آمیزی گرم در جدول ۲ نشان داده شده است.

جدول ۲: نتایج تست‌های بیوشیمیایی و رنگ‌آمیزی گرم.

نمونه	رنگ‌آمیزی گرم	کاتالاز	امیلاز	ژلاتیناز	اکسیداز	اوره آز	IMViC	تخمیر کربوهیدرات	باکتری تشخیصی
۷۲	+	+	V	-	-	V	V	+-	<i>NR staph</i>
۸۶	+	+	+	+	-	+	---	+	<i>Staph.epidermidis</i>
۱۰۳	+	+	V	-	-	+	V	+-	<i>*NR staph</i>
۱۰۴	+	+	V	-	-	+	V	+	<i>NR staph</i>
۱۱۰	+	+	+	+	-	+	---	+	<i>Staph.epidermidis</i>
۱۱۵	+	+	V	-	-	+	V	+-	<i>NR staph</i>
۱۱۷	+	+	V	-	-	+	V	+-	<i>NR staph</i>
۱۱۸	+	+	V	-	-	+	V	+	<i>NR staph</i>

نمونه	رنگ آمیزی گرم	کاتالاز	آمیلاز	زلاتیناز	اکسیداز	اوره آز	IMViC	تخمیر کربوهیدرات	باکتری تشخیصی
۱۲۰	+	+	+	+	-	+	--+	+	<i>Staph.epidermidis</i>
۱۲۳	+	+	+	+	-	+	--+	+	<i>Staph.epidermidis</i>
۱۲۴	+	+	+	+	-	+	--+	+	<i>Staph.epidermidis</i>
۱۲۵	+	+	+	+	-	+	--+	+	<i>Staph.epidermidis</i>
۱۲۶	+	+	+	+	-	+	--+	+	<i>Staph.epidermidis</i>
۱۲۹	+	+	+	+	-	+	--+	+	<i>Staph.epidermidis</i>
۱۷۴	+	+	+	+	-	+	--+	+	<i>Staph.epidermidis</i>
۱۷۷	+	+	+	+	-	+	--+	+	<i>Staph.epidermidis</i>
۱۸۱	+	+	+	+	-	+	--+	+	<i>Staph.epidermidis</i>
۱۹۴	+	+	V	-	-	-	--+	+-	<i>NR staph</i>
۲۲۸	+	+	V	-	-	-	--+	+	<i>NR staph</i>
۲۳۹	+	+	V	-	-	-	--+	+	<i>NR staph</i>

\*NR: Non-Recognized

بعد از انجام تست‌های بیوشیمیایی PCR ژن *tuf* انجام شد. که بعد از تعیین توالی، در سایت NCBI، بلاست شدند. نتایج حاصل از بلاست در جدول ۳ آورده شده است.

### جدول ۳: نتایج حاصل از بلاست.

نمونه	نتیجه‌ی بلاست
۷۲	<i>Staph. capitis</i>
۸۶	<i>Staph.epidermidis</i>
۱۰۳	<i>Staph. capitis</i>
۱۰۴	<i>Staph.hominis</i>
۱۱۰	<i>Staph.epidermidis</i>
۱۱۵	<i>Staph.capitis</i>
۱۱۷	<i>Staph.capitis</i>
۱۱۸	<i>Staph.hominis</i>
۱۲۰	<i>Staph.epidermidis</i>
۱۲۳	<i>Staph.epidermidis</i>
۱۲۴	<i>Staph.epidermidis</i>
۱۲۵	<i>Staph.epidermidis</i>
۱۲۶	<i>Staph.epidermidis</i>
۱۲۹	<i>Staph.epidermidis</i>
۱۷۴	<i>Staph.epidermidis</i>
۱۷۷	<i>Staph.epidermidis</i>
۱۸۱	<i>Staph.epidermidis</i>



## بحث و نتیجه‌گیری

در مطالعه‌ی اخیر، در سال ۱۳۹۳-۱۳۹۴ بر روی دریاچه‌های اینچه برون و آماگل و آجی گل انجام شد. این مطالعه بر روی ۵۱ نمونه انجام گرفت که ۲۰ نمونه خالص‌سازی شد؛ که از این تعداد ۲ عدد هالوفیل و ۲۰ عدد اکسترم هالوفیل و هالوفیل خیلی شدید بودند. پس از انجام PCR مشخص شد که فراوان‌ترین گونه‌ها به ترتیب شامل *Staph epidermidis* و *Staph capitis* و *Staph hominis* و *Staph xylosus* بودند که در ۱۷ مورد میزان ترادف ژنی ۹۸ تا ۱۰۰ درصد بوده و در سه مورد ۹۵ تا ۹۶ درصد بوده و در دو مورد دیگر زیر ۹۵ درصد بوده است. روش قدرت تحمل ۷/۵ درصد نمک و تخمیر قند مانیتول است. برای این کار از محیط کشت مانیتول سالت اگر یا محیط کشت چاپمن استفاده می‌شود. این محیط دارای ۷/۵ درصد نمک قند مانیتول و معرف فنل رد بوده و به رنگ قرمز است. اگر باکتری قادر به تحمل ۷/۵ درصد نمک این محیط باشد رشد کرده کلنی ایجاد می‌کند. چنانچه باکتری که در این محیط رشد می‌کند قادر به تخمیر مانیتول باشد با تولید اسید رنگ محیط را زرد می‌کند. استاف اورئوس علاوه بر رشد می‌تواند با تخمیر مانیتول تولید اسید کند که باعث کاهش pH می‌شود. در pH اسیدی فنل رد از قرمز به زرد تغییر رنگ می‌دهد. استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس و ساپروفیتیکوس قادر به تولید اسید نیستند، پس کلنی‌های قرمز تشکیل می‌دهند. این امر سبب افتراق اورئوس از ساپروفیتیکوس و اپیدرمیدیس می‌شود.

در مطالعه زیرپور و همکاران در سال ۱۳۹۳، جنس‌های *Bacillus* (۱۸ درصد)، *Marinobacter* (۱۶ درصد)، *Halomonas* (۱۶ درصد)، *Kocuria* (۹ درصد)، *Oceanobacillus* (۷ درصد)، *Dietzia* (۷ درصد)، *Virgibacillus* (۶ درصد)، *Chromohalobacter* (۵ درصد)، *Rhodococcus* (۲ درصد)، *Micrococcus* (۳ درصد)، *Paenibacillus* (۲ درصد)، *Halobacillus* (۳ درصد)، *Thalassobacillus* (۲ درصد)، *Arthro bacter* (۲ درصد) و *Desmospora* (۲ درصد) جدا شدند. در ۱۳ سویه میزان شباهت در ترادف ژن 16S rRNA بین ۹۷-۹۸/۴ درصد و در ۷ سویه کمتر از ۹۷ درصد بود که بیانگر تفاوت قابل ملاحظه‌ای در سطح گونه و یا در برخی حتی جنس است. با بررسی بهینه رشد نمکی ۲۲ سویه نمک دوست نسبی ۳۳ سویه تحمل‌کننده نمک بودند (Zarparvar and et al., 2014).

در مطالعه مهرشاد و همکاران در سال ۲۰۱۲، محتوای ژنومی نمونه‌های محیطی آب‌و خاک برای بررسی‌های مستقل از کشت استخراج شد. با استفاده از تکثیر 16S rRNA و کلونینگ کتابخانه ژن 16S rRNA تهیه و ۲۰ درصد کلون‌های نوترکیب حاصل تعیین ترادف شدند. از بین ۲۱۷ جدایه حاصل در روش مبتنی بر کشت ژن 16S rRNA برای ۵۲ سویه ترادف‌یابی شد که از نظر فیلوژنتیک در جنس‌های *Paracoccus*, *Pontibacillus*, *Bacillus*, *Gracilibacillus*, *Planococcus*, *Halomonas*, *Halobacillus*, *Kocuria*, *Lysobacter*, *Sanguibacter*, *Alkalibacterium*, *Staphylococcus*, *Providencia*, *Marinobacter* و *Microbacterium*, *Thalassobacillus*, *Brevundimonas*, *Oceanobacillus*, *Micrococcus*, *Salicola*, *Pontibacter* و *Piscibacillus* قرار گرفتند. در روش مستقل از کشت کلون‌های بررسی‌شده در جنس‌های *Salinibacter*, *Adhaeribacter* و *Cesiribacter* قرار گرفتند. در روش مبتنی بر کشت بین جدایه‌های تعیین‌توالی شده ۱۸ جدایه شباهت کمتر از ۹۸/۷ درصد با سویه استاندارد نشان دادند که محدوده مرزی برای ارائه گونه جدید میکروبی بومی است. در روش مستقل از کشت کلون‌های بررسی‌شده در گروه Bacteroidetes قرار گرفتند؛ که مشابه با سایر گزارش‌های موجود در مورد محیط‌های پرشور بررسی‌شده است (Mehrshad and et al., 2012).

اخوان سپه‌ی در سال ۱۳۹۳، سویه‌های جدیدی از باکتری نمک دوست *Salini vibrio* sp از دریاچه‌ی ارومیه را معرفی کردند. این پژوهش برای اولین بار شناسایی میکروارگانیسم نمک دوست نسبی جنس *Salini vibrio* از دریاچه‌ی شور ارومیه مورد مطالعه قرار گرفت که منجر به شناسایی سویه‌های جدیدی از این جنس گردید. دریاچه‌ی ارومیه دریاچه‌ی پرشوری است که در شمال غربی ایران واقع شده و شورترین دریاچه‌ی دائمی ایران و از معدود دریاچه‌های فوق اشباع دائمی در جهان می‌باشد. ابتدا نمونه‌ها از مناطق مختلف دریاچه، جمع‌آوری و در شرایط

استریل به آزمایشگاه منتقل شدند. بعد از غنی‌سازی و کشت نمونه‌ها در شرایط تعریف‌شده، برای دستیابی به کلنی‌های خالص کشت‌های متوالی انجام گرفت. سپس سویه‌های منتخب از نظر ویژگی‌های فنوتیپی و فیلوژنتیکی (به‌وسیله تکنیک توالی‌یابی 16S rRNA) مورد مطالعه قرار گرفتند. از بین کل سویه‌های متعلق به *Salinivibrio* sp.، ۵۷ درصد و ۴۳ درصد سویه‌ها نزدیک‌ترین تشابه را به ترتیب به *S. costicola* و subsp. *alcaliphilus* نشان دادند (Akhavan and et al., 2014).

Annapurna و همکاران در سال ۲۰۱۲، توانایی تولید پروتئاز هالوفیل‌های متوسط در دریاچه Sambhar و ساحل دریای Mumbai مورد ارزیابی قرار دادند. توالی‌یابی مولکولی قارچ‌ها و باکتری‌ها با ارزیابی درخت فیلوژنتیکی حضور *Aspergillus flavus* در نمونه‌های ساحل دریای Mumbai و *Bacillus subtilis* در دریاچه Sambhar از Rajasthan را آشکار کرد. برای بررسی فعالیت پروتئازی، از سوبستراهای کارژین، لکه خون بر روی ابزار جراحی و مو استفاده شد. آنزیم‌ها توانایی حذف لکه خون از ابزار جراحی را نشان دادند. ایزوله‌های باسیلوس سوبتیلیس فعالیت ایتیم در pH برابر با ۸ و دمای ۳۷ درجه و ۱۰ درصد NaCl با فعالیت پروتئازی بر روی کارژین و موی انسان داشتند؛ و همچنین *Aspergillus flavus* پایدار بوده و دارای فعالیت پروتئازی می‌باشند که می‌تواند از این آنزیم‌ها در تکنولوژی تولید مواد شوینده و پردازش چرم استفاده می‌شود (Annapurna and et al., 2012).

Asem و همکاران در سال ۲۰۱۴ تنوع زیستی دریاچه ارومیه را مورد بررسی قرار دادند. این دریاچه دارای میگوی آب‌شور بنام *Artemia urmiana* می‌باشد. علاوه بر این دارای جلبک، باکتری، میکروقارچ، گیاهان، پرندگان و پستانداران می‌باشد. جمعیت میکروبی شامل: آرکی‌ها (جنس‌های *Haloarcula*، *Halobacterium*، *Haloferax* و *Halorubrum*) و باکتری‌ها (مثل میکروباکتریوم، نوستوک، آنابنا، باسیلوس لچینی فورمیس، *Halospina*، *Halomonas*، *Halovibrio* و ...) بوده است (Asem and et al., 2014). Rohban و همکاران در سال ۲۰۰۹، باکتری‌های هالوفیل تولیدکننده آنزیم‌های هیدرولیز خارج سلولی در دریاچه حوض سلطان را جدا کردند. مطالعه باکتری‌ها از نواحی مختلف پلایای حوض سلطان که یک دریاچه بسیار شور در ناحیه بیابان مرکزی ایران است که منجر به جداسازی ۲۳۱ باکتری هالوفیل متوسط (که قادر به رشد ایتیم در محیط حاوی ۱۵-۵ درصد از نمک می‌شود) و ۴۹ میکروارگانسیم بی‌نهایت هالوفیل (که برای رشد ایتیم به ۲۵-۲۰ درصد نمک نیاز دارند). این ایزوله‌ها تنوع وسیعی از آنزیم‌های هیدرولیتیک خارج سلولی را تولید می‌کنند. تعداد ۱۹۵، ۱۷۷، ۱۰۰، ۹۵، ۹۲، ۶۸، ۶۵، ۳۳ و ۲۸ از سویه‌ها به ترتیب تولید لیپاز، آمیلاز، پروتئاز، اینولیناز، زایلاناز، سلولاز، پولولاناز، DNase و پکتیناز می‌کنند. در مقایسه با باکتری‌های گرم منفی، هالوفیل‌های میله‌ای گرم مثبت، فعالیت هالوفیلی بیشتری نشان می‌دهند. چندین فعالیت ترکیبی توسط بعضی از این ایزوله‌ها مشاهده شد. یک سویه ۹ فعالیت هیدرولیتیکی، ۴ سویه ۸ فعالیت هیدرولیتیکی، ۱۰ سویه ۷ فعالیت هیدرولیتیکی و ۲۹ سویه ۶ فعالیت هیدرولیتیکی را نشان می‌دهند. هیچ ایزوله هالوفیلی بدون فعالیت هیدرولیتیکی در این مطالعه یافت نشد. برطبق خصوصیات فنوتیپی و مقایسه جزئی آنالیز توالی 16S rRNA، سویه‌های هالوفیلی جنس‌های زیر مشخص شدند: *Salicola*، *Gracilibacillus*، *Virgibacillus*، *Halobacillus*، *Thalassobacillus*، *Oceanobacillus*، *Halomonas*، *Halovibrio* و *Salinicoccus*، بیشترین تولیدکننده‌های لیپاز و DNase به ترتیب اعضای از جنس *Gracilibacillus* و *Halomonas* بودند. به‌طوری‌که بیشترین ایزوله‌هایی که توانایی تولید آنزیم‌های هیدرولیتیک مانند آمیلاز، پروتئاز، سلولاز و اینولیناز متعلق به باکتری‌های گرم مثبت مانند *Halobacillus*، *Virgibacillus*، *Thalassobacillus*، *Gracilibacillus* بودند (Rohban and et al., 2009).

Cojoc و همکاران در سال ۲۰۰۹، آنزیم‌های هیدرولیتیک خارج سلولی باکتری‌های هالوفیل جدا شده از کریستال سنگ نمک قنات را مورد بررسی قرار دادند. تعداد کلنی‌های رشد یافته تقریباً ۳۰۰۰ در هر گرم از سنگ نمک بر روی سطح محیط کشت MH حاوی ۱۰ درصد از NaCl، تخمین زده شد. سویه‌های مورد بررسی، به‌طور تصادفی از کلنی‌های مشاهده‌شده بر روی پلیت، انتخاب شدند و فعالیت آنزیمی هیدرولیتیک خارج سلولی آن‌ها بررسی شد و یک سویه از ۷ سوبسترای مورد مطالعه، ۶ سوبسترا را هیدرولیز کردند. مطالعه آن‌ها نشان داد که

فعالیت هیدرولیتیکی برای توئین ۸۰ و کازئین، در بین سویه‌های جداسده در غلظت نمک بیش از ۲ مولار، غالب می‌شود. حضور فعالیت‌های هیدرولیتیکی ترکیبی در بعضی از سویه‌های جداسده می‌تواند برای استفاده در بعضی از فعالیت‌های بیوتکنولوژی در زمینه‌های مختلف صنعت یا کشاورزی مفید باشند (Cojoc and *et al.*, 2009).

در مطالعه‌ی قاسمی و همکاران در سال ۲۰۱۰، بررسی توانایی تولید آمیلاز باکتری هالوفیل از دریاچه مهارلو در جنوب شرقی شیراز انجام شد. ۵۰ کلنی می‌توانند از نشاسته به‌عنوان منبع کربن استفاده می‌کنند. تعیین فعالیت آمیلاز، تجزیه نشاسته با استفاده از روش‌های یدومتریک انجام شده است. در بین آن‌ها، ۱۳ سویه با بیشترین فعالیت آمیلازی توسط خصوصیات بیوشیمیایی و مورفولوژیکی و توالی 16S rRNA به‌عنوان مارکر مولکولی انجام شد. در این مطالعه باکتری *Rheinheimera aquimaris* BCCS 026 بالاترین توانایی تولید آمیلاز U/MI ۶۱ نشان داد (Ghasemi and *et al.*, 2010).

در سال ۲۰۱۱، Nayak و همکاران بر روی قارچ‌های هالوفیل در Goa در هند مطالعه کردند. قارچ‌های این دریاچه عمدتاً متعلق به جنس‌های اسپریژیلوس، تعدادی پنی سیلیوم و تعداد کمتری یوروتیوم و *Hortaea* بودند. بیشتر گونه‌ها هالوفیل اختیاری بودند. اما *A. penicillioides* هالوفیل اجباری بوده و تنها در حضور نمک قادر به رشد می‌باشد (Nayak and *et al.*, 2012). در این مطالعه مشاهده شد که تست‌های بیوشیمیایی در ۱۱ مورد قادر به تشخیص گونه نبودند و براین اساس، روش مولکولی به نسبت روش بیوشیمیایی از کارایی بالاتری برخوردار است. بنابراین در تشخیص گونه‌ها از روش مولکولی با کارایی بالاتری می‌توان استفاده کرد.

## سپاسگزاری

با تشکر فراوان از اساتید و پرسنل محترم دانشگاه علوم پزشکی گلستان که ما را در انجام این تحقیق یاری رساندند. این تحقیق باهدف مقایسه دو روش بیوشیمیایی و مولکولی در شناسایی باکتری‌های هالوفیل و اکسترا هالوفیل سه دریاچه اینچه برون، آجی گل و آماگل در قالب پایان‌نامه کارشناسی ارشد انجام شد.

## منابع

- Akhavan Sepahy, A., Irannejad, Sh., Amoozegar, M. A. and Tukmechi, A., 2014. The presentation of Novel Strains of Halophile Bacteria *Salinivibrio* sp. from Urmia Lake. *Journal of Cellular and Molecular (Iranian Journal of Biology)*. 27 (3): 335- 345 (Persian).
- Annapurna, S. A., Singh, A., Garg, S., Kumar, A. and Kumar, H., 2012. Screening, isolation and characterization protease producing moderately halophilic microorganisms. *Asian Journal of Microbiology, Biotechnology & Environmental Sciences*. 14 (4): 603- 612.
- Arora, S., Vanza, M., Mehta, R., Bhuvra, C. and Patel, P., 2014. Halophilic microbes for bio-remediation of salt affected soils. *African Journal of Microbiology Research*. 8 (33): 3070- 3078
- Asem, A., Eimanifar, A., Djamali, M., Rios, P. and Wink, M., 2014. Biodiversity of the hypersaline lake national park (NW Iran). *Diversity*. 6: 102-132
- Azhar, M., Uniyal, V., Chauhan, N. and Singh Rawat, D., 2014. Isolation and biochemical characterization of Halophiles from Sahastradhara region, Dehradun, India. *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci*. 3 (12): 753-760

**Cojoc, R., Merciu, S., Popescu, G., Dumitru, L., Kamekura, M. and Enache, M., 2009.** Extracellular hydrolytic enzymes of halophilic bacteria isolated from a subterranean rock salt crystal, Rom. Biotechnology Letters. 14: 4658–4664.

**Ghasemi, Y., Amini, S., Ebrahimnezhad, A. and Zarrini, 2010.** Halotolerant amylase production by a novel bacterial strain, *Rheinheimera aquimaris*. Research Journal of Microbiology. 5 (2): 144- 149

**Hwang, S. M., Kim, M. S., Park, K. U., Song, J. and Kim, E. C., 2011.** tuf Gene Sequence Analysis Has Greater Discriminatory Power than 16S rRNA Sequence Analysis in Identification of Clinical Isolates of Coagulase-Negative Staphylococci. Journal of Clinical Microbiology. 49 (12): 4142–4149.

**Jacob, J. H., 2012.** Classification of Halophilic Heterotrophic Bacteria Thriving in the Jordanian Dead Sea Littoral Zone. Journal of Biological Sciences. 12: 246-252.

**Mehrshad, M., Amoozegar, M. A., Yakhchali, B. and Shahzade Fazeli, S. A., 2012.** Biodiversity of moderately halophilic and halotolerant bacteria in the western coastal line of Urmia lake. Biological Journal of Microorganism. 1 (2): 49- 70 (Persian).

**Nayak, S., Gonsalves, V. and Nazareth, S., 2012.** Isolation and salt tolerance of halophilic fungi mangroves and solar salterns in Goa- India. Indian Journal of Geo-Marine Science. 41 (2): 146- 172

**Rode, T. M., Moretro, T., Langsrud, S. and Holck, A., 2012.** Responses of *Staphylococcus aureus* to environmental stresses. Nova Science Publishers, Inc. 509- 546

**Rohban, R., Amoozegar, M. A. and Ventosa, A., 2009.** Screening and isolation of halophilic bacteria producing extracellular hydrolyses from Howz Soltan Lake, Iran. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology. 36: 333–340.

**Wackett, L., 2012.** Industrial applications of microbial salt-tolerant enzymes. Microbial Biotechnology. 5(5): 668–669.

**Zarparvar, P., Amoozegar, M. E. and Fallahian, M., 2014.** Diversity of culturable moderate halophilic and halotolerant bacteria in incheh boroun hyper saline wetland in Iran. Journal of Cellular and Molecular (Iranian Journal of Biology). 27 (1): 44-56 (Persian).

