

باز ارزیابی جایگاه ژنومی سویه ایرانی MJ01 و مقایسه ژن‌های مرتبط با تحمل شوری و تنظیم زیست‌سنتز سورفکتین در سویه‌های مرجع و مرتبط با محیط‌های نفتی جنس *Bacillus*

دکتر آرزو رضایی^{۱*} ^۱ - استادیار گروه مهندسی نفت و زمین انرژی، دانشگاه امیرکبیر، تهران، ایران

چکیده

اطلاعات

تاریخچه مقاله:

تاریخ دریافت: ۱۴۰۵/۰۳/۲۵

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۵/۰۵/۲۵

انتشار آنلاین: ۱۴۰۵/۰۶/۳۱

دسترسی سریع به مقاله الکترونیکی



اطلاعات نویسنده مسئول:

آرزو رضایی

گروه مهندسی نفت و زمین انرژی، دانشگاه امیرکبیر، تهران، ایران

ایمیل: arezoo@aut.ac.ir

حیطه موضوعی:

علوم پایه و منابع طبیعی فرآورده های زیست طبیعی

زمینه و هدف: سویه ایرانی MJ01 توانایی تولید سورفکتین دارد، اما ظرفیت ژنومی آن برای کاربرد در شرایط شور مخزن به بررسی بیشتری نیاز دارد. هدف این مطالعه، ارزیابی جایگاه ژنومی MJ01 و مقایسه ژن‌های مرتبط با سازگاری اسمزی و زیست‌سنتز و تنظیم سورفکتین بود.

روش‌ها: ژنوم MJ01 با سویه‌های مرتبط با محیط نفتی DM2 و RI4914، سویه تیپ *Bacillus spizizenii* TU-B-10 و سویه مرجع *Bacillus subtilis* 168 مقایسه شد. ویژگی‌های مونتاژ، حاشیه‌نویسی، خویشاوندی ژنومی و خوشه‌های ژنی زیست‌سنتزی با *QUAST*، *Bakta*، *FastANI*، *TYGS* و *antiSMASH* بررسی شدند. مجموعه‌ای از ۳۵ ژن مرتبط با حفاظت اسمزی، هم‌ایستایی پتاسیم، پاسخ به تنش و تنظیم سورفکتین، همراه با پروتئین‌های SrfAA تا SrfAD، با BLASTP و هم‌ترازی نوکلئوتیدی هدفمند ارزیابی شد.

یافته‌ها: مقدار ANI میان MJ01 و TU-B-10 برابر ۹۹/۱۱ درصد و مقدار dDDH حاصل از فرمول d4 برابر ۹۳/۴ درصد بود. در MJ01، تعداد ۳۳ ژن از مجموعه ۳۵ ژنی در گروه کامل و حفاظت‌شده قرار گرفتند و *opuCD* پوشش تقریباً کامل داشت. پروتئین‌های SrfAA تا SrfAD در مقایسه با TU-B-10 دارای هویت ۹۹/۰۶ تا ۹۹/۶۹ درصد و پوشش ۱۰۰ درصد بودند. جایگزینی کدون TTA با TGA در توالی موجود *comA*، توقف زودرس در کدون ۵۳ را پیش‌بینی کرد. هویت پروتئین *Comp* نسبت به همتای آن در TU-B-10 برابر ۵۶/۰۵ درصد بود. در MJ01، تعداد ۱۲ ناحیه زیست‌سنتزی، از جمله ناحیه مشابه خوشه سورفکتین، پیش‌بینی شد.

نتیجه‌گیری: در مجموعه بررسی‌شده، شواهدی از فقدان گسترده ژن‌های حفاظت اسمزی در MJ01 به دست نیامد. حفاظت اجزای زیست‌سنتزی سورفکتین و تغییر پیش‌بینی‌شده *comA*، بررسی تنظیم این مسیر را برای مطالعات بعدی مطرح می‌کنند. شواهد ژنومی نیز از انتساب MJ01 به *B. spizizenii* حمایت می‌کنند. پیامد عملکردی این یافته‌ها برای تحمل شوری و تولید سورفکتین به تأیید مستقل نیاز دارد.

کلیدواژه‌ها: *Bacillus spizizenii*؛ MJ01؛ سورفکتین؛ تحمل شوری؛ ژنومیک مقایسه‌ای؛ ازدیاد برداشت میکروبی نفت

Genome-based reassessment of the Iranian strain MJ01 and comparative analysis of salinity tolerance and surfactin regulation in petroleum-associated and reference Bacillus strains

1- Dr. Arezoo Rezaie ^{1*} 

1. Assistant Professor, Department of Petroleum and Engineering and Geoenergy, University of Amirkabir, Tehran, Iran

Background and objective: The Iranian strain MJ01 has been reported to produce surfactin, but its genomic potential for use under saline reservoir conditions requires further investigation. This study assessed the genomic placement of MJ01 and compared genes associated with osmotic adaptation and surfactin biosynthesis and regulation in petroleum-associated and reference Bacillus strains.

Methods: Public genome sequences of MJ01, the petroleum-associated strains DM2 and RI4914, the Bacillus spizizenii type strain TU-B-10, and the Bacillus subtilis reference strain 168 were compared. Assembly characteristics, annotation, genome relatedness, and biosynthetic gene clusters were assessed using QUAST, Bakta, FastANI, TYGS, and antiSMASH. BLASTP and targeted nucleotide alignments were used to examine a 35-gene panel covering osmoprotection, potassium homeostasis, stress responses, and surfactin regulation, together with the SrfAA–SrfAD proteins.

Findings: MJ01 shared 99.11% average nucleotide identity with TU-B-10, with a d4 digital DNA–DNA hybridization estimate of 93.4%. Among the 35 target genes, 33 were classified as full-length and conserved in MJ01; opuCD showed near-full query coverage. The SrfAA–SrfAD proteins shared 99.06–99.69% identity with those of TU-B-10 at 100% query coverage. A TTA-to-TGA substitution in the available MJ01 comA sequence predicted a premature stop at codon 53. ComP shared 56.05% protein identity with the TU-B-10 homolog. antiSMASH predicted 12 biosynthetic regions in MJ01, including a region matching the surfactin cluster.

Conclusion: The analyzed gene panel did not support widespread loss of osmoprotection genes in MJ01. Conservation of SrfAA–SrfAD and the predicted comA alteration identify surfactin regulation as a candidate for further investigation. Genome relatedness supports the placement of MJ01 with B. spizizenii. These sequence-based findings do not establish impaired salt tolerance or surfactin production; the comA sequence and its functional consequences require independent validation.

Keywords: Bacillus spizizenii; MJ01; surfactin; salinity tolerance; comparative genomics; microbial enhanced oil recovery

Received: 25 June 2026

Accepted: 16 August 2026

Published: 22 September 2026

Scan QR code and read the article online



Corresponding author:

Arezoo Rezaie

Department of Petroleum and Engineering and Geoenergy, University of Amirkabir, Tehran, Iran
Email: arezoo@aut.ac.ir

Scope:

Basic Sciences and Natural Resources of Natural Products

Copyright: The International Journal of Health Law is an open-access journal. Copying, distribution, and publication for non-commercial purposes are permitted, provided that the source is properly acknowledged.

۱- مقدمه

کاربرد باکتری‌های تولیدکننده زیست‌سورفکتانت در ازدیاد برداشت میکروبی نفت به حفظ فعالیت آنها در شرایط فیزیکی‌وشیمیایی مخزن وابسته است. از این رو، تولید زیست‌سورفکتانت در محیط کشت به‌تنهایی برای ارزیابی کارایی یک سویه در مخزن کفایت نمی‌کند. سویه ایرانی MJ01 از آب مخزن ذخیره یک تأسیسات نفتی در جنوب ایران جداسازی شده است. برای زیست‌سورفکتانت لیپوپتیدی تولیدشده توسط این سویه، از نوع سورفکتین، غلظت بحرانی تشکیل میسل حدود ۰/۰۶ گرم در لیتر گزارش شده است. این فرآورده در شوری پایین موجب تغییر ترشوندگی شد، اما اثر آن در شوری مشابه آب دریا محدود بود.^۱ ژنوم کامل MJ01 با طول ۴'۱۰۸'۲۹۳ جفت‌باز در یک توالی پیوسته و بدون شکاف منتشر شده است. در مطالعه اولیه این ژنوم، شباهت زیاد آن به گروه *spizizenii*، به‌ویژه سویه TU-B-10، و وجود ژنهای مرتبط با تجزیه زیستی و تولید ترکیبات زیست‌فعال گزارش شد.^۲ این یافته‌ها مبنایی برای بررسی هدفمند ژنهای سازگاری اسمزی و تنظیم زیست‌سنتر سورفکتین در MJ01 فراهم می‌کنند. سویه RI4914 از آب تولیدی یک میدان نفتی در برزیل جداسازی شده و تولید سورفکتین، حلال و پلیمر برای آن گزارش شده است. سوپرناتانت کشت این سویه در حضور نمک با غلظت حداکثر ۱۲۰ گرم در لیتر، کشش بین‌سطحی را به حدود ۰/۰۷ میلی‌نیوتن بر متر کاهش داد و در آزمایش ستون‌شنی موجب افزایش بازیافت نفت شد.^۳ بررسی ژنومی RI4914 نیز حفاظت اپروژن *srfa* را در ژنوم‌های مقایسه‌شده نشان داده است.

^۴ سویه DM2 از خاک آلوده به نفت در فلات تبت جداسازی شده است. ژنوم آن از یک کروموزوم و یک پلاسمید تشکیل شده و ژنهای

مرتبط با پاسخ به تنش و متابولیسم هیدروکربن در آن گزارش شده‌اند.^۵ برای بررسی تفاوت‌های ژنومی در چارچوب خویشاوندی تاکسونومیک، سویه تیپ TU-B-10 به‌عنوان مرجع نزدیک به MJ01 انتخاب شد.^۶ سویه 168 از گونه *Bacillus subtilis* نیز به‌عنوان مرجع ژنی و آزمایشگاهی در مقایسه قرار گرفت.^۷ حضور این دو مرجع امکان مقایسه نتایج سویه‌های مرتبط با محیط نفتی با ژنوم‌های مرجع را فراهم کرد. هدف مطالعه حاضر، بازاریابی جایگاه ژنومی MJ01 و مقایسه ژنهای مرتبط با سازگاری اسمزی، پاسخ به تنش و زیست‌سنتر و تنظیم سورفکتین بود. فرضیه اولیه آن بود که اجزای اصلی زیست‌سنتر سورفکتین در MJ01 حفظ شده‌اند، اما تفاوت در ژنهای سازگاری اسمزی یا تنظیم پاسخ به تنش می‌تواند نامزد بررسی محدودیت عملکرد این سویه در شرایط شور باشد. این فرضیه در سطح توالی ژنومی ارزیابی شد.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱ طراحی مطالعه و انتخاب ژنوم‌ها

این پژوهش به‌صورت مطالعه ژنومیک مقایسه‌ای بر پایه داده‌های عمومی انجام شد. پنج ژنوم شامل MJ01 به‌عنوان سویه هدف، DM2 و RI4914 به‌عنوان سویه‌های مرتبط با محیط‌های نفتی، TU-B-10 به‌عنوان مرجع نزدیک از گونه *B. subtilis* و سویه 168 به‌عنوان مرجع *B. spizizenii* انتخاب شدند. معیار انتخاب، دسترسی آزاد به توالی کامل ژنوم و امکان پردازش داده‌ها با روش یکسان بود. سویه TU-B-10 نقش مرجع تاکسونومیک داشت و در گروه سویه‌های مرتبط با محیط نفتی طبقه‌بندی نشد.

جدول ۱. سویه‌ها، شماره‌های دسترسی و نقش هر ژنوم در مطالعه

سویه	شماره دسترسی	منشأ/توصیف	نقش در مقایسه
MJ01	CP018173.1	آب مخزن ذخیره تأسیسات نفتی جنوب ایران	سویه هدف
TU-B-10	NC_016047.1 GCF_000227465.1	سویه تیپ <i>B. spizizenii</i>	نزدیک‌ترین مرجع ژنومی
DM2	CP030937.1 CP030938.1	خاک آلوده به نفت، فلات تبت، چین	سویه مرتبط با محیط نفتی
RI4914	CP051306.1	آب تولیدی میدان نفتی، برزیل	تولیدکننده سورفکتین با گزارش فعالیت فرآورده در شوری بالا
168	NC_000964.3	سویه مرجع آزمایشگاهی <i>B. subtilis</i>	مرجع ژن و پروتئین

سویه تیپ نزدیک، مقدار dDDH حاصل از فرمول d4 به‌عنوان شاخص اصلی ارائه شد.

۲-۲ بررسی ویژگی‌های مونتاژ و حاشیه‌نویسی ژنوم

۴-۲ پیش‌بینی خوشه‌های ژنی زیست‌سنتری

توالی‌های ژنومی با antiSMASH نسخه 8.0.4 در حالت تشخیص relaxed بررسی شدند.¹² تعداد نواحی دارای خوشه ژنی زیست‌سنتری (BGC)، نوع خوشه و نزدیک‌ترین تطابق با خوشه‌های شناخته‌شده ثبت شد. نبود یک تطابق در فهرست نزدیک‌ترین خوشه‌های شناخته‌شده، به‌تنهایی به‌عنوان شاهد فقدان مسیر زیستی تفسیر نشد. همچنین تطابق توالی با یک خوشه شناخته‌شده معادل اثبات تولید فرآورده آن در نظر گرفته نشد.

توالی کامل هر ژنوم در قالب FASTA تهیه و ویژگی‌های مونتاژ آن با QUAST بررسی شد.⁸ برای کاهش ناهمگنی ناشی از تفاوت روش‌های حاشیه‌نویسی، همه ژنوم‌ها با Bakta و جدول ترجمه ۱۱ پردازش شدند.⁹ در مورد DM2، توالی‌های کروموزوم و پلاسمید در یک فایل FASTA چندتوالی قرار گرفتند؛ این دو رپلیکون به‌صورت توالی‌های مستقل حفظ و در Bakta به‌ترتیب به‌عنوان کروموزوم و پلاسمید مشخص شدند.

۵-۲ مقایسه ژنهای هدف

مجموعه‌ای از ۳۵ ژن سویه 168 به‌عنوان مرجع مقایسه انتخاب شد. این مجموعه شامل ژنهای سامانه‌های انتقال اسمولیت‌های سازگار، ساخت گلیسین‌بتائین و پرولین، هم‌ایستایی پتاسیم، پاسخ عمومی به تنش و تنظیم سورفکتین بود. توالی پروتئین‌های مرجع با BLASTP در برابر پروتئوم‌های پیش‌بینی‌شده توسط Bakta جست‌وجو شد.¹³ تطابق‌ها با توجه به مقدار E-value، درصد هویت، پوشش توالی پرس‌وجو، طول پروتئین و سازگاری با حاشیه‌نویسی ژن بررسی شدند. برای تطابق‌های ضعیف یا ناسازگار

۳-۲ ارزیابی خویشاوندی ژنومی و جایگاه تاکسونومیک

میانگین هویت نوکلئوتیدی ژنوم‌ها (ANI) با مقایسه‌های جفتی در FastANI محاسبه شد.¹⁰ مقدار ۹۵ درصد به‌عنوان آستانه متداول برای تفسیر شباهت در سطح گونه در نظر گرفته شد. ژنوم MJ01 همچنین در سامانه TYGS تحلیل شد و مقادیر هیبریداسیون دیجیتال DNA-DNA (dDDH) و درخت مبتنی بر فاصله ژنومی (GBDP) استخراج شدند.¹¹ در گزارش مقایسه با

patchwork, scales و ragg ترسیم شدند. فایل‌های تصویری با وضوح ۶۰۰ نقطه در اینچ و نسخه برداری PDF تهیه شد. در موارد دارای مقایسه ANI در هر دو جهت، میانگین دو مقدار برای نمایش در ماتریس به کار رفت. تحلیل‌ها توصیفی بودند و آزمون استنباطی برای ارتباط ژنوتیپ و فنوتیپ انجام نشد.

۳- نتایج

۳-۱ ویژگی‌های کلی، ژنوم‌ها

اندازه ژنوم‌های بررسی‌شده بین ۴/۱۰ و ۴/۳۲ مگاباز و محتوای GC بین ۴۳/۴۰ و ۴۳/۹۰ درصد بود. تعداد توالی‌های کدکننده پروتئین (CDS) از ۴۰۴۳ در MJ01 تا ۴۴۳۷ در RI4914 متغیر بود. بیشترین تعداد شبه‌ژن پیش‌بینی‌شده به RI4914 اختصاص داشت؛ در این سویه ۱۳۸ شبه‌ژن گزارش شد (جدول ۲ و شکل ۱). این مقادیر خروجی حاشیه‌نویسی هستند و به‌تنهایی تعداد ژن‌های غیرفعال را تعیین نمی‌کنند.

از عنوان «بدون همتای توالی قابل اعتماد» استفاده شد؛ این عنوان به معنای اثبات فقدان رُز نیست.

برای موارد مشکوک به قطعه‌قطعه‌شدن ژن در حاشیه‌نویسی یا تغییر چارچوب خوانش، توالی نوکلئوتیدی مرجع با BLASTN در ژنوم کامل جست‌وجو شد. ژنهای *comA* و *comP* نیز به‌طور جداگانه بررسی شدند. علاوه بر این، پروتئین‌های SrfAB، SrfAA، SrfAD و SrfAC سویه MJ01 مستقیماً با پروتئوم TU-B-10 مقایسه شدند. انتخاب ژنهای هدف با توجه به نقش سامانه‌های Opu در انتقال اسمولیت‌های سازگار^{14,15} و نقش مسیر ComX-ComP-ComA در تنظیم پاسخ وابسته به حدنصاب، از جمله تنظیم اپرون‌سورفکتین، انجام شد.^{16,17}

۲-۶ تجميع داده‌ها و ترسيم شكل‌ها

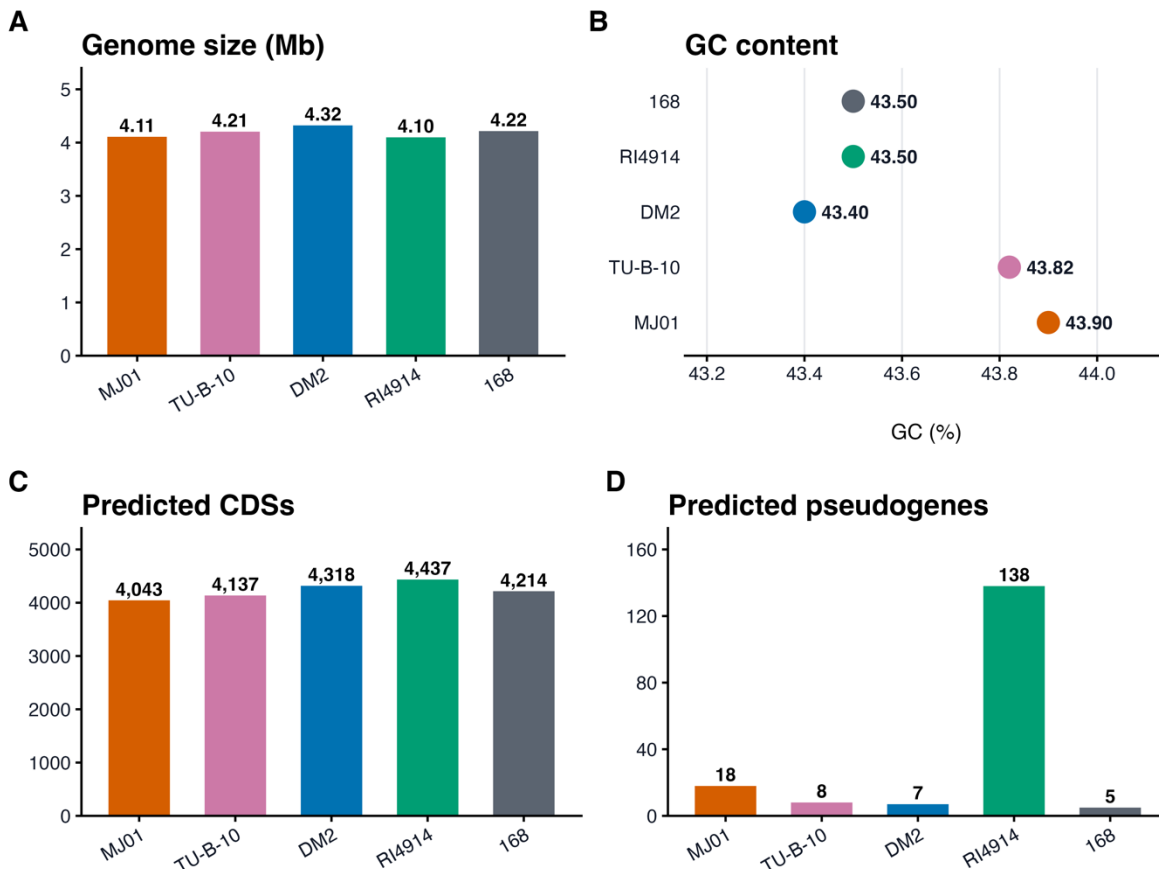
خروجی ابزارهای QUAST، .Bakta، .FastANI، .TYGS، antiSMASH و BLAST در جدولهای مقایسه‌ای تجمیع شد. شکلها با زبان R و بسته‌های ggplot2، dplyr، tidyr.

جدول ۲. ویژگی‌های ژنوم و حاشیه‌نویسی Bakta

شبه ژد	CDS	GC (%)	اندازه ژنوم (Mb)	سویه
18	4043	43.90	4.108	MJ01
8	4137	43.82	4.207	TU-B-10
7	4318	43.40	4.323	DM2
138	4437	43.50	4.101	RI4914
5	4214	43.50	4.216	168

Genome assembly and standardized annotation characteristics

QUAST summary metrics and Bakta annotation outputs



شکل ۱. مقایسه ویژگی‌های ژنوم و حاشیه‌نویسی استاندارد. پنل‌ها به ترتیب اندازه ژنوم، درصد GC، تعداد CDS و تعداد شبه‌ژن پیش‌بینی شده را نشان می‌دهند.

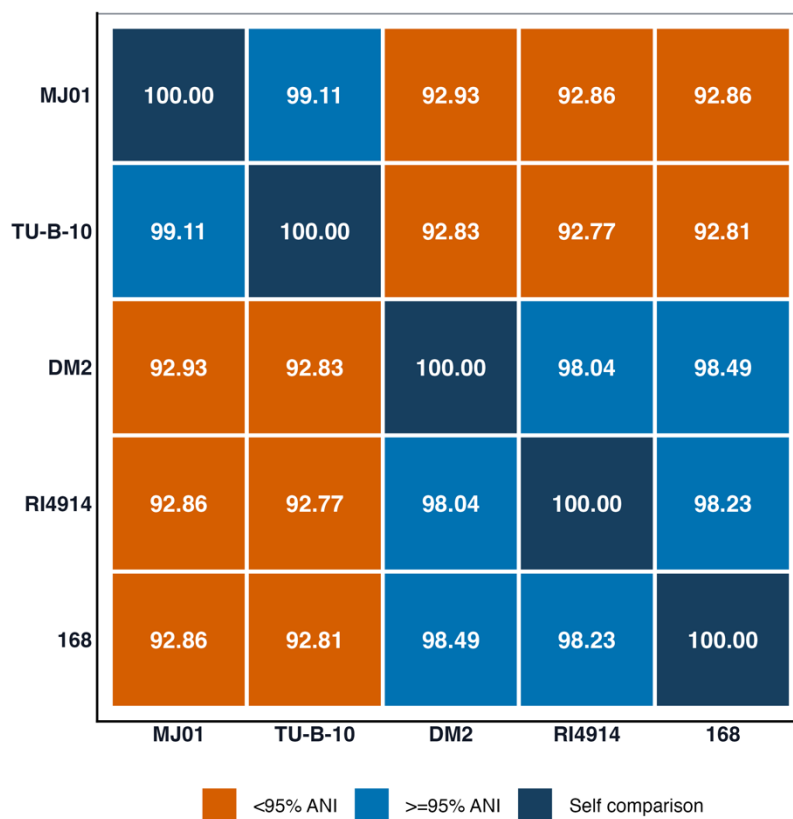
اساس فرمولهای d0، d4 و d6 به ترتیب ۹۴/۷، ۹۳/۴ و ۹۶/۳ درصد و اختلاف محتوای GC در خروجی این سامانه ۰/۱۱ واحد درصد بود. مقدار d4 در مقایسه MJ01 با سویه‌های ATCC 6051 و NCIB 3610 از گونه *B. subtilis* حدود ۵۱ درصد گزارش شد. در درخت GBDP، سویه‌های MJ01 و TU-B-10 یک گروه مشترک با پشتیبانی بوت‌استرپ ۸۳ تشکیل دادند (شکل ۳). این نتایج از انتساب ژنومی MJ01 به *B. spizizenii* حمایت می‌کنند.

۲-۳ خویشاوندی ژنومی MJ01 با سویه تیپ TU-B-10

بیشترین مقدار ANI برای MJ01 در مقایسه با TU-B-10 به دست آمد و برابر ۹۹/۱۱ درصد بود. مقادیر ANI میان MJ01 و سویه‌های DM2، RI4914 و 168 به ترتیب ۹۲/۹۳، ۹۲/۸۶ و ۹۲/۸۶ درصد بودند. در مقابل، مقایسه‌های جفتی میان MJ01 و RI4914 و 168 مقادیری در بازه ۹۸/۰۴ تا ۹۸/۴۹ درصد نشان دادند (شکل ۲). نتایج TYGS با نزدیکی ژنومی MJ01 و TU-B-10 سازگار بود. مقدار dDDH برای این دو سویه بر

Whole-genome average nucleotide identity

FastANI pairwise comparison; values are nucleotide identity percentages

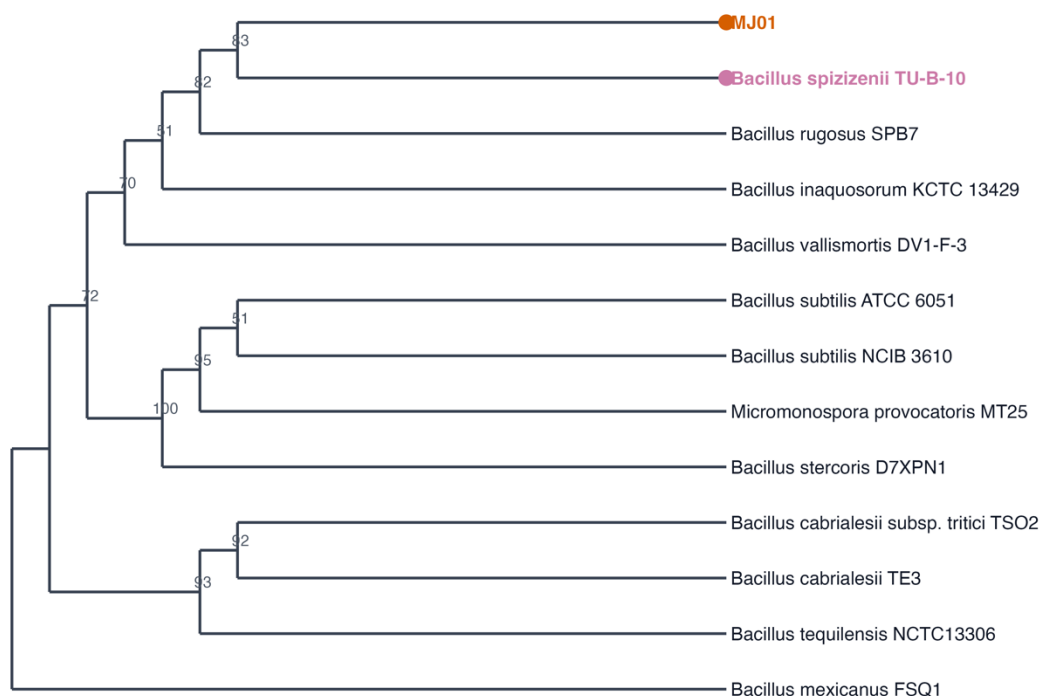


Species-level reference threshold shown in the legend: ANI ≥ 95%.

شکل ۲. ماتریس هویت متوسط نوکلئوتیدی کل ژنوم بر اساس FastANI. خانه‌های آبی نشان‌دهنده ANI مساوی یا بیشتر از ۹۵ درصد و خانه‌های نارنجی نشان‌دهنده مقادیر کمتر از این آستانه هستند.

Whole-genome GBDP phylogenetic placement of MJ01

Cladogram reconstructed from the TYGS whole-genome Newick output; node labels are bootstrap support values



MJ01 forms a strongly supported sister relationship with the type strain *Bacillus spizizenii* TU-B-10.

شکل ۳. کلادوگرام حاصل از بازترسیم خروجی Newick سامانه TYGS بر پایه تحلیل GBDP کل ژنوم. اعداد گره‌ها نشان‌دهنده پشتیبانی بوت‌استرپ هستند. رنگ‌های متمایز، سویه MJ01 و سویه تیپ TU-B-10 را مشخص می‌کنند. طول شاخه‌ها در این کلادوگرام بیانگر فاصله تکاملی نیست.

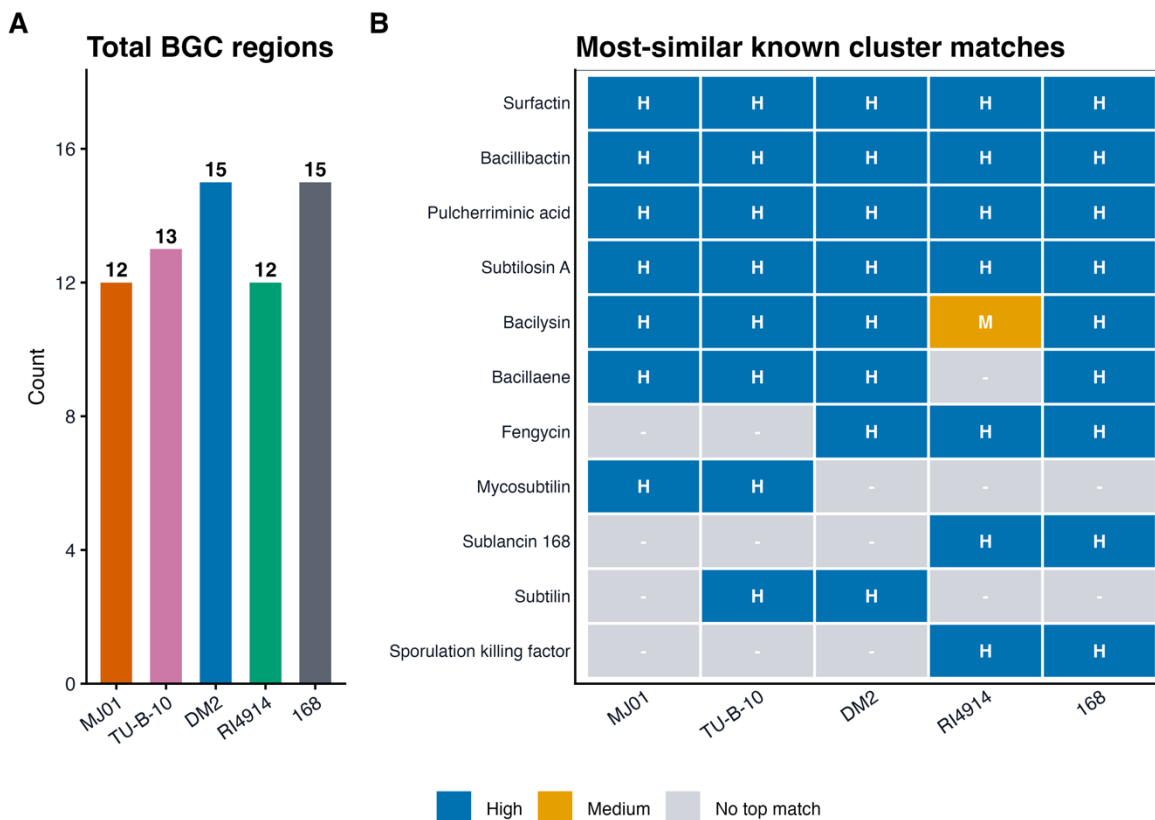
شناسایی شد. در MJ01، علاوه بر سورفکتین، تطابق‌هایی با سطح اطمینان بالا برای خوشه‌های باسیلوباکتین، اسید پولکرری‌مینیک، سوبتیلوزین A، باسیلیسین، باسیلائن و مایکوسوبتیلین گزارش شد (شکل ۴). این نتایج ظرفیت پیش‌بینی‌شده ژنومی را توصیف می‌کنند و به‌منزله تأیید تولید این ترکیبات نیستند.

۳-۳ خوشه‌های ژنی زیست‌سنتزی

در تحلیل antiSMASH، تعداد نواحی BGC در MJ01، RI4914، DM2، TU-B-10 و 168 به ترتیب ۱۲، ۱۳، ۱۵ و ۱۲ بود. در هر پنج ژنوم، ناحیه‌ای با تطابق به خوشه سورفکتین

Predicted biosynthetic gene-cluster repertoire

antiSMASH 8.0.4; relaxed detection strictness; H, high-confidence known-cluster match; M, medium



شکل ۴. مقایسه نواحی خوشه‌های ژنی بیوسنتزی پیش‌بینی‌شده با antiSMASH 8.0.4 پنل A تعداد کل BGC و پنل B نزدیک‌ترین تطابق با خوشه‌های شناخته‌شده را نشان می‌دهد. H و M به ترتیب اطمینان بالا و متوسط را بیان می‌کنند.

پاسخ عمومی به تنش شامل *sigB*, *rsbU*, *clpC* و *clpP* نیز در این سویه وجود داشتند. مورد باقیمانده، *comA*، دارای توقف زودرس پیش‌بینی‌شده بود (شکل ۵). در TU-B-10، تعداد ۳۴ ژن در گروه حفاظت‌شده قرار گرفتند و Comp دارای توالی کامل با هویت پایین‌تر بود. در DM2، تعداد ۳۱ ژن حفاظت‌شده شناسایی شد؛ برای *ybdG*, *ybdJ* و *ybdK* همتای توالی قابل‌اعتمادی به‌دست نیامد و Comp کامل اما واگرا بود. در RI4914، تعداد ۳۲ ژن حفاظت‌شده گزارش شد. در این سویه، *opuD* دارای شواهد

۳-۴ الگوی حفاظت ژنهای سازگاری اسمزی و

پاسخ به تنش

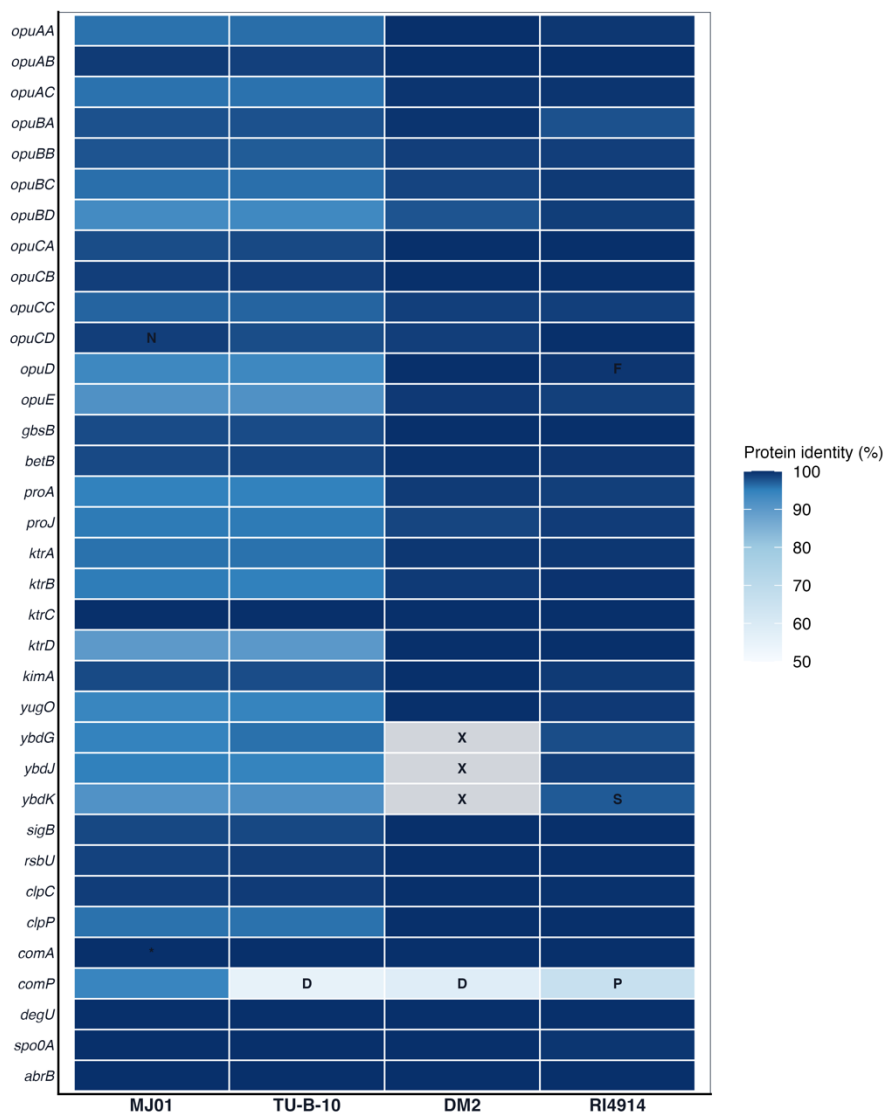
از مجموعه ۳۵ ژنی، ۳۳ ژن در MJ01 بر پایه تطابق توالی در گروه کامل و حفاظت‌شده قرار گرفتند. ژن *opuCD* با پوشش ۹۴/۳ درصدی توالی پرس‌وجو به‌عنوان تطابق تقریباً کامل طبقه‌بندی شد. همتهای ژنهای سامانه‌های انتقال اسمولیت، ژنهای *gbsB* و *betB* مرتبط با ساخت گلیسین‌بتائین، ژنهای *proA* و *proJ* مرتبط با ساخت پرولین و ژنهای هم‌ایستایی پتاسیم شناسایی شدند. اجزای

ارزیابی توالی استوارند و عملکرد ژنها را به‌طور مستقیم نشان نمی‌دهند.

تغییر چارچوب خوانش، *ybdK* دارای تطابق کوتاه‌شده و *comP* مشکوک به قطعه‌قطعه‌شدن در حاشیه‌نویسی بود. این دست‌بندی‌ها بر

Salt- and stress-response gene conservation

BLASTP against strain 168 proteins; grey cells indicate no confident ortholog



D, divergent; N, near-full; S, shortened; P, probable split; F, frameshift; *, premature stop; X, no confident ortholog.

شکل ۵. مقایسه مجموعه ۳۵ ژنی مرتبط با سازگاری اسمزی، پاسخ به تنش و تنظیم سورفکتین نسبت به پروتئین‌های مرجع سویه 168. شدت رنگ نشان‌دهنده درصد هویت در ناحیه هم‌تراز است. نماد D بیانگر توالی کامل ولی واگرا، N تطابق تقریباً کامل، S تطابق کوتاه‌شده، P قطعه‌قطعه‌شدن احتمالی در حاشیه‌نویسی، F تغییر چارچوب خوانش و ستاره توقف زودرس پیش‌بینی شده است. خانه‌های خاکستری با نماد X موارد بدون همتای توالی قابل اعتماد را نشان می‌دهند.

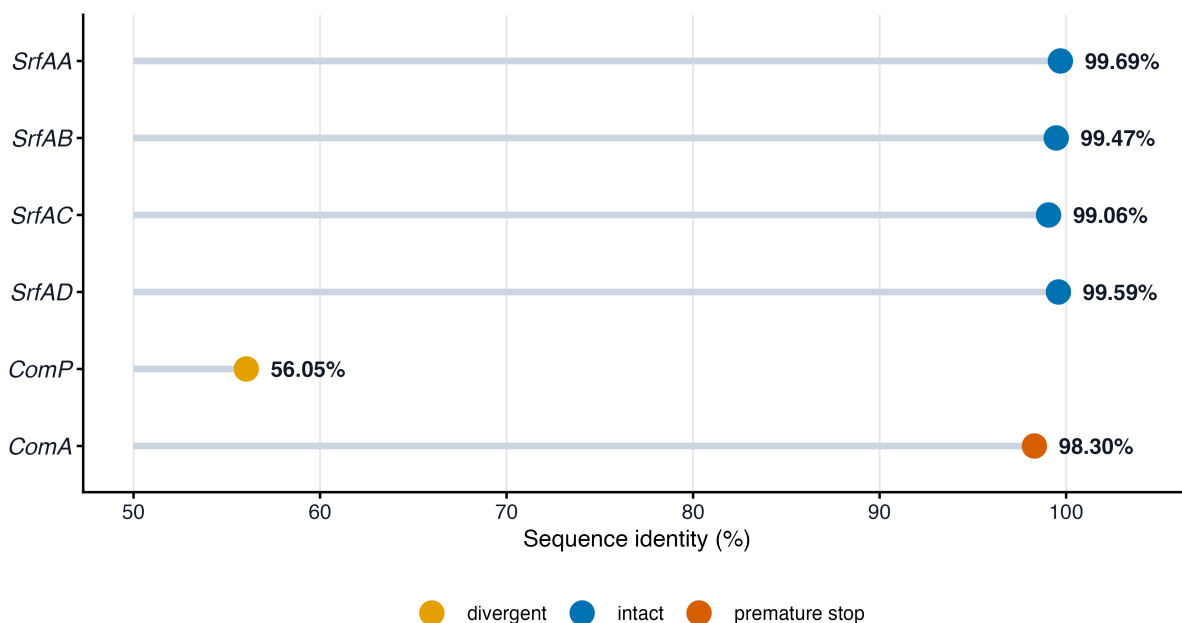
۳-۵ مقایسه پروتئین‌های زیست‌سنتزی و تنظیم‌کننده‌های سورفکتین

در مقایسه مستقیم MJ01 و TU-B-10، پروتئین‌های SrfAA، SrfAB، SrfAC و SrfAD پوشش کامل توالی پرسوجو و طول یکسان داشتند. درصد هویت این پروتئین‌ها به ترتیب ۹۹/۶۹، ۹۹/۴۷، ۹۹/۰۶ و ۹۹/۵۹ بود. حفاظت این اجزا با گزارش پیشین تولید سورفکتین در MJ01 سازگار است، هرچند از مقایسه توالی نمی‌توان مقدار یا شرایط تولید را تعیین کرد.^۱ هم‌ترازی نوکلئوتیدی *comA* سویه MJ01 با توالی مرجع

سویه 168، پوشش کامل و هویت ۹۸/۳۰ درصد نشان داد. در توالی بررسی‌شده، جایگزینی کدون TTA با TGA در جایگاه ۵۳ مشاهده شد که توقف زودرس ترجمه را پیش‌بینی می‌کند و با قطعه‌قطعه‌شدن این ژن در حاشیه‌نویسی Bakta سازگار است. در مقایسه پروتئین ComP میان MJ01 و TU-B-10 نیز پوشش ۹۹/۷۴ درصد و هویت ۵۶/۰۵ درصد به‌دست آمد (شکل ۶). با توجه به تنوع گزارش‌شده ناحیه حسی ComP در سویه‌های طبیعی، هویت پایین‌تر این پروتئین به‌تنهایی نشان‌دهنده اختلال عملکرد آن نیست.^{۱۶}

Surfactin machinery and quorum-response divergence

Direct protein comparisons, except ComA status confirmed by full-length nucleotide alignment



All four SrfA proteins have complete coverage and identical protein lengths in MJ01 and TU-B-10.

شکل ۶. مقایسه پروتئین‌های زیست‌سنتزی سورفکتین و اجزای تنظیمی منتخب. مقادیر SrfAA، SrfAB، SrfAC، SrfAD و ComP. درصد هویت پروتئینی میان MJ01 و TU-B-10 را نشان می‌دهند. مقدار مربوط به ComA، هویت نوکلئوتیدی ژن *comA* میان MJ01 و سویه 168 است؛ بنابراین مبنای این مقدار با سایر نقاط یکسان نیست. رنگ نارنجی، توقف زودرس پیش‌بینی‌شده را مشخص می‌کند.

۴- بحث

نتایج این مطالعه شواهدی از فقدان گسترده ژنهای حفاظت اسمزی در مجموعه بررسی شده MJ01 نشان داد. همتهای بیشتر ژنهای انتقال اسمولیت، ساخت بتائین و پرولین، هم‌ایستایی پتاسیم و پاسخ عمومی به تنش شناسایی شدند. نقش سامانه‌های Opu در جذب اسمولیت‌های سازگار و تنظیم آنها در پاسخ به شرایط اسمزی در مطالعات پیشین توصیف شده است.^{14,15} با این حال حضور این ژنها در ژنوم MJ01 به تنهایی برای نتیجه‌گیری درباره میزان تحمل شوری آن کافی نیست.

تفسیر یافته‌های ژنومی باید با نوع شواهد فنوتیپی مقایسه‌شونده متناسب باشد. برای RI4914، فعالیت سوپرناتانت کشت در غلظت‌های بالای نمک گزارش شده است.³ این مشاهده با توان رشد سلول در هم‌از غلظت نمک یا میزان بیان ژنهای حفاظت اسمزی یکسان نیست. از این رو، پیش‌بینی تغییر چارچوب خوانش در *opuD* این سویه را نمی‌توان مستقیماً با پایداری فعالیت سوپرناتانت مقایسه کرد. بررسی چنین رابطه‌ای به تأیید توالی ژن و اندازه‌گیری مستقل رشد و فعالیت فرآورده در شرایط تعریف‌شده نیاز دارد.

حفاظت بالای SrfAA تا SrfAD، در کنار تغییر پیش‌بینی‌شده *comA*، بررسی تنظیم زیست‌سنتر سورفکتین را به یک مسیر مشخص برای ادامه پژوهش تبدیل می‌کند. *ComA* در تنظیم مستقیم یا غیرمستقیم مجموعه‌ای از ژنهای پاسخ وابسته به حدنصاب نقش دارد.¹⁷ توقف زودرس در کدون ۵۳ می‌تواند بر عملکرد این تنظیم‌کننده اثر بگذارد، اما این اثر در مطالعه حاضر اندازه‌گیری نشده است. از سوی دیگر، تولید سورفکتین توسط MJ01 پیش‌تر گزارش شده است.¹ برای تفسیر هم‌زمان این دو مشاهده، نخست باید صحت توالی *comA* و انطباق جدایه مورد استفاده در مطالعات تأیید شود؛ سپس می‌توان نقش سایر مسیرهای تنظیمی یا بیان پایه اپرون *srfA* را بررسی کرد. واگرایی *ComP* نیز لزوماً به معنای کاهش کارایی مسیر پیام‌رسانی نیست. تنوع ژنتیکی این گیرنده در ارتباط با اختصاصیت سامانه تشخیص فرمون *ComX* گزارش شده است.¹⁶

از این رو، هویت ۵۶/۰۵ درصدی *ComP* میان MJ01 و TU-B-10 می‌تواند با تفاوت در اختصاصیت دریافت پیام سازگار باشد. با این حال انتساب این واگرایی به انتخاب سازشی یا تعیین نوع فرمونی سویه‌ها از داده‌های حاضر امکان‌پذیر نیست و به تحلیل کامل ناحیه *comQXPA* و آزمون پاسخ به فرمون نیاز دارد. قربات ژنومی MJ01 با TU-B-10 برای تفسیر مقایسه‌ها اهمیت دارد. همگرایی نتایج ANI، dDDH و درخت GBDP از جایگاه MJ01 در گروه *B. spizizenii* حمایت می‌کند. بنابراین، تفاوت آن با DM2، RI4914 و سویه 168 ممکن است تا حدی ناشی از فاصله تاکسونومیک باشد. استفاده از TU-B-10 یک مرجع نزدیک برای مقایسه فراهم کرد، اما با تعداد محدود ژنوم‌ها نمی‌تواند اثر خویشاوندی، منشأ محیطی و سازگاری با شوری را به‌طور کامل از یکدیگر تفکیک کرد.

۴-۱ دلالت یافته‌ها برای کاربردهای نفتی

پیشینه جداسازی MJ01 از تأسیسات نفتی ایران و گزارش تولید سورفکتین، بررسی بیشتر این سویه را برای کاربردهای مرتبط با ازدیاد برداشت میکروبی نفت توجیه می‌کند. نتایج حاضر، اعتبارسنجی *comA* و ارزیابی تنظیم اپرون *srfA* را به‌عنوان محورهای پیگیری پیشنهاد می‌کنند. برای ارزیابی کارایی عملی، لازم است رشد و زنده‌مانی باکتری، مقدار سورفکتین و اثر فرآورده بر کشش بین‌سطحی و ترشوندگی در شرایط متناسب با شوری، دما و ترکیب یونی مخزن هدف اندازه‌گیری شوند. در صورت تأیید تغییر *comA*، مقایسه سویه اولیه با سویه مکمل‌شده می‌تواند به روشن‌شدن نقش این ژن در فنوتیپ کمک کند.

۴-۲ محدودیت‌های مطالعه

این مطالعه مبتنی بر توالی‌های عمومی ژنوم و پیش‌بینی‌های محاسباتی بود و داده‌ای از آزمایش رشد، سنجش بیان ژن اندازه‌گیری مستقیم سورفکتین یا آزمون مغزه سنگ تولید نکرد. تغییرات پیش‌بینی‌شده در چارچوب خوانش یا کدون توقف ممکن است تحت تأثیر خطای توالی‌یابی، مونتاژ یا حاشیه‌نویسی قرار گرفته باشند. همچنین نبود تطابق قابل‌اعتماد در جست‌وجوی توالی، فقدان قطعی ژن را اثبات نمی‌کند. استفاده از حالت relaxed

حمایت می‌کنند. تأیید توالی *comA* و سنجش هم‌زمان بیان *srfA*، رشد و تولید سورفکتین در شوری‌های مختلف، گام‌های لازم برای آزمون پیامد عملکردی این یافته‌ها هستند.

ملاحظات اخلاقی

این پژوهش تحلیل ثانویه داده‌های ژنومی عمومی بود و شامل نمونه انسانی، حیوانی یا مداخله بالینی نبود.

دسترسی به داده‌ها

شماره‌های دسترسی ژنوم‌ها در جدول ۱ درج شده‌اند. جدول‌های مقایسه‌ای، داده‌های مبنای شکل‌ها و کد ترسیم در R در مجموعه فایل‌های همراه مقاله ارائه شده‌اند.

تعارض منافع و منابع مالی

این بخش باید پیش از ارسال توسط نویسندگان مسئول تکمیل و تأیید شود.

References

- Jahanbani Veshareh M, Ganji Azad E, Deihimi T, Niazi A, Ayatollahi S. Isolation and screening of *Bacillus subtilis* MJ01 for MEOR application: biosurfactant characterization, production optimization and wetting effect on carbonate surfaces. *J Pet Explor Prod Technol.* 2019;9(1):233-245. doi:10.1007/s13202-018-0457-0.
- Rahimi T, Niazi A, Deihimi T, Taghavi SM, Ayatollahi S, Ebrahimie E. Genome annotation and comparative genomic analysis of *Bacillus subtilis* MJ01, a new bio-degradation strain isolated from oil-contaminated soil. *Funct Integr Genomics.* 2018;18(5):533-543. doi:10.1007/s10142-018-0604-1.
- Fernandes PL, Rodrigues EM, Paiva FR, Ayupe BAL, McInerney MJ, Tótola MR. Biosurfactant, solvents and polymer production by *Bacillus subtilis* RI4914 and their application for enhanced oil recovery. *Fuel.* 2016;180:551-557. doi:10.1016/j.fuel.2016.04.080.

در *antiSMASH* و تفاوت گونه‌ای میان ژنوم‌ها باید در تفسیر نتایج لحاظ شود. تعداد محدود سویه‌ها، نبود فنوتیپ‌های اندازه‌گیری شده در شرایط یکساز و پوشش هدمند ژنهای منتخب، استنتاج درباره سازگاری جغرافیایی، عملکرد کامل مسیرها و رابطه علی ژنوتیپ و فنوتیپ را محدود می‌کند.

۵- نتیجه‌گیری

در مجموعه ژنهای بررسی شده، MJ01 بیشتر همتهای مرتبط با حفاظت اسمزی، هم‌ایستایی پتاسیم و پاسخ به تنش را حفظ کرده بود. پروتئین‌های *SrfAA* تا *SrfAD* نیز در مقایسه با سویه تیپ TU-B-10 حفاظت بالایی نشان دادند. توقف زودرس پیش‌بینی شده در *comA* و واگرایی *ComP*، نامزدهایی برای بررسی تنظیم زیست‌سنتر سورفکتین هستند؛ با این حال نقش آنها در تحمل شوری یا تولید سورفکتین هنوز اثبات نشده است. نتایج خویشاوندی ژنومی نیز از انتساب MJ01 به *B. spizizenii*

- Ferreira JKDL, Varani AM, Tótola MR, Almeida MF, Melo DS, Batista CFSE, et al. Phylogenomic characterization and pangenomic insights into the surfactin-producing bacteria *Bacillus subtilis* strain RI4914. *Braz J Microbiol.* 2022;53(4):2051-2063. doi:10.1007/s42770-022-00815-0.
- Li SW, Liu MY, Yang RQ. Comparative genome characterization of a petroleum-degrading *Bacillus subtilis* strain DM2. *Int J Genomics.* 2019;2019:7410823. doi:10.1155/2019/7410823.
- Earl AM, Eppinger M, Fricke WF, Rosovitz MJ, Rasko DA, Daugherty S, et al. Whole-genome sequences of *Bacillus subtilis* and close relatives. *J Bacteriol.* 2012;194(9):2378-2379. doi:10.1128/JB.05675-11.
- Kunst F, Ogasawara N, Moszer I, Albertini AM, Alloni G, Azevedo V, et al. The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature.* 1997;390(6657):249-256. doi:10.1038/36786.

8. Gurevich A, Saveliev V, Vyahhi N, Tesler G. QUAST: quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics*. 2013;29(8):1072-1075. doi:10.1093/bioinformatics/btt086.
9. Schwengers O, Jelonek L, Dieckmann MA, Beyvers S, Blom J, Goesmann A. Bakta: rapid and standardized annotation of bacterial genomes via alignment-free sequence identification. *Microb Genom*. 2021;7(11):000685. doi:10.1099/mgen.0.000685.
10. Jain C, Rodriguez-R LM, Phillippy AM, Konstantinidis KT, Aluru S. High throughput ANI analysis of 90K prokaryotic genomes reveals clear species boundaries. *Nat Commun*. 2018;9(1):5114. doi:10.1038/s41467-018-07641-9.
11. Meier-Kolthoff JP, Göker M. TYGS is an automated high-throughput platform for state-of-the-art genome-based taxonomy. *Nat Commun*. 2019;10:2182. doi:10.1038/s41467-019-10210-3.
12. Blin K, Shaw S, Vader L, Szenei J, Reitz ZL, Augustijn HE, et al. antiSMASH 8.0: extended gene cluster detection capabilities and analyses of chemistry, enzymology, and regulation. *Nucleic Acids Res*. 2025;53(W1):W32-W38. doi:10.1093/nar/gkaf334.
13. Camacho C, Coulouris G, Avagyan V, Ma N, Papadopoulos J, Bealer K, et al. BLAST+: architecture and applications. *BMC Bioinformatics*. 2009;10:421. doi:10.1186/1471-2105-10-421.
14. Kappes RM, Kempf B, Bremer E. Three transport systems for the osmoprotectant glycine betaine operate in *Bacillus subtilis*: characterization of OpuD. *J Bacteriol*. 1996;178(17):5071-5079. doi:10.1128/jb.178.17.5071-5079.1996.
15. Hoffmann T, Wensing A, Brosius M, Steil L, Völker U, Bremer E. Osmotic control of opuA expression in *Bacillus subtilis* and its modulation in response to intracellular glycine betaine and proline pools. *J Bacteriol*. 2013;195(3):510-522. doi:10.1128/JB.01505-12.
16. Tortosa P, Logsdon L, Kraigher B, Itoh Y, Mandic-Mulec I, Dubnau D. Specificity and genetic polymorphism of the *Bacillus* competence quorum-sensing system. *J Bacteriol*. 2001;183(2):451-460. doi:10.1128/JB.183.2.451-460.2001.
17. Comella N, Grossman AD. Conservation of genes and processes controlled by the quorum response in bacteria: characterization of genes controlled by the quorum-sensing transcription factor ComA in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol*. 2005;57(4):1159-1174. doi:10.1111/j.1365-2958.2005.04749.x.