دو فصلنامه

بیوتکنولوژی و میکروبیولوژی کاربردی

سال دوم، شماره ۳ و ۴، پاییز و زمستان ۱۳۹۲

بررسی حضور متانوژن‌ها درآب شور دریا

میترا السادات طباطبائی *

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

چکیده

متانوژن‌ها دسته‌ای از آرکی‌های به شدت بی‌هوازی هستند که می‌توانند در محیط‌های متنوعی زندگی کنند. از جمله این محیط‌ها که مورد توجه بسیاری از محققین نیز قرار گرفته است، محیط‌های دریایی با درجه شوری بالا است. در این تحقیق حضور متانوژن‌های بومی در آب‌های سطحی خلیج فارس مورد بررسی قرار گرفته است. نمونه‌گیری‌ها در ظروف در پیچ دار انجام و کشت در Serum bottle بصورت بی‌هوازی با تنظیم گازهای دی اکسید کربن و هیدروژن انجام گرفت. سپس حضور متانوژن‌ها از لحاظ تولید گاز متان توسط دستگاه گاز کروماتوگراف مورد بررسی قرار گرفت و رشد نمونه‌ها با میکروسکوپ فلورسنت مطالعه شد. آنالیز نتایج حاصل از گاز کروماتوگرافی بیانگر حضور متانوژن‌های بومی آب‌های شور ایران بود. ضمنا مشخص شد میزان فعالیت متانوژنز با توجه به ترکیبات محیط کشت متفاوت می‌باشد. چنان که در محیط‌های کشت ساخته شده با آب دریای سنتتیک تولید متان بیشتر از آنهایی است که با آب مقطرساخته شده است و این نشانگر نیاز این میکروارگانیسم‌ها به نمک های موجود در آب دریا شامل NaCl، $MgCl_2$، KCl و $MgSo_4$ است. از این میان نمک طعام مورد بررسی قرار گرفت و نتایج حاصل حاکی از هالوفیل بودن متانوژن‌های دریازی بود به طوریکه این میکروارگانیسم‌ها قادر به تحمل بازه گسترده‌ای از شوری می‌باشند. مشاهدات میکروسکوپ فلورسنت نشان داد که افزایش شوری با افزایش اندازه میکروارگانیسم‌ها و تعداد آنها نسبت دارد.

واژه‌های کلیدی: متانوژن، آب دریا، شوری

مقدمه

در طی ۵۰ سال گذشته، تحقیقات روی میکرواورگانیسم‌ها در محیط‌های دشوار مانند محیط‌های با pH بالا، دمای بالا، غلظت مواد غذایی و فشار، اطلاعات وسیعی را در رابطه با تنوع و منشأ زندگی گسترده میکروبی در اختیار ما قرار داده است. آرکی‌ها که سومین عرصه از میدان حیات می‌باشند شامل تعداد کثیری از اکستریموفیل‌ها هستند که در این محیط‌ها مثل چشمه‌های آب گرم، دریاچه‌های نمک و آتشفشان‌های زیر آب زندگی می‌کنند. شناسایی آرکی‌ها به عنوان ناحیهٔ مجزایی از ارگانیسم‌ها بر مبنای تجزیه و تحلیل مقایسه‌ای توالی‌های RNA بود که منتج به شناسایی دستهٔ متفاوتی از رده‌بندی‌های کلاسیک شد. اصطلاح (Archaea) آرکیا بیانگر دیدگاه اولیه‌ای است که این

* مسئول مکاتبات: Mit.Tabatabaee@iauctb.ac.ir

ارگانیسم‌ها را به سطحی از زندگی اولیه بر می‌گرداند که قبل از اشتقاق باکتری‌ها را از یوکاریوت‌ها بوده است(۱). با این وجود بر مبنای توالی‌های موجود پروتئینی، آرکی‌ها در شاخه‌ای قرار می‌گیرند که به یوکاریوت‌ها ختم می‌شود(۲). پدیده‌ای که باعث تمیز آرکی‌ها از باکتریها می‌شود ساختار ریبوزومی آرکی‌هاست که اولین بار در هالوفیل‌ها مشخص شد که بیشتر اسیدی هستند تا بازی، به علاوه ماشین همانندسازی و ساختار RNA پلیمراز وابسته به DNA در این گروه منحصر به فرد بوده و با توجه به ساختار زیر واحدهای آن ارتباط نزدیک‌تری را با یوکاریوت‌ها در قیاس با پروکاریوتها از خود نشان می‌دهند(۳) .ویژگی دیگر متمایز کنندهٔ آرکی‌ها از باکتری‌ها ترکیب لایه‌های سطحی آن‌هاست. آرکی‌ها دارای فلاژین های ویژه و لیپیدهای با پیوندهای اتری هستند و فاقد مورین در دیواره می‌باشند(٤) و لایه‌های سطحی گلیکوپروتئین این‌ها می‌تواند ساختارهای شبه کریستالی را که به محکمی به غشاء سلولی چسبیده‌اند، ایجادکند. لذا هیچ فضای پری پلاسمی باقی نخواهد ماند(۲،۵،٦). از جمله مهمترین و اولین آرکی های شناخته شده متانوژن ها میباشند. تولید متان تحت شرایط به شدت بی‌هوازی روی می‌دهد، بنابراین پروسه و روند متانوژنز به زیستگاه‌های با پتانسیل اکسید و احیا منفی محدود می‌شود. از میان سوبستراهای مختلف، ده سوبسترا نشان داده شده است که توسط یک یا تعداد بیشتری از متانوژن‌ها، قابل تبدیل به متان می‌باشند که به طور کلی در سه دسته اصلی سوبسترا دسته‌بندی می‌شوند که در جدول ۱ آمده است.

جدول۱- سوبستراهای مصرفی مختلف متوسط متانوژنها (۱)

substrates converted to methane by various methanogenic Archaea	
I- CO_2 type substrates	Carbon dioxide CO_2 (with electrons derived from H_2 or certain alcohols) Formate HCOO- Carbon monoxide CO
II- Methyl substrates	Methanol CH_3OH Methylamine CH_2NH_3 Dimethylamine $(CH_3)_2NH_2$ Trimethylamine $(CH_3)^3NH$ Methylmertapcan CH_2SH Dimethylsulflde $(CH_3)_2S$
III- Acetoclastic substrates	Acetate CH_3COO

متانوژن‌ها در نیچ‌های اکولوژیک گسترده‌ای از جمله دریاهای آزاد، آب شیرین، چشمه‌های آب گرم زیر زمینی، هاضم‌های بیهوازی تصفیه آب و سیستم گوارشی حیوانات یافت می‌شوند(۷). امروزه توجه زیادی به مطالعه متانوژنز در محیط‌های آبی معطوف شده است خصوصا بررسی تفاوت‌ها و شباهت‌های متانوژنز در آب‌های شور و شیرین(۸). اصولا متانوژن‌ها در اعماق و رسوبات بی‌هوازی دریاها و اقیانوس‌ها و حتی مصب رودخانه‌ها به علت شرایط اکسیداسیون و احیا منفی یافت می‌شوند(۹،۱۰). با این وجود غلظت بالایی از متان در بخش‌های سطحی‌تر بسیاری از دریاها و اقیانوس‌ها که در معرض هوادهی هستند دیده می‌شود که این یافته خود معمایی از متان موجود در آب‌های آزاد

است(۱۱،۱۲). توجیهی که برای وجود متان بیوژنیک در بخش‌های سطحی آب‌های آزاد ارائه شده است مبنی بر حضور متانوژن‌ها در بخش‌هایی مثل سطوح بدن موجودات دریایی اعم از فیتو و زئو پلانکتون‌ها تا نهنگ‌ها و بقایای ذره‌بینی و معلق مدفوع آنها یا ذرات ریز دریایی تحت عنوان ذرات برف دریایی می‌باشد(۱۳،۱۲،۱۰)

مواد و روش‌ها

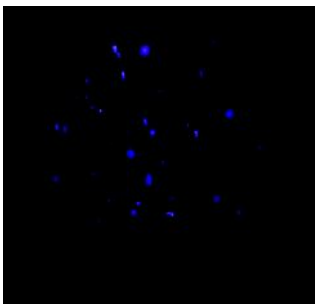
نمونه‌گیری در شیشه‌های در پیچ دار از خلیج فارس انجام شده بود و نمونه‌ها در دمای محیط به آزمایشگاه منتقل شدند. دو نمونه آب دریا از یک نقطه نزدیک ساحل و دیگری از آب سطحی عمیق‌تر مورد بررسی در این مطالعه بوده اند. از آنجا که متانوژن‌ها موجودات به شدت بی‌هوازی هستند، از کشت به روش serum bottle که توسط Miller و Wollin در سال ۱۹۷۳ ارائه شده بود استفاده شد(۱۲،۱٤،۱۵،۳،۵) شیشه‌های سرمی تا نیمه از محیط‌کشت پر می‌شد و سپس تنظیم اتمسفریک با گاز N_2 و $CO_2 + H_2$ انجام می‌گرفت. کشت‌های جامد در پلیت و یا لوله آزمایش به صورت Slant در جار بی‌هوازی با تنظیم اتمسفریک با N_2 و CO_2+H_2 در حضور گاز پک A و C انجام می‌شد. گرما گذاری در ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۱ روز صورت می‌گرفت. در این مطالعه سه نوع محیط کشت مورد استفاده قرار گرفت که عبات بودند از: Mineral Salt-Methanol(١٦) حاوی ۱گرم NH_4Cl ، ۰/۰٤ گرم K_2HPo_4، ۱۰گرم Methanol، ۰/۰۱ گرم $MgCl_2$، ۲۰ گرم استات کلسیم در آب دریای استریل شده که برای کشت اولیه استفاده شد. LPBM برای غنی‌سازی انتخابی و رشد متانوژن‌ها بکار برده شد(۱۵)که حاوی ۰/۷۵ گرم KH_2PO_4، ۱/٤۵ گرم $K_2HPO_4.3H_2O$، ۰/۹ گرم NH_4Cl ، ۰/۲ گرم $MgCl_2.H_2O$ ، ۰/۵ گرم $Na_2S.9H_2O$ که Stock سولفید سدیم به صورت فیلتر استریل تهیه می‌شد و پس از اتوکلاو به محیط اضافه می‌شد و ۹ میلی‌لیتر محلول فلزات نادر به همراه ۱ میلی لیتر محلول ویتامین‌ها و ۱ میلی لیتر محلول رزازورین ۰/۲ درصد برای احیاء کردن محیط کشت بود و با آب مقطر به حجم ۱۰۰۰ سی‌سی رسانده شد. pH محیط قبل از اتوکلاو معادل ۷/٤ تنظیم می‌شود. محیط دیگر – Medium 141 Methanognium media-DSMZ list of media بود که محیطی بسیار غنی با انواع محرک‌های رشد متانوژنیک بود، مورد استفاده قرار گرفت. سه سوبسترای اصلی متانوژنیک یعنی CO_2+H_2 و فرمات (به‌صورت فرمات سدیم) ومتانول به نسبت ۱ درصد به تمام محیط‌ها افزوده شد. کشت‌ها ابتدا در LPBM انجام گرفت تا به علت حذف سولفات در این محیط پایه احتمال رشد باکتری‌های احیاء کنندهٔ سولفات را که بزرگترین رقبای متانوژن‌ها در محیط‌های طبیعی می‌باشند کاهش یافته (۱۲) همچنین حذف ترکیبات آلی مثل trypticase و yeast extract رشد آلاینده‌های هتروتروف را تقلیل می‌دهد. البته اگرچه این محیط برای این مطالعه کارآمد است اما برای شمارش و سنجش کار متانوژن‌های یک محیط طبیعی محدودیت دارد زیرا برخی از گونه‌های خاص به برخی از ترکیبات آلی محرک رشد برای تکثیر و بقا نیاز دارند(۱۵). سپس کشت مجدد برای تقویت رشد متانوژنیک در DSMZ صورت گرفت. به علاوه برای حذف یوباکترها از سه آنتی بیوتیک پنی سیلین (برای

حذف گرم مثبت‌ها)، استرپتومیسین (حذف گرم منفی‌ها) و اریترومایسین (به عنوان ضد باکتری وسیع الطیف) به میزان ۵۰mg/l (۱۷) در تمام محیط‌های کشت استفاده می‌شد (۲،۹،۱۸) برای بررسی کلونی‌های متانوژنیک به محیط‌های کشت ۲درصد آگار آگار (۲۰،٦) افزوده شد. در مرحله بعد بررسی‌ها به جای آب دریای استریل از آب دریای سنتتیک از partB محیط sea water agar، تولید شرکت High media استفاده شد. فرمولاسیون آب دریا سنتتیک دارای ۲٤گرم NaCl، ۰/۷۰ گرمKCl، ۵/۳۰ گرم $MgCl_2 . 6H_2O$ و ۷/۰۰ گرم $MgSo_4.$ $7H_2O$ در ۱۰۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر می‌باشد. در مشاهدات ماکروسکوپی در محیط جامد برای تمییز کلونی ها از روش ارائه شده توسط Edwards و Mc Brid (۲۰) استفاده شد. به این صورت که پلیت‌هایی که به صورت خطی کشت داده شدند، در برابر نور ماوراء بنفش با طول موج بلند قرار می‌گیرند و کلونی‌های ریزی به صورت فلورسنت در سطح پلیت دیده می‌شوند (کلونی‌های کوچک‌تر از ۰/۵ میکرون خاصیت فورسنت ندارند(۱۵) (شکل ۱). در تمام محیط‌ها نمونه‌ها به مدت ۲۱ روز در۳۰ درجه سانی‌گراد گرماگذاری شدند. همچنین در محیط مایع نمونه‌ها در برابر UV ویا نور خورشید قرار داده شدند تا ذرات معلق فلورسنت قابل رویت شود. به منظور بررسی رشد و مطالعات میکروسکوپی از میکروسکوپ فلورسنت استفاده شد. تولید گاز متان بوسیله گاز کروماتوگرافی با دستگاه کروماتوگراف مدل SRI8010 در حد PPM (close found 6% cyanopropyle- 94% dimethyle polysicloxane) برای حصول اطمینان از متانوژنز، بکار برده شد. در یک مورد که دقت دستگاه کمتر از میزان متان تولیدی بود با استناد به اساس set up ارائه شده توسط Atlas و Brown (۱٦)، روش ابتکاری جدیدی بکار برده شد که در آن کبریت شعله‌وری در نزدیک انتهای یک سوزن سرنگ قرار گرفت و سر سوزن در درپوش پلی‌اتیلنی شیشه سرمی با سرعت وارد شد که وجود گاز جمع شده زیر در پوش و خروج ناگهانی آن منجر به شعله‌ورتر شدن لحظه ای کبریت شد.

تاثیر غلظت نمک (NaCl) بر رشد نیز مورد بررسی قرار گرفت.

بررسی رشد از غلظت ۱/۸ درصد با توجه به فرمولاسیون محیط DSMZ آغاز شد. سپس غلظت‌های ۱/۸و۲/٤و ۳/۵و ٤/۵و ٦و ۹و ۱۲و ۱٤و ۱۷و ۲۰و ۲۲و ۲٤و ۲٦و ۳۰ و ۳۲ (درصد اشباع در ۲۵درجه سانتی‌گراد) درصد نمک NaCl بررسی شد.

شکل ۱- کلونی های فلورسنت



شکل ۲- میکروگراف فلورسنت

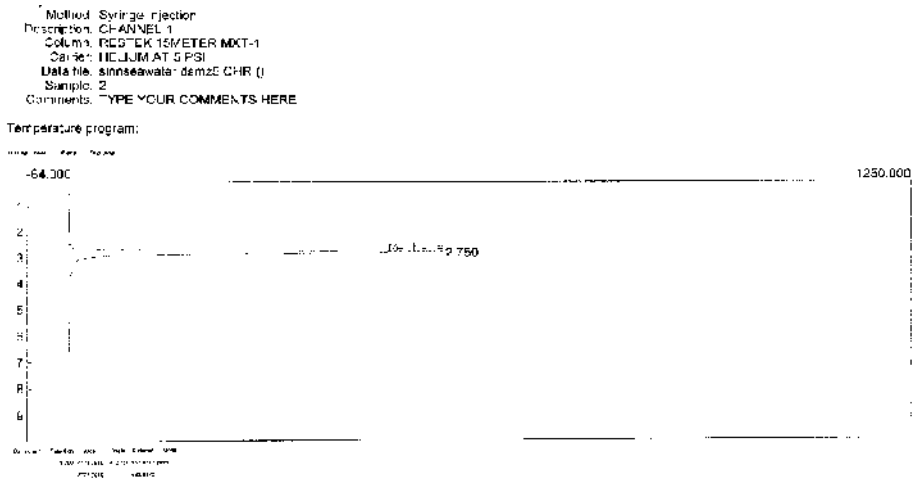
نتایج

کنده شدن Slant ها از کف لوله آزمایش که

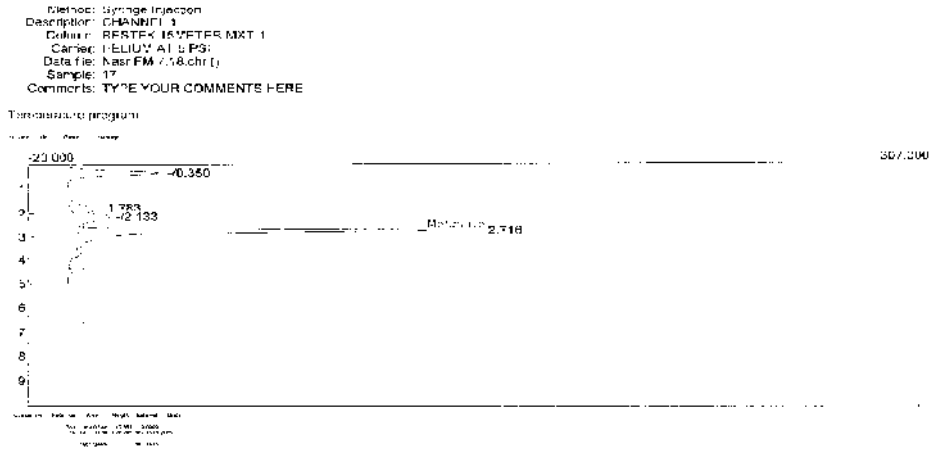
حاصل از تولید گاز بود. با قرار گرفتن در معرض برابر نور ماوراء بنفش با طول موج بلند کلونی‌های ریزی به صورت فلورسنت در سطح پلیت دیده شد همچنین ذرات معلق درخشان در محیط مایع زمانی که در برابر UV ویا نور خورشید قرار داده می‌شدند مشاهده شد که بیانگر رشد متانوژن‌ها و ایجاد کلونی در آنها بود.

متانوژن‌ها با اشکال و تنوعی از تعداد توسط میکروسکوپ فلورسنت قابل رویت بودند.

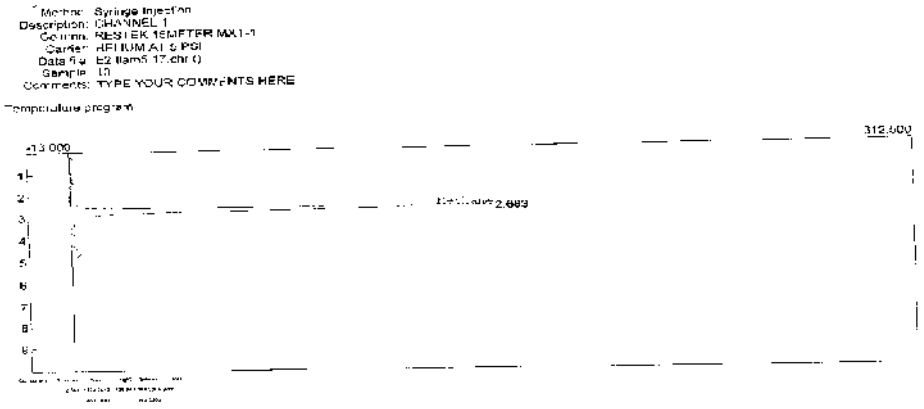
ردیابی تولید گاز متان توسط گاز کروماتوگراف معرفی شده در مواد و روش‌ها حاکی از فعالیت متانوژنیک در نمونه‌های آب دریا مورد بررسی بود.میزان متان تولیدی با محاسبه سطح زیر نمودار در نمونه ISA در محیط DSMZ Sea water معادل ۹۱/۵٦۸ و در محیط LPBM معادل ppm ۲۵/۵۸۵ بود. میزان متان تولیدی در نمونه IE2 در محیط DSMZ Sea water معادل ۲۱/۳۵۵بود و در محیط LPBM کمتر مقدار قابل تشخیص با دستگاه مورد استفاده بود لذا با استاده از روش شعله ور شدن آنی تنها ثابت شد که متان تولید شده است.



شکل ۳- کروماتوگرام نمونه ISA در Seawater DSMZ



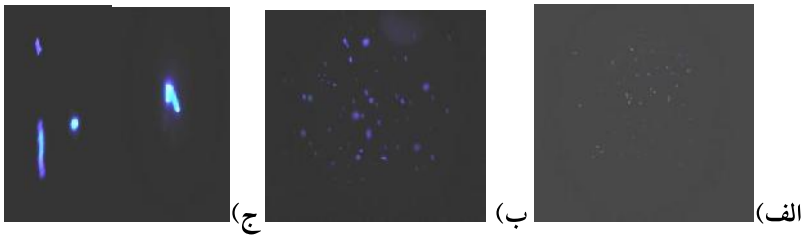
شکل ٤- کروماتوگرام نمونه نمونه ISA درLPBM



شکل ۵-کروماتوگرام نمونه E_2 Injection water در Seawater DSMZ

در بررسی تاثیر غلظت نمک (NaCl) بر رشد(۲۱) هیچگونه رشد متانوژنیک در محیط فاقد نمک ردیابی نشد و مشخص شد که با افزایش غلظت تا ۱۲ درصد بر تعداد باکتری‌ها در مشاهدات میکروسکوپی افزوده می شد (شکل۵) اما در غلظت‌های بالاتر گرچه بر تنوع مورفولوژیک افزوده می‌شد از تعداد باکتری‌ها کاسته می‌شد(شکل ٦) چنان که در غلظت‌های بالای ۲۰ درصد انگشت شمار متانوژن‌هایی که اندازه آنها بسیار بزرگ شده بود دیده می‌شد.

شکل ٦- سری رقت‌های نمکی



الف) ب) ج)

شکل ۷- میکروگراف با شوری الف) غلظت۲/٤درصد ب) غلظت۱۲درصد ج) غلظت۳۰ درصد نمک

بحث

در محیط‌های دریایی خصوصا آنهایی که دارای حجم قابل ملاحضه‌ای مواد آلی هستند مثل رسوبات ساحلی متانوژنز متیلوتروفی و اتوتروفی به وفور دیده می‌شود و گونه‌های مصرف کننده استات غالبا در آبهای شیرین دیده می‌شوند(۲۲). با این وجود با توجه به هدف این مطالعه که بررسی حضور متانوژنها صرف نظر از سوبسترای مصرفی آنها بود در

محیط‌های کشت متانوژنیک به منظور بررسی حضور متانوژن‌های مصرف کننده از هر سه دسته سوبسترا استفاده شد. در سال ۱۹۷۷ Mink و Dugan روش استفاده از میکروسکوپ فلورسنت را برای شناسایی نسبی متانوژن‌ها ارائه دادند(۱۲،۲۱،۲۳،۲٤). آنها بیان کردند که فاکتور F420 (۲۵) در شرایط اکسیده قادر به تولید فلورسنت سبز–آبی است(۲٦) که این اساس استفاده از میکروسکوپ فلورسنت بود و همچنین روش کشت سطحی در پلیت بنا بر روش ارائه شده توسط Edwards و Mc Bride (۲۷) بر اساس همین خاصیت در متانوژن‌ها بود. گاز کروماتوگرام‌ها اطلاعات خوبی را در مورد فعالیت متانوژنز ارائه دادند. با توجه به این که آب تزریقی از آب دریاست محیط غنی DSMZ با آب مشابه آب دریا ساخته شد تا شرایط رشد مناسب متانوژن‌ها محیا گردد. در محیط‌ها هر سه سوبسترای متانول، فرمات و CO_2 لحاظ شدند. نمونه‌ها در ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۱ روز گرماگذاری شدند.

جدول ۲- میزان متان تولیدی بر حسب ppm

نمونه‌های آب‌دریا	آب ISA	آب IE_2
میزان متان تولیدی	۹۱/٥٦۸ ppm	۲۱/۳۷۱ ppm

برای بررسی تأثیر نمک‌های دریا در محیط‌کشت و نیز غنی‌سازی و ترکیب محیط‌کشت بر میزان فرآیند متانوژنز، نمونه ISA که دارای تولید بسیار خوب و قابل ملاحظه‌ای از متان بود در محیط LPBM نیز کشت داده شد. پس از گرماگذاری در ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۱ روز نمونه مورد بررسی گاز کروماتوگرافی قرار گرفت. نتیجه حاصل بیانگر کاهش بسیار چشمگیر متانوژنز در محیط بود. میزان تولید در محیط LPBM به ۲۷/۵۸۳ کاهش یافته بود.

جدول ۳- تفاوت متانوژنز نمونهٔ ISA در دو محیط ساده و غنی شده با آب دریا

نمونه تزریقی ISA	در محیط Seawater	در محیط LPBM
میزان متان تولیدی (ppm)	۹۱/٥٦۸	۲۷/۵۸۳

نتیجه حاصله بیانگر نیاز متانوژن های موجود در آب دریا به نمک‌های معدنی آب دریا برای رشد است یعنی وجود نمک‌های معدنی آب دریا برای متانوژن های دریازی حیاتی بوده و به شدت بر تعداد و تنوع میکروبی می‌افزاید. تمام اطلاعات بدست آمده دراین مطالعه اعم از یافته‌های ماکروسکوپی، میکروسکوپی و گاز کروماتوگرافی حاکی از حضور متانوژن‌ها از متانوژن‌های نمک دوست در بخش سطحی آب‌های خلیج فارس به عنوان دسته‌ای از میکرو ارگانیسم‌های بومی دریا بود. تحقیقات متعددی در سراسر دنیا مؤید حضور متانوژن ها در شرایط دریایی بوده است. نتایج حاصل از بررسی شوری بیانگر تحمل پذیری حیطه وسیعی از تغییرات محیطی در شرایط کاملاً بی‌هوازی در این میکروارگانیسم‌ها بود. و این خود نشانگر شرایط و ویژگی‌های منحصر به فرد این آرکی‌های متانوژن است.

منابع

1- Brock T. D. MMT. Biology of microorganisms. Prentice hall.Inc – sixth edition; 1991.

2- Rapheal. S.V SKR, Lalitha. K. Metabolic characteristics of an aerobe isolated from a methylotrophic methanogenic enrichment culture. Journal of bioscience. 2003; 28 (2): 235-42.

3- Warren. E BBA, Godsy.E.M, editor. Inhibition of acetoclastic methanogenesis by crude oil from Bemidji, Minnesota. USGeological survey toxic substances hydrology program Proceeding of technical meeting; 1999; Charleston, south Carolina.
4- Brown.L.R AA, Vadie .A. A study of the interaction between organisms, microbial by– Product and oil bearing formation material – Barttesville project office Barthesville, oklahma: U.S. Department of energy; 1992 Contract No.: Document Number|.
5- Holowenko FM, mackinnon MD, Federok PM. Methanogens and sulfate reducing bacteria in oil sands fine tailing waste. canadian journal of microbiology. 2000; 46: 927-37.
6- Whiteman W.B. PF, Blum P., Klein A. What archaea have to tell biologists. Genetics. 1999; 152 1245-8.
7- Boopathy R. DL. Isolation and Characterization of a Marine Methanogenic Bacterium from the Biofilm of a Shiphull in Los Angeles Harbor. Current Microbiology. 1992; 25: 157-64.
8- John Parkes R. SH, Webster G. , Watkins A. J., Weightman A. J. , O'SullivanL. A., Cragg B. A. Methods for Studying Methanogens and Methanogenesis in Marine Sediments. Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology. Berlin: Springer 2010.
9- Kendall M. M. LY, Sieprawska-Lupa M., Stetter K. O., Whitman W. B., Boone D. R. Methanococcus aeolicus sp. nov a mesophilic, methanogenic archaeon from shallow and deep marine sediments. Int J Syst Evol Microbiol. 2006; 56(7): 1525 - 9.
10- Singh N. KMM, Liu Y., Boone D. R. Isolation and characterization of methylotrophic methanogens from anoxic marine sediments in Skan Bay, Alaska: description of Methanococcoides alaskense sp. nov., and emended description of Methanosarcina baltica. Int J Syst Evol Microbiol. 2005; 55: 531-2538.
11- R.P. K. Production and consumption of methanein aquatic systems. In: Microbial Production and Consumption of Greenhouse Gases: Methane, Nitrogen Oxides, and Halomethanes. Washington DC: Rogers, J.E. and Whitman, W.B., Eds.; 1991 Contract No.: Document Number.
12- Marc J.E.C. VdMA, Wander Sprenger B., Reneè Haanstra A., Larry J. Forney A.,. Detection of methanogenic archaea in seawater particles and the digestive tract of a marine species. FEMS Microbiology Letters. 1999; 173: 189-94.
13- J.McN. S. C1 bacteria in the water column of Chesapeake Bay USA, Distribution of sub-populations of O2-tolerant, obligately anaerobic, methylotrophic methanogens that occur in microniches reduced by their bacterial consorts. Marine Ecology. 1993;95:68-70.
14- Federok Ph.M CD, Salloum M.J., Dudas M.J. Methanogenic potential of tailing sands extraction plants. Canadian journal of microbiology. 2000; 48: 21-3.
15- Zeikus JG. The biology of methanogenic bacteria. Bacteriological reviews. 1977; 42: 514- 41.
16- Atlas. R.M BAE, Dobra K.W.,. Experimental microbiology. New York Mackmillan, U.S.: Fundumental publishing company; 1988.
17- Lanoil B. O. SR, La Duc M.T.,Sweet S.T.,Nelson K.H. Bacteria and archaea physically Associated with Gulf of Mexico gas hydrates. Applied Applied and Environment Microbiology. 2001; 67(11): 5143-53.
18- Boone D.R. CRW. Burgey's manual of systematic bacteriology. Newyork: elsevier; 2001.
19- Kandler O. KH. Cell wall polymers in archaea. CMLS, cell Mol life, Sci. 1998; 54: 305 – 8.
20- Edwards T, McBride B. C. New method forvthe isolation and identification of methanogenic bacteria. Applied microbiology. 1975; 29: 540-5.
21- Mink R.W. DPR. Tentative identification of methanogenic bacteria by fluorescence microscopy. Applied and Environmental Microbiology. 1977; 33(3): 713-7.
22- Ferry J. J, Lessner D.G. Methanogenesis in Marine Sediments. Annals of the New York Academy of Sciences. 2008; 1125: 147-15.

23- Buchenau .B TRK. Tetrahydrofulate specific enzyme in Methanosarcina barker and growth dependence of this mehanogenic archaean of folic acid or p-aminobenzioc acid. Archives of microbiology. 2004; 182(4): 313-25.
24- Doddema. H.J VGD. Improved identification of methanogenic bacteria by fluorescence microscopy. Applied and Environmental Microbiology. 1987; 36(5): 752-4.
25- Ashby.k.D CTA, Rasmnssen .M.A, Petrich I.W. Steady and time resolved spectroscopy of F420 extracted from methanogen cell and its utility as a marker for fecal contamination. Agrec Food Chem. 2001; 49:1123-7.
26- Schafer . G EM, volker.M. Bioenergetics of archaea. Microbiology and molecular biology reviews. 1999; 63(3):570 – 620.
27- Whiteman W.B. PF, Blum P., Klein A.,. What archaea have to tell biologists. Genetics. 1999; 152: 1245-8.