

## جداسازی و شناسایی باکتری‌های پلی‌اکستریموفیل قلیادوست، نمک‌دوست و تحمل‌کننده نمک تالاب قلیایی شور-دریایی گمیشان

آزاده شاهین‌پی<sup>۱</sup>، محمد علی آموزگار<sup>۲\*</sup> و عباس اخوان سپهی<sup>۴</sup>

<sup>۱</sup> بخش میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران

<sup>۲</sup> بخش میکروبیولوژی، دانشکده زیست‌شناسی و قطب تبارزایی موجودات زنده، پردیس علوم، دانشگاه تهران، تهران، ایران

<sup>۳</sup> بانک میکروارگانسیم‌ها، مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران، کرج، ایران

<sup>۴</sup> گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، تهران، ایران

### چکیده

تالاب گمیشان یک اکوسیستم طبیعی در ۳۵ کیلومتری شمال غربی گرگان، در جوار غربی شهر خواجه نفس و گمیشان واقع است. نمونه برداری از سه موقعیت جغرافیایی مختلف، در دو نوبت فصل خشک و بارش، منجر به جداسازی ۲۲۴ جدایه شد. از بین جدایه‌ها، ۵۷ سویه برای بررسی رفتارهای نمک‌دوستی و تحمل‌کنندگی نمک و همچنین، بهینه و محدوده رشد در اسیدیته و دماهای مختلف بررسی شدند. بیشتر سویه‌های نمک‌دوست نسبی و تحمل‌کننده نمک قادر به رشد بهینه در اسیدیته ۸/۵-۹ بودند و محدوده دمای رشد ۰-۴۰ درجه سانتیگراد را نشان دادند. سویه‌ها از نظر تولید آنزیم‌های هیدرولازی مطالعه شدند. فعالیت لیپازی در اغلب جدایه‌ها مشاهده شد و به ترتیب ۱۵، ۷ و ۳ سویه از کل سویه‌ها آمیلاز، پروتئاز و DNase تولید کردند. این آنزیم‌ها در برخی فرآیندهای صنعتی می‌تواند سودمند باشد. بررسی فیلوژنتیک ترادف 16S rDNA برای ۵۵ سویه انجام شد. این سویه‌ها از نظر فیلوژنتیک در ۲۲ جنس مختلف *Bacillus*، *Altererythrobacter*، *Aeromicrobium*، *Achromobacter*، *Jonesia*، *Idiomarina*، *Halomonas*، *Halobacillus*، *Erythrobacter*، *Cyclobacterium*، *Caenispirillum*، *Rheinheimera*، *Pseudomonas*، *Planococcus*، *Paenibacillus*، *Nesiotobacter*، *Marteella*، *Marinobacter* و *Saccharospirillum*، *Stappia*، *Thalassospira* و *Vibrio* قرار گرفتند. ۲۳ درصد از این سویه‌ها باکتری‌های نمک‌دوست قلیادوست بودند که به جنس‌های *Bacillus*، *Halobacillus*، *Halomonas*، *Idiomarina* و *Marinobacter* تعلق داشتند. این بررسی، نخستین مطالعه بر روی باکتری‌های قابل کشت تالاب گمیشان، یک اکوسیستم قلیایی شور-دریایی مهم، است.

**واژه‌های کلیدی:** تالاب گمیشان، تحمل‌کننده نمک، نمک‌دوست، 16S rDNA

## مقدمه

تالاب بین‌المللی گمیشان نوار نسبتاً باریکی است که با برای شمالی-جنوبی در امتداد سواحل شرقی دریای خزر قرار گرفته است. این تالاب تقریباً از دو کیلومتری شمال شهر گمیشان آغاز شده و تا مرز ترکمنستان و فراسوی آن یعنی تا هشت کیلومتر در خاک ترکمنستان نیز ادامه پیدا می‌کند. مساحت آن بیست هزار هکتار و ارتفاع آن ۲۷ متر پایین‌تر از سطح آب‌های آزاد است. این تالاب به لحاظ هم‌پیوندی با دریای خزر (حاشیه اقلیمی معتدل) در کنار یک اقلیم خشک، ایجاد میکرواقلم‌هایی می‌کند که تبعات زیستگاهی با ارزشی را به ارمغان آورده است. کلر و سدیم بیشترین یون‌های موجود در تالاب بوده که تأییدی بر تقسیم‌بندی تالاب در گروه دریاچه‌های تالازوهالین است. مقدار نمک دریاچه ۳-۵ درصد و متوسط اسیدیته آن ۸/۸ است (بهروزی‌راد، ۱۳۸۶). هدف اصلی در اکولوژی میکروبی درک تنوع میکروبی در زیستگاه‌های طبیعی است. بنابراین، شناخت ما از میکروارگانیسم‌ها و همچنین زیستگاه‌ها ضروری است (Grant, 1992). توزیع و فراوانی نوع خاصی از محیط‌های افراطی برای تعیین رتبه و ویژگی زیوگان (biota) بسیار مهم است (Rodriguez-Valera, 1993). مهم‌ترین اکوسیستم‌های پرشور که تاکنون بررسی شده است شامل دریاچه بزرگ شور ایالت یوتا آمریکا، دریای مرده، شورابه‌های به شدت قلیایی وادی ناترون مصر و دریاچه ماگادی (Magadi) کنیا هستند (Oren, 1994; Kamekura, 1998, 2002a). دریاچه‌های پرشور آران و بیدگل، ارومیه و حوض سلطان در ایران نیز اکوسیستم‌های با اهمیتی هستند که از نظر تنوع میکروارگانیسم‌های نمک‌دوست بررسی شده‌اند

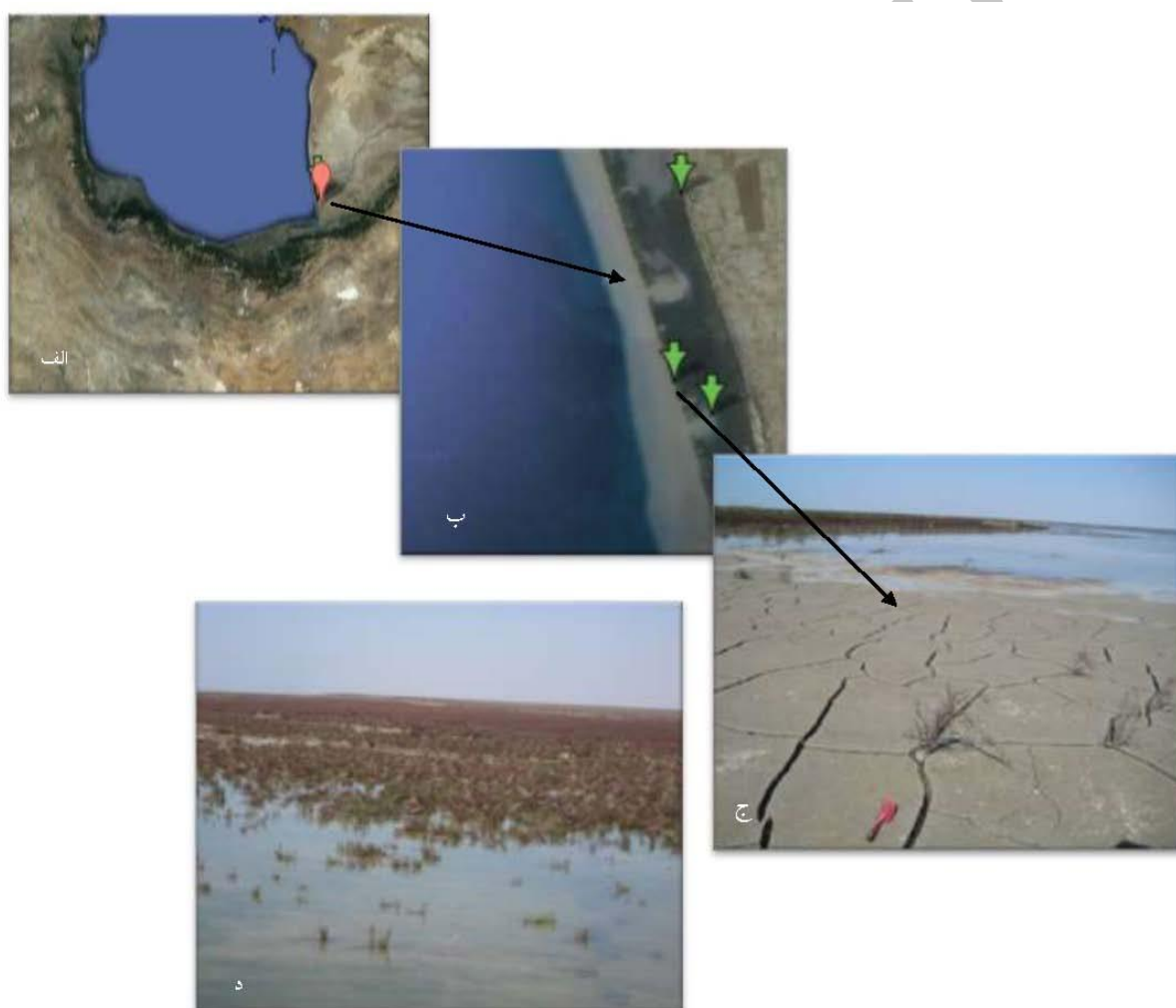
(Makhdoumi Kakhki et al., 2009; Rohban et al., 2012). محیط‌های پرشور به علت سختی شرایط، تنوع میکروبی کمتری نسبت به محیط‌های معمولی دارند، اما تنوع فیلوژنتیک میکروارگانیسم‌هایی که در غلظت‌های بالای نمک زندگی می‌کنند، شگفت‌انگیز است. تنوع متابولیسمی نمک‌دوست‌ها نیز به همان اندازه قابل توجه است (Oren, 2002b). آنها مدل‌های ارزشمندی برای بررسی مولکولی سازگاری اسمزی پروکاریوتی هستند که پتانسیل کاربرد در زیست‌فناوری و میکروبیولوژی کاربردی را دارند (Kushner and Kamekura, 1988). به طور طبیعی محیط‌هایی با مقادیر اسیدیته بالا که رشد میکروبی را حمایت می‌کنند در بسیاری از اکوسیستم‌ها پراکنده شده‌اند. اغلب ارگانیسم‌های در حال رشد در این محیط‌ها مقادیر اسیدیته به مراتب بالاتر از خنثی را تجربه می‌کنند. ارگانیسم‌هایی که در محیط‌های بسیار قلیایی زیست می‌کنند، ارائه‌دهنده سازگاری‌های گسترده فرآیندهای زیستی برای غلبه بر شرایط مختلف محیطی هستند (Ulukanli, 2002). هدف از این پژوهش، بررسی تنوع زیستی باکتری‌های نمک‌دوست و تحمل‌کننده نمک ساکن در تالاب قلیایی شور-دریایی گمیشان و نیز امکان دستیابی به جنس، گونه یا سویه جدید از میکروارگانیسم‌های بومی این منطقه است.

## مواد و روش‌ها

نمونه‌ها از سه موقعیت تالاب (مناطق شمال شرقی (A)، جنوب شرقی (B) و جنوب غربی تالاب (C)) در دو فصل خشک و بارش به ترتیب در شهریور و بهمن ماه سال ۱۳۸۹ جمع‌آوری شد. طول و عرض جغرافیایی دقیق مناطق نمونه‌برداری توسط GPS ثبت و روی

منطقه بود. نمونه‌ها در دمای محیط و در طی یک روز به آزمایشگاه منتقل و میزان شوری آنها نیز اندازه‌گیری شد. آنالیز شیمیایی آب تالاب برای سنجش عناصر موجود در محیط‌زیست طبیعی باکتری‌های این اکوسیستم و به کارگیری آن در طراحی محیط کشت مناسب که امکان جداسازی طیف گسترده‌تری از باکتری‌ها را فراهم سازد، توسط شرکت خاک بهین آزما صورت گرفت.

تصویر ماهواره‌ای علامت‌گذاری شد (شکل ۱). نمونه‌های مختلف جمع‌آوری شده از هر منطقه درون کیسه‌های پلاستیکی و لوله‌های فالدکون استریل ریخته شد و دما، اسیدیته و میزان ذرات جامد محلول در آب (Total Dissolved Solids) نمونه‌ها به ترتیب با دماسنج، pH متر و TDS متر قابل حمل در محل اندازه‌گیری و ثبت شد. انتخاب این مناطق بر اساس نقاط قابل نمونه‌برداری تالاب و ویژگی‌های ظاهری هر



شکل ۱- الف) موقعیت تالاب گمیشان در نقشه ایران، ب) موقعیت سه نقطه نمونه‌برداری (earth.google.com)، ج) جنوب غربی (منطقه باتلاقی) د) گیاهان شورپسند غوطه‌ور در آب تالاب

نمک‌دوست و تحمل‌کننده نمک از محیط کشت مارین آگار (MA, Marine agar) با ترکیبات زیر استفاده شد

متعاقباً نگهداری نمونه‌ها در دمای ۴ درجه سانتیگراد صورت گرفت. برای جداسازی باکتری‌های

شد. تمام محیط‌های فوق در دماهای ۳۴ درجه سانتیگراد گرماگذاری شد. تمامی کلونی‌های رشد یافته روی محیط‌های جامد پس از ۲۴، ۴۸، ۷۲ ساعت و همچنین، به منظور جداسازی کلونی‌های کند رشد تا شش ماه پس از گرماگذاری روی محیط‌های جامد مشابه، جداسازی و خالص شد. خالص‌سازی سویه‌ها، پس از رشد و ظاهر شدن کلونی، حتی‌المقدور از تک کلونی‌ها کشت خالص به عمل آمد (Caton, 2004). برای تأیید خالص بودن کلونی‌ها رنگ‌آمیزی گرم بر اساس روش Hucker انجام شد (Gerhardt and Murray, 1994). به منظور تسهیل بررسی جدایه‌ها از نمونه‌های مختلف، سویه‌ها خالص شده بر مبنای مکان جدا شده، نوع نمونه و همچنین نوع محیط کشت استفاده شده به صورت زیر نام‌گذاری شدند:

A: مکان ۱، B: مکان ۲، C: مکان ۳، G: تالاب گمیشان، P: نمونه گیاهی، F: رسوبات، S: خاک، W: آب، (Marine agar): X: محیط مارین آگار، Y: محیط (Modified Alkalophilic Halophile agar): محیط تغییر یافته هالوفیل آلکالوفیل آگار.

بررسی خصوصیات فنوتیپی و بیوشیمیایی تمامی سویه‌ها با استفاده از روش Simbert و Krieg (۱۹۹۴) انجام شد.

برای افتراق باکتری‌های نمک‌دوست و تحمل‌کننده نمک از محیطی با ترکیب زیر استفاده شد ( $g\ l^{-1}$ ):

Yeast extract, 5; SW medium: NaCl, 234; MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O, 39; CaCl<sub>2</sub>, 1; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 61; KCl, 6; NaHCO<sub>3</sub>, 0.2; KBr, 0.7

محیط SW با غلظت نمکی ۳۰ درصد تهیه شد و به نسبت‌های متفاوت برای درصدهای نمکی ۰ تا ۲۵ به محیط پایه اضافه شد. اسیدیته محیط ۸/۵ تنظیم شد. در

( $g\ l^{-1}$ ):

NaCl, 19.45; MgCl<sub>2</sub>, 8.8; Peptone, 5.0; Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>, 3.24; CaCl<sub>2</sub>, 1.8; Yeast extract, 1; KCl, 0.55; NaHCO<sub>3</sub>, 0.16; Ferric Citrate, 0.1; KBr, 0.08; H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 0.02; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 8.0 mg; NaF, 2.4 mg; NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, 1.6 mg; Agar, 15.0; Distilled water, 1000ml

اسیدیته محیط ۷/۵ تنظیم شد (Ronald, 2005). برای کشت و جداسازی احتمالی باکتری‌های نمک‌دوست قلیادوست و تحمل‌کننده قلیا از محیط کشت MAHA (Modified Alkalophilic Halophile Agar) استفاده شد. مقدار نمک این محیط ۵ درصد در نظر گرفته شد و اسیدیته آن ۹/۵ تنظیم شد. برای ایجاد شرایط قلیایی مجموعاً ۱۹ گرم در لیتر از Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 10.6 و NaHCO<sub>3</sub>, 8.42 استفاده شد (Ronald, 2005) ( $g\ l^{-1}$ ):

NaCl, 30.0; Peptone, 5.0; Yeast extract, 2.0; Meat extract, 1.0; Tri-Sodium Citrate, 0.12; KCl, 0.08; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0.04; FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 2.0 mg; MnCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O, 0.36 mg; Agar, 15.0; Distilled water, 1000ml

برای بررسی میکروارگانیزم‌ها در سیستم‌های طبیعی - بر حسب تعداد کل، تعداد جوامع خاص یا فعالیت‌های متابولیکی آنها - نمونه‌های شاخص آنالیز شد و نتایج آن به کل جامعه تعمیم داده می‌شوند. نمونه باید نمایان‌گر تنوع و تراکم موجودات در کل محیط نمونه‌برداری باشد. برای مثال نمونه‌های خاک جمع‌آوری شده از مکان A با هم مخلوط شده و به عنوان نمونه شاخص در نظر گرفته شد (Atlas and Bartha, 1998). پس، از این نمونه‌های شاخص سری رقت متوالی تهیه و در محیط‌های تعریف شده کشت

آنزیم آمیلاز از محیط کشت با ترکیب زیر استفاده شد  
( $g\ l^{-1}$ ):

Soluble starch, 10; Beef extract, 3; Agar, 15

پس از رشد در محیط، لوگل (یدید پتاسیم)، بر روی محل رشد باکتری اضافه شد. ایجاد هاله شفاف نشانه تولید آنزیم خارج سلولی آمیلاز و هیدرولیز نشاسته در برون سلول است (Amoozgar *et al.*, 2003).

#### تولید خارج سلولی پروتئاز: برای بررسی تولید

آنزیم پروتئاز، از یک محیط کشت با ترکیب زیر استفاده شد ( $g\ l^{-1}$ ):

Meat extract, 3; Peptone, 5; Skim milk, 20; Agar, 15

وجود هاله شفاف در اطراف کلونی‌ها پس از دو هفته گرماگذاری نشانه هیدرولیز پروتئین کازئین بوده، به عنوان پاسخ مثبت در نظر گرفته شد (Amoozgar *et al.*, 2008).

#### تولید خارج سلولی لیپاز: برای بررسی هیدرولیز

توئین ۸۰ از محیط کشت زیراستفاده شد ( $g\ l^{-1}$ ):

Peptone, 10; Tween80, 10;  $CaCl_2.H_2O$ , 0.1; Agar, 15

ایجاد نواحی رسوب اطراف کلونی‌ها به صورت دانه‌های سفید همراه با هاله کدر، نشان‌دهنده تولید آنزیم لیپاز توسط باکتری است. به تناسب ضعف و قوت آنزیم لیپاز گستردگی محوطه رسوب کمتر یا بیشتر شد (Martin *et al.*, 2003).

#### تولید خارج سلولی داکسی‌ریبونوکلئاز: برای

بررسی فعالیت داکسی‌ریبونوکلئازی سویه‌ها از محیط داکسی‌ریبونوکلئاز تست-آگار به میزان ۴۰ گرم در لیتر استفاده شد. برای تشخیص بهتر، مقدار ۰/۰۰۰۸

شیکر انکوباتور با دمای ۳۴ درجه سانتیگراد و ۱۵۰ دور در دقیقه گرماگذاری شدند. سویه‌هایی که علاوه بر توانایی رشد در محیط فاقد نمک دارای رشد بهینه در کمتر از ۳ درصد نمک (معادل غلظت نمک دریا) بودند، به عنوان سویه‌های تحمل‌کننده نمک و آن دسته که بهینه رشد در بالای ۳ درصد نمک داشتند و قادر به رشد در محیط فاقد نمک نبودند به عنوان نمک‌دوست در نظر گرفته شدند و محدوده رشد نمک در این باکتری‌ها تعیین گردید.

برای بررسی محدوده اسیدیته رشد و نیز میزان بهینه آن از محیط‌های مایع با ترکیب زیر استفاده شد ( $g\ l^{-1}$ ):  
Nutrient broth, 8; NaCl, 30; HEPES, 50mM; CAPS, mM

از بافر HEPES در دامنه اسیدیته ۴ تا ۹ و برای اسیدیته بالاتر ۱۰ و ۱۱ از بافر CAPS در محیط‌ها استفاده شد. اسیدیته محیط‌ها پیش از اتوکلاو در بازه بین ۴ تا ۱۱ با فاصله‌های ۱ و نیم واحدی تنظیم شد و پس از اتوکلاو نیز تأیید شد.

برای بررسی محدوده دمای رشد از محیط کشت نوترینت آگار برای دماهای ۵ تا ۱۰ درجه سانتیگراد و نوترینت برات برای دماهای بین ۱۰ تا ۵۰ درجه سانتیگراد استفاده شد و میزان اسیدیته بر روی ۸/۵ تنظیم شد. برای هر یک از سویه‌های انتخاب شده میزان مورد نیاز از نمک NaCl نیز اضافه شد.

#### فعالیت آنزیم‌های هیدرولازی: این بررسی تنها

روی سویه‌های منتخب برای مطالعه فیلوژنتیک صورت گرفت. در این مرحله سنجش به روش پلیت انجام گردید. محیط‌ها همگی دارای ۳ درصد NaCl بودند و اسیدیته آنها ۸/۵ تنظیم شد (Rohban *et al.*, 2009).

#### تولید خارج سلولی آمیلاز: برای بررسی تولید

درجه سانتیگراد نگهداری شد.

۵ میکرولیتر از محصول PCR به همراه شاهد مثبت و منفی PCR و شاخص وزن مولکولی با طیف ۱۰۰-۱۰۰۰۰ bp روی ژل آگاروز ۰/۵ تحلیل شد و برای ترادف‌خوانی به شرکت ماکروژن در کره جنوبی فرستاده شد. ترادف‌های به دست آمده با نرم‌افزار Chromas Pro مرتب شده، با نرم‌افزار BLAST با توالی‌های ثبت شده موجود در پایگاه اطلاعات ژنومی GenBank و Eztaxon مقایسه شد. به این ترتیب، نزدیک‌ترین سویه‌ها با ترادف 16S rRNA مشابه با سویه‌های منتخب PCR شده تعیین شد. تحلیل فیلوژنتیک باکتری‌های منتخب با سویه‌های نزدیک به آنها با نرم‌افزار ClustalX (نسخه ۲/۰) انجام شد. بررسی ارتباط فیلوژنتیکی توالی‌های به دست آمده با یکدیگر و دیگر سویه‌ها توالی‌های مرتبط به دست آمده حاصل از جستجو در پایگاه‌های اطلاعاتی Genbank و Eztaxon با نرم‌افزار MEGA (نسخه ۵/۰) درخت فیلوژنتیک با الگوریتم‌های Neighbour-joining و Maximum parsimony نیز رسم گردید (Tamura and Dudley, 2007). بررسی اعتبار شاخه‌های درخت با الگوریتم bootstrap analysis و با ۱۰۰۰ بار نمونه‌گیری صورت گرفت. توالی‌های به دست آمده در این پژوهش در بانک ژنی NCBI ثبت و شماره ژنی مربوط به هر توالی دریافت گردید.

## نتایج

**بررسی‌های فیزیوشیمیایی:** اطلاعات مربوط به مشخصات فیزیوشیمیایی نمونه‌ها در جدول ۱ آورده شده است. در نمونه‌گیری شهریور ماه بیشترین دما مربوط به منطقه C یعنی ۳۵ درجه سانتیگراد است،

گرم در لیتر تولوئیدن بلو به محیط فوق اضافه شد. پس از رشد از کلریدریک اسید یک نرمال به عنوان معرف استفاده شد. مشاهده هاله روشن‌تر در اطراف رشد به عنوان پاسخ مثبت گزارش شد.

## تکنیک 16S rRNA توسط واکنش زنجیره‌ای

**پلیمراز:** برای استخراج DNA باکتری‌ها از روش دست‌ورزی شده استخراج DNA پیشنهاد شده توسط Marmur در سال ۱۹۹۴ استفاده شد.

برای تکثیر ژن 16S rRNA از پرایمرهای عمومی (5'- AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG) 27F و (5'- GGT TAC CTT GTT ACG ACT) 1492R استفاده شد (Spencer, et al., 2004). غلظت مواد به کار رفته در تهیه مخلوط واکنش زنجیره پلیمراز برای حجم واکنش ۵۰ میکرولیتر به این صورت است: PCR buffer (10X), 50µl; MgCl<sub>2</sub> (5 mM), 1.5µl; dNTP mix (10 mM), 1 µl; Primers (10 µM each), 1.25µl; Taq DNA polymerase, 0.25 µl; Template DNA, 2-3µl; Sterilized distilled water, 38-39µl

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با این روش صورت گرفت: دنا تورا سیون اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه انجام شد. چرخه تکثیر شامل ۳۰ سیکل تکرار شونده با دمای دنا تورا سیون ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۶۰ ثانیه، دمای اتصال ۵۵ تا ۶۰ درجه سانتیگراد (دمای اتصال پرایمرها برحسب سویه‌های مختلف متفاوت بود، لذا، برای بهینه‌سازی دمای اتصال هر سویه از روش گرادیان استفاده شد) به مدت ۴۵ ثانیه و دمای سنتز ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۴۵-۵۰ ثانیه بود. پس از اتمام چرخه‌ها و به منظور تکمیل نهایی ساختار DNA تکثیر شده، نمونه‌ها به مدت ۷ دقیقه در دمای ۷۲

منطقه دیگر بالاتر است. در نمونه‌های خاک نیز میزان شوری و TDS در هر سه مکان نمونه‌گیری در فصل خشک نسبت به فصل بارش بیشتر گزارش شد. جدول ۱ نتیجه سنجش غلظت برخی از آنیون‌ها و کاتیون‌های مهم موجود در ساختار نمک تالاب را نشان می‌دهد.

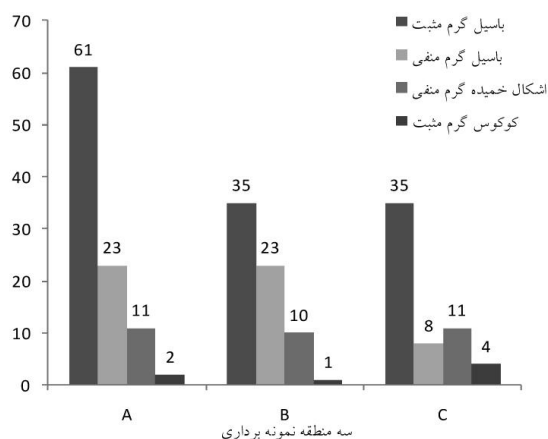
شوری آب این منطقه حدود ۳۶ گرم بر لیتر برآورد شد، که نسبت به دو منطقه دیگر بالاتر بود. با توجه به بستر جلبکی این تالاب، اسیدیته قلیایی آن قابل توجه است. این بستر در منطقه جنوب شرقی وسعت بالاتری دارد و به همان نسبت اسیدیته این منطقه نسبت به دو

جدول ۱- مشخصات فیزیکوشیمیایی نمونه‌های آب و خاک در دو نوبت نمونه‌گیری و غلظت برخی از یون‌های مهم نمونه آب از تالاب گمیشان

فصل بارش				فصل خشک			
شوری (g l <sup>-1</sup> )	TDS (g l <sup>-1</sup> )	دما (°C)	اسیدیته	شوری (g l <sup>-1</sup> )	TDS (g l <sup>-1</sup> )	دما (°C)	اسیدیته
۹/۴۲	۸/۰۷	۸	۷/۶	۲۶/۲۵	۲۳/۵	۲۷/۳	۸/۸۴
۴/۸۰	۴/۲۶	۹/۳	۸/۴۴	۲۷/۱۶	۲۱/۳	۳۳/۴	۹/۴۲
۱۹/۸	۱۵/۴۷	۸/۱	۸/۱۶	۳۵/۹۵	۲۶/۷	۳۵/۳	۷/۶۰
TDS (g l <sup>-1</sup> )				TDS (g l <sup>-1</sup> )			
شوری (g l <sup>-1</sup> )		بر حسب محلول ۱۰۰ (m) مولال خاک		شوری (g l <sup>-1</sup> )		بر حسب محلول ۱۰۰ (m) مولال خاک	
۰/۸۳		۸۵۷mg/l		۸/۱۴		۷/۰۴	
۲/۱۴		۲/۰۴		۲/۳۸		۲/۲۴	
۱/۵۷		۱۵۳۱mg/l		۱۰/۸۲		۹/۱۶	
Cl	۱۴۴۶۷/۶۷	Mg	۱۹۲۱/۲۸	K	۱۹۶/۹۱	Mn	۰/۱
Na	۹۷۳۰/۱۵	Ca	۷۲۹/۴۵	Zn	۱۴/۸۵	Ni	۰/۰۲۵
SO <sub>4</sub>	۵۱۰۷	HCO <sub>3</sub>	۲۷۴/۵۴	Fe	۵/۰۱	Cu	۰/۰۱

معادل با ۶۶ سویه از محیط قلیایی جدا شد. در میان مناطق نمونه برداری، منطقه A با ۹۷ و منطقه B با ۶۹ جدایه، بیشترین و منطقه C با ۵۸ کمترین تعداد جدایه را داشت. در شکل ۲ رابطه بین مناطق مختلف نمونه برداری و نوع جدایه‌ها بر مبنای رنگ آمیزی گرم نشان داده شده است. تفکیک کل جدایه‌ها بر اساس رنگ آمیزی گرم نشان داد که باسیل‌های گرم مثبت غیررشته‌ای با تعداد ۱۳۱ جدایه و پس از آن باسیل‌های گرم منفی با ۵۴ جدایه بیشترین تعداد و اشکال خمیده گرم منفی با ۳۲ جدایه و کوکوس‌های گرم مثبت با ۷ جدایه با فراوانی بسیار کمتری جداسازی شد.

**تنوع میکروارگانیزم های جداسازی شده از تالاب گمیشان:** از نمونه‌های مختلف جمع‌آوری شامل شورابه‌ها، خاک، رسوبات و گیاهان در مجموع، ۲۲۴ باکتری جدا شد. از این تعداد، ۱۶۴ سویه مربوط به نمونه‌گیری در فصل خشک و ۶۰ سویه در رابطه با نمونه‌گیری در فصل بارش است. متوسط میزان کلونی‌های به دست آمده در روش کشت (شمارش زنده) در دو نوبت نمونه‌گیری در هر منطقه در نمونه‌های آب و خاک محاسبه شد و نتایج آن در جدول ۲ آمده است. بیشترین تعداد جدایه از محیط MA دارای اسیدیته ۷/۵ بود. شایان ذکر است که حدود ۲۹/۵ درصد کل جدایه‌ها



شکل ۲- فراوانی باکتری‌های جدا شده از سه نقطه نمونه برداری و نوع جدایه‌های هر منطقه بر اساس رنگ آمیزی گرم

**افتراق سویه‌های نمک‌دوست نسبی و تحمل‌کننده نمک:** از مجموع ۵۷ سویه منتخب، ۶۳/۲ درصد آنها نمک‌دوست نسبی و ۳۶/۸ درصد سویه‌ها تحمل‌کننده نمک بودند. در بین سویه‌های نمک‌دوست نسبی که رشد بهینه خود را در محیط ۳-۱۵ درصد نمک دارند، در برخی سویه‌ها رشد در ۲۵ درصد نمک هم مشاهده شد. سویه‌هایی که رشد بهینه در محیط‌های پایین‌تر از ۳ درصد نمک داشتند و همچنین، توانایی رشد در محیط فاقد نمک به عنوان باکتری‌های تحمل‌کننده نمک انتخاب شدند. در باکتری‌های تحمل‌کننده نمک رشد بهینه در محیط حاوی ۱ درصد نمک مشاهده شد. درصد سویه‌های نمک‌دوست نسبی و تحمل‌کننده نمک به تفکیک مناطق جداسازی آنها در شکل ۳ آمده است. در هر سه منطقه میزان جدایه‌های نمک‌دوست نسبی نسبت به تحمل‌کننده نمک بیشتر است.

جدول ۲- شمارش زنده در دو نوبت نمونه برداری از آب و خاک

فصل بارش		مناطق نمونه برداری	
متوسط میزان کلونی‌های به دست آمده		CFU/ml	
آب	خاک	آب	خاک
فصل خشک			
متوسط میزان کلونی‌های به دست آمده		CFU/ml	
آب	خاک	آب	خاک
$2/5 \times 10^3$	$2/5 - 7/2 \times 10^6$	$1/2 - 8/8 \times 10^3$	$1/4 - 3/2 \times 10^7$
(A) منطقه جنوب غربی		(A) منطقه جنوب غربی	
$2/9 \times 10^3$	$2/2 - 7/2 \times 10^6$	$2/3 \times 10^4$	$1/5 - 6/8 \times 10^6$
(B) منطقه جنوب شرقی		(B) منطقه جنوب شرقی	
$2/9 \times 10^4$	$1/9 - 3/2 \times 10^6$	$2/2 - 4/8 \times 10^4$	$1/5 - 6 \times 10^6$
(C) منطقه شمال شرقی		(C) منطقه شمال شرقی	

بسیل‌های گرم مثبت، باسیل‌ها و اشکال خمیده گرم منفی و کوکوس‌های گرم مثبت به ترتیب ۵۸/۵، ۳۸/۴ و ۳/۱ درصد از جدایه‌های را در بر گرفتند. همچنین، مشاهده لام رنگ آمیزی اسپور نشان داد که بیش از ۵۰ درصد باسیل‌های گرم مثبت اسپوردار بودند. در نهایت، بر اساس ویژگی‌های فنوتیپی بررسی شده، سویه‌ها به چندین گروه تقسیم و در هر گروه سویه‌هایی با خصوصیات بسیار مشابه قرار داده شد. سپس، از میان این گروه‌ها ۵۷ سویه به صورت تصادفی برای مطالعات بیوشیمیایی بیشتر انتخاب گردید. این ۵۷ سویه، ترادفیابی 16S rRNA برای ۵۵ سویه صورت گرفت. جدول ۳ ویژگی‌های ریخت‌شناسی، فیزیولوژیک و بیوشیمیایی برای ۵۷ سویه را نشان می‌دهد.

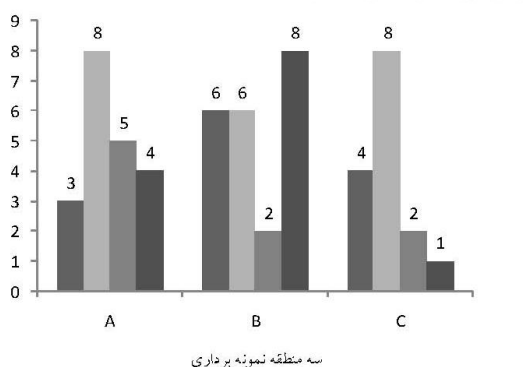


جدول ۳- ویژگی‌های ریخت‌شناسی، فیزیولوژیک و بیوشیمیایی بررسی شده در سویه‌های منتخب

سویه	شکل سلول	رنگ کلونی	رنگ آمیزی گرم	KOH	حرکت	اکسیداز	کاتالاز	اسپور	
								موقعیت اسپور	شکل اسپور
سلول مولد									
GAA <sub>x</sub> 1	باسیل	کرم	-	+	+	+	-	-	-
GAA <sub>x</sub> 7	باسیل کوتاه	کرم روشن	-	+	-	+	+	-	-
GAA <sub>x</sub> 6	ویبریو فرم	قرمز	-	+	+	-	+	-	-
GAA <sub>x</sub> 9	باسیل ریز	کرم-قهوه‌ای	-	+	+	+	+	-	-
GAA <sub>y</sub> 3	کوکسی	نارنجی	+	-	-	+	+	-	-
GAA <sub>y</sub> 5	خمیده	بی‌رنگ	-	+	+	+	+	-	-
GAA <sub>y</sub> 6	باسیل	کرم	-	+	+	+	+	-	-
GAS <sub>x</sub> 6	باسیل	سفید	+	-	-	+	+	متورم	بیضی
GAS <sub>x</sub> 9	باسیل	صورتی-قهوه‌ای	v	+	-	+	+	-	-
GAS <sub>x</sub> 17	باسیل ریز	کرم	-	+	+	+	+	-	-
GAS <sub>x</sub> 19	خمیده	زرد	-	+	+	+	+	-	-
GAS <sub>x</sub> 20	خمیده	بی‌رنگ	-	+	+	+	+	-	-
GAS <sub>x</sub> 25	باسیل	کرم	+	-	+	-	+	-	-
GAS <sub>x</sub> 41	باسیل	صورتی کم‌رنگ	-	+	-	+	-	-	-
GAS <sub>y</sub> 1	باسیل	کرم	+	-	-	+	-	-	-
GAS <sub>y</sub> 9	باسیل	کرم	+	-	+	-	+	متورم	بیضی
GAW <sub>x</sub> 1	باسیل ریز	نارنجی	-	+	-	+	-	-	-
GAW <sub>x</sub> 3	باسیل ریز	زرد	-	+	+	+	+	-	-
GAW <sub>y</sub> 5	باسیل	کرم	-	+	+	+	+	-	-
GAW <sub>y</sub> 6	باسیل	کرم	-	+	+	+	+	-	-
GBF <sub>x</sub> 3	باسیل	صورتی-قهوه‌ای	v	+	-	+	+	-	-
GBF <sub>y</sub> 1	باسیل	کرم	+	-	+	-	+	متورم	بیضی
GBP <sub>x</sub> 2	باسیل	صورتی کم‌رنگ	-	+	-	+	-	-	-
GBP <sub>x</sub> 3	ویبریو فرم	کرم	-	+	+	+	+	-	-
GBP <sub>x</sub> 9	باسیل	کرم	-	+	+	+	+	-	-
GBP <sub>y</sub> 5	باسیل	بی‌رنگ	-	+	+	+	+	-	-
GBP <sub>y</sub> 7	خمیده	بی‌رنگ	-	+	+	+	+	-	-
GBP <sub>y</sub> 11	باسیل	زرد تیره	+	-	-	+	-	-	-
GBP <sub>y</sub> 13	کوکسی	نارنجی	+	-	+	-	+	-	-
GBP <sub>y</sub> 15	باسیل	زرد	+	+	+	+	+	-	-
GBP <sub>y</sub> 16	باسیل	کرم	+	-	-	+	-	متورم	بیضی
GBS <sub>x</sub> 1	باسیل ریز	کرم	-	+	+	+	+	-	-
GBS <sub>x</sub> 2	باسیل	کرم	-	+	-	+	+	-	-
GBS <sub>x</sub> 4	باسیل	کرم	-	+	-	+	+	-	-
GBS <sub>y</sub> 1	خمیده	کرم	-	+	+	+	+	-	-
GBW <sub>x</sub> 7	باسیل	کرم	v	-	+	+	+	-	-
GBW <sub>x</sub> 8	باسیل	کرم	-	+	+	-	+	-	-
GBW <sub>x</sub> 15	باسیل	کرم تیره	+	-	-	+	+	متورم	بیضی
GBW <sub>x</sub> 29	باسیل	کرم	-	+	-	+	+	-	-
GBW <sub>y</sub> 1	باسیل	کرم	+	-	+	-	+	-	-
GBW <sub>y</sub> 4	خمیده	کرم	-	+	+	+	+	-	-
GBW <sub>y</sub> 6	خمیده	کرم تیره	-	+	+	+	+	-	-

سویه	شکل سلول	رنگ کلونی	رنگ آمیزی گرم	KOH	حرکت	اکسیداز	کاتالاز	اسپور		
								موقعیت اسپور	شکل اسپور	سلول مولد
GCF <sub>x</sub> 1	خمیده	کرم	-	+	-	+	+	-	-	-
GCF <sub>x</sub> 3	باسیل ریز	کرم	-	+	+	+	+	-	-	-
GCF <sub>x</sub> 8	باسیل کوتاه	کرم	-	+	+	+	+	-	-	-
GCF <sub>x</sub> 14	باسیل	کرم	+	-	-	+	+	متورم	بیضی	مرکزی
GCF <sub>x</sub> 16	باسیل کوتاه	کرم	-	+	+	+	+	-	-	-
GCF <sub>x</sub> 20	باسیل	کرم	-	+	-	+	+	-	-	-
GCF <sub>y</sub> 1	باسیل	کرم	-	+	+	+	+	-	-	-
GCF <sub>y</sub> 5	خمیده	کرم	-	+	+	+	+	-	-	-
GCS <sub>x</sub> 7	باسیل	کرم	+	-	+	+	+	متورم	بیضی	مرکزی
GCS <sub>x</sub> 17	باسیل کوتاه	کرم-زرد	+	-	-	+	-	-	-	-
GCS <sub>x</sub> 21	باسیل کوتاه	زرد	+	-	-	+	-	-	-	-
GCS <sub>x</sub> 25	باسیل ریز	قرمز	-	+	-	+	+	-	-	-
GCS <sub>y</sub> 1	باسیل	کرم	+	-	+	+	-	-	-	-
GCW <sub>x</sub> 8	باسیل	کرم-نارنجی	-	+	+	+	+	-	-	-
GCW <sub>y</sub> 1	خمیده	کرم	-	+	+	+	+	-	-	-

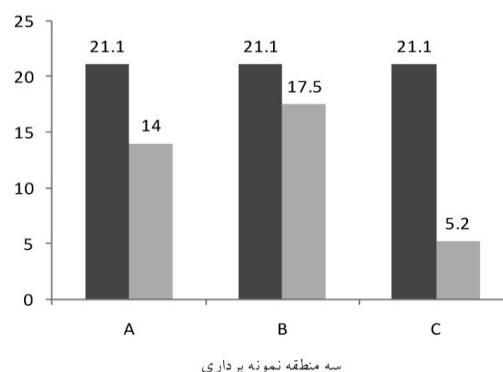
جدایه های نمک دوست قلیا دوست  
 جدایه های نمک دوست قلیا دوست  
 جدایه های نمک دوست قلیا دوست



شکل ۴- فراوانی سویه‌ها بر اساس پاسخ به غلظت نمک و اسیدیته متفاوت

تحمیل کننده قلیا (۳۸ درصد) و کمترین فراوانی در تحمیل کننده‌های نمک قلیادوست (۱۶ درصد) مشاهده شد. میزان فراوانی نمک دوست‌های آلکالوفیل و تحمیل کننده‌های نمک آلکالوتولورنت، یکسان برآورد شد. **محدوده دمای رشد سویه‌های نمک دوست و تحمیل کننده نمک:** اغلب سویه‌ها نمک دوست و تحمیل کننده نمک محدوده دمای رشدی ۰-۴۰ درجه سانتیگراد را نشان دادند. در برخی سویه‌ها رشد در دماهای

جدایه های نمک دوست نسبی  
 جدایه های نمک دوست نسبی



شکل ۳- درصد سویه‌های نمک دوست نسبی و تحمیل کننده نمک در هر منطقه

**محدوده اسیدیته رشد سویه‌های نمک دوست و تحمیل کننده نمک:** بیشتر سویه‌های نمک دوست نسبی و تحمیل کننده نمک رشد بهینه خود را در اسیدیته ۵/۸-۹ نشان دادند. ۶۱ درصد سویه‌های بررسی شده تحمیل کننده قلیا بودند و در ۳۹ درصد جدایه‌ها رفتار قلیادوستی مشاهده شد. فراوانی جدایه‌ها در هر منطقه با توجه به پاسخ آنها به غلظت‌های مختلف نمک و اسیدیته متفاوت در شکل ۴ آورده شده است. بیشترین فراوانی در نمک دوست‌های

*Caenispirillum*, *Stappia*, *Talassospira*, *Marteella*, *Altererythrobacter*, *Erythrobacter* و *Nesiotobacter* به دست آمد و از رده *Gammaproteobacteria* جنس‌های *Pseudomonas*, *Marinabacter*, *Jdiomarina*, *Halomonas*, *Vibrio* و *Rheinheimera* جدا شد. از رده *Betaproteobacteria* تنها جنسی که به دست آمد *Achromobacter* بود. سه جنس *Bacillus*, *Halobacillus* و *Paenibacillus* شامل باسیل‌های گرم‌مثبت و کوکوس‌های گرم‌مثبت جنس *Planococcus* در شاخه *Firmicutes* قرار گرفت. دو جدایه با اعضای جنس‌های *Aeromicrobium* و *Jonesia* در شاخه *Actinobacteria* قرابت داشت. تنها یک جنس *Cyclobacterium* از شاخه *Bacteroidetes* به دست آمد که شامل دو سویه باسیل گرم‌منفی بود.

همان‌طور که جدول ۴ نشان می‌دهد، میزان شباهت ترادف 16S rRNA در دو سویه GCFx20 و GBWx7 به گونه‌های ثبت شده نزدیک، ۱۰۰ درصد بود. این میزان شباهت برای ۱۵ سویه بین ۹۷-۹۸ درصد بود که با انجام هیبریداسیون DNA-DNA با گونه‌های نزدیک و بررسی صفات فنوتیپی ممکن است در گونه جدیدی قرار گیرند. برای ۸ سویه، درصد شباهت کمتر از ۹۷ درصد نشان داده شده که بیانگر تفاوت قابل ملاحظه در سطح گونه و یا حتی جنس بین این سویه‌ها و گونه‌های ثبت شده بوده، این سویه‌ها می‌توانند بدون انجام هیبریداسیون DNA-DNA با گونه‌های نزدیک در گونه‌های جدید قرار گیرند (Stackebrandt and Woese, 1984). سویه GCWyl با ۹۱ درصد شباهت با گونه‌های ثبت شده در رده *Gammaproteobacteria* نامزد معرفی یک جنس جدید است.

بالتر یعنی ۴۵ درجه سانتیگراد هم مشاهده شد.

**فعالیت آنزیم‌های هیدرولازی در سویه‌های نمک‌دوست و تحمل‌کننده نمک: فعالیت هیدرولازی در میان سویه‌های منتخب انجام گرفت.** از ۵۷ جدایه بررسی شده تنها در ۷ سویه از باکتری‌های نمک‌دوست نسبی و تحمل‌کننده نمک فعالیت پروتئاز خارج سلولی دیده شد. فعالیت لیلازی در بیش از نیمی از جدایه‌ها نمایان شد و بیشترین فعالیت در بین آنزیم‌های بررسی شده را به خود اختصاص داد. ۱۵ سویه واجد فعالیت آمیلازی بودند و کمترین فعالیت در آنزیم‌های هیدرولازی بررسی شده مربوط به آنزیم داکسی‌ریبونوکلئاز بود که تنها در سه سویه مثبت گزارش شد.

**شناسایی مولکولی سویه‌های منتخب:** با مقایسه توالی ژن 16S rRNA به دست آمده از سویه‌های منتخب با توالی‌های موجود در پایگاه اطلاعاتی Eztaxon، نزدیک‌ترین میکروارگانیزم شناخته شده به هر سویه مشخص گردید. از بین ۵۵ جدایه منتخب، ترادف‌یابی ژن 16S rRNA برای ۱۸ جدایه به صورت کامل و برای ۳۷ جدایه به صورت نسبی و با خواندن توالی در برای رفت انجام شد. بر اساس این نتایج، ۵۵ جدایه بررسی شده متعلق به چهار شاخه باکتریایی *Actinobacteria*، *Bacteroidetes*، *Firmicutes* و *Proteobacteria* بود. جدول ۴ میزان شباهت هر سویه با نزدیک‌ترین میکروارگانیزم شناخته شده را نشان می‌دهد. بیشتر سویه‌ها به شاخه *Proteobacteria* متعلق بودند به طوری که، سویه‌های نمک‌دوست و تحمل‌کننده نمک، شامل باسیل‌های گرم‌منفی جدا شده در این شاخه در سه رده *Alphaproteobacteria*، *Gammaproteobacteria* و *Betaproteobacteria* قرار گرفتند.

در رده *Alphaproteobacteria* جنس‌های

جدول ۴- میزان شباهت سویه‌ها منتخب با نزدیک‌ترین گونه ثبت شده در پایگاه Eztaxon

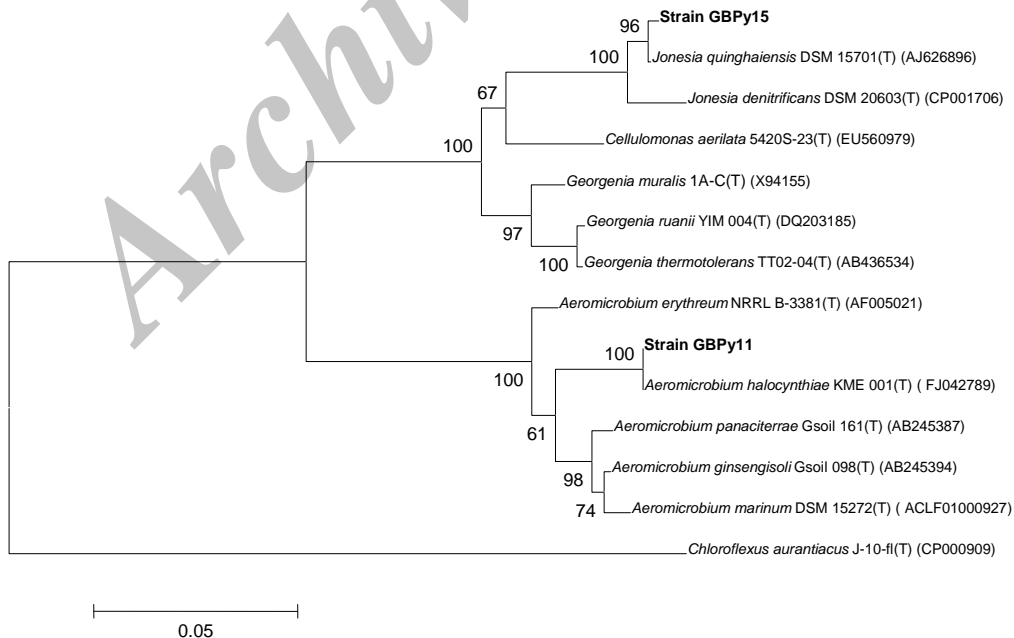
سویه	سویه‌های نزدیک	شماره دستیابی در بانک ژن	میزان شباهت (درصد)
GAA <sub>x</sub> 1	<i>Pseudomonas pachastrellae</i> KMM 330(T)	AB125366	98.1
GAA <sub>x</sub> 7	<i>Martellella mediterranea</i> MACL11(T)	-	97
GAA <sub>x</sub> 6	<i>Vibrio ruber</i> VR1(T)	AF462458	99.5
GAA <sub>x</sub> 9	<i>Rheinheimera aquimaris</i> SW-353(T)	EF076757	99.6
GAA <sub>y</sub> 3	<i>Planococcus rifietoensis</i> M8(T)	AJ493659	99.6
GAA <sub>y</sub> 5	<i>Saccharospirillum impatiens</i> EL-105(T)	-	95.7
GAA <sub>y</sub> 6	<i>Halomonas boliviensis</i> LC1(T)	AY245449	99.2
GAS <sub>x</sub> 6	<i>Bacillus circulans</i> ATCC 4513(T)	AY724690	99.3
GAS <sub>x</sub> 9	<i>Bacillus cohnii</i> DSM 6307(T)	-	97
GAS <sub>x</sub> 17	<i>Idiomarina zobellii</i> KMM 231(T)	AF052741	99.7
GAS <sub>x</sub> 19	<i>Idiomarina zobellii</i> KMM 231(T)	AF052741	99.8
GAS <sub>x</sub> 20	<i>Marinobacter santoriniensis</i> NKSG1(T)	-	96.4
GAS <sub>x</sub> 25	<i>Paenibacillus chungangensis</i> CAU 9038(T)	-	97.8
GAS <sub>x</sub> 41	<i>Cyclobacterium lianum</i> HY9(T)	-	94.6
GAS <sub>y</sub> 1	<i>Bacillus neizhouensis</i> JSM 071004(T)	-	97.2
GAS <sub>y</sub> 9	<i>Bacillus cohnii</i> DSM 6307(T)	-	97
GAW <sub>x</sub> 1	<i>Altererythrobacter ishigakiensis</i> JPCCMB0017(T)	-	98.1
GAW <sub>x</sub> 3	<i>Idiomarina zobellii</i> KMM 231(T)	AF052741	99.8
GAW <sub>y</sub> 5	<i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i> MBIC1303(T)	AB019148	97.6
GAW <sub>y</sub> 6	<i>Halomonas andesensis</i> LC6(T)	EF622233	99.5
GBF <sub>x</sub> 3	<i>Stappia stellulata</i> IAM 12621(T)	D88525	99
GBF <sub>y</sub> 1	<i>Bacillus cohnii</i> DSM 6307(T)	X76437	99.6
GBP <sub>x</sub> 2	<i>Cyclobacterium lianum</i> HY9(T)	-	97
GBP <sub>x</sub> 3	<i>Vibrio ordalii</i> ATCC 33509(T)	X74718	99.6
GBP <sub>x</sub> 9	<i>Halomonas sulfidaeris</i> ATCC BAA-803(T)	AF212204	97.7
GBP <sub>y</sub> 5	<i>Pseudomonas sabulinigri</i> J64(T)	-	95.4
GBP <sub>y</sub> 7	<i>Idiomarina fontislapidosi</i> F23(T)	-	93.8
GBP <sub>y</sub> 11	<i>Aeromicrobium halocynthiae</i> KME 001(T)	FJ042789	99.7
GBP <sub>y</sub> 13	<i>Planococcus rifietoensis</i> M8(T)	AJ493659	99
GBP <sub>y</sub> 15	<i>Jonesia quinghaiensis</i> DSM 15701(T)	AJ626896	99.6
GBP <sub>y</sub> 16	<i>Bacillus horikoshii</i> DSM 8719(T)	X76443	99.3
GBS <sub>x</sub> 1	<i>Idiomarina zobellii</i> KMM 231(T)	AF052741	99.6
GBS <sub>x</sub> 2	<i>Marinobacter szutsaonensis</i> NTU-104(T)	EU164778	98.7
GBS <sub>y</sub> 1	<i>Idiomarina fontislapidosi</i> F23(T)	-	94.6
GBW <sub>x</sub> 7	<i>Nesiotobacter exalbescens</i> LA33B(T)	AF513441	100
GBW <sub>x</sub> 8	<i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i> MBIC1303(T)	AB019148	99.9
GBW <sub>x</sub> 15	<i>Bacillus hwajinpoensis</i> SW-72(T)	AF541966	99.4
GBW <sub>x</sub> 29	<i>Achromobacter marplatensis</i> B2(T)	-	96.7
GBW <sub>y</sub> 1	<i>Bacillus horikoshii</i> DSM 8719(T)	X76443	98.9
GBW <sub>y</sub> 4	<i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i> MBIC1303(T)	AB019148	98.4
GBW <sub>y</sub> 6	<i>Halomonas andesensis</i> LC6(T)	EF622233	99.5
GCF <sub>x</sub> 1	<i>Caenispirillum salinarum</i> AK4(T)	FN995238	99.4
GCF <sub>x</sub> 3	<i>Idiomarina zobellii</i> KMM 231(T)	AF052741	99.6
GCF <sub>x</sub> 8	<i>Thalassospira profundimaris</i> WP0211(T)	AY186195	99.4
GCF <sub>x</sub> 14	<i>Halobacillus trueperi</i> DSM 10404(T)	AJ310149	99.7
GCF <sub>x</sub> 16	<i>Idiomarina seosinensis</i> CL-SP19(T)	-	97.8
GCF <sub>x</sub> 20	<i>Halomonas ventosae</i> A112(T)	AY268080	100
GCF <sub>y</sub> 1	<i>Marinobacter lipolyticus</i> SM19(T)	AY147906	96.5
GCF <sub>y</sub> 5	<i>Halomonas andesensis</i> LC6(T)	EF622233	99.3
GCS <sub>x</sub> 7	<i>Bacillus vietnamensis</i> 15-1(T)	AB099708	97.8
GCS <sub>x</sub> 17	<i>Halobacillus alkaliphilus</i> FP5(T)	AM295006	99.3

سویه	سویه‌های نزدیک	شماره دستیابی در بانک ژن	میزان شباهت (درصد)
GCS <sub>x</sub> 21	<i>Halobacillus alkaliphilus</i> FP5(T)	AM295006	99.4
GCS <sub>x</sub> 25	<i>Erythrobacter nanhaisediminis</i> T30(T)	FJ654473	99.6
GCS <sub>y</sub> 1	<i>Bacillus neizhouensis</i> JSM 071004(T)	-	97
GCW <sub>x</sub> 8	<i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i> MBIC1303(T)	AB019148	99.9
GCW <sub>y</sub> 1	<i>Saccharospirillum impatiens</i> EL-105(T)	-	91.1

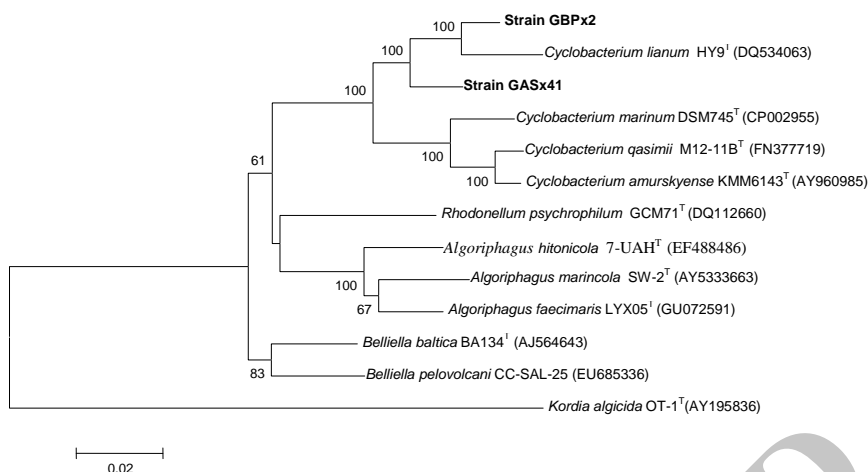
*Bacteroidetes* قرابت دارند نشان داده شده است. شکل ۷ درخت فیلوژنتیک باسیل‌های گرم‌مثبت و کوکوس‌های گرم‌مثبت ترادف‌یابی شده با سویه‌های ثبت شده نزدیک به آنها در رده *Firmicute* را نشان می‌دهد. در شکل ۸ درخت فیلوژنتیک سویه‌هایی که با گونه‌های متعلق به سه رده *α-Proteobacteria*، *β-Proteobacteria* و *γ-Proteobacteria* قرابت دارند نشان داده شده است. این سویه‌ها بیشترین فراوانی را در بین جدایه‌هایی که ترادف‌یابی برای آنها انجام شده است به خود اختصاص داده‌اند.

### رسم درخت فیلوژنتیک سویه‌های

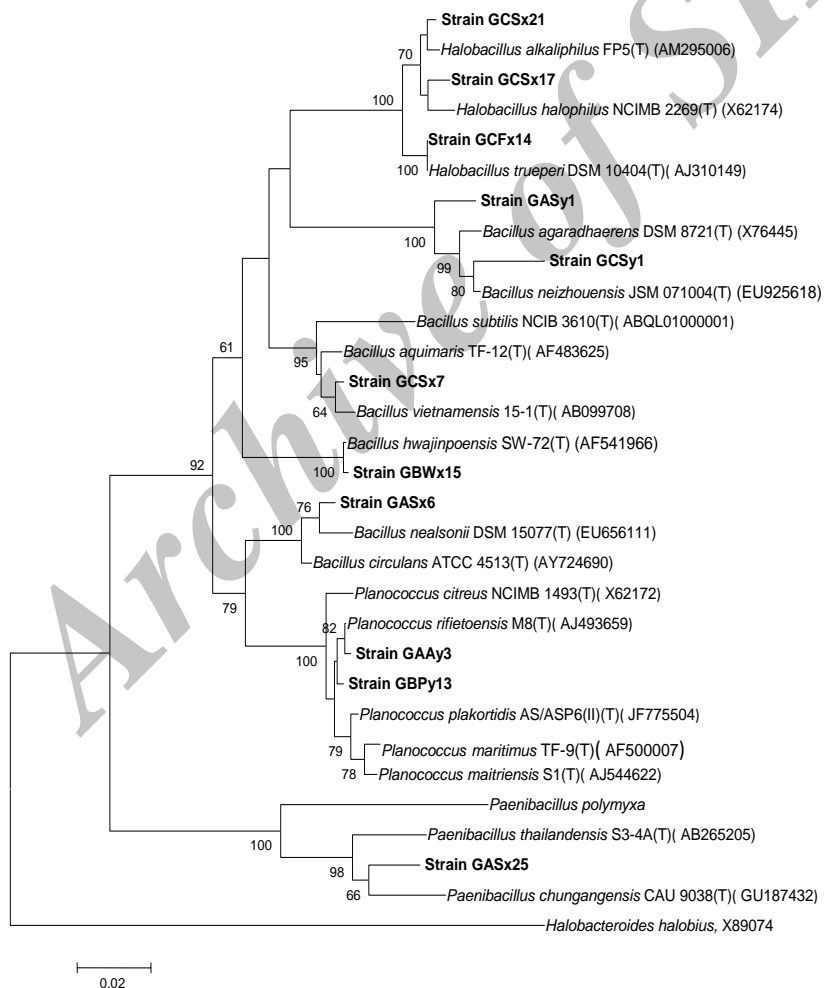
**نمک‌دوست و تحمل‌کننده نمک:** برای سویه‌های ترادف‌یابی شده پس از هم‌راستا کردن ترادف‌ها با ترادف گونه‌های نزدیک، درخت فیلوژنتیک با الگوریتم‌های Maximum Parsimony، Maximum likelihood و Neighbor-Joining رسم شد. در مقایسه درخت‌های رسم شده، محل قرارگیری زیرشاخه‌ها و شاخه‌ها در هر سه روش با یکدیگر هم‌خوانی داشت. درخت فیلوژنتیک سویه‌هایی که با گونه‌های متعلق به شاخه *Actinobacteria* قرابت دارند در شکل ۵ نشان داده شده است. در شکل ۶ درخت فیلوژنتیک سویه‌هایی که با گونه‌های متعلق به شاخه



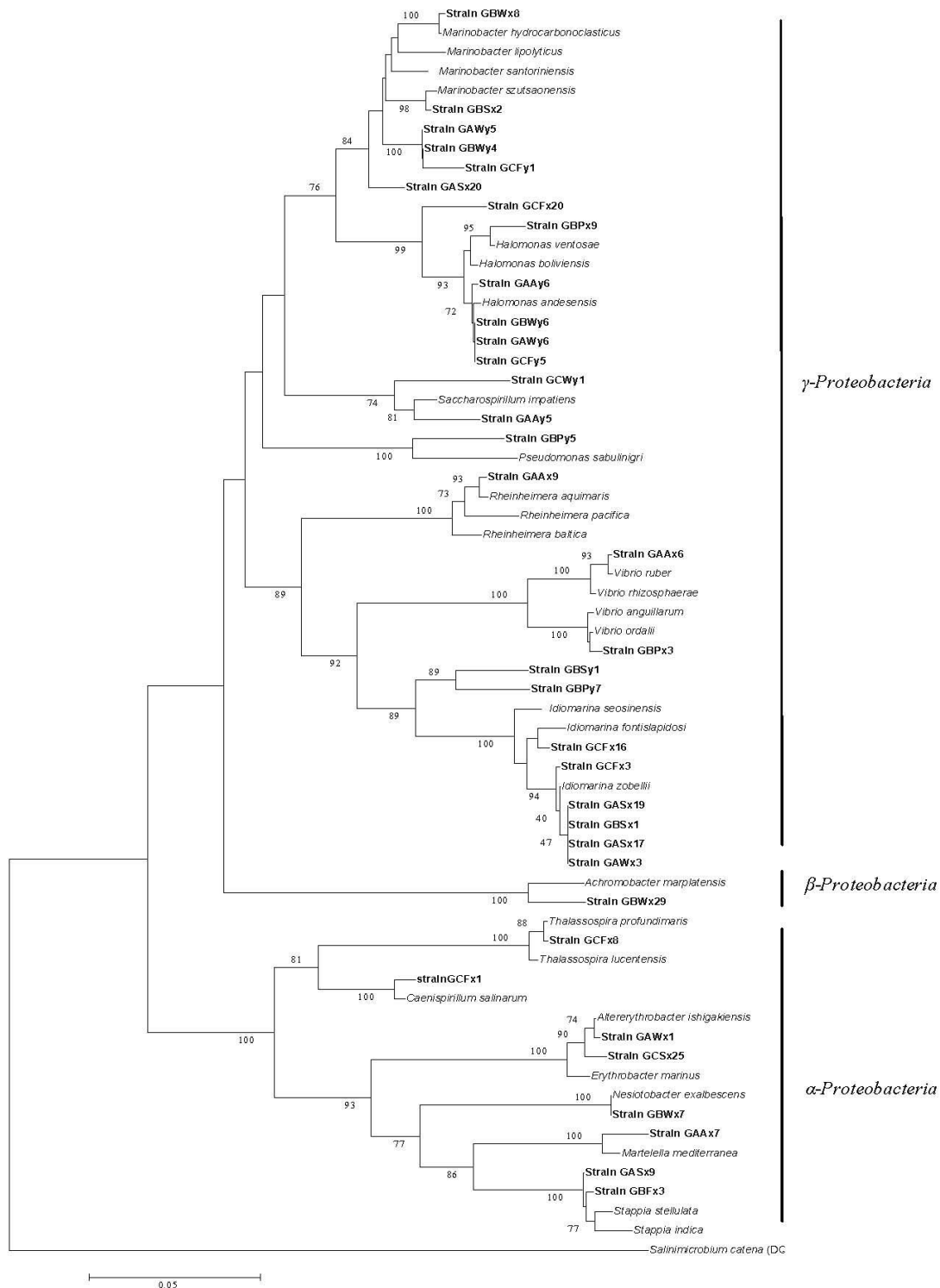
شکل ۵- دندروگرام 16S rRNA باکترهای ترادف‌یابی شده که به جنس‌های موجود در شاخه *Actinobacteria* قرابت نشان دادند. اعداد ذکر شده در محل انشعاب نشانگر درصد نمونه‌گیری bootstrap از ۱۰۰ نمونه است. سویه *Chloroflexus aurantiacus* به عنوان outgroup قرار داده شد.



شکل ۶- دندروگرام 16S rRNA باکتری‌های مترادف‌یابی شده که به جنس‌های موجود در شاخه *Bacteroidetes* قرابت نشان دادند. اعداد ذکر شده در محل انشعاب نشانگر درصد نمونه‌گیری bootstrap از ۱۰۰۰ نمونه است. سویه *Kordia algicida* OT-1<sup>T</sup> به عنوان outgroup قرار داده شد.



شکل ۷- دندروگرام 16S rRNA باکتری‌های مترادف‌یابی شده که به جنس‌های باسیلوس و جنس‌های وابسته و کوکوس‌های گرم‌مثبت موجود در شاخه *Firmicute* قرابت نشان دادند. اعداد ذکر شده در محل انشعاب نشانگر درصد نمونه‌گیری bootstrap از ۱۰۰۰ نمونه است. سویه *Halobacteroides halobius*, X89074 به عنوان outgroup قرار داده شد.



شکل ۸- دندروگرام 16S rRNA باکتری‌های ترادف‌یابی شده که به جنس‌های موجود در سه رده  $\gamma$ -Proteobacteria،  $\beta$ -Proteobacteria و  $\alpha$ -Proteobacteria قرار داده شده است. سویه *Salinimicrobium catena* (DQ640642) به عنوان outgroup قرار داده شد. اعداد ذکر شده در محل انشعاب نشانگر درصد نمونه گیری bootstrap از ۱۰۰۰ نمونه است.

## بحث

به منظور درک چگونگی عمل جامعه میکروبی و کل اکوسیستم، به طور محض شناسایی اجزای مختلف جامعه مقدماتی ترین مرحله است، که نیاز به داده‌هایی در مورد عملکرد آنها، میان کنش و دینامیک فضایی و زمانی و شاخص‌های محیطی برای تکمیل آن دارد. گسترش الگوهای اکوسیستم بر طبق همه این اطلاعات ضروری است، اما نظر به اینکه داده‌های اولیه ارتباط‌دهنده اکثر میکروب‌ها به عملکردشان هنوز ناشناخته است، این یک هدف دراز مدت است (López-García and Moreira, 2008). شوری پایین تالاب گمیشان همچنین اسیدیته قلیایی آن، این محیط را از دیگر اکوسیستم‌های شور بررسی شده در ایران نظیر دریاچه ارومیه، دریاچه آران و بیدگل با شوری بالا و اسیدیته خنثی و دریاچه پرشور حوض سلطان متمایز می‌کند. بنابراین، امکان دستیابی به جمعیت‌های میکروبی متفاوت از سایر اکوسیستم‌های بررسی شده وجود دارد. در این پژوهش، جداسازی و شناسایی سویه‌های نمک‌دوست نسبی و تحمل‌کننده نمک قابل کشت تالاب قلیایی شور-دریایی گمیشان واقع در شمال شرق ایران، سنجش شد. جدایه‌های حاصل از محیط MA نظیر  $GAA_x7$ ،  $GAA_x9$ ،  $GAA_x6$ ،  $GAS_x9$ ،  $GAS_x19$ ،  $GAS_x41$ ،  $GAW_x1$ ،  $GAW_x3$ ،  $GBF_x3$ ،  $GBP_x2$ ،  $GBP_x9$ ،  $GBS_x1$  و  $GCS_x25$  قرابت زیادی با گونه‌های *Aeromicrobium*، *Altererythro bacter ishigakiensis*، *halocynthiae*، *Cyclobacterium lianum*، *Bacillus neizhouensis*، *Halomonas*، *Erythro bacter nanhaisediminis*، *Martellella*، *Idiomarina zobellii*، *sulfidaeris*، *Rheinheimera*، *aquimaris*، *mediterranea*

*Vibrio ruber* و *Stappia stellulata* که منشأ دریایی دارند، نشان دادند. به دلیل اینکه این تالاب منشأ دریایی دارد و یک تالاب دریایی-ساحلی است چنین نتیجه‌ای قابل پیش‌بینی بود. قابل توجه است که بیشترین جدایه‌های منسوب به گونه‌های دریایی از نقطه A جداسازی شد و این منطقه در واقع نزدیک‌ترین فاصله را از نظر موقعیت جغرافیایی با دریای خزر نسبت به دو منطقه دیگر نمونه‌گیری دارد. از این رو، فراوانی بیشتر این نوع جدایه‌ها از این مکان دور از انتظار نیست.

با توجه به اسیدیته قلیایی تالاب گمیشان، استفاده از محیط‌های کشت با اسیدیته قلیایی ضروری به نظر می‌رسید و منجر به جداسازی سویه‌هایی گردید که قرابت زیادی به گونه‌های قلیادوست از قبیل *Bacillus* و *Halobacillus alkaliphilus* FP5(T) *horikoshii* DSM 8719(T) از آنجا که گونه‌های جنس *Bacillus* توانایی گسترده‌ای در تولید آنزیم‌های هیدرولازی دارند، ارزیابی این سویه‌ها از نظر تولید آنزیم‌های قلیایی می‌تواند در زیست فناوری حایز اهمیت باشد.

مطالعات نشان داد که بیشترین جدایه‌ها حاصل از کشت، متعلق به باسیل‌های گرم مثبت (۵۹ درصد) به ویژه باسیل‌های گرم مثبت اسپوردار است که چنین یافته‌ای، تأییدی بر شرایط سخت این مکان اکولوژیک متغیر و پویاست. اسپور این باکتری‌ها قابلیت مقاومت نسبت به شرایط سخت و حالت خفتگی را دارا بوده، می‌تواند شرایط سخت و نامطلوب را تحمل نماید. دلیل دیگر آن می‌تواند استفاده از محیط‌های کشت انتخابی و شرایط آزمایش باشد که منجر به جداسازی بیشتر باسیل‌های گرم مثبت شده است. در مطالعه باباویان (۱۳۸۶)، جداسازی و شناسایی باکتری‌های نمک‌دوست



تالاب گمیشان بر خلاف دریاچه نمکی آران و بیدگل که یک دریاچه اتالازوهالین است، یک تالاب دریایی-ساحلی است و وجود جدایه‌های گرم منفی و بی‌یوفرم و ماریپیچی قابل انتظار است. بنابراین، تفاوت‌های مشاهده شده را می‌توان به ویژگی‌های متفاوت زیستگاه‌های مختلف نسبت داد و صحت این موضوع که تنوع زیستی هر زیستگاه از ویژگی‌های منحصر به فرد آن محسوب می‌شود و پژوهش روی هر محیط جدید اهمیت خاص خود را دارد، تأیید کرد. کوکوس‌های گرم مثبت تنها ۷ درصد سویه‌ها را تشکیل دادند.

در هر سه منطقه نمونه‌برداری در تالاب گمیشان میزان جدایه‌های نمک‌دوست نسبی بیشتر بود. این حالت در منطقه C با توجه به میزان شوری سنجش شده بالاتر نسبت به دو مکان دیگر نمونه‌گیری (A و B) برجسته‌تر بود. از سوی دیگر، استفاده از محیط‌های انتخابی احتمالاً تمایل را به سمت فراوانی بیشتر باکتری‌های نمک‌دوست سوق داده است.

با توجه به اسیدیته قلیایی این اکوسیستم، جداسازی سویه‌های قلیادوست و تحمل‌کننده قلیا قابل انتظار بود. ۳۹ درصد سویه‌های بررسی شده قلیادوست بودند، به طوری که بهینه رشد خود را در اسیدیته ۹ نشان دادند و توانایی رشد در اسیدیته ۱۰ را داشتند. ۲۳ درصد این سویه‌ها را جدایه‌های نمک‌دوست قلیادوست تشکیل دادند. یعنی این سویه‌ها رشد بهینه خود را در دو نوع شرایط تنشی فیزیکیوشیمیایی نشان دادند و می‌توان آنها را جزو باکتری‌های پلی‌اکستریموفیل در نظر گرفت. از طرف دیگر، بیشترین فراوانی مربوط به سویه‌های تحمل‌کننده قلیا بود که ۳۸ درصد آنها هالوآلکالوتلورنت بودند و ۲۳ درصد باقی مانده تحمل‌کننده نمک آلکالوتلورنت بودند. در بررسی تنوع

نسبی بومی دریاچه نمک آران و بیدگل انجام شد و بر اساس شباهت‌های فنوتیپی در میان جدایه‌های جداسازی شده، در نهایت، ۸۳ سویه نمک‌دوست نسبی جدا شد که ۴۴ سویه آنها باسیل گرم مثبت بودند (بابولیان، ۱۳۸۶). همین نتیجه در بررسی‌های بعدی بر روی دریاچه آران و بیدگل با فراوانی بیشتری از باسیل‌های گرم مثبت به دست آمده است (دیدری خمسه مطلق، ۱۳۸۸؛ باقری، ۱۳۸۸). در مطالعه مشابهی بر روی دریاچه پرشور ارومیه نیز باسیل‌های گرم مثبت دارای بیشترین فراوانی بودند و ۵۹/۹ درصد جدایه‌ها را به خود اختصاص دادند (مهرشاد، ۱۳۹۰)، که این فراوانی به نتایج به دست آمده در پژوهش حاضر نزدیک تر است. در بررسی تنوع زیستی دریاچه‌های شور در مغولستان داخلی توسط *Ventosa* و همکاران (۲۰۰۶) ۱۶۳ باکتری نمک‌دوست نسبی جدا شد که ۱۰۲ سویه آن به جنس‌های *Bacillus*، *Halobacillus*، *Virgibacillus*، *Gracilibacillus*، *Oceanobacillus* و *Filobacillus* تعلق داشتند. اما در مطالعات مشابه توسط Ghozlan و همکاران (۲۰۰۶) در محیط‌های شور مصر به جداسازی ۷۶ باکتری نمک‌دوست نسبی گرم منفی و ۱۴ باکتری نمک‌دوست نسبی گرم مثبت منجر شد (Ghozlan et al., 2006).

در مرحله بعد باسیل‌های گرم منفی با ۲۴ درصد فراوانی و اشکال خمیده که شامل سلول‌های و بی‌یوفرم و ماریپیچی بود، ۱۴ درصد جدایه‌ها را به خود اختصاص دادند. در بررسی مشابه دیگر توسط دیدری خمسه مطلق (۱۳۸۸) و باقری (۱۳۸۸) به ترتیب بر روی جدایه‌های تحمل‌کننده نمک و نمک‌دوست نسبی دریاچه شور آران و بیدگل، اشکال و بی‌یوفرم و ماریپیچی گزارش نشده است. با توجه به این مطلب که

می‌کنند. ۱۵ سویه از نظر تولید آنزیم هیدرولازی بررسی شده فاقد فعالیت هستند. تمام سویه‌های پروتئاز مثبت (تولیدکننده پروتئاز) از باکتری‌های نمک‌دوست و تحمل‌کننده نمک تحمل‌کننده قلیا هستند. فعالیت لیپازی در بیش از نیمی از جدایه‌ها مثبت بود. جالب توجه است که ۷ سویه از جدایه‌های نمک‌دوست قلیادوست به دست آمده مولد آنزیم لیپاز خارج سلولی هستند، این آنزیم‌ها می‌توانند در زیست فناوری حایز اهمیت باشند. فعالیت آنزیم آمیلاز نیز در چهار سویه نمک‌دوست قلیادوست مشاهده شد. علاوه بر آن در سویه‌های تحمل‌کننده نمک قلیادوست و تحمل‌کننده قلیا نیز این آنزیم شناسایی شد. تنها در یک سویه از جدایه‌ها نمک‌دوست قلیادوست فعالیت آنزیم داکسی‌ریبونوکلئاز مشاهده شد. پژوهش انجام شده بر روی دریاچه حوض سلطان منجر به جداسازی ۲۳۱ جدایه نمک‌دوست شد که طیف وسیعی از آنزیم‌های هیدرولازی را تولید می‌کردند و میکروارگانسیم نمک‌دوست فاقد فعالیت هیدرولیتیک مشاهده نشد. از بین آنزیم‌های مطالعه شده، ۱۹۵ سویه تولید آمیلاز، ۱۷۷ سویه پروتئاز، ۶۵ سویه DNase و ۲۸ سویه مولد لیپاز بودند. در مقایسه با نتایج حاصل از پژوهش حاضر که سویه‌های مولد آنزیم لیپاز بیشترین فراوانی را در جدایه‌های مورد بررسی دارند، باکتری‌های نمک‌دوست جدا شده مولد لیپاز از دریاچه حوض سلطان کمترین فراوانی را به خود اختصاص دادند (Rohban *et al.*, 2009). در بررسی تنوع زیستی میکروارگانسیم‌های نمک‌دوست تولیدکننده آنزیم‌های هیدرولیتیک خارج سلولی در دریاچه ارومیه توسط آموزگار و همکاران (۱۳۸۶)، ۱۸۸ جدایه نمک‌دوست جداسازی شد که از نظر تولید آنزیم‌های هیدرولازی

زیستی باکتری‌های نمک‌دوست و تحمل‌کننده نمک دریاچه ارومیه، دو سویه نمک‌دوست قلیادوست که به گونه قلیادوست *Alkalibacterium putridalgicola* قرابت داشتند، به دست آمد (مهرشاد، ۱۳۹۰). به طور کلی، ۹۵ باکتری نمک‌دوست قلیادوست از زیستگاه‌های نمکی مختلف جدا شده است. بیشتر این سویه‌ها می‌توانند در دامنه ۵-۲۵ درصد کلرید سدیم و اسیدیته ۸-۱۰ رشد کنند. در تحقیقی Dodia و همکاران (۲۰۰۶) بر اساس همسانی ژن 16S rRNA، ۵ سویه از ۱۳ جدایه جدید بود در حالی که ۸ سویه دیگر با بیش از ۹۰ درصد همسانی توالی با نمک‌دوست‌ها و قلیادوست‌های متفاوت جداسازی شده از دریاچه‌های قلیایی و سایر زیستگاه‌های پرشور مختلف در سراسر کره خاکی ظاهر شدند (Dodia *et al.*, 2006). در بررسی دیگر توسط Foti و همکاران (۲۰۰۸) بر روی دریاچه‌های قلیایی روسیه، هیچ یک از گونه‌های توصیف شده به واقع به عنوان نمک‌دوست قلیادوست و نمک‌دوست تحمل‌کننده قلیا تعریف نشد. سایر مطالعات بر روی دریاچه‌های قلیایی کنیا و مصر بر اساس تکنیک مستقل از کشت کلون انجام شد، سویه‌های به دست آمده به نمک‌دوست‌های قلیادوست توصیف شده وابسته بودند (Foti *et al.*, 2008).

باکتری‌های نمک‌دوست قلیادوست در طی دهه گذشته مورد توجه شایانی بوده و هستند و به طور وسیعی تنوع فیلوژنتیک آنها بررسی شده است. اطلاعات محدودی روی پتانسیل آنزیمی و خصوصیات آنزیمی این ارگانسیم‌ها در دسترس است (Singh *et al.*, 2006). از ۵۷ سویه مطالعه شده از نظر وجود آنزیم‌های هیدرولیتیک ۳۲ جدایه لیپاز، ۱۵ جدایه آمیلاز، ۷ جدایه پروتئاز و ۳ جدایه DNase تولید

ارزیابی شدند. ۱۰۶ جدایه قادر به تولید آنزیم داکسی ریبونوکلئاز، ۶۳ جدایه لیاز و ۵۷ جدایه آمیلاز و ۴۹ جدایه پروتئاز مثبت بودند. برخلاف پژوهش حاضر که کمترین فراوانی مربوط به سویه‌های مولد داکسی ریبونوکلئاز است، در بررسی انجام شده روی جدایه‌های نمک‌دوست دریاچه ارومیه سویه‌های مولد این آنزیم بیشترین فراوانی را به خود اختصاص دادند (زهراپی، ۱۳۸۶).

۵۵ سویه منتخب با توالی‌یابی 16S rRNA در ۲۲ جنس مختلف قرار گرفتند، که به شش رده باکتریایی *Firmicutes*، *Bacteroidetes*، *Actinoacteria*، *α-Proteobacteria* و *γ-Proteobacteria* و *β-Proteobacteria* تعلق داشتند و اغلب سویه‌ها به رده *Gammaproteobacteria* متعلق بودند و در مجموع، ۲۳ سویه نمک‌دوست و تحمل‌کننده نمک در این رده قرار گرفت که شامل ۱۱ باسیل گرم‌منفی و مابقی اشکال خمیده گرم‌منفی شامل ویبریوفرم و مارپیچی بود. باسیل‌های گرم‌منفی در جنس‌های *Halomonas*، *Idiomarina*، *Marinobacter*، *Pseudomonas* و *Rheinheimera* قرار گرفتند و سلول‌های مارپیچی و ویبریوفرم به چهار جنس *Idiomarina*، *Marinobacter*، *Saccharospirillum* و *Vibrio* تعلق داشتند. ۱۵ سویه به رده *Firmicutes* متعلق بود که شامل ۱۳ باسیل گرم‌مثبت و ۲ کوکوس گرم‌مثبت بود. باسیل‌های گرم‌مثبت در جنس‌های *Bacillus*، *Halobacillus* و *Paenibacillus* قرار گرفتند و کوکوس‌های گرم‌مثبت به جنس *Planococcus* قرابت نشان دادند. در رده *Alphaproteobacteria* ۸ باسیل گرم‌منفی متعلق به جنس‌های *Altererythrobacter*، *Martellella*، *Erythrobacter*، *Caenispirillum*

*Thalassospira* و *Stappia*، *Nesiotobacter* مشاهده شد. تنها جنسی که به رده *Betaproteobacteria* تعلق داشت جنس *Achromobacter* بود. از شاخه *Actinobacteria* دو باسیل گرم‌مثبت متعلق به جنس‌های *Aeromicrobium* و *Jonesia* جداسازی شد. تنها جنس جدا شده از شاخه *Bacteroidetes*، جنس *Cyclobacterium* بود که دو باسیل خمیده گرم‌منفی را به خود اختصاص داد. در مطالعه باباولیان (۱۳۸۶)، جداسازی و شناسایی باکتری‌های نمک‌دوست نسبی بومی دریاچه نمک آران و بیدگل و توانایی این میکروارگانیسم‌ها در تولید آنزیم‌های هیدرولازی خارج سلولی بررسی شده است. بر اساس شباهت‌های فوتویی در میان جدایه‌های جداسازی شده، در نهایت، ۸۳ سویه نمک‌دوست نسبی جدا شد که به جنس‌های نمک‌دوست نسبی *Bacillus*، *Thalassobacillus*، *Halomonas*، *Halobacillus*، *Salinicoccus*، *Idiomarina*، *Marinococcus*، *Staphylococcus* و *Salicola* قرابت داشته، بیشترین فراوانی مربوط به جنس‌های *Salicola* و *Halobacillus* گزارش گردید (باباولیان، ۱۳۸۶). مطالعات مشابه توسط آموزگار و همکاران (۱۳۸۸) بر روی دریاچه نمک آران و بیدگل انجام شد و به طور مجزا تنوع زیستی باکتری‌های نمک‌دوست نسبی و تحمل‌کننده نمک بررسی شده است. در بررسی که روی باکتری‌های تحمل‌کننده نمک دریاچه صورت گرفت، اغلب سویه‌ها به رده *Firmicutes* متعلق بود و در مجموع، ۴۱ سویه تحمل‌کننده نمک در این رده قرار گرفت که شامل ۳۵ باسیل گرم‌مثبت و ۶ کوکوس گرم‌مثبت بود. باسیل‌های گرم‌مثبت شامل جنس‌های *Aneurinibacillus*، *Bacillus*، *Brevibacillus*، *Marinilactibacillus*

*Pontibacter*, *Kocuria*, *Alkalibacterium*,  
*Oceanobacillus*, *Micrococcus*, *Sanguibacter*  
 و *Thalassobacillus*, *Microbacterium*  
*Piscibacillus* و جدایه‌های گرم منفی در جنس‌های  
*Marinobacter*, *Paracoccus*, *Halomonas*,  
*Salicola*, *Pontibacter*, *Lysobacter*, *Providencia*  
 و *Brevundimonas* منجر شد (مهرشاد، ۱۳۹۰).

برخلاف پژوهش حاضر، در هر چهار پژوهش تفسیر شده، باسیل‌های گرم مثبت بیشترین میزان فراوانی را به خود اختصاص دادند. سویه‌های جداسازی شده در این بررسی تنوع فیلوژنتیک بالاتری نسبت به مطالعات گذشته دارد و این تنوع در شش رده باکتریایی پراکنده شده است.

در هیچ یک از این پژوهش‌ها جنس‌های  
*Aeromicrobium*, *Achromobacter*,  
*Caenispirillum*, *Altererythrobacter*,  
*Jonesia*, *Erythrobacter*, *Cyclobacterium*,  
*Planococcus*, *Nesiotobacte*, *Marteilella*,  
*Stappia*, *Saccharospirillum*, *Rheinheimera*

و *Thalassospira* و *Vibrio* مشاهده نشد. تعداد و تنوع نمونه‌ها، فصل‌های مختلف نمونه‌برداری، تعداد و تنوع نمونه‌های به کار گرفته شده، توزیع طبیعی میکروارگانیسم‌ها در محیط زیست و مشخصات اکولوژی هر منطقه همگی از جمله مواردی هستند که در نوع باکتری‌های جداسازی شده اثر خواهند داشت (Alain and Querellou, 2009). احتمال افزایش تنوع موجود با افزایش هر بار نمونه‌برداری، بدون رسیدن به آستانه شناخت تنوع کامل در تعداد نمونه‌برداری امکان‌پذیر نیز در تفاوت نوع و تعداد میکروارگانیسم‌های جدا شده در هر پژوهش تأثیرگذار خواهد بود (Hughes et al., 2001).

*Ornithinibacillus*, *Oceanobacillus*,  
*Paenibacillus* و *Virgibacillus* بود. کوکوس‌های گرم مثبت رده *Firmicutes* در چهار جنس *Jeotgalicoccus*, *Aerococcus*, *Staphylococcus* و *Salinicoccus* قرار گرفت. چهار جدایه با اعضای رده *Actinobacteria* قرابت داشت که دو جدایه متعلق به جنس *Arthrobacter* و دو جدایه در جنس‌های *Kocuria* و *Microbacterium* گزارش شدند. در رده *γ-Proteobacteria* سه باسیل گرم منفی گزارش شد که با اعضای جنس‌های *Pseudomonas*, *Halomonas* و *Acinetobacter* قرابت نشان دادند. یک کوکوس گرم منفی متعلق به جنس *Paracoccus* و یک باسیل گرم منفی متعلق به جنس *Brevundimonas* در رده *α-Proteobacteria* نیز گزارش شدند (دیداری خمسه مطلق، ۱۳۸۸). همچنین، مطالعه‌ای بر روی باکتری‌های نمک دوست نسبی دریاچه آران و بیدگل به جداسازی سویه‌های گرم مثبت که از نظر فیلوژنتیک در جنس‌های *Gracilibacillus*, *Bacillus*, *Aquisalibacillus*, *Oceanobacillus*, *Halobacillus*, *Paraliobacillus*, *Ornithinibacillus*, *Salirhabdus*, *Salinicoccus*, *Piscibacillus* و *Thalassobacillus* قرار می‌گرفتند، منجر شد. سویه‌های گرم منفی از جنس‌های *Salicola*, *Halomonas*, *Chromohalobacter*, *Marinobacter* و *Idiomarina* جداسازی و شناسایی شدند (باقری، ۱۳۸۸). بررسی تنوع زیستی باکتری‌های نمک دوست نسبی و تحمل کننده نمک سواحل غربی دریاچه ارومیه به جداسازی جدایه‌های گرم مثبت در جنس‌های *Gracilibacillus*, *Planococcus*, *Halobacillus*, *Ornithinibacillus*, *Staphylococcus*, *Basillus*

## منابع

- بابولیان، ح. (۱۳۸۶) تنوع زیستی باکتری‌های نمک‌دوست نسبی تولیدکننده آنزیم‌های هیدرولیتیک دریاچه نمک آران و بیدگل. پایان‌نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم، قم، ایران.
- باقری، م. (۱۳۸۸) بررسی تنوع باکتری‌های نمک‌دوست نسبی هتروتروف هوازی و قابل کشت در دریاچه آران و بیدگل. پایان‌نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه تهران، تهران، ایران.
- دیدری خمسه مطلق، م. (۱۳۸۸) بررسی تنوع باکتری‌های تحمل‌کننده نمک هوازی هتروتروف قابل کشت در دریاچه آران و بیدگل. پایان‌نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه تهران، تهران، ایران.
- بهروزی‌راد، ب. (۱۳۸۶) تالاب‌های ایران. سازمان جغرافیایی نیروی‌های مسلح، تهران.
- زهرایی، ش. (۱۳۸۶) بررسی تنوع زیستی میکروارگانیزم‌های نمک‌دوست تولیدکننده آنزیم‌های هیدرولیتیک خارج سلولی در دریاچه ارومیه. پایان‌نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه تهران، تهران، ایران.
- مهرشاد، م. (۱۳۹۰) بررسی تنوع زیستی باکتری‌های نمک‌دوست و تحمل‌کننده نمک سواحل غربی دریاچه ارومیه. پایان‌نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه تهران، تهران، ایران.
- Alain, K. and Querellou, J. (2009) Cultivating the uncultured: limits, advances and future challenges. *Extremophiles*. 4: 583-594.
- Amoozgar, M. A., Malekzadeh, F. and Malik, K. A. (2003) Production of amylase by newly isolated moderate halophile *Halobacillus* sp. Strain MA-2. *Microbiology Methods* 52: 353-359.
- Amoozgar, M. A., Schumann, P., Hajjighasemi, M. and Fatemi, A. Z. (2008) *Salinivibrio proteolyticus* sp. nov. a moderately halophilic and proteolytic species from a hypersaline lake in Iran. *International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology* 58: 1159-1163.
- Atlas, R. M. and Bartha, R. (1998) *Microbial ecology: fundamentals and applications*. 4<sup>th</sup> edition. Addison-Wesley. California.
- Caton, T. (2004) Halotolerant aerobic heterotrophic bacteria from the Great Salt Plains of Oklahoma. *Microbial Ecology* 4: 449-462.
- Dodia, M. S., Patel, R. K., Rupal, H., Joshi, R. H., Patel, B. K. C. and Singh, S. P. (2006) Diversity and molecular phylogeny of the haloalkaliphilic bacteria isolated from Western coast of India. The sixth International Congress on Extremophiles. Brest, France.
- Foti, M. J., Sorokin, D. Y., Zacharova, E. E., Pimenov, N. V., Kuenen, J. G. and Muyzer, G. (2008) Bacterial diversity and activity along a salinity gradient in soda lakes of the Kulunda Steppe (Altai, Russia). *Extremophiles* 12: 133-145.
- Gerhardt, P. and Murray, R. G. E. (1994) *Methods for general and molecular bacteriology*. American Society for Microbiology. Washington.
- Ghozlan, H., Deif, H., Kandil, R. A. and Sabry S. (2006) Biodiversity of moderately halophilic bacteria in hypersaline habitats in Egypt. *The Journal of General and Applied Microbiology* 52: 63-72.
- Grant, W. D. (1992) *Hypersaline environments*. Proceedings of the Sixth International Symposium on Microbial Ecology. Barcelona, Spain.
- Hughes, J. Hellmann, J. Ricketts, T. H. and Bohannan B. J. M. (2001) Counting the uncountable:

- statistical approaches to estimating microbial diversity. *Applied Environmental Microbiology* 10: 4399-4406.
- Kamekura, M. (1998) Diversity of extremely halophilic bacteria. *Extremophiles* 2: 289-295.
- Kushner, D. J. and Kamekura, M. (1988) *Physiology of halophilic eubacteria*. CRC Press, Boca Raton.
- López-García, P. and Moreira D. (2008) Tracking microbial biodiversity through molecular and genomic ecology. *Research in Microbiology* 1: 67-73.
- Makhdoumi Kakhki, A., Amoozegar, M. A., Kazemi, B., Paši, L. and Ventosa, A. (2012) Prokaryotic diversity in Aran-Bidgol salt lake, the largest hypersaline playa in Iran. *Microbes and Environments* 1: 87-93.
- Martin, S., Marquez, M., Sanchez-Porro, C., Mellado, E., Arahál, D. R. and Ventosa, A. (2003) *Marinobacter lipolytic* sp. nov. a novel moderate halophile with lipolytic activity. *International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology* 53: 1383-1387.
- Oren, A. (1994) The ecology of the halophilic archaea. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology* 13: 415-440.
- Oren, A. (2002a) *Halophilic microorganisms and their environments*. Kluwer Scientific Historical Survey, Dordrecht.
- Oren, A. (2002b) Molecular ecology of extremely halophilic archaea and bacteria. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology* 1: 1-7.
- Rodriguez-Valera, F. (1993) *Introduction to saline environments. The biology of halophilic bacteria*. CRC Press Incorporation. Boca Raton.
- Rohban, R., Amoozegar, M. A. and Ventosa, A. (2009) Screening and isolation of halophilic bacteria producing extracellular hydrolases from Howz Soltan Lake, Iran. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology Official Journal of the Society for Industrial Microbiology* 36: 333-340.
- Ronald, M. (2005) *Media for environmental microbiology*. 2<sup>nd</sup> edition, Taylor and Francis Group, Boca Raton.
- Simbert, R. M. and Krieg, N. R. (1994) Phenotypic characterization. In: *Methods for general and molecular bacteriology* (eds. Gerhard, P., Murray, R. G. E., Wood, W. A. and Krieg, N. R.) 607-655. American Society for Microbiology, Washington.
- Singh, S. P., Dodia, M. S. and Joshi, R. H. (2006) Diversity among haloalkaliphilic bacteria isolated from Western India with respect to the occurrence and properties of extracellular alkaline proteases. *The Sixth International Congress on Extremophiles*. Brest, France.
- Spencer, J. F. T. and Ragout de Spencer, A. L. (2004) *Environmental microbiology: methods and protocols*. Humana Press Incorporation, New Jersey.
- Stackebrandt, E. and Woese, C. R. (1984) The phylogeny of prokaryotes. *Microbiological sciences* 5: 117-122.
- Tamura, K. and Dudley, J. (2007) MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 8: 1596-1599.
- Ulukanli, Z. (2002) Alkaliphilic micro-organisms and habitats. *Turkish Journal of Biology* 26: 181-191.