Archive of SID

فصلنامه علمی- پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها
سال اول، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۱، صفحه ۴۹- ۷۰
تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۰۷/۰۱ – تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۱۰/۰۹

تنوع زیستی باکتری‌های نمک دوست و تحمل کننده نمک سواحل غربی دریاچه ارومیه

ملیحه مهرشاد: دانشجوی دکتری میکروبیولوژی، دانشگاه تهران، ایران، m.mehrshad@ut.ac.ir **
محمد علی آموزگار: دانشیار میکروبیولوژی، دانشگاه تهران، ایران، amoozegar@ut.ac.ir * **
باقر یخچالی: دانشیار میکروبیولوژی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران، bahar@nigeb.ac.ir
ابوالحسن شاهزاده فاضلی: استادیار ژنتیک مولکولی، مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی، تهران، ایران، fazeli@ibrc.ir ***

چکیده

مقدمه: دریاچه ارومیه واقع در شمال غربی ایران بزرگ‌ترین دریاچه دائمی ایران و یکی از سه دریاچه شور دائمی در سطح جهان است. از چهار منطقه غربی این دریاچه نمونه‌برداری انجام شد و تنوع میکروارگانیسم‌ها با روش‌های مبتنی بر کشت و مستقل از کشت بررسی شد.

مواد و روش‌ها: در روش مبتنی بر کشت، باکتری‌های هالوفیل و هالوتالرنت در شرایط هوازی در چهار محیط کشت MH، SWN، SWNLN و MHLN جداسازی شدند. جدایه‌ها بر اساس تفاوت‌های کلونی، واکنش گرم، رنگ‌آمیزی اسپور و ویژگی‌های بیوشیمیایی اولیه تفکیک شدند. محتوای ژنومی نمونه‌های محیطی آب و خاک برای بررسی‌های مستقل از کشت استخراج شد. با استفاده از تکثیر 16S rRNA و کلونینگ کتابخانه ژن 16S rRNA تهیه و ۲۰ درصد کلون‌های نوترکیب حاصل تعیین ترادف شدند.

نتایج: از بین ۲۱۷ جدایه حاصل در روش مبتنی بر کشت ژن 16S rRNA برای ۵۲ سویه ترادف‌یابی شد که از نظر فیلوژنتیک در جنس‌های *Halobacillus*، *Halomonas*، *Planococcus*، *Gracilibacillus*، *Bacillus*، *Pontibacillus*، *Paracoccus*، *Marinobacter*، *Providencia*، *Staphylococcus*، *Alkalibacterium*، *Sanguibacter*، *Lysobacter*، *Kocuria*، *Pontibacter*، *Salicola*، *Micrococcus*، *Oceanobacillus*، *Brevundimonas*، *Thalassobacillus*، *Microbacterium* و *Piscibacillus* قرارگرفتند. در روش مستقل از کشت کلون‌های بررسی شده در جنس‌های *Salinibacter*، *Adhaeribacter* و *Cesiribacter* قرارگرفتند.

بحث و نتیجه‌گیری: در روش مبتنی بر کشت بین جدایه های تعیین توالی شده ۱۸ جدایه شباهت کمتر از ۹۸/۷ درصد با سویه استاندارد نشان دادند که محدوده مرزی برای ارائه گونه جدید میکروبی بومی است. در روش مستقل از کشت کلون‌های بررسی شده در گروه *Bacteroidetes* قرارگرفتند. که مشابه با سایر گزارش‌های موجود در مورد محیط‌های پر شور بررسی شده است.

واژه‌های کلیدی: باکتری تحمل‌کننده نمک، باکتری نمک‌دوست نسبی، تنوع زیستی، دریاچه پرشور ارومیه

---

* نویسنده مسؤول مکاتبات، مدیر بانک میکروارگانیسم‌های مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران
** آزمایشگاه اکستریموفیل، بخش میکروبیولوژی، دانشکده زیست شناسی و قطب تبارزایی، پردیس علوم، دانشگاه تهران، ایران
*** پژوهشکده رویان، پژوهشکده علوم تولید مثل، گروه ژنتیک، تهران، ایران

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

تنوع زیستی مفهوم بسیار مهمی است که پایه و اساس حیات روی کره‌ی زمین را تشکیل می‌دهد. روابط بین انسان و سایر موجودات کره‌ی زمین به‌گونه‌ای به هم پیوند خورده که نابودی یک گونه می‌تواند یکی از امکانات زندگی انسان را کاهش دهد. بنابراین حفاظت از محیط زیست و اطمینان از پایداری و همه‌جانبه بودن توسعه‌ی آن از چالش‌های مهمی است که جامعه‌ی جهانی با آن روبرو است. امروزه برای مطالعه‌ی تنوع زیستی، سطوح سلسله مراتبی مختلفی شامل تنوع ژنتیکی، تنوع ارگانیسمی یا تاکسونومیک و تنوع بوم‌شناختی در نظر گرفته می‌شوند (۱). آگاهی از الگوی تنوع زیستی میکروارگانیسم‌ها از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است؛ چرا که میکروارگانیسم‌ها دارای بیشترین تعداد افراد در روی زمین هستند (۲). علاوه بر این، باکتری‌ها واسطه بسیاری از فرآیندهای محیطی هستند که باعث حفظ حیات در روی کره زمین می‌شوند. همچنین، تنوع آن‌ها از اهمیت عملی زیادی در حذف زیستی[۱] و اکتشاف زیستی[۲] برخوردار است.

با وجود تعداد زیاد میکروارگانیسم‌ها، دانش بشری تنها نسبت به بخش بسیار کمی ازآن‌ها آگاهی دارد. تا کنون بین ۱ تا۰/۱ درصد از گونه‌های باکتریایی موجود توصیف شده‌اند (۳). اکثر باقی‌مانده گونه‌های باکتریایی (حدود ۴×۱۰^{۵} تا ۳×۱۰^{۶} گونه) ناشناخته باقی مانده‌اند که بیشتر این میکروارگانیسم‌ها با روش‌های موجود، در آزمایشگاه قابل کشت نیستند (۴).

روش‌های مستقل از کشت، از قبیل انواع مبتنی بر ماده ژنتیکی استخراج شده از محیط، شناسایی گونه‌های غیر قابل کشت را امکان‌پذیر و شرایط را برای پیشرفت تصویر کامل‌تر و جزیی‌تری از اجتماعات باکتریایی فراهم کرده است (۵). توصیف فیلوژنتیک مورد قبول از گونه پروکاریوتی عبارت از سویه‌های با وابستگی DNA-DNA برابر ۷۰ درصد یا بیشتر است (۶). به‌علاوه تمامی سویه‌های متعلق به یک گونه باید سطح قابل قبولی از ثبات صفات فنوتیپی را داشته باشند و توصیف یک گونه باید با بیش از یک سویه شاخص انجام شود. تنها زمانی می‌توان نام گونه را به گروهی از میکروارگانیسم‌ها اطلاق کرد که حداقل در یک صفت فنوتیپی تشخیصی از سایر گونه‌ها متمایز شده باشند (۷). سویه‌های با میزان شباهت RNA ریبوزومی ۹۸/۷ درصد یا کمتر همیشه اعضای گونه‌های متفاوت خواهند بود؛ زیرا تفاوت زیاد در توالی 16S rRNA با احتمال زیادی نشان دهنده وابستگی DNA-DNA کمتر از ۷۰ درصد است (۸).

ایران دارای تنوعی از محیط‌های پر شور است. این محیط‌ها شامل معادن نمکی، بیابان‌های پر شور، رودخانه‌های نمکی و به ویژه دریاچه‌های نمک است. دریاچه ارومیه دریاچه نمک مهارلو، تالاب بختگان، دریاچه نمک اینچه‌برون و دریاچه نمک آران و بیدگل از جمله دریاچه‌های نمکی ایران هستند. دریاچه ارومیه بزرگ‌ترین و شورترین دریاچه دائمی ایران و یکی از دریاچه‌های فوق اشباع از نمک دنیا است که از این نظر با دریاچه نمک بزرگ آمریکا شباهت دارد. درازای این دریاچه ۱۴۰ و پهنای آن بین ۱۵ تا ۵۰ کیلومتر و مساحت آن بین ۵۰۰۰ تا ۶۰۰۰ کیلومتر مربع بر حسب میزان بارش و تبخیر است. سطح حوضه آبریز دریاچه ارومیه حدود ۵۰۰۰۰ کیلومتر مربع است. میزان شوری این دریاچه در زمستان ۲۲۰ گرم در لیتر است که در تابستان تا ۲۸۰ گرم در لیتر افزایش می‌یابد. با توجه به اهمیت و پراکندگی بالای مناطق شور در ایران و

www.SID.ir

Archive of SID

همین‌طور نقش مطالعات تنوع زیستی در توسعه زیربنایی دانش کشور، باکتری های نمک دوست نسبی و تحمل کننده نمک هتروتروف هوازی سواحل غربی دریاچه پرشور ارومیه به روش‌های مبتنی بر کشت و مستقل از کشت بررسی شدند. هدف ما بررسی تنوع زیستی این دریاچه با استفاده از الگوی پلیفازیک مبتنی بر کشت و مستقل از کشت و شناسایی تاکسون‌های احتمالی ارائه شده در این روند پس از این پژوهش است. با توجه به اهمیت اکولوژیک بسیار بالای دریاچه ارومیه به عنوان ذخیره‌گاه بیوسفر و در معرض خطر بودن آن انجام این گونه مطالعات به منظور ارائه نقشه ژنتیکی کامل پروکاریوتی این دریاچه با ارزش در آینده نزدیک و حفظ محتوای ژنتیکی این زیست بوم بسیار ضروری به نظر می‌رسد.

مواد و روش‌ها

نمونه برداری

با توجه به وسعت دریاچه ارومیه و شرایط بوم شناختی متنوع آن برای تمرکز بر روی تنوع زیستی دریاچه، نوار ساحلی غربی این دریاچه به‌عنوان محل نمونه‌برداری انتخاب شد. برای نمونه‌گیری، نوار ساحلی غربی دریاچه از نظر دسترسی به چهار ناحیه‌ی مختلف تقسیم شده و در هر کدام از این نواحی حداقل از پنج منطقه نمونه‌برداری انجام شد. نمونه‌های جمع آوری شده از محیط شامل آب، خاک، بلورهای نمک و بقایای گیاهی بودند که در مهرماه ۱۳۸۹ از نوار ساحلی غربی دریاچه‌ی ارومیه جمع‌آوری شده و در شرایط سترون به آزمایشگاه منتقل شدند. موقعیت جغرافیایی هر یک از نقاط نمونه‌برداری توسط GPS مشخص و ثبت شده است. میزان اسیدیته و دمای نمونه‌ها به‌ترتیب توسط pH متر و دماسنج در محل نمونه‌گیری با استفاده از دماسنج قابل حمل، اندازه‌گیری شد. میزان شوری نمونه‌ها نیز با استفاده از دستگاه مالتی‌متر شرکت MettlerToledo مدل Multiseven و پس از انتقال نمونه‌ها به آزمایشگاه اندازه‌گیری شد. تحلیل شیمیایی ترکیبات نمونه‌ها برای سنجش عناصر موجود در نمونه‌ها در دانشکده زمین شناسی دانشگاه تهران با استفاده از روش نور سنجی شعله‌ای[۳] انجام شد. نمونه‌ها در آزمایشگاه در دمای چهار درجه سلسیوس نگهداری شدند.

کشت و جدا سازی باکتری‌ها

برای رسیدن به تنوع کامل‌تری از باکتری‌های نمک‌دوست نسبی و تحمل کننده‌ی نمک هتروتروف هوازی، لازم است از محیط کشت‌های متنوعی استفاده شود. شرایط محیط کشت‌های مورد استفاده بر اساس شرایط اقلیمی دریاچه و همچنین، نیازمندی‌های انواع مختلف این باکتری‌ها انتخاب شده‌اند. محیط کشت‌های MH و SWN با اسیدیته مختلف و SWN و MH با میزان کم ماده غذایی (SWNLN و MHLN) به‌منظور جداسازی بیشترین جدایه‌های ممکن استفاده شدند. مشخصات محیط‌های کشت مورد استفاده برای جداسازی در جدول ۱ آورده شده است. تلقیح نمونه‌های خاک، رسوب و نمک با استفاده از روش رقت‌های متوالی تا رقت 10^{-5} بر روی محیط های مورد استفاده برای جداسازی انجام شد.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱- مشخصات محیط‌های کشت مورد استفاده برای جداسازی

* سترون سازی کلیه محیط‌ها در دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس، فشار ۱۵ psi و زمان ۱۵ دقیقه انجام شده است.

* محیط‌های MH و SWN با اسیدیته‌های ۷/۵ و ۹/۵ و محیط‌های LNMH و LNSWN با اسیدیته ۷/۵ استفاده شدند.

نام محیط کشت	ترکیبات												
	NaCl	$MgCl_2.6H_2O$	$MgSO_4.7H_2O$	$CaCl_2.2H_2O$	KCl	$NaHCO_3$	NaBr	Yeast Extract	Meat Extract	Peptone	Glucose	Sucrose	Agar
Moderate Halophilic Medium (MH)	۱۰۱	۷	۹/۶	۰/۳۶	۲	۰/۰۶	۰/۰۲۶	۱۰	–	۵	۱	–	۱۵
Modified halophilic medium (1125) low nutrient (LNMH)	۱۰۱	۷	۹/۶	۰/۳۶	۲	۰/۰۶	۰/۰۲۶	۰/۱	–	–	–	۰/۵	۱۵
Sea water Nutrient Agar (SWN)	۲۰	۳	۵	۰/۰۵	۰/۵	–	–	۱	۲	۵	–	–	۱۵
Modified halophilic medium (1125) low nutrient (LNSWN)	۲۰	۳	۵	۰/۰۵	۰/۵	–	–	۰/۱	–	–	–	۰/۵	۱۵

برای تلقیح نمونه‌های آب، از رسوب حاصل از سانتریفوژ آب برای تلقیح مستقیم به محیط کشت استفاده شد. محیط‌های تلقیح شده در دمای ۳۴ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شدند. کلونی‌های رشد کرده روی محیط‌های جامد در دوره‌های زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت جداسازی و خالص‌سازی شدند. به‌منظور دسترسی به بیشترین میزان تنوع و جداسازی انواع کند رشد، پلیت‌ها با استفاده از تامین رطوبت در محیط نگهداری و استفاده از پارافیلم دور پلیت‌ها به مدت ۶ ماه نگهداری شده و در بازه‌های زمانی دو هفته‌ای بررسی و کلونی‌های جدید جداسازی شدند. در هر مرحله کلونی‌های دارای مشخصات ریخت‌شناسی (شکل، اندازه، رنگ، قوام، حاشیه و برآمدگی سطحی) متفاوت جداسازی شدند. این کلونی‌ها در شرایط مشابه محیط جداسازی نگهداری شدند (۹).

خالص‌سازی، نگهداری و نامگذاری سویه‌ها

به منظور خالص‌سازی جدایه‌ها کشت متوالی از تک کلونی انجام شد. کلونی‌هایی که پس از پنج بار کشت متوالی بر روی محیط‌های با مشخصات ثابت از نظر واکنش گرم و ریخت‌شناسی رفتار ثابتی از خود نشان دادند به‌عنوان کلونی خالص در نظر گرفته شدند (۹).

توصیف اولیه سویه ها

توصیف اولیه سویه ها بر اساس تعیین صفات اولیه ماکروسکوپی، میکروسکوپی و فیزیولوژیک انجام شد. برای مشاهده‌ی ویژگی‌های ماکروسکوپی کلونی، از محیط جامد با ترکیب مورد استفاده برای جداسازی استفاده شده، شکل، ارتفاع، حاشیه، سطح و رنگ کلونی جدایه‌ها مورد توجه قرار گرفت. شکل میکروسکوپی جدایه‌ها توسط میکروسکوپ نوری و بزرگنمایی ۱۰۰۰ مشاهده شد. برای تایید نتایج حاصل از رنگ‌آمیزی گرم از روش KOH سه درصد توصیه شده توسط بارون[۴] استفاده شد (۱۰). حرکت سلول با استفاده از روش لام مرطوب بررسی شد. برای مشاهده حرکت از بزرگنمایی ۴۰۰ میکروسکوپ نوری استفاده شد. برای بررسی فعالیت کاتالازی از کشت ۲۴ ساعته جدایه‌ها و پراکسید هیدروژن سه درصد به‌عنوان معرف استفاده شده و تولید حباب به عنوان واکنش مثبت درنظر

www.SID.ir

Archive of SID

گرفته شد. برای بررسی فعالیت اکسیدازی از دیسک‌های آماده اکسیداز (شرکت پادتن طب) استفاده شد(۱۱). حدود ۲۵ درصد سویه‌ها به شکل تصادفی برای شناسایی تکمیلی استفاده شدند.

تفکیک سویه های نمک دوست نسبی و تحمل کننده نمک

سویه های منتخب از نظر تعلق به گروه نمک دوست‌های نسبی و یا تحمل کننده نمک تفکیک شدند. برای ایجاد تفکیک بین میکروارگانیسم‌ها بر اساس نیاز و پاسخ به غلظت‌های مختلف نمک، غلظت کلی نمک‌های موجود در محیط مطرح است. بنابراین، برای تفکیک جدایه‌ها از نظر تعلق به گروه‌های نمک‌دوست نسبی یا تحمل کننده نمک از محیط با کمترین میزان ماده آلی - که تامین کننده رشد برای سویه‌های مورد بررسی باشد- استفاده شد. لازم است از افزوده شدن نمک و اسمولیت‌های ناخواسته به محیط کشت نیز اجتناب شود. محیط کشت فوق با مقادیر مختلف صفر، ۰/۵، ۳، ۵، ۷/۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰ و ۲۵ درصد نمک از نمک کلی دریا ۳۰ درصد با ترکیب زیر (گرم در لیتر) تهیه، هر یک از جدایه‌های منتخب بر روی کلیه این محیط‌ها کشت داده شده و در دمای ۳۴ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شدند.

Yeast extract, 5; Sea Water 30%: NaCl, 234; MgCl2.6H2O, 39; CaCl2, 1; MgSO4.7H2O; KCl, 6; NaHCO3, 0.2; KBr, 0.7

درصدی از نمک که نخستین رشد ادامه‌دار باکتری در آن مشاهده شد، به‌عنوان درصد نمک بهینه برای رشد در نظر گرفته شد. گرماگذاری تا ۱۰ روز ادامه یافت و محدوده نمک قابل تحمل برای رشد جدایه‌ها مشخص شد. جدایه‌های با رشد بهینه در محدوده ۳ تا ۱۵ درصد نمک به‌عنوان نمک‌دوست نسبی و جدایه‌های با توانایی رشد در محیط فاقد نمک و رشد بهینه در محیط با نمک کمتر از سه درصد به‌عنوان تحمل‌کننده‌ی نمک در نظر گرفته شدند(۱۲، ۱۳ و ۱۴).

شناسایی مولکولی و تحلیل فیلوژنتیک جدایه‌های منتخب

شناسایی تکمیلی جدایه‌های منتخب با تکثیر و تعیین توالی ژن ۱۶S rRNA انجام شد. برای این منظور، ابتدا از جدایه‌های منتخب، توده زیستی تهیه شده و پس از استخراج DNA ژنومی جدایه‌ها (۱۵)، تکثیر ژن مربوط به زیر واحد کوچک ریبوزومی انجام شد. این تکثیر با استفاده از پرایمرهای عمومی ۱۶S rRNA، 27F با توالی (5’-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3’)، 1492R با توالی (5’-GGTTACCTTGTTACGACT T-3’) و پرایمر 1488R با توالی (5’-CGGTTACCTTGTTACGACTTCACC-3’) و از طریق واکنش زنجیره‌ای پلیمراز بود (۱۶). استخراج DNA ژنومی و تکثیر ژن ۱۶S rRNA با استفاده از الکتروفورز ژل آگاروز تایید شد. به منظور تکثیر ژن ۱۶S rRNA با استفاده از واکنش زنجیره ای پلیمراز بافر با غلظت 1X در ترکیب نهایی، $MgCl_2$ با غلظت ۲/۵ تا ۰/۵ میلی‌مول، dNTP با غلظت ۰/۴ میلی‌مول از هر کدام، آنزیم Taq DNA پلیمراز به میزان ۲U/۵۰ میکرولیتر و پرایمرهای رفت و برگشت از هر کدام به میزان ۰/۵ تا ۰/۴ میلی‌مول و DNA الگو به میزان مناسب استفاده شد. در انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز از نمونه با شرایط مشابه با سایرنمونه‌ها که در آن به‌جای DNA الگو از آب مقطر تزریقی استفاده شده بود، به‌عنوان شاهد منفی استفاده شد. برای انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز از واسرشت اولیه با دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد

www.SID.ir

Archive of SID

به مدت پنج دقیقه و ۳۰ چرخه تکرار شونده شامل واسرشت با دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد و اتصال با دمای بین ۵۶ تا ۵۹ درجه سانتی‌گراد هر کدام به مدت ۶۰ ثانیه و سنتز با دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵۰ تا ۶۰ ثانیه و پس از اتمام ۳۰ چرخه برای سنتز نهایی دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای مدت ۷ دقیقه در نظر گرفته شد. محصول نهایی حاصل از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز توسط روش ختم سنتز DNA [5] به شکل رفت و برگشت تعیین ترادف شد (شرکت ماکروژن کره جنوبی). نتایج حاصل از آن با استفاده از نرم افزار Chromas Pro ویرایش شده و با استفاده از نرم افزار BLAST با توالی‌های معتبر ثبت شده در پایگاه داده EzTaxon (۱۷) مقایسه، نزدیک‌ترین سویه از نظر توالی ژن 16S rRNA مشخص شد. تحلیل فیلوژنتیک سویه‌ها پس از یافتن توالی‌های مشابه و همراستاسازی توالی‌ها، ویرایش و رسم درخت فیلوژنتیک با استفاده از نرم‌افزارهای ClustalX (ویرایش دوم) (۱۸)، Bioedit (۱۹) و MEGA (ویرایش پنجم) (۲۰) و با الگوریتم Neibour-Joining (۲۱) رسم شد. بررسی اعتبار شاخه‌های درخت با استفاده از الگوریتم Bootstrap analysis و با ۱۰۰ بار نمونه‌گیری انجام شد (۲۲). توالی‌های حاصل از این پژوهش در بانک ژنی NCBI ثبت شدند.

استخراج محتوای ژنومی نمونه‌های محیطی

به‌منظور استخراج DNA از نمونه‌های آب و خاک از روش ارائه شده توسط بنلوچ [6] و همکاران استفاده شد (۲۳).

بررسی تنوع زیستی با استفاده از روش کلونینگ- تعیین توالی

در این روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از DNA استخراج شده از محیط برای استحصال ژن 16S rRNA با استفاده از پرایمرهای عمومی باکتریایی مورد استفاده در روش قابل کشت انجام شد. برای تکثیر ژن 16S rRNA از برنامه Touchdown استفاده شد و دمای اتصال از ۶۰ درجه سانتی‌گراد در دوره اول شروع شد و در هر دوره دو درجه سانتی‌گراد کاهش داشت تا به ۵۰ درجه سانتی‌گراد رسید. ۲۰ دوره باقیمانده با دمای اتصال ۵۰ درجه سانتی‌گراد انجام شد. ژن‌های 16S rRNA تکثیر شده از نمونه‌های محیطی برای استفاده در مراحل بعد با استفاده از الکتروفورز ژل آگاروز و با استفاده از کیت استخراج DNA از ژل شرکت Roche آلمان خالص شد. با استفاده از روش کلونینگ هر یک از ژن‌های تکثیر شده که ژن 16S rRNA مربوط به یک سویه منفرد است با استفاده از کیت T/A وکتور Fermentase به درون وکتور pTz57R/T انتقال یافته و در درون باکتری *E. coli* سویه DH5α به‌عنوان میزبان کلونینگ تکثیر یافت. واکنش اتصال در حجم نهایی ۳۰ میکرولیتر (Buffer, 1; rATP, 1; vector, 1; T_4 ligase, 1 و DNA ورودی بسته به غلظت) انجام شد. پس از افزودن همه ترکیبات، ویال در دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد برای مدت ۱۶ ساعت قرار داده شد. بر اساس توصیه کیت و فرمول‌های ارائه شده میزان ژن ورودی ۲۵ نانوگرم محاسبه شد. سلول‌های میزبان برای انتقال وکتور ابتدا مستعد شده و سپس فرآیند ورود وکتور به درون سلول انجام شد. از روش شوک حرارتی به مدت دو دقیقه در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد برای انتقال پلاسمید به درون باکتری مستعد استفاده شد. جداسازی سلول‌های واجد پلاسمید نوترکیب با استفاده از غربال‌گری سفید و آبی انجام، کلونی‌های سفید انتخاب و کتابخانه‌ای از آن‌ها

www.SID.ir

Archive of SID

تهیه شد. هر کدام از کلونی های سفید دارای یک ژن ۱۶S rRNA متفاوت است. با تعیین توالی هر یک از این ژن‌ها امکان بررسی تنوع زیستی میکروارگانیسم‌های موجود در محیط مورد بررسی به‌شکل مستقل از کشت فراهم می‌شود. به‌طور تصادفی ۲۰ کلونی برای مطالعات بعدی استفاده شد. استخراج پلاسمید با استفاده از کیت استخراج پلاسمید Bioneer انجام شد(Miniprep plasmid extraction kit, Bioneer, South Korea). از تغییر موقعیت پلاسمید واجد ژن در مقایسه با حالت اولیه در ژل آگاروز ورود ژن به پلاسمید تایید اولیه و پلاسمید های با غلظت (شدت باند) مناسب برای تعیین توالی استفاده شدند. پلاسمیدها توسط شرکت Macrogen با استفاده از پرایمرهای رفت و برگشت M13 مربوط به وکتور تعیین توالی شدند. توالی‌های به‌دست آمده با استفاده از نرم‌افزارهای Chromas و Bioedit ویرایش شدند. از نرم‌افزار Bellerphon برای ارزیابی وجود کایمر در بین قطعات تکثیر شده استفاده شد (۲۴). توالی‌های حاصل از روش مستقل از کشت مشابه با روش ارائه شده برای توالی‌های حاصل از روش قابل کشت تحلیل فیلوژنتیک شدند.

نتایج

تصویر دریاچه و موقعیت جغرافیایی مناطق نمونه‌برداری بر روی نقشه در شکل ۱ نمایش داده شده است.

شکل ۱- نقشه مناطق جغرافیایی نمونه برداری

نمونه برداری و بررسی ویژگی‌های نمونه‌ها

مشخصات جغرافیایی محل نمونه برداری و میزان شوری نمونه‌های شاخص در جدول۲ آورده شده است. بیشترین میزان شوری در منطقه باری و کمترین میزان شوری در منطقه چیچست مشاهده شد.

جدول۳ ترکیب و نوع یون‌های موجود در دریاچه را نشان می‌دهد. یون‌های سدیم و کلر به ترتیب بیشترین میزان کاتیون و آنیون را در ترکیب این دریاچه به خود اختصاص دادند که نشان‌دهنده ماهیت تالازوهالین این دریاچه است.

جدول ۲- مشخصات نمونه‌های شاخص مناطق نمونه‌برداری

منطقه نمونه‌برداری	مختصات جغرافیایی	نوع نمونه			دما(درجه‌ی سلسیوس)	شوری mg/L	اسیدیته
		آب	نمک	خاک			
باری	N: 37.59.7.87 E: 45.4.5.87	✓		✓	۲۰	۲۸۳۰	۷/۵
دیزج	N: 37.17.52.99 E: 45.18.14.90			✓	۲۰	۱۰۰۰	۸
چیچست	N: 37.35.33.45 E: 45.16.35.11	✓	✓		۱۸	۷۱۰	۷
اسکله	N: 37.45.43.04 E: 45.18.5.88	✓	✓		۱۸	۱۰۲۰	۸

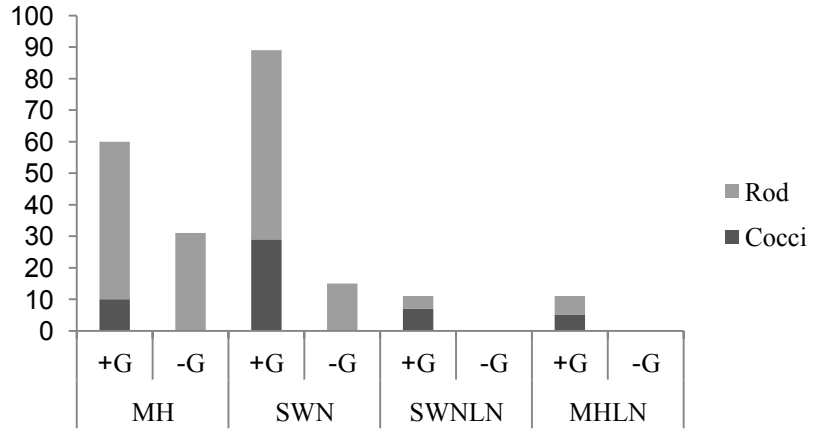
www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۳- ترکیب و نوع یون‌های موجود در دریاچه ارومیه

نوع یون	باری (mg/L)	اسکله (mg/L)	چیچست (mg/L)
Na	۱۰۷۲۸	۸۳۸۱۲	۶۳۲۹۶
K	۹۷۵۰	۳۴۷۰	۹۶۰۰
Mg	۱۶۳۰۰	۳۳۷۰۰	۲۲۰۰۰
Ca	۷۳	۷۱	۱۴۹
Fe	۰/۶۲۶	۰/۴۳	۰/۲۳
Ba	۱۸	۶/۵	۱۰/۲
Cl	۱۳۴۹۰۰	۲۳۶۰۷۵	۱۸۱۷۰۰
HCO_3	۱۹۰	۳۲۴	۵۰۶

بر اساس تفاوت در ویژگی‌های اولیه از قبیل تفاوت در کلونی و رشد، تعداد ۲۱۷ جدایه از نمونه‌ها و محیط‌های مختلف جداسازی به‌دست آمد. تعداد جدایه‌های اولیه منطقه باری ۱۰۶، منطقه چیجست ۵۴، منطقه دیزج ۳۹ و منطقه اسکله ۱۸ جدایه بود. بر این اساس، منطقه باری بیشترین میزان جدایه‌های اولیه و اسکله کمترین میزان جدایه اولیه را در بین مناطق مختلف نمونه‌برداری به خود اختصاص دادند. در شکل ۳ میزان اولیه جدایه‌ها به تفکیک محیط مورد استفاده برای جداسازی، شکل میکروسکوپی و رنگ آمیزی گرم آورده شده است. محیط SWN بیشترین و محیط SWNLN و MHLN کمترین میزان جدایه‌های اولیه را به خود اختصاص داده است. در بین ۵۲ جدایه منتخب، تعداد ۲۷ جدایه نمک‌دوست نسبی و تعداد ۲۵ جدایه دارای بهینه رشد کمتر از ۳ درصد و تحمل کننده نمک بودند.



شکل ۴- نمودار میزان جدایه‌های اولیه به تفکیک محیط کشت، شکل میکروسکوپی و رنگ‌آمیزی گرم

نتایج حاصل از مقایسه سویه‌های منتخب از نظر میزان شباهت در توالی ژن 16S rRNA با سویه‌های استاندارد ثبت شده در پایگاه داده Eztaxon در جدول ۴ آورده شده است. بیشترین شباهت، ۱۰۰ درصد و کمترین شباهت، ۹۶/۹ در میان سویه ها مشاهده شد.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۴- مقایسه میزان شباهت ژن ۱۶S rRNA سویه‌های منتخب با سویه‌های استاندارد

ردیف	نام سویه منتخب	سویه استاندارد با بیشترین میزان شباهت	درصد شباهت
۱	BC1	*Bacillus novalis* LMG 21837(T)	۹۶/۹
۲	WT16	*Piscibacillus salipiscarius* RBU1-1(T)	۹۸/۸
۳	WH2	*Microbacterium testaceum* DSM 20166(T)	۹۷/۷
۴	WE17	*Halomonas ventosae* Al12(T)	۹۹/۴
۵	WE16	*Providencia vermicola* OP1(T)	۹۹/۵
۶	WB4	*Paracoccus aminovorans* JCM 7685(T)	۹۷/۹
۷	DB2	*Thalassobacillus hwangdonensis* AD-1(T)	۹۹/۷
۸	BH20	*Bacillus daliensis* DLS13(T)	۹۹/۵
۹	BH3	*Brevundimonas basaltis* J22(T)	۹۹/۲
۱۰	BB6	*Bacillus niabensis* 4T19(T)	۹۷/۴
۱۱	BE1	*Oceanobacillus picturae* LMG 19492(T)	۹۹/۷
۱۲	BD3	*Micrococcus lylae* DSM 20315(T)	۹۹/۲
۱۳	BZ2	*Planococcus donghaensis* JH 1(T)	۹۸/۱
۱۴	WT10	*Gracilibacillus saliphilus* YIM 91119(T)	۹۸
۱۵	WG9	*Salicola salis* B2(T)	۹۹/۳
۱۶	WE21	*Marinobacter adhaerens* HP15(T)	۹۹/۱
۱۷	DC2	*Alkalibacterium putridalgicola* T129-2-1(T)	۹۹/۱
۱۸	BH54	*Planococcus rifietoensis* M8(T)	۹۸/۵
۱۹	BH53	*Pontibacter korlensis* X14-1(T)	۹۷/۲
۲۰	BH50	*Bacillus pseudofirmus* DSM 8715(T)	۹۹/۶
۲۱	BH44	*Staphylococcus saprophyticus* subsp. bovis GTC 843(T)	۹۹/۵
۲۲	BH41	*Planococcus donghaensis* JH 1(T)	۹۷/۸
۲۳	BH6	*Bacillus halmapalus* DSM 8723(T)	۹۷/۶
۲۴	BG14	*Paracoccus homiensis* DD-R11(T)	۹۷/۹
۲۵	WT4	*Bacillus vallismortis* DSM 11031(T)	۱۰۰
۲۶	N2	*Kocuria gwangalliensis* SJ2(T)	۹۹/۳
۲۷	WL12	*Bacillus hwajinpoensis* SW-72(T)	۹۹/۱
۲۸	BH24	*Planococcus rifietoensis* M8(T)	۹۸/۱
۲۹	BG3	*Bacillus horikoshii* DSM 8719(T)	۹۸
۳۰	DB7	*Lysobacter spongiicola* KMM 329(T)	۱۰۰
۳۱	WT6	*Bacillus safensis* FO-036b(T)	۱۰۰
۳۲	WE12	*Sanguibacter marinus* 1-19(T)	۹۹/۴
۳۳	BH8	*Alkalibacterium putridalgicola* T129-2-1(T)	۹۹/۸
۳۴	WN2	*Staphylococcus warneri* ATCC 27836(T)	۹۹/۸
۳۵	WL3	*Bacillus subterraneus* DSM 13966(T)	۹۹/۵
۳۶	WG5	*Providencia vermicola* OP1(T)	۹۹/۸

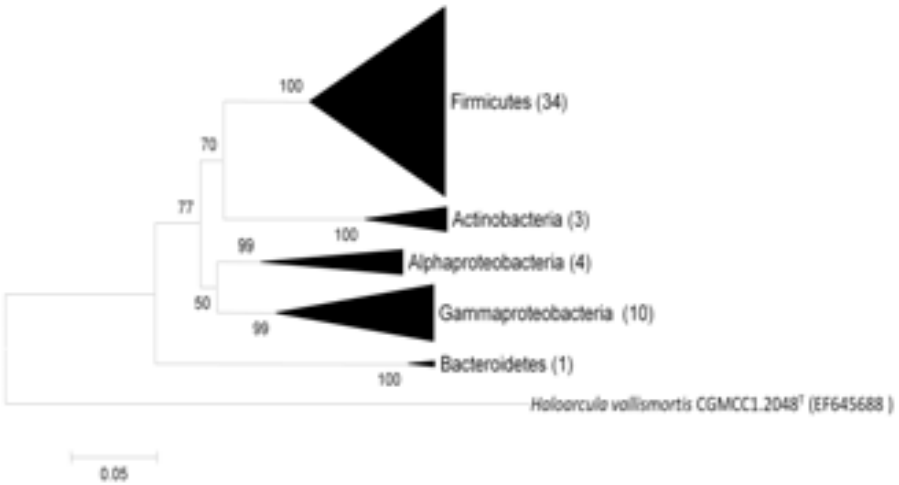
www.SID.ir

Archive of SID

ادامه جدول ۴

ردیف	نام سویه منتخب	سویه استاندارد با بیشترین میزان شباهت	درصد شباهت
۳۷	BB4	*Bacillus oceanisediminis* H2(T)	۹۹/۳
۳۸	A5	*Marinobacter daqiaonensis* YCSA40(T)	۹۹/۵
۳۹	BG5	*Planococcus antarcticus* CMS 26or(T)	۹۷/۴
۴۰	BG7	*Paracoccus aestuarii* B7(T)	۹۹/۲
۴۱	DA2	*Pontibacillus marinus* BH030004(T)	۹۹/۶
۴۲	DB9	*Bacillus vietnamensis* 15-1(T)	۹۸/۴
۴۳	DB14	*Halobacillus profundi* IS-Hb4(T)	۹۹
۴۴	WE7	*Planococcus rifietoensis* M8(T)	۹۹/۱
۴۵	WT1	*Bacillus clausii* KSM-K16	۹۸/۵
۴۶	WT20	*Gracilibacillus dipsosauri* DD1(T)	۹۹/۸
۴۷	BG6	*Halomonas desiderata* FB2(T)	۹۸/۹
۴۸	DB8	*Halobacillus profundi* IS-Hb4(T)	۹۸/۶
۴۹	WE11	*Planococcus donghaensis* JH 1(T)	۹۸/۴
۵۰	WE22	*Halomonas ventosae* Al12(T)	۹۹/۳
۵۱	WL1	*Halomonas fontilapidosi* 5CR(T)	۹۹/۸
۵۲	WT17	*Halobacillus trueperi* DSM 10404(T)	۹۹/۵

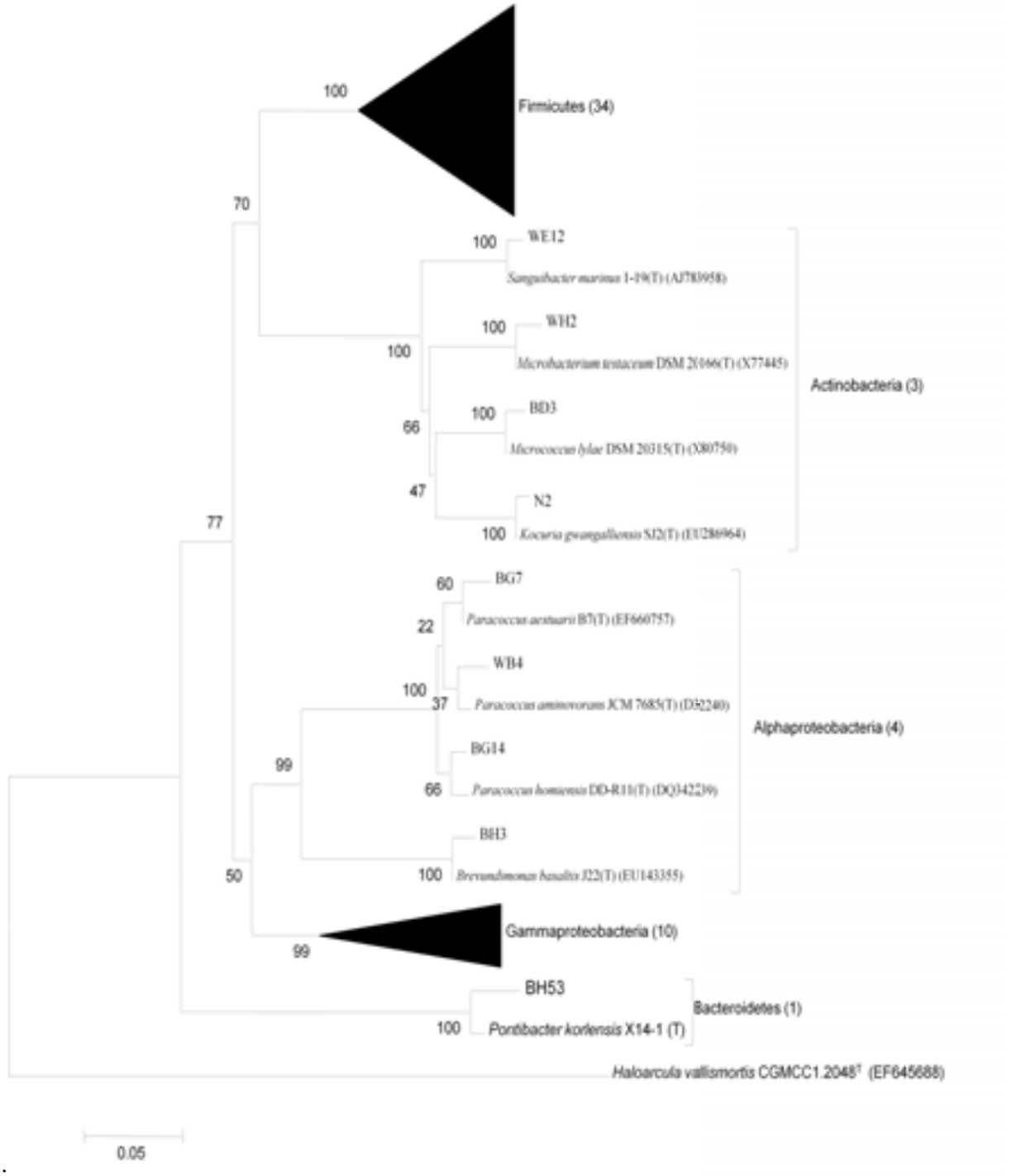
درخت فیلوژنتیک کلی برای مقایسه وضعیت سویه‌های مورد بررسی و درخت فیلوژنتیک رسم شده برای سویه‌های متعلق به هر شاخه، به تفکیک شاخه‌های مختلف به ترتیب در شکل‌های ۴، ۵، ۶ و ۷ آورده شده است. در شکل ۴ که درخت کلی سویه‌های مورد بررسی به تفکیک شاخه رسم شده است، فراوانی شاخه‌های مختلف در بین سویه‌های مورد بررسی و رابطه فیلوژنتیک این شاخه‌ها را نمایش می‌دهد. همانطور که مشاهده می‌شود، شاخه *Firmicutes* بیشترین میزان جدایه‌ها را به خود اختصاص داده است.



شکل ۴- درخت فیلوژنتیک جدایه‌ها برای نمایش روابط فیلوژنتیک با استفاده از روش Neighbor- joining و ضریب Boot Strap صد

www.SID.ir

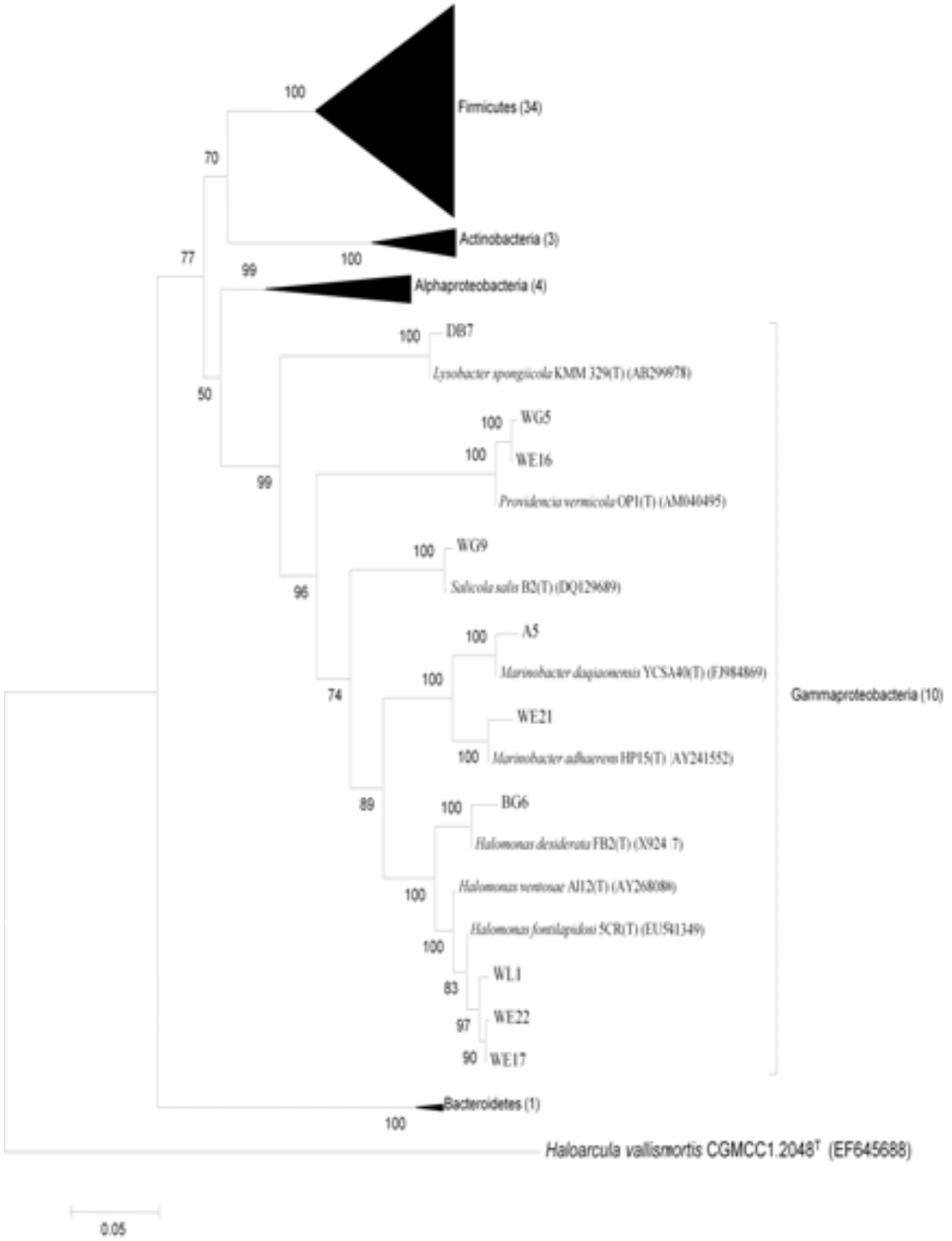
Archive of SID



شکل ۵- درخت فیلوژنتیک جدایه‌های شاخه‌های *Bacteroidetes*، *Alphaproteobacteria* و *Actinobacteria* برای نمایش روابط فیلوژنتیک سویه‌های جداسازی شده در هر شاخه با یکدیگر و با سایر شاخه‌ها با استفاده از روش Neighbor- joining و ضریب Boot Strap صد

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۶- درخت فیلوژنتیک جدایه‌های شاخه *Gamaproteobacteria* برای نمایش روابط فیلوژنتیک سویه‌های جداسازی شده در هر شاخه با یکدیگر و با سایر شاخه‌ها با استفاده از روش Neighbor- joining و ضریب Boot Strap صد

www.SID.ir

Archive of SID

شکل ۷- درخت فیلوژنتیک جدایه‌های شاخه *Firmicutes* برای نمایش روابط فیلوژنتیک سویه‌های جداسازی شده در هر شاخه با یکدیگر و با سایر شاخه‌ها با استفاده از روش Neighbor- joining و ضریب Boot Strap صد

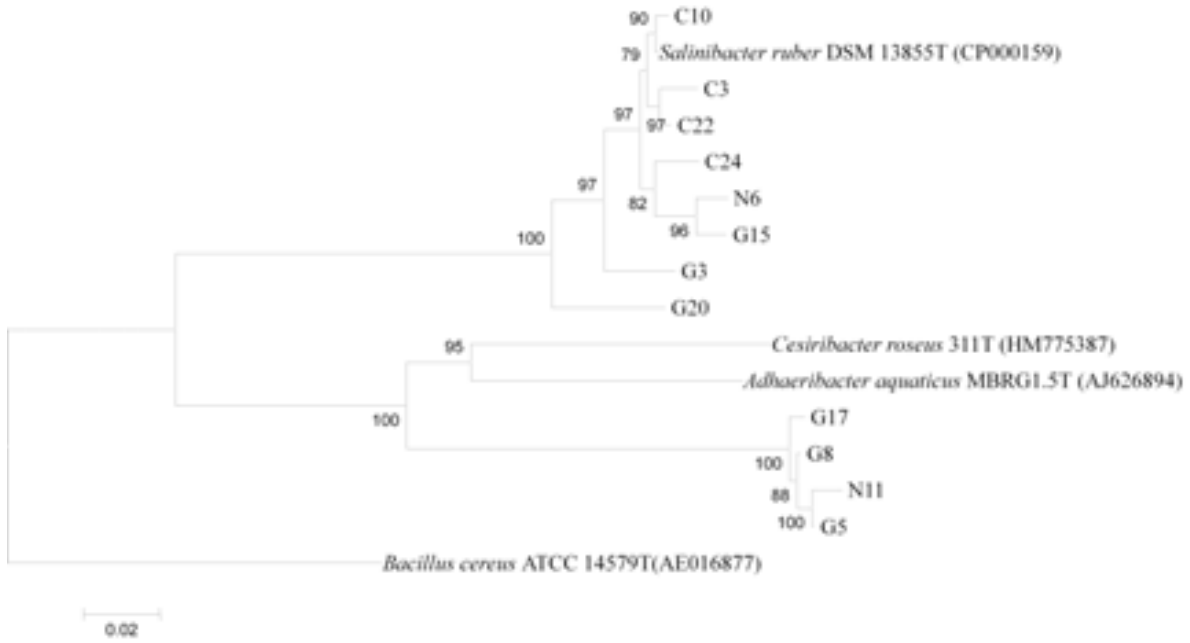
www.SID.ir

Archive of SID

در روش مستقل از کشت، نتایج حاصل از مقایسه میزان شباهت کلون‌های منتخب در توالی ژن 16S rRNA در جدول ۵ آورده شده است. بیشترین میزان شباهت مشاهده شده به میزان ۹۸/۹ و کمترین میزان شباهت مشاهده شده به میزان ۸۲/۳ است. درخت فیلوژنتیک رسم شده برای توالی‌های حاصل از روش مستقل از کشت در شکل ۸ آورده شده است.

جدول ۵- مقایسه‌ی کلون‌های منتخب با توالی‌های ثبت شده استاندارد

ردیف	نام کلون	سویه استاندارد با بیشترین میزان شباهت	درصد شباهت
۱	C10	*Salinibacter ruber* DSM 13855(T)	۹۹/۳
۲	G8	*Adhaeribacter aquaticus* MBRG1.5(T)	۸۲/۸
۳	G15	*Salinibacter ruber* DSM 13855(T)	۹۸/۲
۴	G17	*Adhaeribacter aquaticus* MBRG1.5(T)	۸۲/۸
۵	C3	*Salinibacter ruber* DSM 13855(T)	۹۸/۹
۶	C22	*Salinibacter ruber* DSM 13855(T)	۹۸/۹
۷	C24	*Salinibacter ruber* DSM 13855(T)	۹۸/۳
۸	G3	*Salinibacter ruber* DSM 13855(T)	۹۷/۲
۹	G5	*Adhaeribacter aquaticus* MBRG1.5(T)	۸۲/۴
۱۰	G20	*Salinibacter ruber* DSM 13855(T)	۹۴
۱۱	N6	*Salinibacter ruber* DSM 13855(T)	۹۷/۶
۱۲	N11	*Cesiribacter roseus* 311(T)	۸۲/۳



شکل ۸- درخت فیلوژنتیک جدایه‌های حاصل از روش کلونینگ و تعیین توالی به روش Neighbor- joining و با استفاده از معیار صد Boot strap

www.SID.ir

Archive of SID

بحث

محیط‌های پر شور به دو بخش آب‌های پر شور و خاک‌های پرشور تقسیم می‌شوند. محیط‌های پر شور به علت سختی شرایط زندگی از تنوع زیستی کمتری نسبت به محیط‌های معتدل برخوردارند؛ اما از نظر حضور میکروارگانیسم‌های نمک‌دوست و تحمل‌کننده نمک، تنوع بالایی دارند و انواعی از نمک‌دوست‌های نسبی و تحمل‌کننده‌های نمک در این محیط‌ها وجود دارند.

در روش‌های مبتنی بر کشت در زمینه جداسازی، از محیط‌های کشت متنوع و رقت‌های متوالی و گرماگذاری طولانی، برای جداسازی بیشترین تنوع گونه‌ها استفاده شد. محیط کشت‌های رقیق شده SWNLN و MHLN نیز برای افزایش جداسازی استفاده شد. کارآیی استفاده از محیط کشت‌های رقیق شده در پژوهش‌های قبلی تایید شده است (۲۵ و ۲۶). در زمینه استفاده از این محیط‌ها یکی از دشواری‌ها، خالص‌سازی میکروارگانیسم‌های جدا شده از طریق این محیط است که این مورد در بیشتر موارد به علت عدم توانایی رشد در محیط‌های خالص‌سازی است. محیط‌های MH و SWN بازده مناسبی در جداسازی داشتند. تفاوت در میزان جدایه‌های حاصل از هر محیط کشت نشان‌دهنده بازده هر کدام از محیط‌ها در جداسازی و همچنین ایجاد امکان کشت مجدد و خالص‌سازی است. بیشترین میزان جدایه‌ها از نمونه‌های محیط بازی به‌دست آمد که شاید به‌علت وجود نمونه‌های خاک در بین نمونه‌های مربوط به این منطقه است. از جدایه‌های حاصل از محیط‌های جداسازی دارای اسیدیته قلیایی، جدایه‌های BH8 و DC2 برای تکثیر ژن 16S rRNA و توالی‌یابی انتخاب شدند و بیشترین میزان شباهت را به گونه استاندارد (*Alkalibacterium putridalgicola* T129-2-1T) نشان دادند. این جدایه‌ها پلی‌اکستریموفیل (نمک‌دوست و قلیادوست) بوده و به علت این ویژگی دارای قابلیت بررسی در زمینه توانمندی‌های آنزیمی هستند. بیشترین میزان سویه‌ها دارای شکل میکروسکوپی میله‌ای و گرم مثبت هستند که با توجه به شرایط شوری و سخت اکوسیستم و توانایی برخی از اشکال میله‌ای در ایجاد هاگ و قرارگیری در حالت خفتگی مورد انتظار است. نتیجه مشابه در بررسی‌های قبلی بر روی دریاچه آران و بیدگل نیز به‌دست آمده است (۲۷ و ۲۸). جدایه‌های گرم منفی و جدایه‌های دارای شکل میکروسکوپی کوکوس از فراوانی کمتری در بین جدایه‌ها برخوردار بودند. در بررسی مشابه که توسط گارابیتو[۷] و همکاران در سال ۱۹۹۸ انجام شد. ایشان این گروه ۹۹ شکل میله‌ای به شدت تحمل کننده نمک گرم مثبت و مولد هاگ را از خاک و رسوبات زیستگاه‌های پر شور واقع در نقاط مختلف اسپانیا جدا کردند که قادر به رشد در غلظت‌های نمک ۲۰ تا ۲۵ درصد بودند و بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناسی و محتوی G+C، در گونه‌های مختلف جنس *Bacillus* قرار گرفتند (۲۹).

بر خلاف نتایج حاصل از پژوهش حاضر، که اشکال میله‌ای گرم مثبت در بین جدایه‌ها دارای بیشترین میزان فراوانی هستند و ۵۹/۹ درصد جدایه‌ها را به خود اختصاص می‌دهند، در مطالعه‌ی مشابه انجام شده توسط مارکوز[۸] و همکاران که در سال ۱۹۸۷ انجام شد، تعداد ۱۵۴ باکتری غیر نمک‌دوست از یک حوضچه نمک واقع در Huelvea کشور اسپانیا جداسازی و مطالعه شد که بیشتر آن‌ها کوکوس‌های گرم مثبت به جنس‌های *Micrococcus* و *Staphylococcus* متعلق بوده و اشکال

www.SID.ir

Archive of SID

میله‌ای گرم مثبت از جنس *Bacillus* نیز با سهم کمتری در این زیست‌گاه حضور داشتند (۳۰). این اختلاف تعجب برانگیز نبوده و در مطالعات انجام شده مشخص شده که تنوع میکربی خاک‌های پرشور بیشتر به خاک‌های غیر شور شباهت دارد تا آب‌های شور و باکتری‌های خاک‌های پرشور به طور معمول وابستگان تحمل‌کنندهٔ نمک باکتری‌های معمول موجود در خاک هستند (۹). با توجه به جدا سازی بخش اعظم سویه‌ها از خاک و رسوبات این تفاوت قابل تفسیر است.

بیشترین میزان جداسازی سویه‌ها بر روی محیط SWN با میزان نمک سه درصد به‌دست آمد که به‌علت تعداد زیاد نمونه‌های خاک با شوری متوسط قابل انتظار است. همچنین، ناهمگونی مکانی[۹] که از ویژگی‌های ذاتی خاک است موجب به‌وجود آمدن ریز زیستگاه‌های مختلفی می‌شود که دارای شرایط فیزیکی شیمیایی و زیستی متفاوت هستند (۳۱). از آن‌جایی که در خاک ماده غذایی بیشتری در دسترس باکتری‌ها است، وجود چنین ریز زیستگاه‌هایی در خاک نسبت به شورابه و بلورهای نمک، که شوری بسیار بالا (۴۰ درصد) و یکنواخت دارند، برای رشد و تکثیر گونه‌های تحمل‌کننده نمک مکان مناسب‌تری است. در مورد نمونه‌های با درصد نمک بالا و کریستال‌های نمک از قبیل نمونه‌های بلور نمک مربوط به منطقه اسکله و چیچست، تعداد جدایه‌ها بسیار پائین بود که شاید به علت شوری بالا، برای زندگی انواع نمک‌دوست اجباری مناسب‌تر به‌نظر می‌رسند. در بررسی‌های فیلوژنتیک بر اساس توالی‌یابی ژن 16S rRNA در مورد سویه‌های منتخب، این سویه‌ها به پنج رده *Firmicutes*، *Actinobacteria*، *γ-Proteobacteria*، *α-Proteobacteria* و *Bacteroidet* و ۲۲ جنس *مختلف* تعلق داشتند. در بین سویه‌های تعیین توالی شده تعداد ۳۴ سویه به رده *Firmicutes* و ۱۰سویه به رده *γ-Proteobacteria* تعلق داشتند. همچنین، تعداد چهار سویه به شاخه *α-Proteobacteria*، سه سویه به شاخه *Actinobacteria* و یک سویه به شاخه *Bacteroidetes* تعلق داشتند. در مطالعه‌ی مشابه دیگری با هدف جداسازی و شناسایی باکتری‌های نمک‌دوست نسبی بومی دریاچه نمک آران و بیدگل و توانایی این میکروارگانیسم‌ها در تولید آنزیم‌های هیدرولازی خارج سلولی، ۸۳ سویه نمک‌دوست نسبی جدا شد که با جنس‌های نمک‌دوست نسبی *Bacillus*، *Thalassobacillus*، *Salinococcus*، *Halobacillus*، *Halomonas*، *Staphylococcus*، *Marinococcus*، *Idiomarina* و *Salicola* نزدیکی داشته و بیشترین فراوانی مربوط به جنس‌های *Salicola* و *Halobacillus* گزارش شد (۳۲).

در مطالعه تنوع زیستی باکتریهای تحمل کننده نمک دریاچه آران و بیدگل، جدایه‌های حاصل به چهار رده *Firmicutes*، *Actinobacteria*، *γ-Proteobacteria* و *α-Proteobacteria* و ۲۰ جنس مختلف متعلق بودند. ۴۱ سویه متعلق به رده *Firmicutes*، چهار سویه در رده *Actinobacteria*، در رده *γ-Proteobacteria* سه سویه و در رده *α-Proteobacteria* دو سویه گزارش شد. جنس‌های *Aneurinibacillus*، *Bacillus*، *Brevibacillus*، *Marinilactibacillus*، *Oceanobacillus*، *Ornithinibacillus*، *Paenibacillus*، *Virgibacillus*، *Staphylococcus*، *Aerococcus*، *Jeotgalicoccus*، *Salinicoccus*، *Arthrobacter*، *Kocuria*، *Microbacterium*، *Pseudomonas*، *Halomonas*، *Acinetobacter*،

www.SID.ir

Archive of SID

Paracoccus، *Bervundimonas* در این مطالعه گزارش شدند (۲۷).

از بین جدایه‌های نمک‌دوست نسبی حاصل از بررسی تنوع زیستی در دریاچه آران و بیدگل جنس‌های *Aquisalibacillus*، *Bacillus*، *Gracilibacillus*، *Halobacillus*، *Oceanobacillus*، *Ornithinibacillus*، *Paraliobacillus*، *Piscibacillus*، *Salinicoccus*، *Salirhabdus*، *Thalassobacillus*، *Virgibacillus*، *Salicola*، *Marinobacter*، *Chromohalobacter*، *Halomonas* و *Idiomarina* گزارش شدند (۲۸).

در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۱ بر روی جداسازی میکروارگانیسم‌ها از دریاچه ارومیه انجام شده است نیز میکروارگانیسم‌هایی در دو شاخه *Proteobactreia* -γ و *Firmicutes* گزارش شدند که بیشترین میزان شباهت را به جنس‌های *Halomonas*، *Salicola*، *Pseudomonas*، *Idiomarina*، *Marinobacter*، *Bacillus* و *Halobacillus* نشان دادند (۳۳). در پژوهش حاضر، تنوع بسیار بالاتری در سطح شاخه و جنس مشاهده شد که می‌توان آنرا به تنوع محیط‌های جداسازی و حجم بالاتر کار نسبت داد.

در این پژوهش، سویه‌های گرم مثبت در جنس‌های *Halobacillus*، *Planococcus*، *Gracilibacillus*، *Bacillus*، *Staphylococcus*، *Ornithinibacillus*، *Alkalibacterium*، *Kocuria*، *Pontibacter*، *Sanguibacter*، *Micrococcus*، *Oceanobacillus*، *Microbacterium*، *Thalassobacillus* و *Piscibacillus* و سویه‌های گرم منفی نیز در جنس‌های *Halomonas*، *Paracoccus*، *Marinobacter*، *Providencia*، *Lysobacter*، *Pontibacter*، *Salicola* و *Brevundimonas* قرار گرفتند.

در مطالعات محدودی که روی تنوع زیستی خاک‌های پرشور انجام شده، مشخص شد که جنس‌های بیشتر در این محیط‌ها را به طور معمول جنس‌های *Bacillus*، *Pseudomonas*، *Micrococcus*، *Alcaligenes*، *Flavobacterium* و *Acinetobacter* تشکیل می‌دهند (۹).

علاوه بر این گروه‌ها، جنس‌های *Salinivibrio*، *Pseudoalteromonas*، *Vibrio*، *Marinicoccus*، *Geotgalibacillus*، *Nestrenconia*، *Actinopolyspora*، *Aquisalibacillus*، *Ornithinibacillus*، *Paraliobacillus*، *Salirhabdus*، *Salinicoccus*، *Virgibacillus*، *Chromohalobacter* و *Idiomarina* که در بررسی تنوع زیستی دریاچه ارومیه مشاهده نشدند؛ در مطالعه بر روی محیط‌های پر شور دیگر گزارش شده‌اند (۳۴، ۳۵، ۳۶، ۳۷ و ۳۸).

تعداد و تنوع نمونه‌های به‌کار گرفته شده، فصل‌های مختلف نمونه‌برداری، توزیع طبیعی میکروارگانیسم‌ها در محیط زیست و مشخصات بوم‌شناختی هر منطقه همگی از جمله‌ی مواردی هستند که در نوع باکتری‌های جداسازی شده اثر خواهند داشت (۳۹). احتمال افزایش تنوع موجود با افزایش هربار نمونه‌برداری نیز در تفاوت نوع و تعداد میکروارگانیسم‌های جداشده در هر پژوهش تأثیرگذار خواهد بود (۴۰).

بخش اصلی توالی‌ها در کتابخانه ژنی باکتری‌ها، توالی‌های به گروه *Bacteroidetes* متعلق بود. در این گروه، توالی‌های مرتبط با گونه *Salinibacter ruber* بیشترین فراوانی را داشت به‌طوری‌که ۶۶ درصد از

www.SID.ir

Archive of SID

توالی‌های به‌دست آمده در روش مستقل از کشت، اعضای این جنس بودند. این مشاهده در دیگر دریاچه‌های نمک نیز گزارش شده است (۴۱ و۴۲). مطالعه بر روی تنوع زیستی باکتری‌های دریاچه آران و بیدگل با استفاده از روش کلونینگ و توالی‌یابی نیز نتایج مشابهی را ارائه داد که حدود ۴۰ درصد از جدایه‌های تعیین توالی شده به گونه *Salinibacter ruber* متعلق بودند (۴۳). در میان اعضای کتابخانه‌های ژنومی تهیه شده از دریاچه ارومیه در ۴۲ درصد از جدایه‌های تعیین توالی شده شباهت کمتر از ۹۷ درصد با گونه‌های استاندارد ثبت شده مشاهده شد. سه جنس متفاوت *Salinibacter*، *Adhaeribacter* و *Cesiribacter* در بین جدایه‌های تعیین توالی شده مشاهده شدند که هر سه به رده *Bacteroidetes* متعلق هستند.

روش‌های کشت و کلونینگ- توالی‌یابی، برای بررسی تنوع زیستی باکتری‌های دریاچه ارومیه به‌کار برده شدند. نتایج به‌دست آمده از هرکدام از روش‌ها با توجه به ویژگی‌های ذاتی روش و شیوه‌های اجرایی دارای محدودیت و جهت‌گیری‌های[10] خاص است. در روش کشت علاوه بر محدودیت اصلی (دسترسی به تنها حدود یک درصد از میکروارگانیسم‌های موجود)، محیط‌ها و روش‌های کشت استفاده شده، تنها امکان رشد گروه خاصی از میکروارگانیسم‌ها را فراهم می‌کند و نتایج به‌دست آمده از این روش بیانگر واقعیت کامل جامعه نیست. در روش مولکولی سد کشت برداشته شده و دسترسی به میکروارگانیسم‌های محیط بدون نیاز به رشد آن‌ها در شرایط مصنوعی آزمایشگاه میسر است. با این وجود، دسترسی به ماده ژنتیکی و توانایی تکثیر ژن مورد نظر در این روش محدودیت‌هایی ایجاد می‌کند. تمامی میکروارگانیسم‌های منطقه در برابر روش استخراج DNA بکاربرده شده پاسخ یکسانی ندارند. در این پژوهش، هیچ‌گونه همپوشانی در بین نتایج حاصل از روش‌های وابسته به کشت و غیر وابسته به کشت مشاهده نشد که این امر را می‌توان به تعداد بسیار کم جدایه‌های تعیین توالی شده با استفاده از روش کلونینگ و تعیین توالی نسبت داد. در بررسی جوامع میکروبی افزایش تعداد نمونه به‌اندازه افزایش تعداد نمونه در جوامع گیاهی و جانوری مؤثر و قابل تعمیم به واقعیت نیست. اما با افزایش تعداد نمونه‌ها نتایج قابل‌قبول‌تری به‌دست می‌آید. بر اساس نتایج به‌دست آمده، به‌کارگیری روش‌های پلی فازیک شامل استفاده همزمان از روش‌های سنتی وابسته به کشت و روش‌های مولکولی بهترین نتیجه در معرفی تنوع زیستی منطقه را ارائه می‌دهد. علاوه بر آن، استفاده از ابزارهای مختلف دید درست‌تری در مورد تنوع زیستی میکروارگانیسم‌های منطقه به‌دست می‌دهد.

تشکر و قدردانی

پژوهش حاضر با حمایت مالی مرکز ملی ذخایر ژنتیک و زیستی ایران انجام گرفته است.

www.SID.ir

Archive of SID

References

(1) Heywood V.H., Baste I., Gardner K.A. *GlobalBiodiversity Assessment.* Cambridge: Cambridge University Press; 1995

(2) Olembo, R, Hawksworth D. *Importance of microorganisms and invertebrates as components of biodiversity*. CAB International. 1991

(3) Colwell R, Hawksworth D. *Microbial Diversity 21: Action Statement. International Union of Biological Sciences and International Union of Microbiological Societies*. UK; 1991

(4) Barnes, R. *Invertebrate Zoology*. Philadeplphia: W. B. Saunders Company; 1984

(5) Head, I., J. Saunders, R.W. Pickup. Microbial evolution, diversity, and ecology: a decade of ribosomal RNA analysis of uncultivated microorganisms. *Microbial Ecology* 1998; 35(1): 1-21.

(6) Wayne,L.G., Brenner,D.J., Colwell,R.R., Grimont,P.A., Kandler,O., Krichevsky,M.I., et al. International Committee on Systematic Bacteriology. Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *Int J Syst Bacteriol* 1987; 37: 463–464.

(7) Stackebrandt, E., Frederiksen, W. Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *Int J Syst Evol Microbiol* 2002; 52(3): 1043.

(8) Stackebrandt, E., J. Ebers. Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards. *Microbiology today* 2006; 33(4): 152.

(9) Caton, T.M., Witte, L.R., Ngyuen, H.D., Buchheim, J.A., Buchheim, M.A. Schneegurt, M.A. Halotolerant aerobic heterotrophic bacteria from the Great Salt Plains of Oklahoma. *Microbial Ecology* 2004; 48(4): 449-462.

(10) Baron, F., Finegold, S.. *Diagnostic Microbiology*, 8Th ed. St. Loui; The CV Mosby Co., 1990.

(11) Murray R. G. E., Doetsch R. N., Robinow C. F. Determinative and cytological light microscopy. In: Gerhardt P, Murray R G E, Wood W A, Krieg N R, editors; Gerhardt P, Murray R G E, Wood W A, Krieg N R, editor s. Methods for general and molecular bacteriology. Washington, D.C: American Society for Microbiology; 1994. 22–41.

(12) Gibbons, N. Isolation, growth and requirements of halophilic bacteria. *Methods in microbiology* 1969; 3: 169-183.

(13) Kushner, D. Life in high salt and solute concentrations: halophilic bacteria, In: D. Kushner, editor. Microbial life in extreme environments. UK; Academic Press: 1978. P 317-68.

(14) Larsen, H. Halophilism. *The bacteria* 1962; 4: 297-342.

(15) Wilson, K. Preparation of genomic DNA from bacteria, In Current Protocols in Molecular Biology, B.R. Ausubel FM, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K, editor., New York; John Wiley & Sons: 1987

(16) Spencer, J. *Environmental microbiology: methods and protocols*. US; Humana Press Inc., 2004.

(17) Chun, J., Lee, J.-H., Jung, Y., Kim, M., Kim, S., Kim, B. K., Lim, Y. W. EzTaxon: a web-based tool for the identification of prokaryotes based on 16S ribosomal RNA gene sequences. *Int J Syst Evol Microbiol* 2007; 57: 2259-2261.

(18) Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 2007; 23: 2947-2948.

(19) Hall, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.* 1999; 41: 95–98.

(20) Kumar S, Stecher G, Peterson D, and Tamura K. MEGA-CC: Computing Core of

www.SID.ir

Archive of SID

Molecular Evolutionary Genetics Analysis Program for Automated and Iterative Data Analysis. *Bioinformatics* 2012; 28:2685-2686.

(21) Saitou, N., Nei, M. The *neighbor-joining* method: a new method for reconstructing phylogenetic *trees*. *Molecular Biology Evolution* 1987; 4: 406-425.

(22) Felsenstein, J. Phylogenies and the comparative method. *American Naturalist*; 1985. p1-15

(23) Benlloch, S., Martinez-Murcia, A. J., odríguez-Valera, F. Sequencing of bacterial and archaeal 16S rRNA genes directly amplified from a hypersaline environment. J. *Syst Appl Microbiol.* 1995; 18: 574-581.

(24) Huber, T., Faulkner, G., Hugenholtz, P.. Bellerophon; a program to detect chimeric sequences in multiple sequence alignments. *Bioinformatics*. 2004; 20: 2317-2319.

(25) Schut, F., Vries, E. J., Gottschal, J. C., Robertson, B. R., Harder, W., Prins, R. A., et al. Isolation of typical marine bacteria by dilution culture: growth, maintenance, and characteristics of isolates under laboratory conditions. *Appl Environ Microbiol* 1993; 59(7): 2150-2160.

(26) Button, D., F. Schut, Quang, P., Martin, R., Robertson, B.R. Viability and isolation of marine bacteria by dilution culture: theory, procedures, and initial results. *Appl Environ Microbiol* 1993; 59(3): 881.

(27) Didari. M. Diversity of aerobic heterotrophic halotolerant bacteria from Aran-Bidgol Lake [Dissertation]. Tehran: University of Tehran.; 2009.

(28) Bagheri. M. Diversity of aerobic heterotrophic moderately halophilic bacteria from Aran-Bidgol Lake [Dissertation]. Tehran: University of Tehran.; 2009.

(29) Garabito MJ, Marquez MC, Ventosa A. Halotolerant *Bacillus* diversity in hypersaline environments. *Can J Microbiol* 1998; 44:95-102.

(30) Márquez, M.C., Ventosa, A., Ruiz-Berraquero, F. A. Taxonomic study of heterotrophic halophilic and non halophilicbacteria from a solar saltern. *Gen. Microbiol*. 1987; 133: 45-46.

(31) Kirk, L., Beaudette, L.A., Hart, M., Moutoglis, P., Klironomos, J.N., Lee, H., et al. Methods of studying soil microbial diversity. *Journal of microbiological methods* 2004; 58(2): 169-188.

(32) Babavalian, H., Amoozegar, M., Pourbabaei, A.A. Isolation, Identification and Characterization of moderately halophilic bacteria producing Hydrolytic enzymes from Aran-Bidgol salt Lake. *Iranian Journ of Biology* 2009; 22(1): 24-45.

(33) Zununi Vahed, S., Forouhandeh, H., Hassanzadeh, S., Klenk, H., Hejazi, M. A., Hejazi, M. S. Isolation and characterization of halophilic bacteria from Urmia Lake in Iran. *Microbiology* 2011; 80 (6): 834–841.

(34) Dong, H., G. Zhang, Jiang, H., Yu, B., Chapman, L.R., Lucas, C.R., Fields, M.W. Microbial diversity in sediments of saline Qinghai Lake, China: linking geochemical controls to microbial ecology. *Microbial Ecology* 2006; 51(1): 65-82.

(35) Ghozlan, H., H. Deif, et al. Biodiversity of moderately halophilic bacteria in hypersaline habitats in Egypt. *The Journal of General and Applied Microbiology* 2006; 52(2): 63-72.

(36) Jiang, H., H. Dong, Zhang, G., Yu, B., Chapman, L.R., Fields, M.W. Microbial diversity in water and sediment of Lake Chaka, an athalassohaline lake in northwestern China. *Appl Environ Microbiol* 2006; 72(6): 3832.

(37) Ventosa, A., Márquez, M., Garabito, MJ., Arahal, DR. Moderately halophilic gram-positive bacterial diversity in hypersaline environments. *Extremophiles* 1998; 2(3): 297-304.

(38) Yeon, S., W. Jeong, Park, JS. The diversity of culturable organotrophic

www.SID.ir

Archive of SID

bacteria from local solar salterns. *Microbiology* 2005; 43: 1-10.

(39) Alain, K. and J. Querellou. Cultivating the uncultured: limits, advances and future challenges. *Extremophiles* 2009; 13(4): 583-594.

(40) Hughes, J. B., Hellmann, J. J., Ricketts, T. H., Bohannan, B. J. M.. Counting the uncountable: statistical approaches to estimating microbial diversity. *Appl Environ Microbiol* 2001; 67(10): 4399-4406.

(41) Maturrano, L., Santos, F., Rossello-Mora, R., Anton, J. Microbial diversity in Maras salterns, a hypersaline environment in the Peruvian Andes. *Appl Environ Microbiol.* 2006; 72: 3887-3895.

(42) Mutlu, M. B., Martínez-Garcıa M., Santos F., Pen A., Guven K, Anton J. Prokaryotic diversity in Tuz Lake, a hypersaline environment in Inland Turkey. *FEMS Microbiol Ecol.* 2008; 63: 1-10.

(43) Makhdoumi-Kakhki A, Amoozegar MA, Kazemi B, Pašić L, Ventosa A. Prokaryotic diversity in Aran-Bidgol salt lake, the largest hypersaline playa in Iran. *Microbes Environ* 2011; 27(1): 87-93.

[1]. Biodegradation
[2]. Bio prospecting
[3]. Flame photometry
[4] Baron
[5]. Deoxy nucleotide chain termination
[6]. Benlloch
[7]. Garabito
[8]. Marquez
[9]. Spatial heterogeneity
[10]. Bias

www.SID.ir

Archive of SID

Biodiversity of moderately halophilic and halotolerant bacteria in the western coastal line of Urmia lake

Maliheh Mehrshad [**]
Ph.D student of Microbiology, University of Tehran, Iran, m.mehrshad@ut.ac.ir
Mohammad Ali Amoozegar [*] [**]
Associate Professor of Microbiology, University of Tehran, Iran, amoozegar@ut.ac.ir
Bagher Yakhchali
Associate Professor of Microbiology, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, Iran, bahar@nigeb.ac.ir
Seyed Abolhassan Shahzade Fazeli [***]
Assistant Professor of Molecular Genetics, Iranian Biological Resource Center and Genetic Department, Tehran, Iran, fazeli@ibrc.ir

Abstract

Introduction: Urmia Lake, located in the northwest of Iran, is the largest permanent lake in Iran and one of the three permanent hypersaline lakes in the world. Microbial sampling from four western different regions of the lake was done and then, biodiversity of the samples were studied by culture dependent and culture independent methods.

Materials and Methods: In culture dependent methods, halophilic and halotolerant bacteria were isolated under aerobic condition on four growth media, MH, SWN, MHLN and SWNLN. Differentiation of bacterial isolates was performed based on colony features, Gram staining and primary biochemical tests. In culture independent method, environmental DNA from water and soil samples were extracted. After 16S rRNA PCR amplification 16S rRNA library was constructed and 20% of clones were sequenced.

Results: Within 217 purified isolates in culture dependent methods, 52 strains were selected for 16S rRNA gene sequencing and representatives of *Halobacillus, Halomonas, Planococcus, Gracilibacillus, Bacillus, Pontibacillus, Paracoccus, Marinobacter, Providencia, Staphylococcus, Alkalibacterium, Sanguibacter, Lysobacter, Kocuria, Pontibacter, Salicola, Micrococcus, Oceanobacillus, Brevundimonas, Thalassobacillus, Microbacterium* and *Piscibacillus* genera were identified. In culture independent method, selected clones belonged to *Salinibacter، Adhaeribacter* and *Cesiribacter* genera.

Discussion and Conclusion: In culture dependent selected strains 18 strains showed less than 98.7% sequence similarity to the closest known strains and were representatives as new taxa of Urmia lake. In culture independent method selected clones belonged to Bacteroidetes category. Data obtained from this study were similar to other scientific reports from hypersaline lakes.

Key words*:* Halotolerant bacteria, Moderately halophilic bacteria, Biodiversity, Urmia Hypersaline Lake

[*] Corresponding Author, Dean of Microorganisms Bank, Iranian Biological Resource Center (IBRC), ACECR, Tehran, Iran
[**] Extremophiles Lab, Dept. of Microbiology, Fac. of Biology and Center of excellence in Phylogeny of Living Organisms, College of Science, University of Tehran, Iran
[***] Royan Institute for Reproductive Biomedicine, ACECR,Tehran, Iran
Received: September 22, 2012/ **Accepted:** December 29, 2012

www.SID.ir