

جداسازی و شناسایی سیانوباکترها از خاک‌های فوق شور پارک ملی کویر

عاطفه اعتمادی خواه^۱، احمد علی پوربابایی^{۲*}، حسینعلی علیخانی^۳، مصطفی نوروزی^۴

۱. دانشجوی دکتری، گروه مهندسی علوم خاک پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج

۲. دانشیار، گروه مهندسی علوم خاک، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج

۳. استاد، گروه مهندسی علوم خاک، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج

۴. استادیار، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیست‌شناسی، دانشگاه الزهراء، تهران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۴/۲۷ - تاریخ بازنگری: ۱۳۹۵/۸/۲ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۵/۸/۵)

چکیده

سیانوباکترها یک گروه منحصر به فرد از باکتری‌های فتواتوتروف هستند که برخی از آن‌ها به دلیل ویژگی‌های ساختاری، تحمل قابل توجهی به تنش شوری نشان می‌دهند. این موجودات نقش مهمی در محیط‌های خاکی به ویژه در نواحی خشک و نیمه‌خشک ایفا می‌کنند. در مطالعه حاضر سیانوباکترهای خاک از مناطق بیابانی ایران جداسازی شده و سپس جدایه‌های مقاوم به شرایط فوق شور شناسایی شدند. ۴۰ نمونه خاک از پارک ملی کویر تهیه شد. نمونه‌ها پس از کشت در محیط BG11 و ASN III (۳/۵، ۵، ۶ و ۷ درصد کلرید سدیم) و انکوباسیون در شرایط مناسب دمایی و نور، جداسازی شده و با استفاده از کلیدهای مورفولوژیکی به طور اولیه و سپس با روش مولکولی مورد شناسایی قرار گرفتند. از مجموع ۴۰ مکان نمونه‌برداری فقط از ۴ مکان سویه‌های سیانوباکتر مقاوم به شرایط فوق شور جداسازی شد. در محیط کشت فاقد کلرید سدیم ۲۷ مورفوتایپ شناسایی شد که پنج سویه متعلق به دو جنس قادر به رشد در حضور ۳/۵ درصد کلرید سدیم بودند. در میان این پنج سویه، سه سویه در غلظت ۵ و دو سویه در غلظت ۶ درصد کلرید سدیم رشد کردند. تنها سویه *Phormidium autumnale* 61et قادر به تحمل غلظت ۷ درصد کلرید سدیم بود که از مکانی با شوری ۸۷/۸۰ دسی‌زیمنس بر متر جداسازی شده بود. نتایج نشان داد که برخی از سیانوباکترهای جدا شده از خاک پارک ملی کویر قادرند در شرایط سخت مانند تنش شوری رشد کنند و توده بیولوژیکی فعالی را ایجاد نمایند.

واژه‌های کلیدی: بیابان، خاک، سیانوباکتر، 16S rRNA

مقدمه

زیستگاه‌های فوق شور محیط‌هایی هستند که غلظت نمک در آن‌ها بیش از آب دریاست (بیش از ۳۵ گرم بر لیتر). این زیستگاه‌ها جزء محیط‌های سخت طبقه‌بندی می‌شوند. زیرا غلظت بالای نمک دشمن بسیاری از موجودات است. با این حال بسیاری از موجودات زنده به ویژه پروکاریوت‌ها به دلیل توانایی مقابله با تنش اسمزی می‌توانند در این محیط‌ها زندگی کنند. این ریزموجودات مکانیسم‌های زیادی برای حفاظت سلول-هایشان از فشار اسمزی بالا و در مقابل اثر دنا توره کننده نمک دارند (Dennis and Shimmin, 1997; Gilmour, 1990; Oren, 2000). سیانوباکترها پروکاریوت‌های فتوسنتز کننده‌ای هستند که از لحاظ کمی جزء مهم‌ترین موجودات کره زمین محسوب می‌شوند. این موجودات در طیف وسیعی از زیستگاه‌های طبیعی یافت می‌شوند که برخی از ویژگی‌های ساختاری و فیزیولوژیکی

آن‌ها دلیل این موفقیت بوده است (Kulasekari, 2011). برخی از این موجودات نسبت به غلظت-های بالای نمک مقاوم هستند و می‌توانند در محیط‌هایی با فشار اسمزی بالا رشد کنند. دریاچه‌های نمکی اغلب حاوی گونه‌های تشکیل دهنده مت^۱ مانند *Microcoleus chthonoplastes*، گونه‌های تثبیت کننده نیتروژن تشکیل دهنده بلوم^۲ مانند *Nodularia apumigena* و گونه‌های تحمل کننده نمک مانند *Aphanothece halophytica* هستند. بعضی از گونه‌های سیانوباکتر نمک دوست اجباری هستند و می‌توانند در غلظت نمک تا ۳۶۰ گرم بر لیتر رشد کنند (۱۰ برابر بیشتر از غلظت نمک آب دریا). سیانوباکترهای ساکن نواحی نمکی انواع مختلفی از املاح درون سلولی تولید می‌کنند (از جمله گلیسین بتائین^۳ و گلوکوزیل گلیسرول^۴) که بدون داشتن اثرات زیان‌آور،

1. Mat
2. Bloom
3. Glycinebetaine
4. Glucosylglycerol

* نویسنده مسئول : pourbabaei@ut.ac.ir

Dorador et al. (2008). Caroppo et al. (2012) گزارش شد که گونه جدید از سیانوباکتر *Halomicronema* را از یک اسفنج دریایی از دریای مدیترانه جداسازی کرده و با روش مورفولوژی، فراساختاری و توالی‌یابی ژن رمز کننده 16S rRNA شناسایی کردند. طبقه‌بندی سیانوباکترهای دریاچه ارومیه و اکوسیستم‌های مجاور آن بر اساس روش‌های مولکولی و مورفولوژیکی مورد بررسی قرار گرفت و تنوع کمی از سیانوباکترهای آن منطقه شامل جنس‌های *Trichormus*، *Aphanocapsa*، *Chroococcus*، *Gloeocapsa*، *Leptolyngbya*، *Oscillatoria*، *Nostoc*، *Nodularia*، *Microcoleus*، *Lyngbya* و *Phormidium* گزارش شد که این تنوع کم را می‌توان به نمونه‌برداری محدود و یا افزایش شوری دریاچه در سال‌های اخیر نسبت داد که باعث حذف تعدادی از نمونه‌های غیر مقاوم شده است (Asadi et al., 2011).

با اینکه برخی از سیانوباکترهای خاکزی در مناطق خاصی از سراسر جهان مورد مطالعه قرار گرفته‌اند، ولی شناسایی سیانوباکترها در خاک‌های بیابانی شور ایران هنوز گزارش نشده است. با توجه به اینکه وسعت بالایی از اراضی ایران را مناطق بیابانی و شور در بر گرفته و با توجه به نقش سیانوباکترها در بهبود خاک این مناطق، لزوم جداسازی جدایه‌های مقاوم به شرایط شور احساس می‌شود تا در سال‌های آتی و تحقیقات آینده بتوان از آن‌ها استفاده نمود. بنابراین هدف این مطالعه جداسازی سیانوباکترهای مقاوم به شرایط فوق شور از خاک یکی از مناطق کویری ایران به نام پارک ملی کویر، شناسایی آن‌ها از نظر مورفولوژی و مولکولی و بررسی میزان رشد آن‌ها در غلظت‌های مختلف کلرید سدیم بود.

مواد و روش‌ها

توصیف منطقه

پارک ملی کویر بین ۵۱ درجه و ۲۵ دقیقه تا ۵۳ درجه و ۳ دقیقه طول شرقی و ۳۴ درجه و ۱۷ دقیقه تا ۳۵ درجه و ۱۱ دقیقه عرض شمالی واقع شده است. این منطقه یکی از بخش‌های کویری ایران واقع در دشت کویر است، ۴۴۰ هزار هکتار وسعت دارد و منطقه حفاظت شده کویر مرکزی واقع در غرب کویر مرکزی ایران و شرق دریاچه نمک و قم رود می‌باشد (شکل ۱). دارای اقلیم خشک و بیابانی است و بیشتر بارندگی آن از آبان تا اردیبهشت ماه صورت می‌گیرد. متوسط میزان بارش سالیانه در آن ۱۵۰ میلی‌متر، حداقل و حداکثر دمای مطلق ۱۵- و ۴۵ درجه سانتی‌گراد و میانگین سالانه رطوبت نسبی هوا

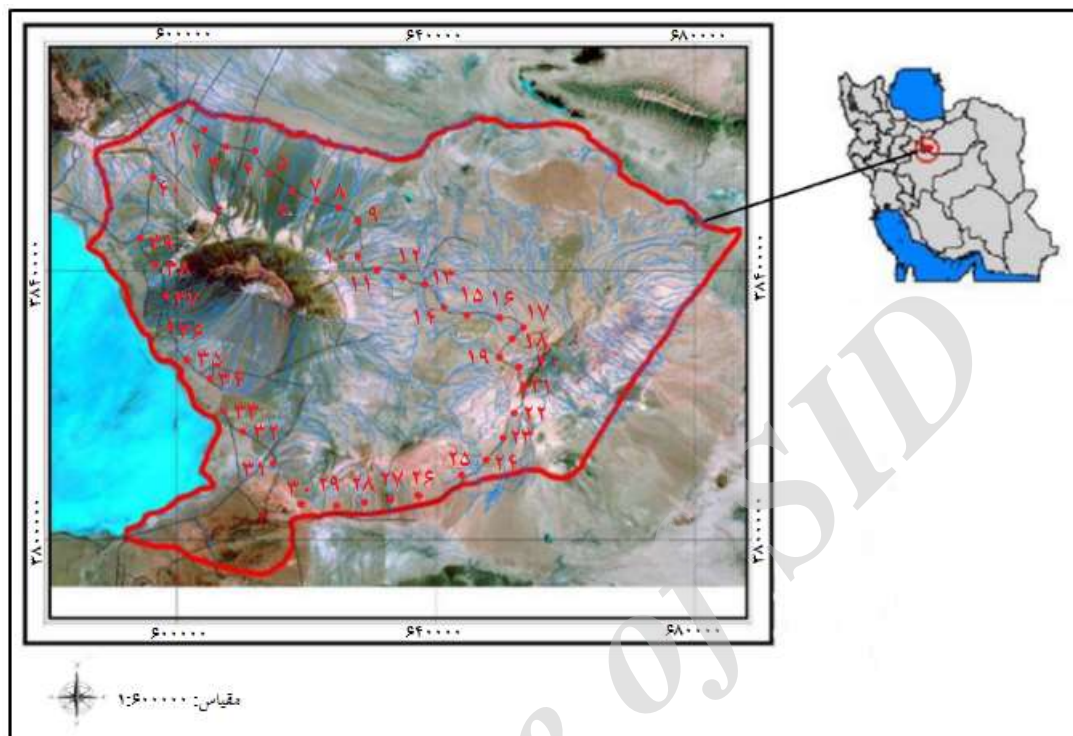
موجب حفظ تعادل اسمزی سلول می‌شوند (Fernandes et al., 1993).

آنالیز تنوع میکروبی در جوامع طبیعی نیاز به یک روش چند فازی دارد که استفاده سنتی و تکنیک‌های مولکولی، خصوصیات تنوع جامعه را با هم ترکیب می‌کنند. این امر در اجتماع سیانوباکترهای دریایی با موفقیت انجام شده است. اما چنین مطالعاتی برای سیانوباکترهای خاکی به ندرت صورت گرفته است (Komarek and Mares, 2012). شناسایی سیانوباکترها با استفاده از روش‌های سنتی عمدتاً بر پایه ویژگی‌هایی مانند مورفولوژی رشته‌ها، سلول‌های رویشی، هتروسیست-ها^۱ و آکینت‌ها^۲ می‌باشد (Komarek and Anagnostidis, 1989). شکل کلنی، شکل سلول‌های انتهایی، وجود یا عدم وجود غلاف و وزیکول‌های گازی^۳ و همچنین چرخه زندگی سیانوباکترها از ویژگی‌هایی است که در شناسایی برخی از جنس‌ها بکار می‌رود (Rajaniemi et al., 2005). در تمام سطوح طبقه‌بندی، آنالیز توالی ژن‌های رمز کننده زیر واحد کوچک RNA (16S rRNA) عموماً بهترین روش برای طبقه‌بندی فیلوژنتیک سیانوباکترهاست و آنالیز مقایسه‌ای توالی ژن‌های رمز کننده 16S rRNA یک ابزار جدیدی را برای بررسی اختلاف بین مجموعه‌های گونه‌ها و جوامع طبیعی فراهم می‌کند (Garcia-Pichel et al., 2001; Casamatta et al., 2005; Chatchawan et al., 2011). (Deshmukh et al., 2010). سیانوباکترهای موجود در یک معدن سنگ نمک در تایلند را جداسازی و ۱۶ گونه متعلق به جنس‌های *Aphanothece*، *Chroococcus*، *Coleofasciculus*، *Johannesbaptistia*، *Halothece*، *Halomicronema*، *Komvophoron*، *Leptolyngbya*، *Lyngbya*، *Nostoc*، *Oscillatoria*، *Spirulina* و *Wolleea* را به روش مورفولوژی شناسایی کردند. تنوع سیانوباکترهای موجود در یک تالاب شور در شمال شیلی با استفاده از روش DGGE^۴ و توالی‌یابی ژن رمز کننده 16S rRNA مورد بررسی قرار گرفت و یک جامعه سیانوباکتریایی منحصر به فرد شامل ۷۸ فیلوتایپ متعلق به جنس‌های *Limnothrix*، *Phormidium*، *Nodularia*، *Aphanizomenon*، *Anabaena*، *Cyanospira*، *Tolypothrix*، *Nostoc*، *Calothrix*، *Synechocystis*، *Merismopedia*، *Gloeocapsa*، *Cyanobacterium*، *Oscillatoria*

1. Heterocyst
2. Akinete
3. Gas vesicles
4. Gel Electrophoresis Denaturing Gradient

علف شور، گز و غیره) و جانوری خاصی است و معمولاً گرمای شدید از اوایل خرداد تا پایان مهرماه در منطقه ادامه دارد (Khosroshahi *et al.*, 2011a,b).

۴۱ درصد بوده که کمترین آن ۲۴ درصد در مرداد ماه و بیشترین آن ۶۵ درصد در بهمن ماه اتفاق می‌افتد. دارای پوشش گیاهی (درمنه، شیرخشت، گون، تیغ، اسفند، تاغ، خارستر، نی،



شکل ۱. نقشه پارک ملی کویب

نمک کلرید سدیم) اضافه شد (Sussman *et al.*, 2006; Pramanik *et al.*, 2011) و در اتاق رشد با دمای ۲۲-۲۵ درجه سانتی‌گراد با لامپ‌های فلورسنت سفید با نور ۳-۵ کیلوواکس و دوره روشنایی/ تاریکی ۱۲/۱۲ گرماگذاری شد. پس از رشد نمونه‌ها، از هر نمونه سری‌های رقت 10^{-2} ، 10^{-3} و 10^{-4} تهیه شد. یک دهم میلی‌لیتر از هر سری رقت درون پلیت‌های حاوی محیط کشت جامد BG11 و ASN III (با غلظت‌های مختلف) کشت داده شد. پلیت‌ها به مدت ۳-۶ هفته در اتاق رشد در شرایط ذکر شده نگهداری شدند (Nayak and Prasanna, 2007). پس از گذشت دو تا سه هفته، پلیت‌ها با میکروسکوپ نوری بررسی شده و رشته‌های منفرد و فاقد آلودگی برداشته و کشت خطی داده شدند. پس از چند بار کشت خطی و استفاده از استریومیکروسکوپ برای تشخیص رشته‌های خالص، برخی از سویه‌ها خالص شده و برخی دیگر نیاز به کشت مجدد برای خالص‌سازی داشتند (Deshmukh *et al.*, 2010; Nongbri and Syiem, 2012). برای حذف آلودگی باکتریایی و قارچی از آنتی‌بیوتیک ایمپینم^۱ و سیکلوهگزامید^۲ با غلظت ۰/۱۲۵ درصد

نمونه‌برداری و آنالیز خاک

نمونه‌برداری از ۴۰ نقطه با ویژگی‌های ظاهری متفاوت و از عمق ۵-۱۰ سانتیمتری به صورت تصادفی صورت گرفت. از هر نقطه سه نمونه خاک برداشته شد و برای تهیه نمونه همگن با هم مخلوط گردید. نمونه‌برداری در اوایل بهار ۹۳ انجام شد. پس از آن، نمونه‌ها درون کیسه‌های پلاستیکی ریخته شده و در محفظه مخصوص با دمای ۴ درجه قرار گرفتند و جهت آنالیز خاک و جداسازی سیانوباکترها به آزمایشگاه بیولوژی گروه مهندسی علوم خاک دانشگاه تهران منتقل شدند. بخشی از نمونه‌ها برای انجام آنالیز فیزیکی و شیمیایی هوا خشک شده و از الک دو میلی‌متری عبور داده شدند. بقیه نمونه‌ها در یخچال ۴ درجه نگهداری گردید. پارامترهای فیزیکی و شیمیایی خاک مانند اسیدیته، قابلیت هدایت الکتریکی، عصاره اشباع، بافت خاک و مواد آلی بر اساس روش‌های استاندارد اندازه‌گیری شدند (Weaver, 2008).

جداسازی و خالص‌سازی سیانوباکترها

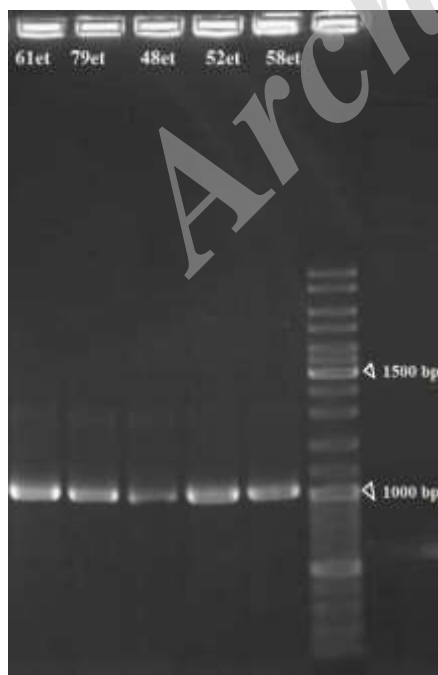
یک گرم از هر نمونه خاک به ۹ میلی‌لیتر محیط کشت BG11 (محیط پایه فاقد کلرید سدیم برای جداسازی سیانوباکترها) و ASN III با غلظت‌های مختلف (دارای ۳/۵، ۵، ۶ و ۷ درصد

1. Imipenem
2. Cycloheximide

آغازگر با غلظت ۰/۴ میلی مولار، ۱ میکرولیتر dNTP، ۰/۵ میکرولیتر آنزیم Taq DNA Polymerase، ۳۱/۵ میکرولیتر آب مقطر استریل و ۴ میکرولیتر (۱۰ نانوگرم) از DNA استخراج شده. واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر MJ Mini با شرایط دمایی ۱ دقیقه و ۵۰ ثانیه واسرشت شدن ابتدایی در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد و در ادامه ۳۳ چرخه شامل واسرشت شدن در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، اتصال در دمای ۵۳ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، گسترش در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه و گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷ دقیقه انجام شد. بعد از انجام واکنش، محصول PCR بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد به همراه نردبان مولکولی 1kb الکتروفورز شدند (شکل ۲). باند مورد نظر با استفاده از تیغ استریل از روی ژل بریده شد و با استفاده از کیت Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (شرکت Promega) خالص شده و برای توالی‌یابی به شرکت Macrogen در کره جنوبی فرستاده شد.

جدول ۱. توالی آغازگرهای استفاده شده برای تکثیر ژن رمز کننده 16S rRNA در سیانوباکترها (Deshmukh et al., 2010)

آغازگر	توالی	اندازه هدف
CYA359F	5' GGGGAATYTTCCGCAATGGG 3'	۳۵۹-۳۷۸
PcR	5' ACGGGCGGTGTGTAC 3'	۱۳۹۲-۱۴۰۶



شکل ۲. الکتروفورز ژل آغاز ژن 16S rDNA تکثیر شده در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز برای سویه‌های مقاوم به شرایط فوق شور

وزنی به حجمی استفاده شد (Ferris and Hirsch, 1991). برای خالص‌سازی برخی از سویه‌ها هم از روش سانتریفیوژ (۱۰ دقیقه در دور ۳۵۰۰ دور در دقیقه جهت جدا کردن سلول‌های بزرگتر و سنگین‌تر سیانوباکتر از باکتری‌های کوچک‌تر) و سونیکیشن^۱ (۳۰ ثانیه در فرکانس ۲۰ کیلوهرتز جهت حذف میکروارگانیسم‌های متصل به سیانوباکترها) استفاده شد (Andersen, 2005).

بررسی‌های مورفولوژیک

برای بررسی مورفولوژی سیانوباکترها از میکروسکوپ نوری (Olympus BX51) با بزرگنمایی 40X و 100X استفاده شد. شناسایی جدایه‌ها بر اساس روش Komarek and Anagnostidis (1998, 2005) انجام گرفت. برای تمام نمونه‌ها خصوصیات مورفولوژیکی شامل شکل و اندازه سلول‌های رویشی (طول و عرض سلول)، شکل رشته، حضور یا عدم حضور غلاف، عرض تریکوم^۲، شکل سلول‌های انتهایی، حضور آکینت، هتروسیست و شاخه جانبی، سلول‌های نکریدی^۳ و انقباض در دیواره سلولی بررسی گردید (Garcia-Pichel et al., 2001; Alwathnani and Johansen, 2011; Martineau et al., 2013).

استخراج و تکثیر DNA

DNA سویه‌های سیانوباکتریایی خالص شده با استفاده از کیت DNA MATRIX Plant & Fungi (شرکت EURx لهستان) استخراج شد. برای این منظور از سیانوباکترهای خالص شده در محیط مایع BG11 کشت تازه تهیه شد. پس از رشد در دمای ۲۲-۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت دو هفته، نمونه‌ها همگن شده و دو میلی‌لیتر (۱۰۰ میلی‌گرم وزن مرطوب بافت) از آن‌ها برداشته شد و به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۳۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. مایع رویی دور ریخته شد و سلول‌های رسوب یافته شش مرتبه سرد و گرم شدند و به روش Bruno et al. (2005)، DNA آن‌ها استخراج شد.

با توجه به انتقال‌پذیری مناسب آغازگرهای CYA359F و PcR در گونه‌های مختلف سیانوباکتر بر اساس مطالعات سایر محققین (Bruno et al., 2005, Caroppo et al., 2012)، این آغازگرها برای تکثیر ژن 16S rDNA استفاده شدند (جدول ۱) که محصولی با طول ۱۰۰۰ جفت باز تولید می‌کنند. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با حجم ۵۰ میکرولیتر انجام شد که ترکیب آن به صورت زیر بود: ۵ میکرولیتر بافر 10X، ۴ میکرولیتر MgCl₂ با غلظت ۲ میلی مولار، ۲ میکرولیتر از هر

1. Sonication
2. Trichome
3. Necridic cells

آنالیز مولکولی

توالی‌یابی ژن رمز کننده 16S rRNA به صورت دو طرفه انجام شد. آغازگرهای استفاده شده CYA359F و PcR بودند که ۱۰۰۰ جفت باز از ژن 16S rDNA را تکثیر می‌کنند. توالی‌ها با استفاده از نرم افزار BioEdit اصلاح شده و بخش‌های مبهم آن حذف شدند. توالی‌های مورد نظر با توالی‌های ژن 16S rRNA سیانوباکترهای مشابه که در بانک ژنی NCBI موجود بودند از طریق برنامه BLAST مقایسه شدند (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) و جنس و گونه سیانوباکترهای جدا شده تعیین گردید. سپس توالی‌ها با نرم افزار MEGA6 هم-ردیف شدند. آنالیز فیلوژنی و رسم درخت فیلوژنی از طریق روش Neighbor-joining و آنالیز (1000 replicates) Bootstrapping به منظور تخمین قابل اطمینان وابستگی سویه‌ها انجام گردید. از سیانوباکتر کروی *Gloeobacter violaceus* PCC 7421 به عنوان out group استفاده شد (Tamura et al., 2007).

اندازه‌گیری رشد سیانوباکترها

پس از جداسازی و شناسایی سیانوباکترهای مقاوم به شرایط فوق شور، وزن زیست توده سیانوباکتر در غلظت‌های ۰، ۳/۵، ۵، ۶ و ۷ درصد کلرید سدیم در مدت هشت هفته اندازه‌گیری و منحنی رشد آن‌ها رسم گردید. برای این منظور سیانوباکترها در پلیت‌های حاوی محیط BG11 به مدت ۱۴ روز در دما و نور ذکر شده کشت شدند. سپس ۵ پلاگ (مربع ۰/۵ در ۰/۵) از سیانوباکترهای رشد یافته در این محیط به ارلن‌های حاوی ۲۵ میلی‌لیتر محیط مایع BG11 اضافه و در دمای ۲۵-۲۲ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شدند. در روزهای مختلف نمونه‌ها توسط کاغذ صافی واتمن ۴۲ صاف و سه بار با آب مقطر استریل شسته شدند و به مدت ۱۲ ساعت در آون ۵۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفته و وزن زیست توده آن‌ها اندازه‌گیری شد (Leston and Lamar, 1996). جهت اندازه‌گیری MPN^۱ این سویه‌ها، از خاک-های مربوط به مکان‌های ۱۳، ۱۸، ۲۷ و ۲۸ در محیط مایع BG11 سری‌های رقت 10^{-4} تا 10^{-9} تهیه و میزان MPN به روش‌های استاندارد اندازه‌گیری شد (Prasanna et al., 2006).

تجزیه و تحلیل آماری

آزمایشات در قالب فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. تجزیه و تحلیل‌های آماری به کمک نرم افزار SAS انجام و برای مقایسه میانگین تیمارها از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد استفاده شد.

نتایج

خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک

قابلیت هدایت الکتریکی عصاره اشباع در نمونه‌های خاک از ۰/۲۲۸ تا ۲۰۳ دسی‌زیمنس بر متر متغیر بود. از ۴۰ مکان نمونه‌برداری ۴ مکان Ec بیش از ۴۵ دسی‌زیمنس بر متر داشتند که دارای سویه‌های سیانوباکتر مقاوم به شرایط فوق شور بودند. بالاترین شوری در خاک دارای سیانوباکتر، مربوط به مکان ۲۸ با Ec ۸۷/۸۰ دسی‌زیمنس بر متر بود. اسیدیته نمونه‌ها تغییر چندانی نداشت و از ۶/۵۲ تا ۸/۲۹ متغیر بود. سایر پارامترها در جدول (۲) آمده است.

شناسایی مورفولوژی

در محیط BG11 (فاقد کلرید سدیم) ۲۷ مورفوتایپ، در محیط ASN III با غلظت‌های ۳/۵، ۵، ۶ و ۷ درصد نمک، به ترتیب ۵، ۳، ۲ و ۱ مورفوتایپ سیانوباکتر جداسازی شد که میزان تحمل آن‌ها به غلظت‌های مختلف نمک در جدول (۳) آورده شده است. سویه‌های جدا شده در غلظت ۳/۵ درصد و بالاتر، به طور کامل مورد شناسایی قرار گرفتند و نام سویه‌های مربوط به غلظت صفر کلرید سدیم و شماره دسترسی آن‌ها در بانک ژن، در جدول (۲) آورده شدند. در این مطالعه پنج مورفوتایپ سیانوباکتر رشته‌ای با استفاده از میکروسکوپ نوری شناسایی شد که تصویر آن‌ها در شکل (۳الف-ر) آمده است. سویه‌ها متعلق به جنس‌های *Phormidium* و *Trichocoleus* بودند. مکان ۲۷ با دو سویه بیشترین تعداد سیانوباکتر را داشت که میزان Ec آن ۵۵/۷۰ دسی‌زیمنس بر متر بود. بالاترین فراوانی سیانوباکتر مربوط به جنس *Phormidium* با سه سویه بود. مشاهده سویه‌ها در زیر میکروسکوپ نوری نشان داد که تمام سویه‌ها فاقد هتروسیست، اکینت و شاخه جانبی بوده و تریکوم-های آن‌ها توسط غلاف موسیلاژی احاطه شده‌اند. نتایج نشان داد سویه 61et که دارای غلاف موسیلاژی ضخیمی است از مکان ۲۸ با بالاترین غلظت نمک جدا شده که Ec آن ۸۷/۸۰ دسی‌زیمنس بر متر بود و تنها سویه‌ای است که قادر به تحمل ۷ درصد کلرید سدیم می‌باشد.

توصیف سویه‌ها:

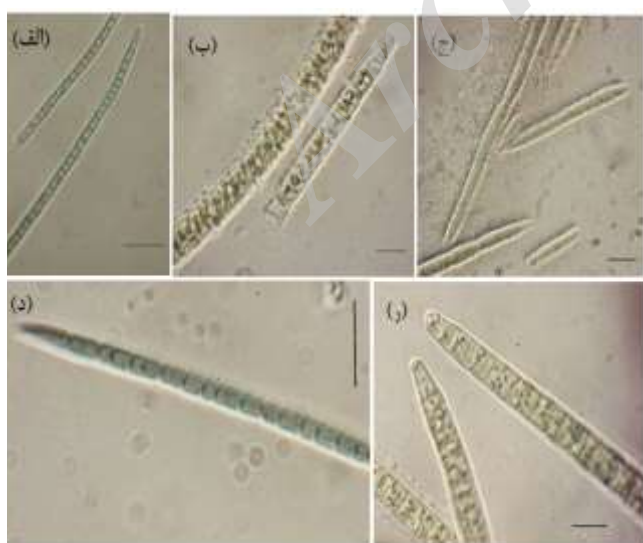
Trichocoleus desertorum 52et: (شکل (۳-الف))

رشته‌ای، رشته‌ها به صورت انفرادی، صاف یا منحنی و در هم تنیده هستند. تریکوم‌ها متحرک‌اند، ۲-۱/۵ میکرومتر عرض دارند و توسط غلاف‌های نازک و بی‌رنگ احاطه شده‌اند. رنگ سلول‌ها سبز آبی تا سبز زیتونی است و در دیواره‌های میانی

۱/۵ میکرومتر عرض دارند و توسط غلاف‌های نسبتاً ضخیم و بی‌رنگی احاطه شده‌اند. سلول‌ها سبز تا سبز آبی تیره هستند، ۲-۲/۵ میکرومتر طول دارند و طول آن‌ها بلندتر از عرض می‌باشد. به آرامی در انتها باریک شده‌اند، به شدت در دیواره‌های سلولی میانی منقبض شده‌اند، دارای تعدادی سلول نکرییدی هستند. در مرکز سلول تعدادی دانه کوچک یا بزرگ دیده می‌شود. سلول‌های رأسی دارای طول بیشتر از عرض بوده، مخروطی شکل یا تیز هستند، این سلول‌ها در قسمت میانی ۲-۱/۸ میکرومتر عرض و ۷/۲-۷/۵ میکرومتر طول دارند و فاقد کالیپترا می‌باشند (Komarek and Anagnostidis, 1998; 2005).

Phormidium autumnale 61et: (شکل ۳-ر)

رشته‌ای، رشته‌ها به صورت انفرادی، صاف و به ندرت منحنی هستند. تریکوم‌ها توسط غلاف‌های ضخیم و بی‌رنگی احاطه شده‌اند که این غلاف‌ها در انتها باز می‌باشند. تریکوم‌ها ۶/۵-۷/۵ میکرومتر عرض دارند و در انتها باریک شده‌اند. محتوای سلول‌ها دانه‌دار است، در دیواره‌های سلولی میانی انقباض دیده نمی‌شود. سلول‌های نکرییدی وجود ندارند. سلول‌ها دارای رنگ سبز تا سبز مایل به قهوه‌ای می‌باشند، ۵-۶ میکرومتر طول دارند و طول آن‌ها کوتاه‌تر از عرض می‌باشد. سلول‌های انتهایی گرد یا مخروطی شکل هستند و فاقد کالیپترا می‌باشند (Komarek and Anagnostidis, 1998; 2005).



شکل ۳ (الف-ر). عکس‌های تهیه شده توسط میکروسکوپ نوری از سیانوباکترهای جدا شده از خاک پارک ملی کویر. الف: *T. desertorum* 52et، ب: *P. autumnale* 79et، ج: *P. animale* 48et، د: *T. desertorum* 58et، ر: *P. autumnale* 61et مقیاس تمام عکس‌ها ۱۰ میکرومتر بود.

منقبض شده‌اند، سلول‌ها هم ابعاد بوده و یا طول بیشتر از عرض می‌باشد، ۱/۵-۲ میکرومتر عرض دارند. تعداد زیادی هورموگونیای^۱ کوچک دیده می‌شود، ولی نکرییدی مشاهده نمی‌گردد. گاهی اوقات یک یا تعدادی دانه کوچک در مرکز سلول دیده می‌شود. سلول‌های رأسی مخروطی شکل یا تیز و کشیده هستند و طول آن‌ها بیشتر از عرض می‌باشد، این سلول‌ها در قسمت میانی ۲-۱/۷ میکرومتر عرض و ۴/۵-۵ میکرومتر طول دارند و فاقد کالیپترا^۲ می‌باشند (Komarek and Anagnostidis, 1998; 2005).

Phormidium autumnale 79et: (شکل ۳-ب)

رشته‌ای، رشته‌ها به صورت انفرادی، صاف، کمی مارپیچی و یا به ندرت منحنی و در هم تنیده هستند. تریکوم‌ها توسط غلاف‌های ضخیم، بی‌رنگ و موسیلاژی احاطه شده‌اند که این غلاف‌ها در انتها باز می‌باشند، ۶/۵-۷/۵ میکرومتر عرض دارند و در انتها باریک شده‌اند. سلول‌ها دارای طول کوتاه‌تر از عرض هستند، ۴-۳ میکرومتر طول دارند، محتوای دانه‌دار دارند و رنگ آن‌ها سبز مایل به قهوه‌ای یا زرد است. در دیواره‌های سلولی میانی انقباض دیده نمی‌شود. سلول‌های انتهایی گرد یا مخروطی شکل هستند و فاقد کالیپترا می‌باشند (Komarek and Anagnostidis, 1998; 2005).

Phormidium animale 48et: (شکل ۳-ج)

رشته‌ای، رشته‌ها به صورت انفرادی، صاف یا کمی منحنی هستند، تریکوم‌ها توسط غلاف‌های نازک و بی‌رنگی احاطه شده‌اند که این غلاف‌ها در انتها باز می‌باشند. تریکوم‌ها ۴-۵ میکرومتر عرض دارند، فاقد انقباض یا دارای انقباض کم در دیواره‌های سلولی میانی می‌باشند. دیواره‌های سلولی میانی دانه‌دار نیستند و نکرییدی در آن‌ها مشاهده نمی‌شود. سلول‌ها دارای رنگ سبز مایل به قهوه‌ای تا قهوه‌ای هستند، ۲-۲/۵ میکرومتر عرض دارند و دارای طول کوتاه‌تر از عرض می‌باشد. سلول‌های انتهایی باریک شده‌اند، گرد یا مخروطی شکل هستند و فاقد کالیپترا می‌باشند (Komarek and Anagnostidis, 1998; 2005).

Trichocoleus desertorum 58et: (شکل ۳-د)

رشته‌ای، رشته‌ها به صورت انفرادی و اغلب صاف هستند، گاهی اوقات کمی مارپیچی بوده و در هم تنیده هستند. تریکوم‌ها ۲-

1. Hormogonium
2. Calypttra

جدول ۲. خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک، سیانوباکترهای جدا شده از مکان‌های مختلف و شماره دسترسی سوبه‌ها در بانک ژن

شماره دسترسی در بانک ژن (NCBI)	سوبه جدا شده	مواد آلی (درصد)	هدایت الکتریکی (دسی‌زیمنس بر متر)	اسیدیته	بافت	مکان
KX759131	<i>Phormidium autumnale</i> 60et	۰/۱۳	۴/۹۳	۸/۱۲	لوم رسی شنی	۱
	-	۰/۳۴	۵۹/۶۰	۷/۶۴	لوم رسی شنی	۲
	-	۰/۴۲	۱۹/۰۷	۷/۷۱	لوم شنی	۳
KX759114	<i>Trichocoleus desertorum</i> 35et	۰/۵۰	۱/۲۵	۸/۲۷	شن لومی	۴
	-	۰/۲۳	۳۷/۷۰	۷/۵۴	لوم رسی شنی	۵
	-	۰/۴۵	۱/۷۲	۸/۱۲	شن لومی	۶
KX759112	<i>Tychonema</i> sp. 39et	۰/۴۰	۲/۰۵	۷/۹۱	شن لومی	۷
KX759115	<i>Phormidium autumnale</i> 40et	۰/۵۰	۱/۵۵	۸/۱۲	لوم رسی شنی	۸
KX759116	<i>Trichocoleus desertorum</i> 41et	۰/۶۳	۱/۱۶	۸/۱۳	لوم شنی	۹
KX759117	<i>Trichocoleus desertorum</i> 43et	۰/۴۰	۲/۱۳	۷/۸۷	شن لومی	۱۰
KX759118	<i>Phormidium autumnale</i> 44et	-	۰/۶۷	۳/۶۱	لوم رسی شنی	۱۱
KX759119	<i>Trichocoleus desertorum</i> 46et	۰/۵۴	۶/۷۴	۷/۶۹	لوم شنی	۱۲
KX759120	<i>Phormidium animale</i> 48et	۰/۲۱	۴۵/۴۰	۷/۴۳	لوم رسی شنی	۱۳
	-	۰/۱۱	۸۵/۳۰	۷/۲۶	لوم رسی سیلتی	۱۴
	-	۰/۳۹	۶۸/۲۰	۷/۴۲	لوم شنی	۱۵
KX759121	<i>Microcoleus</i> sp. 50et	۰/۶۴	۵/۳۸	۷/۸۶	لوم رسی شنی	۱۶
KX759122	<i>Trichocoleus desertorum</i> 51et	-	۰/۳۷	۱۲۷/۸۰	لوم رسی شنی	۱۷
KX759123	<i>Trichocoleus desertorum</i> 52et	۰/۹۸	۶۷/۷۰	۷/۲۲	رس شنی	۱۸
	-	۰/۶۱	۱۹۵/۷۰	۶/۵۲	لوم شنی	۱۹
	-	۰/۴۵	۱۹۲/۶۰	۶/۵۹	شن لومی	۲۰
KX759124	<i>Leptolyngbya subtilissima</i> 53et	۰/۱۴	۳/۲۷	۸/۱۲	شن لومی	۲۱
	-	۰/۱۱	۱۶۵/۳۰	۷/۱۳	رس شنی	۲۲
	-	۰/۳۲	۱۰/۹۶	۷/۸۲	شن لومی	۲۳
KX759125	<i>Phormidium autumnale</i> 54et	۰/۱۲	۳/۴۷	۸/۰۵	لوم شنی	۲۴
KX759127	<i>Leptolyngbya scottii</i> 57et	۰/۳۹	۲/۵۰	۷/۹۸	شنی	۲۵
	-	۰/۳۵	۶/۷۹	۷/۷۰	لوم	۲۶
KX759128	<i>Trichocoleus desertorum</i> 58et	۱/۰۸	۵۵/۷۰	۷/۳۸	لوم رسی شنی	۲۷
KX759129	<i>Phormidium autumnale</i> 79et	۰/۷۸	۸۷/۸۰	۸/۱۸	لوم رسی شنی	۲۸
KX759132	<i>Phormidium autumnale</i> 61et	۰/۳۳	۳۳/۱۰	۷/۵۳	رس شنی	۲۹
KX759133	<i>Trichocoleus desertorum</i> 64et	۰/۴۷	۳/۹۸	۷/۹۷	شن لومی	۳۰
KX759134	<i>Phormidium autumnale</i> 65et	-	۰/۰۳	۲۰۳/۰۰	رس شنی	۳۱
KX759130	<i>Trichocoleus desertorum</i> 59et	۰/۲۸	۲/۸۷	۷/۹۷	شنی	۳۲
	-	۰/۰۹	۹۸/۲۰	۷/۶۵	رس شنی	۳۳
	-	۰/۱۵	۲/۹۱	۸/۲۱	لومی	۳۴
KX759113	<i>Phormidium autumnale</i> 2et	۰/۴۸	۰/۶۵	۸/۲۹	شن لومی	۳۵
KX759136	<i>Phormidium autumnale</i> 73et	۰/۲۲	۱/۰۹	۸/۲۱	شن لومی	۳۶
KX759137	<i>Phormidium autumnale</i> 74et	۰/۱۲	۰/۲۳	۸/۰۴	شن لومی	۳۷
KX759138	<i>Phormidium autumnale</i> 76et	۰/۲۱	۱/۰۹	۷/۷۹	شن لومی	۳۸
KX759126	<i>Leptolyngbya scottii</i> 56et	۰/۳۲	۲/۴۵	۷/۶۶	شنی	۳۹
	-	۰/۴۵	۵۵/۹۰	۷/۴۸	لوم رسی سیلتی	۴۰

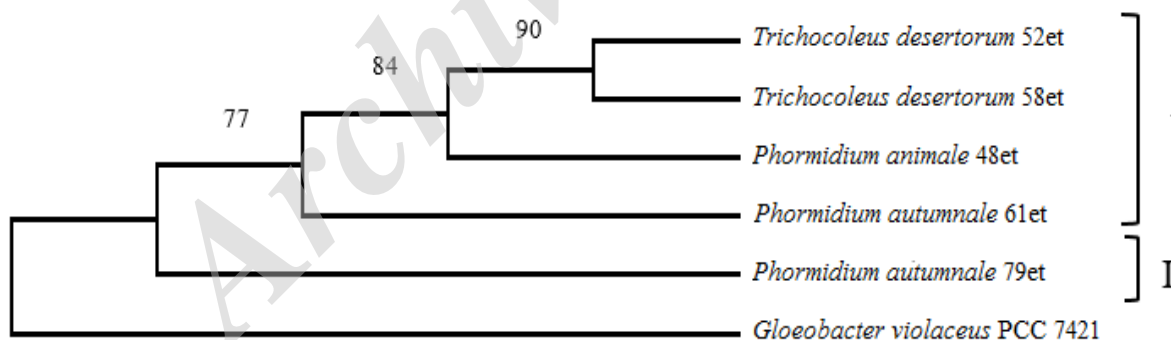
جدول ۳. میزان تحمل نمک در سویه‌های مقاوم به شرایط فوق شور و مقدار MPN سیانوباکترها در مکان‌های مختلف

مکان	سویه	تحمل نمک (درصد)	MPN × 10 ⁴ /g
۱۳	<i>Phormidium animale</i> 48et	۰-۳/۵	۴/۶۳
۱۸	<i>Trichocoleus desertorum</i> 52et	۰-۶	۳/۷۴
۲۷	<i>Trichocoleus desertorum</i> 58et	۰-۳/۵	۴/۱۶
۲۸	<i>Phormidium autumnale</i> 79et	۰-۵	۴/۷۸
	<i>Phormidium autumnale</i> 61et	۰-۷	

شناسایی مولکولی

پس از مقایسه توالی‌های به دست آمده با توالی‌های ثبت شده در بانک ژنی NCBI، پنج سویه متعلق به دو جنس و سه گونه در غلظت ۳/۵ درصد کلرید سدیم به دست آمد که شماره دسترسی آن‌ها در بانک ژن در جدول (۲) آورده شده است. این پنج سویه شامل *Phormidium animale* 48et، *Trichocoleus desertorum* 52et، *Phormidium autumnale* 79et و *Trichocoleus desertorum* 58et و *Phormidium autumnale* 61et بودند که به ترتیب از مکان‌های ۱۳، ۱۸، ۲۷، ۲۷ و ۲۸ جداسازی شدند. شکل (۴) نشان‌دهنده ارتباط فیلوژنی سویه‌های مذکور می‌باشد. در درخت فیلوژنی حاصله، دو گروه اصلی به چشم می‌خورد. گروه اول شامل سه زیرگروه و گروه دوم شامل *Phormidium autumnale* 79et می‌باشد. سویه‌های *T. desertorum*

52et و *T. desertorum* 58et با ۹۰ درصد bootstrap در زیرگروه اول گروه یک قرار گرفته‌اند. این سویه‌ها از نظر مورفولوژی هم بسیار به یکدیگر شباهت داشتند. در زیر گروه دوم و سوم گروه یک به ترتیب *P. animale* 48et و *P. animale* 48et قرار گرفته‌اند که ۹۲/۶ درصد به یکدیگر شباهت داشتند. *P. autumnale* 79et با شاخه طولانی‌تری در گروه دوم قرار داشت. این سویه دارای تکامل کمتری نسبت به سایر سویه‌های جدا شده بود و از نظر ژنتیکی ارتباط کمتری با بقیه داشت. در این درخت بیشترین شباهت بین *T. desertorum* 52et و *T. desertorum* 58et با ۹۸/۱ درصد تشابه و کمترین شباهت بین *P. autumnale* 79et و *T. desertorum* 58et با ۷۸/۷ درصد تشابه بود.



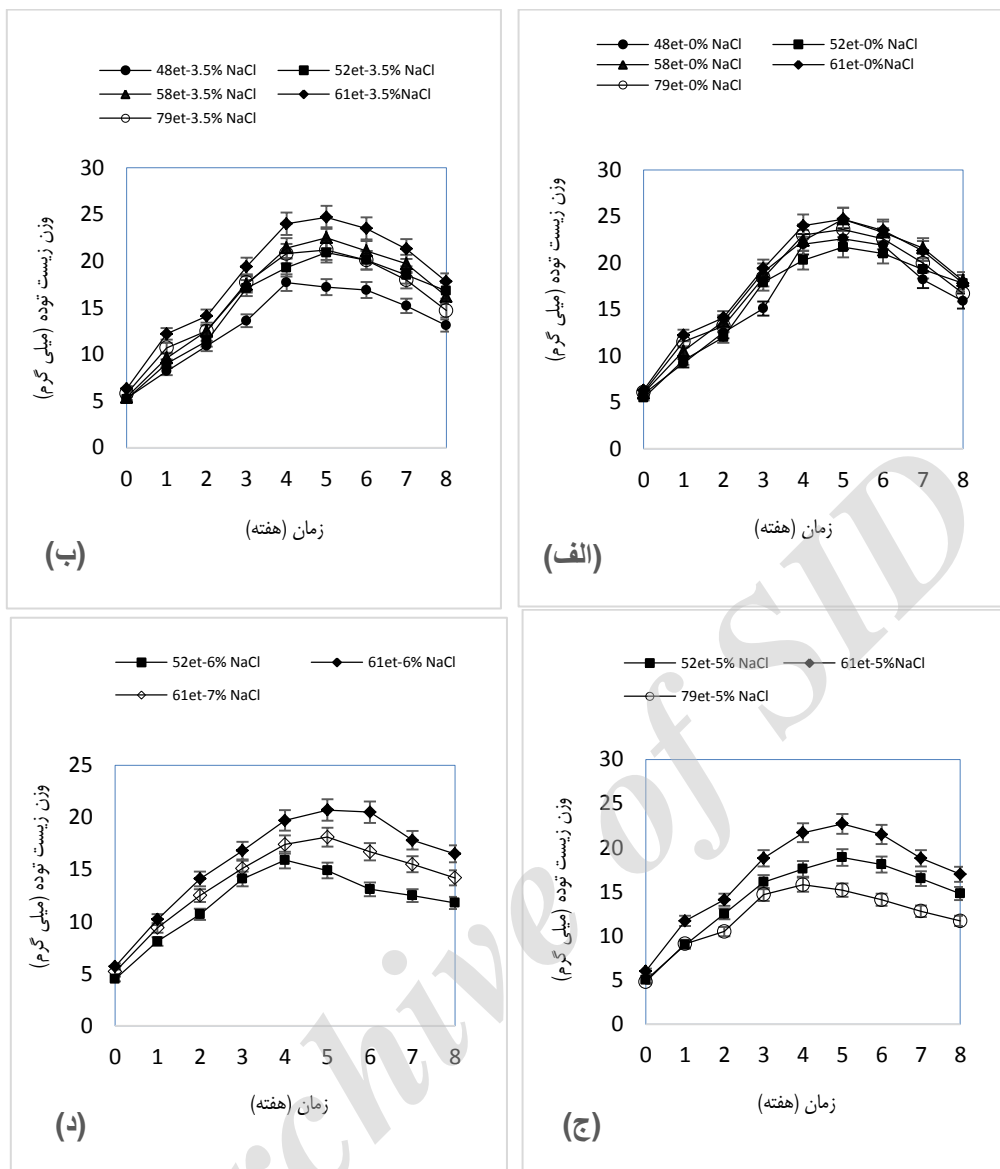
شکل ۴. درخت فیلوژنی بر اساس توالی ژن رمز کننده 16S rRNA سیانوباکترهای جدا شده در این مطالعه

رشد سیانوباکترها

بررسی منحنی‌های رشد سویه‌های 48et، 52et، 58et، 61et و 79et در غلظت‌های ۰، ۳/۵، ۵، ۶ و ۷ درصد کلرید سدیم (شکل الف-د) نشان داد در محیط فاقد نمک کلرید سدیم تمام سویه‌ها تقریباً به یک میزان رشد کرده و در هفته پنجم پس از کشت بیشترین زیست توده را تولید کرده‌اند. با افزایش غلظت نمک، میزان زیست توده تولید شده در تمام سویه‌ها کاهش یافته است. کاهش رشد در سویه 61et با شیب کمتری نسبت به

سایرین رخ داده که نشان می‌دهد این سویه مقاومت بیشتری به غلظت بالای کلرید سدیم داشته و تنها سویه‌ای است که در ۷ درصد نمک رشد کرده است.

اندازه‌گیری MPN در مکان‌های مختلف نشان داد با افزایش شوری، بیشترین تعداد احتمالی سیانوباکترها در خاک کاهش یافته است. مکان ۲۸ با اینکه بالاترین میزان Ec را دارا بود ولی به دلیل وجود دو سویه مقاوم به شوری در این منطقه، بالاترین MPN را داشت (جدول (۳)).



شکل ۵ (الف-د). وزن زیست توده تولید شده توسط سویه‌های 48et, 52et, 58et, 61et و 79et در غیاب کلرید سدیم در روزهای مختلف. الف: منحنی رشد سویه‌های 48et, 52et, 58et, 61et و 79et در غیاب کلرید سدیم، ب: منحنی رشد سویه‌های 48et, 52et, 58et, 61et و 79et در حضور ۳/۵ درصد کلرید سدیم، ج: منحنی رشد سویه‌های 52et, 61et و 79et در حضور ۵ درصد کلرید سدیم، د: منحنی رشد سویه‌های 52et و 61et در حضور ۶ درصد کلرید سدیم و سویه 61et در حضور ۷ درصد کلرید سدیم

بحث

از آنجا که روش فنوتیپی به تنهایی ابزار مناسبی برای شناسایی سیانوباکترها به حساب نمی‌آید و تشخیص دقیق برخی از جنس‌ها مانند *Phormidium* از طریق ویژگی‌های مورفولوژی به راحتی امکان پذیر نیست (Marquardt and Palinska, 2007; Comte et al., 2007; Komarek, 2010). در این مطالعه از روش چند فازی شامل کشت سویه‌ها، مشاهدات مورفولوژیکی و روش مولکولی برای شناسایی سیانوباکترهای بومی خاک پارک ملی کویر استفاده شد. برخی از سویه‌های جدا شده از این منطقه در سایر مناطق شور و فوق شور گزارش شده‌اند (Javor, 1989; Montoya and Golubic, 1991; Garcia-Pichel et al., 2001; Montoya, 2009; Dadheech et al., 2013). تا قبل از سال ۲۰۱۴ میلادی جنس *Trichocoleus* به وسیله بررسی خصوصیات مورفولوژیکی شناسایی می‌شد ولی *Muhlsteinova et al.* در سال ۲۰۱۴ گونه‌ای از *Trichocoleus* به نام *T. desertorum* را از مناطق بیابانی آتاکاما، کلرادو و موهاوای جداسازی کردند و با استفاده از روش‌های مورفولوژیکی، مولکولی و اکولوژیکی مورد شناسایی قرار دادند. سویه‌های *T. desertorum* 58et و *T. desertorum* 52et از لحاظ مولکولی ۹۹٪ درصد مشابه سویه‌های جدا شده از مناطق بیابانی آتاکاما،

از آنجا که روش فنوتیپی به تنهایی ابزار مناسبی برای شناسایی سیانوباکترها به حساب نمی‌آید و تشخیص دقیق برخی از جنس‌ها مانند *Phormidium* از طریق ویژگی‌های مورفولوژیکی به راحتی امکان پذیر نیست (Marquardt and Palinska, 2007; Comte et al., 2007; Komarek, 2010). در این مطالعه از روش چند فازی شامل کشت سویه‌ها، مشاهدات مورفولوژیکی و روش مولکولی برای شناسایی سیانوباکترهای بومی خاک پارک ملی کویر استفاده شد. برخی از سویه‌های جدا شده از این منطقه در سایر مناطق شور و فوق شور گزارش شده‌اند (Javor, 1989; Montoya and Golubic, 1991; Garcia-Pichel et al., 2001; Montoya, 2009; Dadheech et al., 2013). تا قبل از سال ۲۰۱۴ میلادی جنس *Trichocoleus* به وسیله بررسی خصوصیات مورفولوژیکی شناسایی می‌شد ولی *Muhlsteinova et al.* در سال ۲۰۱۴ گونه‌ای از *Trichocoleus* به نام *T. desertorum* را از مناطق بیابانی آتاکاما، کلرادو و موهاوای جداسازی کردند و با استفاده از روش‌های مورفولوژیکی، مولکولی و اکولوژیکی مورد شناسایی قرار دادند. سویه‌های *T. desertorum* 58et و *T. desertorum* 52et از لحاظ مولکولی ۹۹٪ درصد مشابه سویه‌های جدا شده از مناطق بیابانی آتاکاما،

10 و Gerloff's جداسازی شده و سه سویه از جنس *Phormidium* در غلظت ۴۰۰ میلی‌مولار نمک کلرید سدیم گزارش شدند (Pawar and Puranik, 2014). گونه‌های مختلفی از جنس *Phormidium* از خاک و تالاب‌های شور در اوکلاهما (Oklahoma) آمریکا جداسازی شدند (Kirkwood et al., 2008) که برخی از آن‌ها قادر به تحمل ۱۵ درصد نمک کلرید سدیم بودند. نتایج آن‌ها نشان داد بیشترین رشد این سویه‌ها در غلظت‌های پایین نمک رخ داده و با افزایش غلظت نمک رشد آن‌ها به شدت کاهش یافته است که با نتایج ما در مورد رشد سیانوباکترها در غلظت‌های مختلف کلرید سدیم مطابقت داشت. شوری خاک یک مشکل جدی است و در بسیاری از نقاط جهان به ویژه در مناطق خشک و نیمه‌خشک به تدریج در حال افزایش است. اکثر زمین‌ها به دلیل شرایط آب و هوایی، استفاده بی‌رویه از کودهای شیمیایی، زهکشی نامناسب و روش‌های زراعی نادرست در حال شور شدن هستند. هنگامی که خاکی خشک می‌شود، غلظت نمک‌ها در محلول خاک بالا رفته و تنش شوری افزایش می‌یابد. به طور کلی تنش شوری همراه با تنش خشکی است و این دو دارای اثرات مشابهی در کاهش پتانسیل آب می‌باشند (Chen et al., 2006; Hu et al., 2006a). کاهش پایداری خاکدانه‌ها، فرسایش آبی و بادی، انتشار گرد و غبار و کاهش حاصلخیزی خاک از مهم‌ترین مشکلات خاک در مناطق بیابانی و شور می‌باشد (Asadi et al., 2011). اکثر سیانوباکترهای موجود از آب شور و یا خاک‌های مرطوب و غیر شور جداسازی شده‌اند که این موجودات عمدتاً در خاک‌های خشک و شور مقاوم نبوده و برای بهبود و اصلاح خاک در این مناطق قابل استفاده نمی‌باشند. سیانوباکترها جزء مهم بسیاری از خاک‌ها مانند خاک‌های شور هستند. زیرا این موجودات به دلیل توانایی فتوسنتز قادر به تولید ترکیبات پلی‌ساکاریدی فراوانی هستند که در مقابله آن‌ها با شرایط سخت مانند تنش شوری نقش بسیار مهمی دارند و برای بهبود خصوصیات خاک در این مناطق می‌توان از آن‌ها استفاده نمود.

در برخی مطالعات از سیانوباکترها برای بهبود خصوصیات خاک مانند افزایش دانه‌بندی و پایداری خاکدانه‌ها (Issa et al., 2007)، بهبود ساختمان خاک، حاصلخیزی خاک، افزایش رشد گیاه (Maqubela et al., 2008) و تثبیت تپه‌های شنی روان در خاک‌های بیابانی شور (Chen et al., 2006b) استفاده شده است. نتایج تمام این مطالعات نشان داد مقادیر بالای کربن و مواد پلیمری خارج سلولی تولید شده توسط سیانوباکترها دلیل این امر بوده است.

کلرادو و موهاوی بودند. ولی در برخی از خصوصیات مورفولوژی با آن‌ها تفاوت داشتند. برای شناخت بهتر این جدایه‌ها و تشخیص سویه آن‌ها بهتر است از سایر نشانگرها مانند توالی‌یابی برخی از ژن‌های حفاظت شده مانند 16S-23S ITS استفاده کرد (Muhlsteinova et al., 2014). سویه *P. autumnale* 61et که از مکانی با بالاترین میزان شوری جدا شده بود، ۹۹٪ مشابه سویه جدا شده توسط Strunecky et al. (2012) از بخش مرکزی و غربی Spitsbergen واقع در ایسلند بود. سویه *P. autumnale* 79et از نظر مولکولی ۹۹٪ مشابه سویه‌ای بود که از یک منطقه گرم در شهر پادووا ایتالیا جدا شده بود (Sciuto et al., 2012). با مقایسه توالی 48et با توالی‌های موجود در سایت NCBI مشخص شد این سویه ۹۴ درصد مشابه *P. animale* CCAP 1459/6 (Gachon, 2013) می‌باشد. با توجه به اینکه درصد تشابه آن با نمونه‌های موجود در GenBank کمتر از ۹۸ درصد بود، به نظر می‌رسد این توالی یک سویه جدید باشد (Stackebrandt and Goebel, 1994) که نیاز به بررسی بیشتر دارد و باید ژن‌های بزرگ‌تری از آن را توالی‌یابی کرد. نتایج ما نشان داد مقاوم‌ترین جنس به غلظت بالای نمک در پارک ملی کویر *Phormidium* می‌باشد که با نتایج سایرین مطابقت داشت. Asadi et al. (2011) گونه‌های مختلفی از سیانوباکترهای هتروسیست‌دار و فاقد هتروسیست را از آب و خاک شور واقع در دریاچه ارومیه جداسازی و از طریق روش‌های مورفولوژیکی و مولکولی شناسایی کردند. نتایج آن‌ها نشان داد برخی از گونه‌ها قادر به تحمل ۴۵ درصد نمک کلرید سدیم هستند. آن‌ها تنوع کم سیانوباکترهای جدا شده را به نمونه‌برداری محدود (با توجه به بزرگی منطقه) و شوری بالای منطقه نسبت دادند که این امر در مورد نمونه‌های ما نیز صدق می‌کند. گونه‌هایی از جنس *Phormidium* توسط Dadheech et al. (2013) از نمونه‌های آب و خاک فوق شور در پارک ملی Etosha واقع در کشور نامیبیا (جنوب غربی آفریقا) جداسازی و بر اساس توالی‌یابی ژن رمز کننده 16S rRNA و زیر واحدهای بتا و آلفا (cpcBA-IGS) اپرون فیکوسیانین و ویژگی‌های مورفولوژیکی و اکولوژیکی مورد شناسایی قرار گرفت. آن‌ها بیان کردند *Phormidium* یکی از مشکل‌ترین جنس‌ها در ارزیابی فیلوژنتیکی است زیرا برخی از ویژگی‌های مورفولوژیکی گونه‌های مختلف این جنس مانند ضخامت غلاف با توجه به شرایط محیطی قابل تغییر است و در محیط‌های شور برای مقابله با تنش، غلاف موسیلاژی ضخیمی در اطراف آن‌ها ایجاد می‌شود. در مطالعه‌ای سیانوباکترهای تحمل کننده نمک از آب و خاک شور در منطقه Pune و Jalgaon هند به وسیله غنی‌سازی در محیط‌های Chu-BG-11.

سویه‌های جدا شده رشته‌ای، فاقد هتروسپیست و آکینت بودند و در سویه‌های مقاوم به محیط فوق شور غلاف موسیلاژی نسبتاً ضخیمی تریکوم‌ها را احاطه کرده بود. نتایج این مطالعه نشان داد که برخی از سیانوباکترهای جدا شده از خاک پارک ملی کویر قادرند در شرایط سخت مانند تنش شوری رشد کنند و توده بیولوژیکی فعالی را در این منطقه ایجاد نمایند.

سپاسگزاری

از اداره محیط زیست شهرستان ورامین که در نمونه‌برداری از منطقه ما را یاری کردند و از مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران که اجرای این تحقیق با مساعدت آن‌ها انجام پذیرفت، تشکر و قدردانی می‌شود.

REFERENCES

- Alwathnani, H. and Johansen, J.R. (2011). Cyanobacteria in soils from a Mojave Desert ecosystem. *Monographs of the Western North American Naturalist*, 5(1), 71–89.
- Andersen, R. A. (2005) *Algal Culturing Techniques*. Elsevier Academic Press. California, USA.
- Asadi, M., Dehghan, G., Zarrini, G. and Soltani, N. (2011). Taxonomic survey of cyanobacteria of Urmia Lake (NW Iran) and their adjacent ecosystems based on morphological and molecular methods. *Rostaniha*, 12(2), 153-163.
- Bruno, L., Billi, D. and Albertano, P. (2005). Optimization of molecular techniques applied to the taxonomy of epilithic *Leptolyngbya* strains. *Arch Hydrobiol Algological Studies*, 117, 197-207.
- Caroppo, C., Albertano, P., Bruno, L., Montinari, M., Rizzi, M., Vigliotta, G. and Pagliara, P. (2012). Identification and characterization of a new Halomicronema species (Cyanobacteria) isolated from the Mediterranean marine sponge *Petrosia ficiformis* (Porifera). *Fottea*, 12(2), 315–326.
- Casamatta, D. A., Johansen, J. R., Vis, M. L. and Broadwater, S. T. (2005). Molecular and morphological characterization of ten polar and near-polar strains within the Oscillatoriales (Cyanobacteria). *Journal of Phycology*, 41(2), 421–438.
- Chatchawan, T., Peerapornpisal, Y. and Komarek, J. (2011). Diversity of cyanobacteria in man-made solar saltern, Petchaburi Province, Thailand – a pilot study. *Fottea*, 11(1), 203–214.
- Chen, L. Z., Li, D. H., Song, L. R., Hu, C. X., Wang, G. H. and Liu, Y. D. (2006a). Effects of salt stress on carbohydrate metabolism in desert soil alga *Microcoleus vaginatus* Gom. *Journal of Integrative Plant Biology*, 48(8), 914–919.
- Chen, L. Z., Xie, Z. M., Hu, C. X., Li, Y. D., Wang, G.H. and Liu, Y. D. (2006b). Man-made desert algal crusts as affected by environmental factors in Inner Mongolia. *China Journal Arid Environment*, 67, 521-527.
- Comte, K., Sabacka, M., Carre-Mlouka, A., Elster, J. and Komarek, J. (2007). Relationships between the Arctic and the Antarctic cyanobacteria; three *Phormidium*-like strains evaluated by a polyphasic approach. *FEMS Microbiology Ecology*, 59(2), 366–376.
- Dadhech, P. K., Casamatta, D. A., Casper, P. and Krienitz, L. (2013). *Phormidium etoshii* sp. nov. (Oscillatoriales, Cyanobacteria) described from the Etosha Pan, Namibia, based on morphological, molecular and ecological features. *Fottea*, 13(2), 235–244.
- Dennis, P. P. and Shimmin, L. C. (1997). Evolutionary divergence and salinity-mediated selection in halophilic archaea. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 61(1), 90–104.
- Deshmukh, P. P., Wagh, G. N., Nag, B. B. S. P., Suri, R. K. and Thaware, R. R. (2010). Study of cyanobacterial diversity in different ecological niches using molecular techniques. *Asiatic Journal of Biotechnology Resources*, 03, 241-247.
- Dorador, C., Vila, I., Imhoff, J. F. and Witzel, K. P. (2008). Cyanobacterial diversity in Salar de Huasco, a high altitude saline wetland in northern Chile: an example of geographical dispersion. *FEMS Microbiology Ecology*, 64(3), 419-32.
- Fernandes, T. A., Iyer, V. and Apte, S. K. (1993). Differential responses of nitrogen-fixing cyanobacteria to salinity and osmotic stresses. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(3), 899-904.
- Ferris, M. J. and Hirsch, C. F. (1991). Method for isolation and purification of cyanobacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 57(5), 1448-1452.
- Gachon, C. (2013). (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).
- Garcia-Pichel, F., Lopez-Cortes, A. and Nubel, U. (2001). Phylogenetic and morphological diversity of cyanobacteria in soil desert crusts from the

نتیجه‌گیری کلی

در مطالعه حاضر سیانوباکترهای بومی خاک از یک منطقه بیابانی در حاشیه دریاچه نمک قم جداسازی و سپس سویه‌های مقاوم به شرایط فوق شور توسط روش‌های مورفولوژی و مولکولی شناسایی شدند. در محیط کشت فاقد کلرید سدیم ۲۷ مورفوتایپ شناسایی شد که پنج سویه متعلق به دو جنس قادر به رشد در حضور ۳/۵ درصد کلرید سدیم بودند. در میان این پنج سویه، سه سویه در غلظت ۵ و دو سویه در غلظت ۶ درصد کلرید سدیم رشد کردند که میزان رشد تمام سویه‌ها با افزایش غلظت نمک کاهش یافت. تنها سویه *Phormidium autumnale* 61et قادر به تحمل ۷ درصد کلرید سدیم بود که از مکانی با شوری ۸۷/۸۰ دسی زیمنس بر متر جداسازی شده بود. تمام

- Colorado Plateau. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 1902–1910.
- Gilmour, D. (1990) Halotolerant and halophilic microorganisms. In Edwards, C. (Ed.) *Microbiology of extreme environments*. *Open University Press*. (pp. 147–177). Milton Keynes, UK.
- Issa, O. M., Defarge, C., Le Bissonnais, Y., Marin, B., Duval, O., Bruand, A., D'Acqui, L., Nordenberg, S. and Annerman, M. (2007). Effects of the inoculation of cyanobacteria on the microstructure and the structural stability of a tropical soil. *Plant Soil*, 290(1–2), 209–219.
- Javor, B. (1989) *Hypersaline environments*. *Microbiology and Biogeochemistry*. Springer Verlag, Berlin.
- Khayer, K. A., Begum, M. F. A., Ali M. M., Mondal, M. A. and Akther, Q. Y. (2008). Ecology of cyanobacteria in some selected soils. *Journal of Agroforestry and Environment*, 2(1), 1–6.
- Khosroshahi, M., Kalirad, A. and Hosseini Marandi H. (2011a). Comparison of the desert kingdom of climate and tectonic of Iran. *Veld and Desert Research of Iran*, 18(2), 336–352.
- Khosroshahi, M., Mahmoudi, F. and Kashki, M. T. (2011b). Iranian desert areas with emphasis on the role of geological factors affecting their formation. *Earth Sciences*, 20(80), 15–22.
- Kirkwood, A. E., Buchheim, J. A., Buchheim, M. A. and Henley, W. J. (2008). Cyanobacterial Diversity and Halotolerance in a Variable Hypersaline Environment. *Microbial Ecology*, 55, 453–465.
- Komarek, J. (2010). Recent changes (2008) in cyanobacteria taxonomy based on a combination of molecular background with phenotype and ecological consequences (genus and species concept). *Hydrobiologia* 639, 245–259.
- Komarek, J. and Mares, J. (2012). An update to modern taxonomy (2011) of freshwater planktic heterocytous cyanobacteria. *Hydrobiologia*, 698, 327–351.
- Komarek, J. and Anagnostidis, K. (1989). Modern approach to the classification system of cyanophytes 4 Nostocales. *Algological Studies/Archiv für Hydrobiologie, Supplement Volumes*, 82, 247–345.
- Komarek, J. and Anagnostidis, K. (1998) Cyanoprokaryota 1. Teil: Chroococcales. In Ettl, H., Gärtner, G., Heynig, G.H. and Mollenhauer, D. (Eds.) *Süßwasserflora von Mitteleuropa* 19/1, Gustav Fischer Jena–Stuttgart–Lübeck–Ulm. (pp. 548).
- Komarek, J. and Anagnostidis, K. (2005) Cyanoprokaryota 2. Teil: Oscillatoriales. In Büdel, B., Gärtner, G., Krienitz, L. and Schagerl, M. (Eds) *Süßwasserflora von Mitteleuropa* 19/2, Elsevier GmbH. (pp. 760). München.
- Kulasooriya, S. A. (2011). Cyanobacteria: Pioneers of Planet Earth. *Ceylon Journal of Science (Bio. Sci.)* 40 (2), 71–88.
- Lestan, D. and Lamar, R. T. (1996). Development of fungal inocula for bioaugmentation of contaminated soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 2045–2052.
- Maqubela, M. P., Mkeni, P. N. S., Issa, M., Pardo, M. T. and Dacqui, L. P. (2008). Nostoc cyanobacterial inoculation in South African agricultural soils enhances soil structure, fertility, and maize growth. *Plant Soil*, 315(1), 79–92.
- Marquardt, J. and Palinska, K. A. (2007). Genotypic and phenotypic diversity of cyanobacteria assigned to the genus *Phormidium* (Oscillatoriales) from different habitats and geographical sites. *Archives of Microbiology*, 187, 397–413.
- Martineau, E., Wood, S. A., Miller, M. R., Jungblut, A. D., Hawes, I., Webster-Brown, J. and Packer, M. A. (2013). Characterization of Antarctic cyanobacteria and comparison with New Zealand strains. *Hydrobiologia*, 711, 139–154.
- Montoya, H. (2009). Algal and cyanobacterial saline biofilms of the Grande Coastal Lagoon, Lima, Peru. *Natural Resources and Environmental Issues*, 15(23), 127–134.
- Montoya, H. T. and Golubic, S. (1991). Morphological variability in natural populations of mat forming cyanobacteria in the salines of Huacho, Lima, Peru. *Algological Studies*, 64, 423–441.
- Muhlsteinova, R., Johansen, J. R., Pietrasiak, N., Martin, M. P., Osorio-Santos, K. and Warren, S. D. (2014). Polyphasic characterization of *Trichocoleus desertorum* sp. nov. (Pseudanabaenales, Cyanobacteria) from desert soils and phylogenetic placement of the genus *Trichocoleus*. *Phytotaxa*, 163 (5), 241–261.
- Nayak, S. and Prasanna, R. (2007). Soil pH and its role in cyanobacterial abundance and diversity in rice field soils. *Applied Ecology and Environmental Research*, 5(2), 103–113.
- Nongbri, B. B. and Syiem, M. B. (2012). Diversity analysis and molecular typing of cyanobacteria isolated from various ecological niches in the state of Meghalaya, North-East India. *Environmental Engineering Research in December*, 17(S1), S21–S26.
- Oren, A. (2000) Salt and brines. In Whitton, B.A. and Potts, M. (Eds), *The ecology of cyanobacteria: Their diversity in time and space*, *Kluwer Academic Publishers*. (pp. 281–306). Dordrecht.
- Pawar, S. T. and Puranik, P. R. (2014). C-phycoyanin production by halotolerant cyanobacteria. *Phykos*, 44(1), 25–32.
- Pramanik, A., Sundararaman, M., Das, S. and Mukherjee, J. (2011). Isolation and characterization of cyanobacteria possessing antimicrobial activity from the Sundarbans, the World's largest tidal mangrove forest. *Journal of Phycology*, 47(4), 731–743.
- Prasanna, R., Saxena, A. K., Jaiswal, P. and Nayak, S. (2006). Development of Alternative Support System for Viable Count of Cyanobacteria by Most Probable Number Method. *Folia Microbiology*, 51 (5), 455–458.

- Rajaniemi, P., Hrouzek, P., Kastovska, K., Willame, R., Rantala, A., Hoffmann, L., Komarek, J. and Sivonen, K. (2005). Phylogenetic and morphological evaluation of the genera *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Trichormus* and *Nostoc* (Nostocales, Cyanobacteria). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55, 11-26.
- Sciuto, K., Andreoli, C., Rascio N. and Moro I. (2012). Polyphasic approach and typification of selected *Phormidium* strains (Cyanobacteria). *Cladistics*, 28(4), 357-374.
- Stackebrandt, E. and Gobel, U. B. (1994). Taxonomic note: a place for DNA-RNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 44, 846-849.
- Strunecky, O., Komrek, J. and Elster, J. (2012). Biogeography of *Phormidium autumnale* (Oscillatoriales, Cyanobacteria) in western and central Spitsbergen. *Polish Polar Research*, 33(4), 369-382.
- Sussman, M., Bourne, D. G. and Willis, B. L. (2006). A single cyanobacterial ribotype is associated with both red and black bands on diseased corals from Palau. *Diseases of Aquatic Organisms*, 69, 111-118.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. and Kumar, S. (2007). MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 24(8), 1596-9.
- Weaver, R.W. (2008). Methods of soil analysis. Part 2. Soil Science Society of America. Wisconsin, USA.

Archive of SID