

تنوع زیستی پروکاریوت‌های نمک دوست قابل کشت در دریاچه ارومیه

Culturable prokaryotic diversity of Urmia salt lake

فرشته جوکارکاشی^۱، پرویز اولیا^۱، محمدعلی آموزگار^{۲*}، باقر یخچالی^۳

۱- دانشجوی دکتری و استاد، دانشگاه شاهد، تهران، ایران

۲- دانشیار، پردیس علوم، دانشگاه تهران، ایران

۳- دانشیار، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فن آوری، تهران، ایران

Jookar Kashi F¹, Owlia P¹, Amoozgar MA^{*2}, Yakhchali B³

1. PhD student and Professor, Shahed University, Tehran, Iran

2. Associate Professor, University of Tehran, Iran

3. Associate Professor, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: amoozgar@ut.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۲/۹/۲۳ - تاریخ پذیرش: ۹۳/۳/۱۸)

چکیده

برخی از میکروارگانیسم‌ها که به عنوان افراطی دوست از آن‌ها یاد می‌شود قادر به زندگی در نواحی هستند که برای میکروارگانیسم‌های دیگر مرگ آور است. دریاچه‌های نمک با شوری در حد اشباع یکی از این محیط‌ها هستند. توانمندی‌های زیست فن آوری میکروارگانیسم‌ها در محیط‌های پرشور باعث اهمیت بررسی آن‌ها شده است. دریاچه ارومیه بزرگترین سطح آبی کشور و یکی از دریاچه‌های فوق شور در جهان، در شمال غربی کشور قرار دارد که شبیه دریای پر شور Great در آمریکاست. هدف از این تحقیق بررسی تنوع پروکاریوت‌های نمک دوست افراطی مناطق مختلف دریاچه ارومیه با روش مبتنی بر کشت می‌باشد. از مناطق مختلف شرق و غرب دریاچه نمونه برداری شد و برای جداسازی میکروارگانیسم‌های نمک دوست از محیط‌های کشت MGM، SWN و HM با درصد نمک مختلف استفاده شد. جدا به‌ها براساس ویژگی‌های ریخت‌شناسی و بیوشیمیایی اولیه تفکیک شدند. از میان سویه‌های بدست آمده از آب، خاک، لجن و نمک، تعدادی به صورت تصادفی انتخاب و ژن 16S rDNA آنها تکثیر و تعیین ترادف شدند. از بین ۲۲۸ سویه حاصل، قطعه‌ای از 16S rDNA برای ۳۶ سویه منتخب، تکثیر و ترادف‌یابی شد که از نظر فیلوژنتیک سویه‌های آرکی در ۸ گونه و سه جنس *Haloarcula* (۴۴ درصد)، *Halorubrum* (۳۸/۸ درصد) و *Haloterrigena* (۱۱/۱ درصد) قرار گرفتند. باکتری‌های جدا شده هم به دو جنس *Salicola* و *Pseudomonas* تعلق داشتند که از این میان *Pseudomonas* باکتری نمک دوست افراطی نیست. میزان شباهت سویه‌ها با تاکسون‌های شناخته شده میکروبی بین ۹۶/۵-۱۰۰ درصد بود. از بین سویه‌ها، ۵ سویه شباهت کمتر از ۹۸/۷ درصد با سویه‌های استاندارد نشان داد که محدوده مرزی برای ارایه گونه جدید میکروبی بومی است. نتایج این پژوهش نشان داد که دریاچه ارومیه محیط غنی از میکروارگانیسم‌ها بوده که مشابه نتایج سایر مناطق پرشور بررسی شده است.

واژه‌های کلیدی

آرکی

باکتری‌های نمک دوست

تنوع زیستی

دریاچه ارومیه

16S rDNA

مقدمه

های ملکولی در شناسایی میکروارگانیسم‌ها هنوز هم روش‌های مبتنی بر کشت به دلیل مزیت‌هایشان مورد توجه می‌باشند زیرا به این ترتیب می‌توان اطلاعاتی راجع به جرئیات متابولیکی، عملکرد ارگانیسم‌ها بدست آورد و امکان دستکاری ژنتیکی نیز فراهم می‌شود (Sonia et al. 2010; Van et al. 2012). ایران دارای محیط‌های نمکی گوناگونی چون دریاچه‌های پرشور است که تنوع میکربی در آنها مشخص نشده است (Amoozegar et al. 2008). پروکاریوت‌های نمک دوست دارای توانایی‌های بالقوه برای وارد شدن در دنیای زیست فن‌آوری هستند. یکی از ویژگی‌های مهم این میکروارگانیسم‌ها رشد در تراکم بالای نمک است و این مساله خطر آلودگی فرایند را کاهش می‌دهد. ویژگی ارزشمند دیگر این باکتری‌ها، رشد سریع و نیازمندی غذایی ساده آن‌ها است.

هدف این پژوهش، بررسی اکوسیستم نمکی دریاچه ارومیه از نظر گوناگونی میکروارگانیسم‌های ساکن در آن و درک تنوع زیستی موجود در دریاچه و نیز امکان دستیابی به جنس، گونه یا سویه‌های جدید از میکروارگانیسم‌های نمک دوست است و در این راستا حفاظت از تنوع زیستی و گونه‌های به مخاطره افتاده در اکوسیستم و ایجاد بانک ژنی، به عنوان مواد شروع کننده برای مهندسی ژنتیک در صنعت تلاش شد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری و بررسی ویژگی‌های نمونه‌ها نمونه‌برداری از مناطق مختلف شرق و غرب دریاچه نمک ارومیه در تیرماه سال ۱۳۹۱ انجام شد. مشخصات جغرافیایی دقیق مناطق نمونه‌برداری توسط GPS ثبت شد. از مناطق غرب دریاچه منطقه-های باری (مجتمع تفریحی گردشگری باری)، چی چست، رشکان (منطقه تفریحی دانشگاه علوم پزشکی ارومیه)، کاظم داشی (صخره کاظم خان)، ضلع غربی پل شهید کلاتری، گل‌مانخانه و از سمت شرق دریاچه مناطق رحمانلو، روستای گمیچی، سمت شرقی پل شهید کلاتری و از وسط دریاچه از جزیره اسلامی (شاهی) نمونه برداری انجام شد. در مجموع ۸۵ نمونه آب، خاک، لجن و نمک جمع‌آوری شدند که شامل ۳۰ نمونه آب و ۳۰ نمونه خاک، ۲۰ نمونه لجن و ۵ نمونه نمک بودند. نمونه‌های جمع‌آوری شده از هر منطقه درون لوله‌های فالکون استریل و کیسه

جهان میکروبی، بزرگترین مخزن ناشناخته از تنوع زیستی بر روی زمین است. حیات تمامی موجودات زنده در طبیعت به فعالیت میکروارگانیسم‌ها وابسته است و میکروارگانیسم‌ها تنوع زیستی بسیار گسترده‌ای دارند. بطور مثال میکروارگانیسم‌های خاک برای چرخه مداوم مواد غذایی و حیات اکوسیستم‌های زنده ضروری بوده که نتیجه آن حفظ و بقا حیات در کره زمین است (Vibha and Neelam 2012).

میکروارگانیسم‌ها گستره بسیار متنوعی از موجودات زنده را تشکیل می‌دهند. گستردگی میکروارگانیسم‌ها از نظر تعداد، انواع موجود، گستردگی محیط‌های زیست و همین‌طور از نظر متابولیک بسیار بیشتر از سایر جانداران است، به همین دلیل بررسی تنوع و گوناگونی آن‌ها در دنیای جانداران از اهمیت بسیار بالایی برخوردار است (Nee 2004). برای تضمین تولید مواد غذایی و دارویی در آینده و توسعه کشاورزی و صنعت، حفظ ذخایر توارثی موجود در طبیعت بکر و دست نخورده، امری ضروری است. بی‌شک تاریخچه تکامل طولانی میکروارگانیسم‌ها و توانایی‌های متابولیکی گسترده شان و نقش مهمی که در چرخه عناصر، پالایش زیستی، تولید آنتی‌بیوتیک، تولید فراورده‌های تخمیری و خوراکی، همزیستی با گیاهان، بیابان زدایی و افزایش حاصلخیزی خاک و غیره ایفا می‌کنند، اصلی‌ترین دلایل اهمیت بررسی تنوع زیستی میکربی است (Truper 1992). از دست رفتن تنوع زیستی به عنوان مهمترین مشکلات قرن به دو دلیل رشد اقتصادی و گسترش سریع جمعیت از دو میلیارد نفر در سال ۱۹۰۰ به بیش از ۷ میلیارد نفر مورد توجه است که سبب ویرانی اکوسیستم طبیعی سیاره زمین شده است (Helm and Hepburn 2012).

با توجه به تنوع محیط‌های طبیعی و توان میکروارگانیسم‌ها در زمینه‌های دارویی، زیست فن‌آوری صنعتی، شیمیایی می‌توان با تحقیقات در این زمینه به داروها، فرایندها و مواد شیمیایی جدید دست یافت (Philippot et al. 2013).

اکثر باکتری‌ها و آرکی‌ها غیرقابل کشت هستند و تنوع زیستی آنها را نمی‌توان با روش‌های استاندارد کشت تخمین زد به علاوه موجودات مهم کلیدی یک اکوسیستم نیز ممکن است در صورت غیرقابل کشت بودن نادیده گرفته شوند. با وجود توسعه روش-

جدول ۱- مشخصات نمونه‌های مناطق مختلف نمونه‌برداری

نوع نمونه				رنگ آب	دما (درجه سانتی‌گراد)	pH	شوری (درصد)	مختصات جغرافیایی	منطقه نمونه برداری
آب	نمک	خاک	لجن						
×	×	×	×	آبی	۲۷	۷/۴۱	۲۵/۲۴	N:37.59.7.87 E:45.4.5.87	باری
		×	×	آبی	۲۸	۷/۴۱	۲۸/۴	N:37.32.23.45 E:45.26.25.11	گل‌مانخانه
×	×	×	×	آبی	۲۸	۷/۲	۲۸/۱۶	N:37.35.33.45 E:45.16.35.11	چی چست
	×	×	×	آبی	۲۷	۷/۱	۲۶/۸	N:37.35.21.4 H:45.14.12.3	کاظم داشی
	×		×	آبی	۲۶	۷/۳	۲۵/۱۳	N:37.30.20.1 H:45.47.19.3	رحمانلو
			×	آبی	۲۷	۷/۴	۲۷/۴۹	N:37.21.12.3 H:45.56.54.3	پل شهید کلانتری - ضلع شرقی
			×	آبی	۲۶	۷/۴	۲۶/۸	N:37.23.13.4 H:45.52.51.4	پل شهید کلانتری - ضلع غربی
	×	×	×	آبی	۲۷	۷/۳	۲۵/۲۲	N:37.20.11.2 H:45.57.58.2	رشکان
×	×	×	×	قرمز	۲۷	۷/۵	۲۷/۴۹	N:38.05.30.3 H:45.35.10.7	روستای گمیچی
			×	آبی	۲۶	۷/۲۸	۲۴/۱۵	N:37.46.52.8 H:45.25.35.6	وسط دریاچه (اطراف جزیره اسلامی(شاهی)

خاک یا آب اضافه شد تا مجدداً خصوصیات گل اشباع ایجاد شود باید توجه داشت که تمام منافذ و فضاهای خاک با آب پر شده و روی سطح گل، آب جمع نشده باشد. گل را از روی کاغذ صافی به کمک پمپ خلا عبور داده تا حدی که گل خشک شده و روی گل ترک ایجاد شود. فیلتر کردن تا زمان ایجاد ترک روی گل متوقف شد. در صورت کدر بودن مایع صاف شده توسط صافی، دوباره فیلتر شد. در همان ۵ دقیقه اول میزان CO_3^{2-} و HCO_3^- سنجیده و فاز آبی گل اشباع با ایجاد خلا جدا شد و از آن برای تعیین غلظت عناصر محلول، شوری و pH استفاده شد (Zhang et al. 2005). میزان شوری نمونه‌ها با استفاده از دستگاه مالتی‌متر شرکت Mettler Toledo مدل Multiseven محاسبه و سپس میزان عناصر سدیم، کالر، آهن، پتاسیم، منیزیم، کلسیم، کربنات و سولفات تشکیل دهنده نمونه‌ها در آزمایشگاه دانشکده زمین‌شناسی دانشگاه تهران اندازه‌گیری شد. یون کلر با تیتراسیون با نیترات نقره بر طبق روش Mohr در سال ۱۹۲۴ اندازه‌گیری شد (Doughty 1924). یون منیزیم با اسپکتروفتومتری جذب اتمی و یون سدیم با اسپکتروفتومتری نشر شعله‌ای و یون کلسیم با روش

های پلاستیکی ریخته شدند و دمای نمونه‌ها با دماسنج در محل، اندازه‌گیری و ثبت شد. انتخاب این مناطق براساس نقاط قابل نمونه‌برداری و ویژگی‌های ظاهری هر منطقه از دریاچه بود. نمونه‌ها در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و در طی یک روز به آزمایشگاه منتقل شدند. نمونه‌ها پس از انتقال به آزمایشگاه به ۴ دسته آب، خاک، لجن و نمک دسته‌بندی شدند. ۲۰۰ گرم از هر یک از نمونه‌های خاک، لجن و نمک به منظور تهیه نمونه شاخص با هم مخلوط شد و همچنین از هر یک از نمونه آب نیز ۲۰۰ میلی‌لیتر با هم مخلوط و نمونه شاخص تهیه شد. از نمونه‌های شاخص لجن و خاک برای محاسبه شوری، pH و ترکیبات شیمیایی بر طبق روش استاندارد (Rhoades 1982) گل اشباع تهیه شد. برای این منظور ابتدا خاک در معرض هوا کاملاً خشک و سپس کوبیده شد و بعد با الکی با منافذ 10 mesh ($< 2.0 \text{ mm}$) غربال شد. سپس به 5 ± 200 گرم از آن به آرامی آب دیونیزه استریل افزوده شد تا کاملاً یکنواخت شده و گل اشباع آماده شود. روی ظرف حاوی گل اشباع را پوشانده و بعد از ۴ ساعت خصوصیات گل اشباع بررسی شد و اگر لازم بود مجدداً به آن

درصد نمک شامل ترکیبات به میزان گرم بر لیتر yeast extract; (10); proteose peptone (5); glucose (1); NaCl (100); $MgCl_2 \cdot H_2O$ (7); $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (9.6) $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (0.36); KCl (2); $NaHCO_3$ (0.06); NaBr (0.026); با Sea water Nutrient Agar (SWN) (Bowman et al. 2003) نمک سه درصد حاوی ترکیبات به میزان گرم بر لیتر NaCl (20); $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ (3); $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (5); $CaCl_2 \cdot 7H_2O$ (0.05); KCl (0.5); peptone (5); yeast extract (1); meat extract (2); با pH برابر ۷/۲ برای هر یک از محیط‌ها تلقیح شده و با استفاده از میله شیشه‌ای سرکیج در سطح پلیت پخش و تمامی محیط‌های MH و SWN تلقیح شده در دمای ۳۴ درجه سانتی‌گراد و محیط MGM در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد گرم‌گذاری شدند. کلنی‌های رشد کرده روی محیط‌های جامد MH و SWN در دوره‌های زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت جداسازی و خالص‌سازی شدند و به مدت ۶ ماه پلیت‌ها نگهداری شده و در بازه زمانی دو هفته‌ای بررسی و کلنی‌های جدید جداسازی شدند. کلنی‌های رشد کرده روی محیط MGM پس از گذشت حداقل هشت هفته بررسی و ضمن شمارش تعداد کلنی‌ها، هر کدام از جدایه‌های بدست آمده در محیط‌هایی که از آنها جدا سازی شده بودند مجدداً کشت داده شدند. به منظور دسترسی به بیشترین میزان جداسازی، پلیت‌ها نگهداری شده و در بازه‌های زمانی چهار هفته‌ای مورد بررسی قرار گرفته و کلنی‌های رشد کرده جدید جداسازی شدند. در هر مرحله کلنی‌های دارای مشخصات ریخت‌شناسی (شکل، اندازه، رنگ، قوام، حاشیه و برآمدگی سطحی) متفاوت جداسازی شدند. کشت متوالی برای اطمینان از خالص بودن جدایه‌ها انجام شد. به منظور جداسازی کلنی‌های کند رشد تا شش ماه پس از گرم‌گذاری روی محیط‌های جامد مشابه جداسازی و خالص‌سازی ادامه یافت و پس از رشد و ظاهر شدن کلنی، حتی المقدور از تک کلنی‌ها کشت خالص به عمل آمد (Caton et al. 2004). برای تایید خالص بودن کلنی‌ها رنگ‌آمیزی گرم بر اساس روش Hucker انجام شد (Gerhardt and Murray 1994). جدایه‌های خالص‌سازی شده بر اساس محل نمونه‌برداری نام‌گذاری شده و با تهیه دو پلیت ذخیره برای هر سویه با استفاده از کشت تک کلنی بر روی پلیت شش سانتی‌متری در سردخانه با دمای چهار درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. به منظور جلوگیری از خشک شدن،

کمپلکس‌متری اندازه‌گیری شدند (Sheen and Kahler 1938). مشخصات جغرافیایی محل نمونه‌برداری، pH و میزان شوری نمونه‌های جمع‌آوری شده از مناطق مختلف دریاچه در جدول ۱ آورده شده است. جدول ۲ میزان شوری و pH نمونه‌های شاخص را نشان می‌دهد که شوری نمونه‌های شاخص از ۱۴ درصد تا اشباع نمک بود و میزان pH بین ۶/۷۷-۷/۳۷ بود. جدول ۳ ترکیب و نوع یون‌های موجود در هر یک از نمونه‌های شاخص تهیه شده از نمونه‌های آب، خاک، رسوب و نمک را نشان می‌دهد و یون‌های سدیم و کلر به ترتیب بیشترین میزان کاتیون و آنیون را در ترکیب هر یک از نمونه‌های شاخص تهیه شده به خود اختصاص دادند که نشان‌دهنده ماهیت تالازوهالین این دریاچه است.

جدول ۲- مشخصات نمونه‌های شاخص

نوع نمونه	درصد شوری	pH
آب	۲۸/۰۸	۷/۲۰
خاک	۱۴/۰۰	۶/۷۷
لجن	۳۲/۳۹	۷/۳۱
نمک	۹۶/۸۰	۷/۳۷

کشت، جداسازی و خالص‌سازی میکروارگانیسم‌ها برای دستیابی به تنوع کاملی از میکروارگانیسم‌های هتروتروف هوازی از محیط کشت‌های متنوعی استفاده شد. با توجه به شرایط اقلیمی دریاچه و همچنین نیازمندی‌های متنوع میکروارگانیسم‌ها، محیط کشت‌های MH، SWN و MGM با اسیدیته خنثی انتخاب شدند. تلقیح نمونه‌های خاک، رسوب و نمک با استفاده از روش رقت‌های متوالی تا رقت 10^{-10} بر روی محیط‌های مورد استفاده برای جداسازی انجام شد. برای تلقیح نمونه‌های آب، از رسوب حاصل از سانتریفوژ آب برای تلقیح مستقیم به محیط کشت استفاده شد. از هر کدام از رقت‌های حاصل مقدار ۱۰۰ میکرولیتر به محیط کشت‌های (Dyall-Smith 2008) Medium (MGM) Modified Growth با ۲۳ درصد نمک شامل ترکیبات به میزان گرم بر لیتر; $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ (26.9); $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (184.8); NaCl (23.1); KCl (5.4); $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (0.8); peptone (10.0); yeast extract (2.0); agar (15.0); (Caton et al. 2004; محیط و moderate halophilic medium (MH) (Vreeland 2013) با ۱۲

جدول ۳ - ترکیب و نوع یون‌های موجود در نمونه‌های شاخص دریاچه

نوع یون	نمونه			
	نمک (میلی گرم در لیتر)	آب (میلی گرم در لیتر)	لجن (میلی گرم در لیتر)	خاک (میلی گرم در لیتر)
Fe ²⁺	۰/۰۳۷	۱/۴۲۵	۰/۶	۱۴/۸
Na ⁺	۵۴۰۰۰	۴۲۰۰۰	۱۰۰۰۰۰	۶۰۵۰۰
Cl ⁻	۱۱۹۸۱۲۵۰	۱۵۶۲۰۰	۳۳۳۷۰۰۰	۱۸۶۳۷۵۰
K ⁺	۱۵۰۰	۱۸۰۰	۸۰۰۰	۱۵۰۰
Mg ²⁺	۸۱۰۰۰	۱۵۴۶۷	۱۴۰۰۰	۹۵۰
Ca ²⁺	۲۵۷۵۰	۸۰۰	۵۵۰	۱۲۰۰
HCO ³⁻	۷۲۲۰۰	۱۳۴۲۰۰	۳۶۶۰۰۰	۹۷۶۰۰۰
SO ₄ ²⁻	۱۶۵۰۰	۴۲۲۴	۲۴۰۰۰۰	۴۰۸۰

توده زیستی تهیه شده از سویه‌های منتخب در بافر TE حل شده و به آن لیزوزیم (۱۰ میلی گرم در میلی لیتر) اضافه شد و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شد. سپس به آن SDS، پروتئیناز K و RNase افزوده و چند بار به آرامی معکوس شد سپس به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی-گراد قرار داده شد. بعد از طی این دوره محلول کلرید سدیم ۵ مولار افزوده پس از چند بار معکوس کردن در بن ماری ۶۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه قرار داده شد. در مرحله بعد با استفاده فنل-کلروفرم-ایزوامیل الکل خالص‌سازی انجام شد سپس DNA با استفاده از ایزوپروپانول رسوب داده شد و رسوب با الکل ۹۶ درصد و ۷۰ درصد شسته شد. رسوب نهایی در دمای اتاق خشک شده و در نهایت در ۵۰ μ l بافر TE حل شد. DNA استخراج شده برای نگهداری به فریزر -۲۰- درجه سانتی‌گراد منتقل شد. سپس تکثیر قطعه‌ای از 16S rDNA با استفاده از آغازگرهای عمومی شامل توالی‌های 5'-21f (Turner et al. 1999) و 3'-TTCCGGTTGATCCYGCCGGA (Cytryn et al. 2000) (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') (Turner et al. 1999) انجام گرفت. استخراج DNA ژنومی و تکثیر قطعه‌ای از 16S rDNA (۱۵۰۰ bp) با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز تایید شدند. محصول واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمرز تعیین ترادف شده و نتایج حاصل از آن برای تجزیه و تحلیل‌های فیلوژنتیک مورد استفاده قرار گرفتند. به منظور تکثیر قطعه‌ای از 16S rDNA با

پلیت‌ها با پارافیلیم بسته شدند. بررسی خصوصیات فنوتیپی و بیوشیمیایی تمام سویه‌ها با استفاده از روش (Krieg and Simbert 1994) انجام شد.

تفکیک سویه‌های نمک دوست نسبی و تحمل‌کننده نمک و تعیین محدوده نمک رشد سویه‌های منتخب

برای تفکیک سویه‌ها از نظر تعلق به گروه‌های نمک دوست نسبی یا تحمل‌کننده نمک از محیطی با کمترین میزان ماده آلی که تامین‌کننده رشد سویه‌ها باشد استفاده شد. ترکیب محیط کشت شامل ۵ گرم در لیتر عصاره مخمر است که میزان pH این محیط با استفاده از HCl و NaOH دو مولار در مقدار ۷/۲ تنظیم شد. سویه‌هایی که علاوه بر توانایی رشد در محیط فاقد نمک دارای رشد بهینه در کمتر از سه درصد نمک (معادل غلظت نمک دریا) بودند، به عنوان سویه‌های تحمل‌کننده نمک و آن دسته که بهینه رشد در بالای سه درصد نمک داشتند و قادر به رشد در محیط فاقد نمک نبودند به عنوان نمک دوست در نظر گرفته شدند و محدوده رشد نمک در این باکتری‌ها تعیین شد.

شناسایی ملکولی و آنالیز فیلوژنتیکی سویه‌های منتخب شناسایی تکمیلی سویه‌های منتخب با تکثیر و تعیین توالی قطعه-ای از 16S rDNA انجام گرفت. بدین منظور ابتدا DNA ژنومی سویه‌های منتخب به روش (Marmur 1961) به این شرح استخراج شد.

توصیف اولیه سویه‌ها
توصیف اولیه سویه‌ها بر اساس تعیین صفات اولیه ماکروسکوپی، میکروسکوپی و فیزیولوژیک انجام شد. برای مشاهده ویژگی‌های ماکروسکوپی کلنی، از محیط جامد با ترکیب مورد استفاده برای جداسازی استفاده شد و شکل، ارتفاع، حاشیه، سطح و رنگ کلنی سویه‌ها مورد توجه قرار گرفت. شکل میکروسکوپی سویه‌ها توسط میکروسکوپ نوری و بزرگنمایی ۱۰۰۰ مشاهده شد. برای تایید نتایج حاصل از رنگ‌آمیزی گرم از روش KOH سه درصد توصیه شده توسط Baron and Finegold (1990) استفاده شد. 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 به عنوان معرف استفاده شده و تولید حباب به عنوان واکنش مثبت در نظر گرفته شد. برای بررسی فعالیت اکسیدازی از دیسک‌های آماده اکسیداز (شرکت پادتن طب) استفاده شد (Murray et al. 1994). به صورت تصادفی ۳۶ جدایه^۱ برای شناسایی تکمیلی از نظر خصوصیات ظاهری و ریخت‌شناسی کلنی انتخاب شدند.

نتایج و بحث

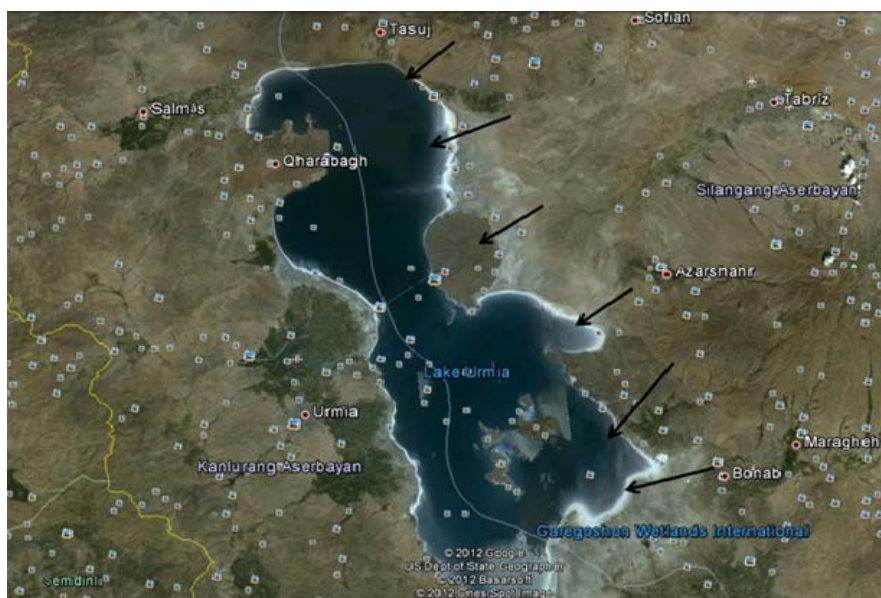
تصویر دریاچه و موقعیت جغرافیایی مناطق نمونه برداری بر روی نقشه در شکل ۱ نمایش داده شده است
بر اساس تفاوت در ویژگی‌های اولیه از قبیل تفاوت در ویژگی‌های کلنی و رشد، تعداد ۲۲۸ سویه از نمونه‌ها و محیط‌های مختلف، بدست آمد. تعداد جدایه‌های اولیه از نمونه‌های شاخص آب ۷۰، خاک ۹۱، رسوب ۴۸ و نمک ۱۹ جدایه بودند. بر این اساس خاک بیشترین جدایه و نمک کمترین جدایه را در بین نمونه‌ها به خود اختصاص داد. در شکل ۲ میزان اولیه جدایه‌ها به تفکیک ریخت‌شناسی (کوکوس، باسیل و پلی مورف) آورده شده است. در بین ۲۲۸ جدایه، تعداد ۱۱۰ سویه نمک دوست و ۱۱۸ سویه تحمل کننده نمک بودند. تعداد کلنی‌های بدست آمده در روش کشت (شمارش زنده) در نمونه‌های شاخص تهیه شده آب،

استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با بافر با غلظت IX 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* پلی مرز به میزان 1 U و آغازگرهای عمومی رفت و برگشت از هر کدام به میزان ۰/۵ تا ۰/۴ میلی‌مول و DNA الگو به میزان مناسب استفاده شد. برای حصول اطمینان از عدم آلودگی مواد مورد استفاده در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز شاهد منفی با افزودن آب به جای DNA الگو در ویال حاوی مخلوط واکنش به کار رفت. برای انجام واکنش زنجیره‌ای پلی مرز از واسرشت اولیه با دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه و ۳۰ چرخه تکرار شونده شامل واسرشت با دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه و اتصال با دمای ۵۶ تا ۵۹ سانتی‌گراد به مدت ۵۰ تا ۶۰ ثانیه و سنتز با دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه و پس از اتمام ۳۰ چرخه برای سنتز نهایی با دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای مدت ۷ دقیقه در نظر گرفته شد. محصول نهایی حاصل از واکنش زنجیره‌ای پلی مرز توسط روش ختم سنتز DNA به شکل رفت و برگشت تعیین ترادف شد (شرکت ماکروژن کره جنوبی).

نتایج حاصل از تعیین توالی با استفاده از نرم‌افزار Chromas pro ویرایش شده و با استفاده از نرم افزار BLAST با توالی‌های معتبر ثبت شده در پایگاه Eztaxon (<http://eztaxon-e.ezbiocloud.net/>) (Kim et al. 2012) و مقایسه با نزدیک‌ترین سویه از نظر توالی 16S rDNA مشخص شد. تحلیل فیلوژنتیک سویه‌ها پس از یافتن توالی‌های مشابه و همراستاسازی توالی‌ها، ویرایش و رسم درخت فیلوژنتیک با استفاده از نرم‌افزارهای (Larkin et al. 2007) MEGA (Tamura et al. و BioEdit (Hall 1999) Clustal X2 (2011) (ویرایش پنجم) و با الگوریتم Neighbour-joining رسم شد. بررسی شاخه‌های درخت با استفاده از الگوریتم analysis Bootstrap با ۱۰۰۰ بار نمونه‌گیری انجام شد (Felsenstein 1985).

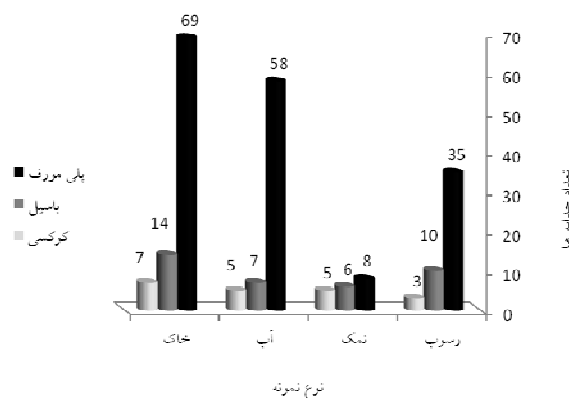
توالی‌های حاصل از این پژوهش در بانک ژنی NCBI ثبت شدند و Accetion Number متعلق به این توالی‌ها در بانک ژنی KJ634427-KJ634462 می‌باشد.

¹ Isolated

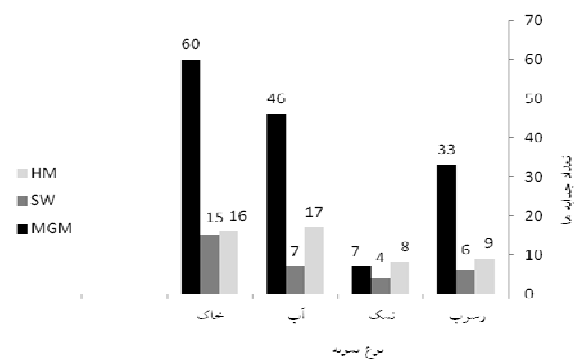


شکل ۱- نقشه مناطق جغرافیایی نمونه برداری در نقشه Google Map در آدرس اینترنتی <http://earth.google.com> که محل‌های نمونه‌برداری با فلش علامت‌گذاری شده است.

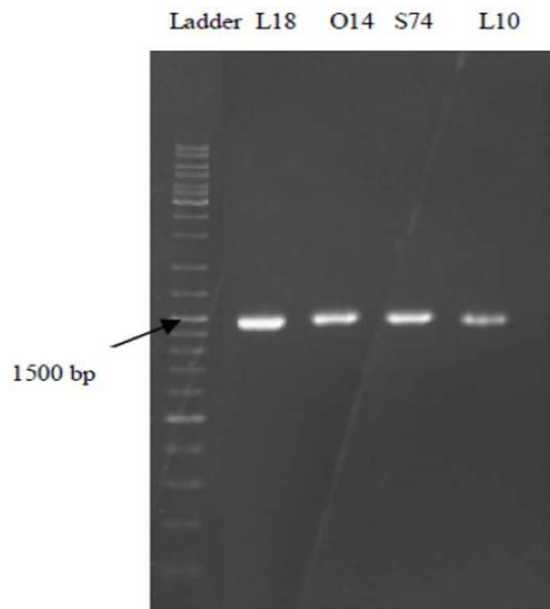
خاک، نمک و رسوب در محیط‌های مختلف در جدول ۴ آمده است. طبق این نتایج تعداد سویه‌ها از محیط MGM ۱۰ برابر بیشتر از دو محیط MH و SWN بود. شکل ۳ تعداد اولیه سویه‌ها به تفکیک محیط مورد استفاده برای جداسازی آورده شده است. در نمونه‌های آب و خاک شاخص بیشترین جدایه‌ها در محیط MGM جداسازی شدند. محیط‌های SWN و HM کمترین میزان جدایه‌های اولیه را به ترتیب به خود اختصاص دادند. شناسایی مولکولی سویه‌های منتخب مطابق روش توضیح داده شده انجام شد. DNA های ژنومی استخراج شده با الکتروفورز ارزیابی شدند. شکل ۴ ژل استخراج DNA ژنومی سویه‌های منتخب را نشان می‌دهد. توالی 16S rDNA سویه‌های منتخب آرکی و باکتری با استفاده از آغازگرهای عمومی مناسب (21F و 1492R مخصوص آرکی؛ 27F و 1492R مخصوص باکتری) تکثیر شدند. شکل ۵ تصویر ژل تکثیر قطعه‌ای از 16S rDNA سویه‌های منتخب را نشان می‌دهد. 16S rDNA پروکاریوتی حدود 1500 bp طول دارد.



شکل ۲- فراوانی تعداد جدایه‌های اولیه از نمونه‌های شاخص آب، خاک، نمک و رسوب به تفکیک ریخت‌شناسی

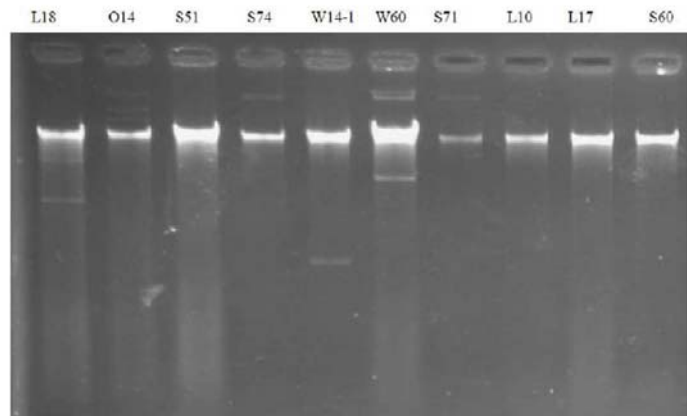


شکل ۳- نمودار تفکیک تعداد جدایه‌های اولیه از نمونه‌های شاخص آب، خاک، رسوب و نمک با استفاده از محیط کشت‌های مختلف



شکل ۵- تصویر ژل محصول PCR قطعه‌ای از 16S rDNA تکثیر شده در چند سویه‌های منتخب با آغازگرهای عمومی که اسامی آن در شکل مشخص شده است.

محیط‌های پرشور در گروه محیط‌های سخت طبقه‌بندی می‌شوند که علاوه بر شوری بالا محدودیت‌های دیگری نیز برای رشد موجودات دارند. این محدودیت‌ها شامل دما، pH، فشار، اکسیژن، دسترسی به منابع غذایی و تشعشعات نوری است. محیط‌های پر شور به دو بخش خاک‌ها و آب‌های پر شور تقسیم می‌شوند. آب‌های شور به محیط‌هایی اطلاق می‌شود که غلظت نمک بالاتری نسبت به دریا دارند. در مورد خاک‌های شور تعریف دقیقی ارائه نشده است. اما به‌طور معمول خاک‌هایی که بیش از ۰/۲ درصد وزن به حجم نمک محلول دارند را به عنوان خاک پرشور در نظر می‌گیرند (Rodriguez-valera 1998). این مناطق بر اساس نوع و منشأ نمک موجود (تالازوهالین-آتالازوهالین) و ناحیه قرار گرفتن (درون سرزمینی-ساحل دریا) تقسیم‌بندی می‌شوند (Oren 2004). در دهه گذشته ویژگی‌های جذاب فیزیولوژیکی آن‌ها باعث توجه فراوان به این مناطق شده است. ویژگی شاخص میکروارگانیسم‌های ساکن این مناطق توانایی زندگی در شرایط سخت است، به همین دلیل آن‌ها منابع جذابی برای آنزیم‌های پایدار در شرایط حاد هستند. با توجه به پایداری ویژه آنزیم‌های آرکیایی (ساکنین اصلی این مناطق) در دما، فشار، pH و شوری افراطی و هم‌چنین



شکل ۴- تصویر ژل باندهای حاصل از استخراج DNA ژنومی چند سویه که اسامی آن در شکل مشخص شده است.

جدول ۴- فراوانی تعداد کلنی‌های بدست آمده از نمونه‌های شاخص (CFU/ml)

نمونه	محیط کشت		
	MH	SW	MGM
خاک	6×10^5	$5/6 \times 10^5$	$6/5 \times 10^6$
آب	$2/7 \times 10^4$	$3/2 \times 10^4$	$3/2 \times 10^5$
نمک	$1/4 \times 10^2$	$9/1 \times 10^3$	$2/2 \times 10^5$
لجن	$2/5 \times 10^4$	$2/6 \times 10^4$	$6/6 \times 10^6$

نتایج حاصل از مقایسه میزان شباهت توالی قطعه‌ای از 16S rDNA سویه‌های منتخب با سویه‌های استاندارد ثبت شده در پایگاه داده Eztaxon در جدول ۵ آورده شده است. بیشترین شباهت، صددرصد و کمترین ۹۶/۵ درصد در میان سویه‌ها مشاهده شد. برای سویه‌های ترادف‌یابی شده پس از هم راستا کردن ترادف‌ها با ترادف گونه‌های نزدیک، درخت فیلوژنتیک با الگوریتم Maximum Parsimony، Maximum Likelihood و Neighbor-Joining رسم شد (Tamura and Dudley 2007).

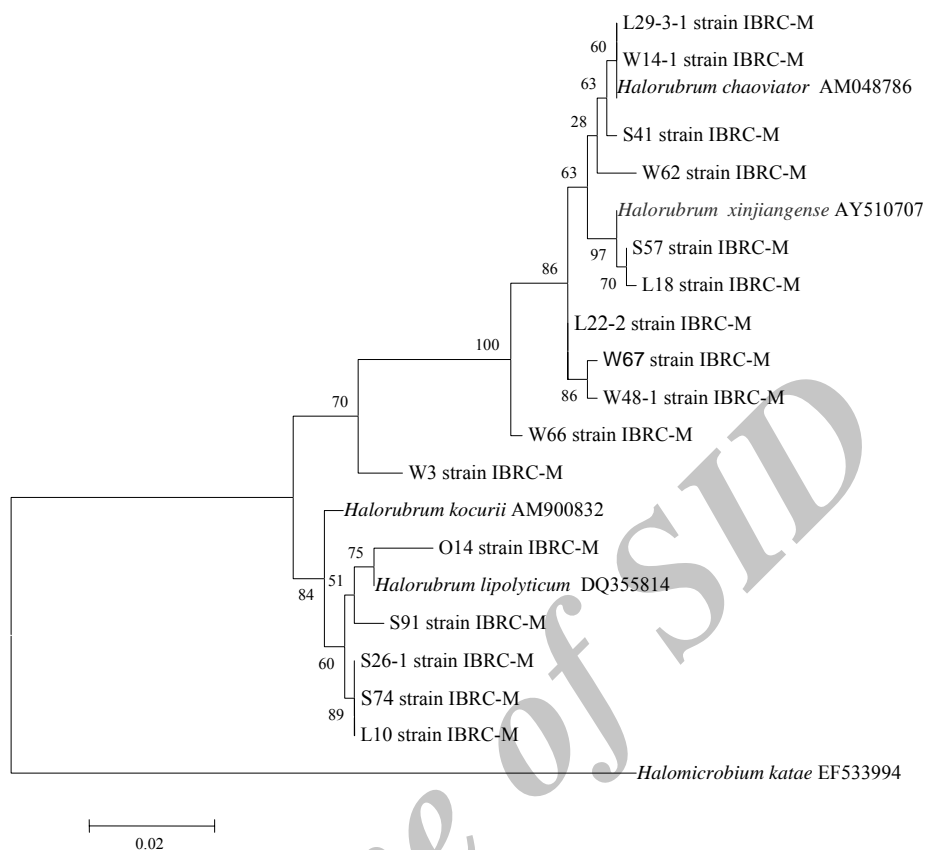
در مقایسه درخت‌های رسم شده، محل قرارگیری زیرشاخه‌ها و شاخه‌ها در هر سه روش با یکدیگر هم‌خوانی داشت. درخت فیلوژنتیک سویه‌هایی که با جنس آرکی *Haloarubrum*، *Haloterrigena* و *Haloarcula* قرابت داشتند، در شکل ۷، ۶ و ۸ نشان داده شده است. شکل ۹ نیز درخت فیلوژنتیک باکتری‌های ترادف‌یابی شده جنس *Pseudomonas* و *Salicola* نشان داده شده است.

جدول ۵- مقایسه میزان شباهت قطعه‌ای از 16S rDNA سویه‌های منتخب با سویه‌های استاندارد در پایگاه داده Eztaxon

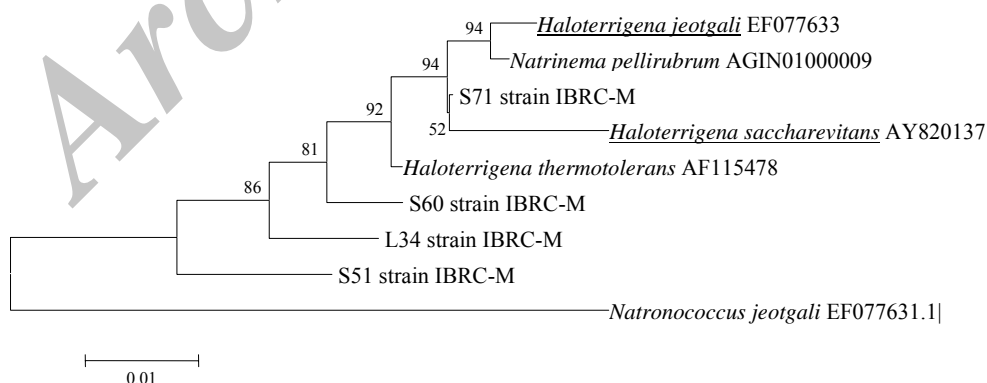
Accetion Number	طول ترادف	درصد شباهت	سویه استاندارد با بیشترین میزان شباهت	کد سویه منتخب
KJ634458	778	97.8	<i>Halorubrum lipolyticum</i> 9-3(T)DG355814	O14
KJ634439	751	99.6	<i>Halorubrum xinjiangense</i> AY510707 BD-1(T)	L18
KJ634442	759	99.3	<i>Haloarcula amylolytica</i> DQ854818 BD-3(T)	L33-2
KJ634444	756	96.5	<i>Haloterrigena thermotolerans</i> AF115478 PR 5(T)	S51
KJ634443	786	99.4	<i>Haloarcula amylolytica</i> DQ854818 BD-3(T)	S67-1
KJ634441	750	98.9	<i>Halorubrum lipolyticum</i> DQ355814 9-3(T)	S74
KJ634440	750	99.2	<i>Haloarcula amylolytica</i> DQ854818 BD-3(T)	W5-1
KJ634454	820	100	<i>Halorubrum chaoviator</i> AM048786	W14-1
KJ634460	770	99.5	<i>Haloarcula marismortui</i> AY596298	W20-1
KJ634455	761	98.8	<i>Halorubrum xinjiangense</i> AY510707	W48-1
KJ634438	752	99.3	<i>Haloarcula amylolytica</i> DQ826513	W60
KJ634437	762	99.0	<i>Haloterrigena jeotgali</i> EF077633	S71
KJ634436	771	98.7	<i>Halorubrum lipolyticum</i> 9-3(T) DQ355814	L10
KJ634462	784	98.8	<i>Haloarcula marismortui</i> (ex Volcani) JCM9737(T)	L17
KJ634434	756	99.7	<i>Halorubrum xinjiangense</i> AY510707	S57
KJ634433	777	98.8	<i>Haloterrigena thermotolerans</i> AF115478	S60
KJ634432	781	98.6	<i>Halorubrum lipolyticum</i> DQ355814	S91
KJ634431	751	99.3	<i>Haloarcula amylolytica</i> DQ854818	W7
KJ634429	858	97.8	<i>Halorubrum kocurii</i> AM900832	W3
KJ634451	750	99.3	<i>Halorubrum chaoviator</i> AM048786	L22-2
KJ634448	774	100.0	<i>Halorubrum chaoviator</i> AM048786	L29-3-1
KJ634449	750	99.2	<i>Halorubrum chaoviator</i> AM048786	W62
KJ634450	750	98.9	<i>Halorubrum lipolyticum</i> DQ355814	S26-1
KJ634457	750	99.5	<i>Haloarcula amylolytica</i> DQ826513	S35
KJ634428	753	99.6	<i>Haloarcula amylolytica</i> DQ826513	W53-2
KJ634459	776	98.3	<i>Halorubrum chaoviator</i> AM048786	W67
KJ634445	749	99.6	<i>Haloarcula marismortui</i> AY596298	W19
KJ634446	763	99.3	<i>Haloarcula amylolytica</i> DQ854818	W13-2
KJ634461	756	99.3	<i>Haloarcula marismortui</i> AY596298	W2-1
KJ634435	750	98.0	<i>Haloterrigena thermotolerans</i> AF115478	L34
KJ634453	700	99.6	<i>Haloarcula amylolytica</i> DQ826513	S34
KJ634452	674	99.4	<i>Halorubrum chaoviator</i> AM048786	S41
KJ634427	681	97.3	<i>Halorubrum chaoviator</i> AM048786	W66
KJ634430	739	99.2	<i>Haloarcula amylolytica</i> DQ826513	W22
KJ634456	777	99.7	<i>Pseudomonas stutzeri</i> CP002881 ATCC 17588(T)	O16
KJ634447	749	99.8	<i>Salicola salis</i> DQ129689	L6

بارش این میزان به تقریباً ۲۸ درصد می‌رسد که این تغییر میزان نمک در فصول مختلف بر تنوع پروکاریوت‌های نمک دوست موثر است. نتایج این تحقیق که در فصل پر بارش انجام گرفت با نتایج حاصل از بررسی سواحل غربی توسط Amoozgar et al. (2008) در فصل کم بارش متفاوت بوده است. در کل این دریاچه با شوری بالا محیط بسیار مناسبی برای میکروارگانیسم‌های نمک‌دوست به عنوان گروه‌های هدف این پژوهش بود. این زیست‌گاه با توجه به محیط زیست منحصر به فرد از جمله سرمایه‌های طبیعی جهانی به شمار می‌رود و سلامت آن نقش مهمی در زندگی سایر موجودات زنده نواحی مجاور دارد.

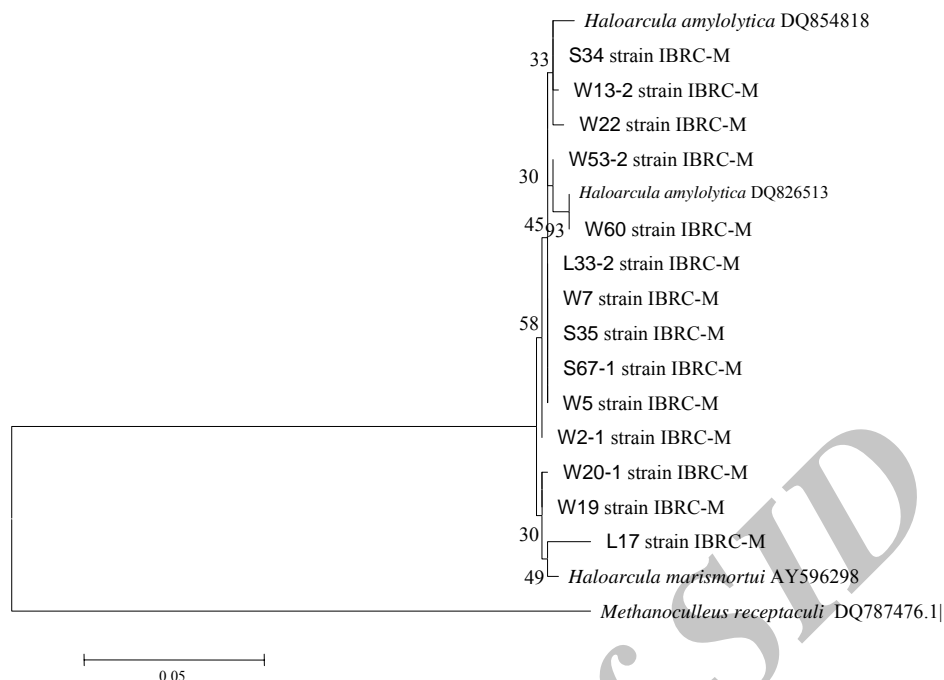
پایداری آنها در حضور حلال‌های آلی، دترجنت‌ها و فلزات سنگین، انتظار می‌رود ابزارهای قدرتمندی در تبدیلات زیستی در شرایط سخت باشند (Alquéres et al. 2007). تعداد زیادی دریاچه نمک در ایران وجود دارد. این دریاچه‌ها شامل انواع درون سرزمینی-ساحلی، دائمی-فصلی و با ترکیبات مختلف نمک می-باشند. در این پژوهش تنوع زیستی سواحل شرقی و غربی دریاچه ارومیه با استفاده از روش کشت مورد بررسی قرار گرفت. دریاچه ارومیه واقع در شمال غربی ایران بزرگترین دریاچه داخلی است که در معرض خطر نابودی زیست‌بوم قرار دارد. محدوده درصد نمک در فصول پربارش سال ۲۲ درصد است و در فصول کم



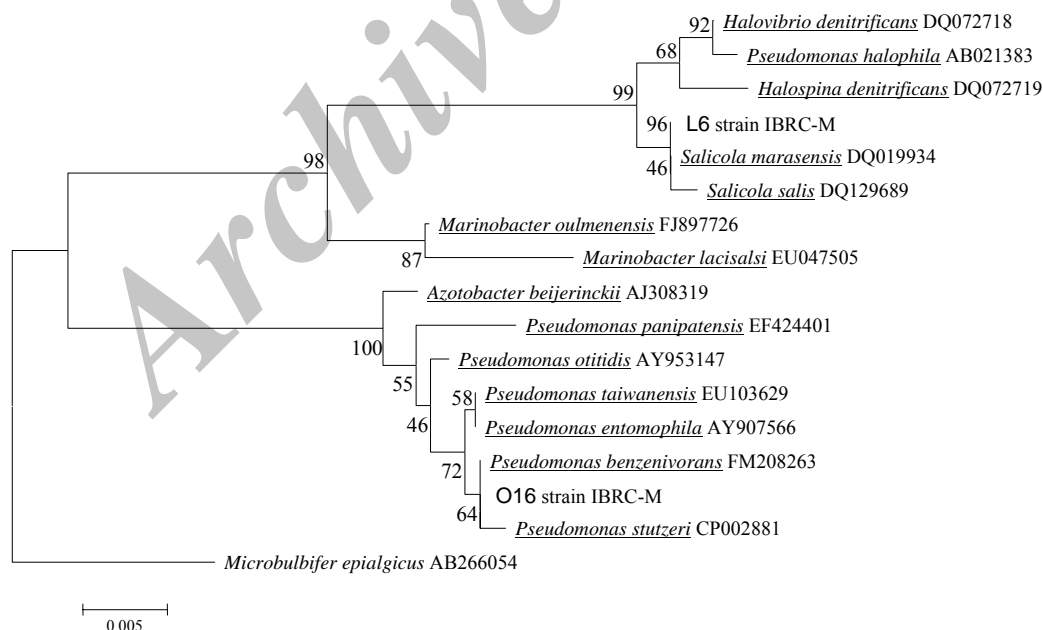
شکل ۶- درخت فیلوژنتیک جدایه‌های جنس *Halorubrum* برای نمایش روابط فیلوژنتیک سویه‌های جداسازی شده با استفاده از روش Neighbor-joining و اعداد ذکر شده در محل انشعاب نشانگر درصد نمونه‌گیری Bootstrap از ۱۰۰۰ نمونه است. سویه *Halomicrobium katae* EF533994 به عنوان outgroup قرار داده شده است.



شکل ۷- درخت فیلوژنتیک جدایه‌های جنس *Haloterrigena* برای نمایش روابط فیلوژنتیک سویه‌های جداسازی شده با استفاده از روش Neighbor-joining و اعداد ذکر شده در محل انشعاب نشانگر درصد نمونه‌گیری Bootstrap از ۱۰۰۰ نمونه است. سویه *Natronococcus jeotgali* EF077631.1 به عنوان outgroup قرار داده شده است.



شکل ۸- درخت فیلوژنتیک جدایه‌های جنس *Haloarcula* برای نمایش روابط فیلوژنتیک سویه‌های جداسازی شده با استفاده از روش Neighbor-joining و اعداد ذکر شده در محل انشعاب نشانگر درصد نمونه‌گیری Bootstrap از ۱۰۰۰ نمونه است. سویه | *Methanoculleus receptaculi* DQ787476.1 به عنوان outgroup قرار داده شده است.



شکل ۹- درخت فیلوژنتیک جدایه‌های باکتری برای نمایش روابط فیلوژنتیک سویه‌های جداسازی شده با استفاده از روش Neighbor-joining و اعداد ذکر شده در محل انشعاب نشانگر درصد نمونه‌گیری Bootstrap از ۱۰۰۰ نمونه است. سویه *Microbulbifer epialgicus* AB266054 به عنوان outgroup قرار داده شده است.

از بین ۲۲۸ سویه، ۳۶ سویه بدون در نظر گرفتن محیط و نوع نمونه برای آنالیزهای فیلوژنتیک انتخاب شدند که نتایج تجزیه سویه‌های منتخب از نظر میزان شباهت در توالی 16S rDNA با سویه‌های استاندارد ثبت شده در پایگاه داده Etaxon نشان داد که این سویه‌ها در جنس‌های *Haloterrigena* (۱۱/۱ درصد)، *Halorubrum* (۴۴/۴ درصد)، *Haloarcula* (۳۸/۸ درصد)، *Pseudomonas* (۲/۷ درصد) و *Salicola* (۲/۷ درصد) قرار گرفتند. *Salicola* اعضای جنس باکتری نمک دوست افراطی بدون رنگ دانه است. این باکتری اولین بار از دریاچه‌های نمک کم عمق در الجزایر جدا شده است (Kharroub et al. 2006). در حالی که *Pseudomonas* باکتری نمک دوست افراطی نیست. در قلمرو آرکی‌ها بیشتر سویه‌های شناخته شده متعلق به اعضای جنس‌های *Halorubrum* و *Haloarcula* بودند که در مطالعه حاضر نیز فراوان‌ترین سویه‌های جدا شده از دریاچه بودند. این آرکی‌های نمک‌دوست افراطی در راسته *Halobacteriales* و شاخه‌ی *Euryarchaeota* قرار دارند (Caton et al. 2004). اولین سویه‌ی جنس *Haloterrigena* از خاک‌های نمکی جدا شده است (Ventosa et al. 1999) و هیچ کدام از سویه‌ها با شباهت به این جنس از آب جدا نشده‌اند. در این پژوهش نیز *Haloterrigena* از خاک و لجن جداسازی شد. نتایج مشابهی از دیگر مناطق پر شور دنیا گزارش شده است به این ترتیب که *Halorubrum*، *Haloarcula* و *Halobacterium* گروه‌های اصلی جدا شده از دریاچه نمک Tuz در ترکیه بوده‌اند (Birbir et al. 2007). اعضای جنس *Haloarcula* ۵۰ درصد جدایه‌های بدست آمده از دریاچه Maras در پرو را تشکیل داده‌اند (Matturano et al., 2008). در حوضچه‌های نمکی استرالیا بیش از ۷۰ درصد جدایه‌ها متعلق به جنس *Halorubrum* بوده است (Burns et al. 2004). بر طبق نظر Bardavid et al. (2008) تلقیح آب نمک دریاچه بر روی پلیت حاوی غلظت بالای نمک و غنی از مواد غذایی پیچیده موجب جداسازی سویه‌های متعلق به جنس‌های *Halorubrum*، *Haloarcula* و *Haloferax* می‌شود. این مطلب بیشتر بخاطر توانایی رشد آن‌ها در این شرایط بوده تا اینکه به واسطه فراوانی آن‌ها در محیط باشد.

با توجه به اهمیت حفظ ذخایر ژنتیکی ملی که با شرایط موجود زیست‌بوم احتمال نابودی بسیار بالایی دارند و خطر نابودی دریاچه ارومیه مطالعه تنوع زیستی این دریاچه ضروری به نظر می‌رسد. در کشت باکتری، با تلقیح مستقیم نمونه‌ها به محیط جامد از ایجاد رقابت میان باکتری‌ها جلوگیری به عمل می‌آید. براساس برخی روش‌های رایج معمولاً نمونه محیطی را ابتدا در کشت مایع غنی سازی کرده و سپس برای جداسازی سویه‌ها از هم به کشت جامد منتقل می‌کنند، در صورتی که این کار باعث بر هم خوردن ترکیب واقعی جمعیت می‌شود. در نهایت دوره گرماگذاری طولانی امکان ایجاد کلنی برای انواع کند رشد احتمالی را فراهم آورده است. درصد جدایه‌ها از هر نمونه شامل ۴۱/۳۶ درصد از خاک و از آب ۲۸/۶۳ درصد و از نمک ۸/۱۸ درصد و از لجن ۲۱/۸۱ درصد بود. بیشترین جدایه‌ها مربوط به نمونه‌های خاک بودند زیرا خاک دارای ویژگی ذاتی ناهمگونی مکانی است که موجب به وجود آمدن ریز زیستگاه‌های مختلفی می‌شود که دارای شرایط فیزیکی، شیمیایی و زیستی متفاوت هستند و احتمال جداسازی میکروارگانیسم‌های فراوان‌تر را امکان‌پذیر می‌کند. از آنجا که در خاک ماده غذایی بیشتری در دسترس میکروارگانیسم‌هاست، وجود چنین ریز زیستگاه‌هایی در خاک نسبت به شورابه و بلورهای نمک، که شوری بسیار بالا (۹۰ درصد) و یکنواختی دارند، برای رشد و تکثیر میکروارگانیسم‌ها مکان مناسبی است. در هر یک از نمونه‌های شاخص آب، خاک، نمک و لجن بیشترین جدایه‌ها از محیط MGM جداسازی شدند. این محیط حاوی ۲۳ درصد نمک و محیط اختصاصی برای جداسازی آرکی‌های نمک دوست است که با توجه به شوری بالای نمونه‌ها این نتیجه محتمل است. تعداد کم سویه‌های باکتری بدست آمده علاوه بر دلیل واقعی کمتر بودن آن‌ها در محیط نسبت به آرکی‌ها ممکن است به علت عدم بکارگیری شرایط بهینه برای جداسازی آن‌ها نیز مربوط باشد. در این پژوهش به دلیل پیچیدگی روش‌های کشت بی‌هوازی و همچنین کشت سویه‌های اتوتروف که خود مطالعه‌ای مستقل را طلب می‌کند، امکان جداسازی این گروه‌ها فراهم نشد.

یا فعالیت‌های متابولیک آنها نمونه شاخص آنالیز و نتایج آن به کل جامعه تعمیم داده می‌شوند. نمونه باید نمایانگر تنوع و تراکم موجودات در کل محیط نمونه‌برداری باشد. برای مثال نمونه‌های جمع‌آوری شده از یک منطقه با هم مخلوط شده و به عنوان نمونه شاخص در نظر گرفته می‌شود (Atlas and Bartha 1998). تعداد و تنوع نمونه‌های به کار گرفته شده، فصل مختلف نمونه‌برداری، توزیع طبیعی میکروارگانیسم‌ها در محیط زیست و مشخصات بوم‌شناختی هر منطقه همگی از جمله مواردی هستند که در نوع میکروارگانیسم‌های جداسازی شده اثر دارند (Alain and Querellou 2009). افزایش تعداد نمونه‌برداری، در افزایش تنوع میکروارگانیسم‌های موجود، تاثیرگذار خواهد بود (Hughes et al. 2001). در بررسی جوامع میکروبی با افزایش تعداد نمونه‌ها نتایج قابل قبول‌تری به دست می‌آید. در روش کشت علاوه بر محدودیت اصلی (دسترسی به تنها حدود یک درصد از میکروارگانیسم‌های موجود)، محیط‌ها و روش‌های کشت استفاده شده گستره زیادی نداشتند و تنها امکان رشد گروه خاصی از میکروارگانیسم‌ها را فراهم می‌کردند. بنابراین نتایج به دست آمده از این روش بیانگر واقعیت کامل جامعه میکروبی منطقه نیست. در روش مولکولی محدودیت‌های کشت برداشته شده و دسترسی به میکروارگانیسم‌های محیط بدون نیاز به رشد آن‌ها در شرایط مصنوعی آزمایشگاه حاصل شده با این وجود دسترسی به ماده ژنتیکی و توانایی تکثیر ژن مورد نظر در این روش محدودیت‌هایی ایجاد می‌کند.

با توجه به اساس این پژوهش که با روش‌های مبتنی بر کشت انجام گرفته است، آنچه از بررسی نتایج آن بدست می‌آید تنها در مورد گروه‌های قابل کشت قابل بحث خواهد بود. بر این اساس و با در نظر گرفتن سهم کوچک میکروارگانیسم‌های قابل کشت در مقایسه با کل جامعه میکروبی، مقایسه نتایج بدست آمده از نظر بازده روش‌های کشت به کار گرفته شده یا تعیین نقش گروه‌های میکروبی جداسازی شده در حفظ عملکرد زیست بوم امکان پذیر نخواهد بود (Hughes et al. 2001). در ایران دریاچه‌های پر شور مثل ارومیه، آران و بیدگل، حوض سلطان، مهارلو و تالاب گمیشان از دیگر اکوسیستم‌هایی هستند که بررسی شده‌اند (Rahban 2008; Bagheri 2009; Didari 2009; Mehrshad

(2007) Xuwei et al. آرکی‌های نمک دوست را از دریاچه پر شور Ayakekumu در چین جداسازی کردند که این سویه‌ها متعلق به ۶ جنس از شاخه *Halobacteriaceae* بودند و جنس‌های غالب *Halorubrum* (۴۷ درصد) و *Natrinema* (۲۴ درصد) بودند. (Zafrilla et al. 2010). به روش غیر وابسته به کشت، دو منطقه پر شور Redonda و Penalva را در اسپانیا بررسی کردند که آرکی‌های شناسایی شده متعلق به جنس‌های *Haloarcula*، *Haloquadatum*، *Halorubrum* و *Halobacterium* بودند.

در پژوهش (Amoozegar et al. 2008)، سویه‌های آرکی مورد بررسی در دریاچه نمک آران و بیدگل اعضای خانواده *Halobacteriaceae* در جنس‌های *Halorubrum* (۵۵/۴ درصد)، *Haloarcula* (۱۷/۸ درصد)، *Natrinema* (۴ درصد)، *Halogeometricum* (سه درصد)، *Halobacterium* (دو درصد)، *Halovivax* (دو درصد)، *Halolamina* (یک درصد) و *Halorentalis* (یک درصد) بوده‌اند (Makhdoui-Kakhki et al. 2012).

در پژوهش (Amoozegar et al. 2008)، سویه‌های آرکی مورد بررسی از سواحل غربی دریاچه نمک ارومیه از نظر فیلوژنتیک در جنس‌های *Halorubrum*، *Haloarcula*، *Natrinema*، *Natronococcus*، *Natronomonas*، *Halobacterium*، *Halomicrobium*، *Halovivax*، *Halosimplex*، *Halopelagius*، *Haloterrigena*، *Halobiforma* و *Halalkalicoccus* قرار گرفتند (Asadi 2011).

در حالی که در پژوهش حاضر که از تمام نقاط شرق و غرب دریاچه ارومیه جداسازی انجام شده بود فقط سه جنس *Halorubrum*، *Haloarcula* و *Haloterrigena* شناسایی شد و جنس‌های *Natronomonas*، *Halomicrobium*، *Halopelagius*، *Halosimplex*، *Halobiforma*، *Halovivax*، *Halalkalicoccus*، *Natrinema* و *Natronococcus* گزارش نشدند. تفاوت نتایج این دو پژوهش علل مختلفی دارد نوع نمونه، اختلاف مکان نمونه‌برداری، تفاوت فصل نمونه‌برداری و تهیه نمونه شاخص از جمله این علل می‌باشد. تنوع جنس‌های جداسازی شده به علل ذکر شده کمتر از نمونه‌های حاصل از سواحل غربی دریاچه گزارش شدند و جنس‌هایی که فراوانی بیشتر داشتند غالب شده و احتمالاً از رشد بقیه جنس‌ها ممانعت کردند. برای بررسی میکروارگانیسم‌ها در سیستم‌های طبیعی بر حسب تعداد کل، تعداد جوامع خاص

منابع

- Amoozegar MA, Schumann P, Hajjghasemi M, Fatemi AZ (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.
- Alain K, Querellou J (2009) Cultivating the uncultured: limits, advances and future challenges. *Extremophiles* 13: 583-594.
- Alquères SMC, Almeida RV, Clementino MM, Vieira RP, Almeida WI, Cardoso AM, Martins OB (2007) Exploring the biotechnological applications in the archaeal domain. *Brazilian Journal of Microbiology* 38: 398-405.
- Asadi B (2011) Diversity of aerobic extreme halophilic prokaryotes from western coastal line of Urmia Lake with culture-dependent and culture-independent methods. MSc Thesis, University of Tehran, Iran (In Farsi)
- Atlas RM, Bartha R (1998) *Microbial ecology: fundamentals and applications*. 4th edition. Addison-Wesley, California.
- Bagheri M (2009) Diversity of culturable Moderate halophilic heterotrophic bacteria in Aran-Bidgol Lake. MSc Thesis, University of Tehran, Iran. (In Farsi).
- Bardavid RE, Khristo P, Oren A (2008) Interrelationships between *Dunaliella* and halophilic prokaryotes in saltern crystallizer ponds. *Extremophiles* 12: 5-14.
- Baron F, Finegold S (1990) *Diagnostic Microbiology*, 8th ed. St. Loui; the CV Mosby Co.
- Birbir M, Calli B, Mertoglu B, Bardavid RE, Oren A, Ogmen MN, Ogan A (2007) Extremely halophilic Archaea from Tuz Lake, Turkey, and the adjacent Kaldirim and Kayacik salterns. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 23: 309-316.
- Bowman JP, McCammon SA, Gibson JAE, Nichols PD, Robertson L (2003) Prokaryotic metabolic activity and community structure within Antarctic continental shelf sediment. *Applied Environmental Microbiology* 69: 2448-2462.
- Burns DG, Camakaris HM, Janssen PH, Dyall-Smith ML (2004) Combined use of cultivation-dependent and cultivation-independent methods indicates that members of most haloarchaeal groups in an Australian crystallizer pond are cultivable. *Applied Environmental Microbiology* 70: 5258-5265.
- Caton TM, Witte LR, Ngyuen HD, Buchheim JA, Buchheim MA, Schneegurt MA (2004) Halotolerant aerobic heterotrophic bacteria from the Great Salt Plains of Oklahoma. *Microbiology Ecology* 48: 449-462.
- Didari Khamseh Motlagh M (2009) Diversity of culturable halotolerant aerobic heterotrophic bacteria in Aran-Bidgol Lake. MSc Thesis, University of Tehran, Iran. (In Farsi)
- Doughty HW (1924) Mohres method for the determination of silver and halogens in other than neutral solutions. *Journal of the American Chemical Society* 46: 2707-2709.
- Dyall-Smith ML (2008) *The Halohandbook: Protocols for haloarchaeal Genetics*. <http://www.haloarchaea.com/resources/halohandbook>.

(2010; Asadi 2011). در طول سال‌های اخیر، بررسی تنوع زیستی پروکاریوت‌ها با روش‌های مولکولی، بیشتر بر اساس تکثیر قطعه ای از 16S rDNA و تعیین توالی ژنی سویه‌ها انجام شده است. به کمک روش‌های مستقل از کشت مثل Microarray، الکتروفورز با شیب ماده واسرشت کننده و کلونینگ-ترادف‌یابی، تنوع زیستی میکروارگانسیم‌ها وسیع‌تر از روش‌های وابسته به کشت گزارش شده است به دلیل این که بسیاری از میکروارگانسیم‌ها به راحتی در محیط کشت‌های موجود کشت نمی‌شوند. Tsiamis et al. (2008). آنچه که در روش‌های مستقل از کشت به دست می‌آید شناختی است که براساس نشانه‌های حضور میکروارگانسیم در طبیعت حاصل می‌شود. براساس همین روش‌هاست که تنوع واقعی میکروارگانسیم‌ها تخمین زده شده و فاصله روش‌های کشت با آن مشخص می‌شود.

در مجموع به نظر می‌رسد تلاش در پیشبرد همزمان هر دو روش به صورت مکمل بهترین گزینه میکروبی‌شناسان در حال حاضر است. توسعه روش‌های کشت به خصوص جایی که گروه‌های جدید میکروبی مد نظر هستند به همراهی روش‌های مولکولی ضروری به نظر می‌رسد. جمع‌آوری داده‌های حاصل از پژوهش‌های مختلف نیز به صورت پایگاه‌های داده‌ای که به آسانی قابل بهره‌برداری باشند نقش مهمی در طرح‌ریزی روش مناسب برای تحقیقات بعدی خواهد داشت (Alain and Querellou 2009). در مقایسه روش کشت و مولکولی، روش‌های مولکولی دامنه گسترده‌تری از تنوع را معرفی کرده‌اند. با این وجود روش‌های پلی‌فازیک شامل استفاده از هر دو روش کشت و مولکولی نتیجه کامل‌تری از تنوع زیستی در محیط‌های پر شور ارائه می‌دهد.

سپاسگزاری

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

- Felsenstein J (1985) Phylogenies and the comparative method. *American Naturalist* 1:1-15.
- Gerhardt P, Murray RGE (1994) Methods for general and molecular bacteriology. American Society for Microbiology. Washington.
- Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium. Series 41*: 95-98.
- Helm D, Hepburn C (2012) The economic analysis of biodiversity: an assessment, *Oxford Review of Economic Policy* 28:1-21.
- Hughes JB, Hellmann JJ, Ricketts TH, Bohannan BJM (2001) Counting the uncountable: Statistical approaches to estimating microbial diversity. *Applied Environmental Microbiology* 67: 4399-4406.
- Kharroub K, Aguilera M, Quesada T, Morillo JA, Ramos-Cormenzana A, Boulharouf A, Monteoliva-Sánchez M (2006) *Salicola salis* sp. nov., an extremely halophilic bacterium isolated from Ezzemoul sabkha in Algeria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 56: 2647-2652.
- Kim OS, Cho YJ, Lee K, Yoon SH, Kim M, Na H, Park SC, Jeon YS, Lee JH, Yi H, Won S, Chun J (2012) Introducing EzTaxon-e: a prokaryotic 16S rRNA gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 62:716-721.
- Mehrshad M (2011) Diversity of aerobic heterotrophic moderately halophilic and halotolerant bacteria from western coastal line of Urmia Lake with culture-dependent and culture-independent methods. MSc Thesis, University of Tehran, Iran. (In Farsi)
- Makhdoumi-Kakhki A, Amoozegar MA, Kazemi B, Pašić L, Ventosa A (2012) Prokaryotic diversity in Aran-Bidgol Salt Lake, the largest hypersaline playa in Iran. *Microbes Environmentes* 27: 87-93.
- Maturrano L, Santos F, Rossello-Mora R, Anton J (2006) Microbial diversity in Maras salterns, a hypersaline environment in the Peruvian Andes. *Applied Environmental Microbiology* 72: 3887-3895.
- Marmur JA (1961) Procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. *Journal Molecular Biology* 3: 207-208.
- Murray RGE, Doetsch RN, Robinow CF (1994) Determinative and cytological light microscopy. In: Gerhardt P, Murray RGE, Wood WA, Krieg NR, editors; Gerhardt P, Murray RGE, Wood WA, Krieg NR, editors. *Methods for general and molecular bacteriology*. Washington, D.C: American Society for Microbiology 22-41.
- Nee S (2004) More than meets the eye. *Nature* 429: 804-805.
- 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 (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23: 2947-2948.
- Oren A (2004) Prokaryote diversity and taxonomy: current status and future challenges. *Philosophical Transactions: Biological Sciences* 359: 623-638.
- Philippot L, Spor A, Nault CH, Bru D, Bizouard F (2013) Original Article. Loss in microbial diversity affects nitrogen cycling in soil. *ISME Journal* 7: 1609-1619.
- Rhoades JD (1982) Soluble Salts. In A.L. Page et al. (ed.) *Methods of soil analysis. Part 2. Agronomy* 9: 167-178.
- Rodriguez-Valera F (1988) Characteristics and microbial ecology of hypersaline environments. *Halophilic bacteria*. F. Rodriguez-Valera. Boca Raton Fla., CRC Press, Inc. 1: 3-30.
- Rohban R (2008) Biodiversity of halophilic bacteria producing hydrolytic enzyme in Howz Soltan Lake. MSc Thesis, Science and Research Branch Islamic Azad University, Iran. (In Farsi)
- Simbert RM, Krieg NR (1994) Phenotypic characterization. In: *Methodes for general and molecular bacteriology* (eds. Gerhard P, Murray, RGE, Wood WA, Krieg NR) American Society for Microbiology, Washington 607-655.
- Sheen RT, Kahler HL (1983) Effects of Ions on mohr method for chloride determination, *Industrial Engineering Chemistry Analysis. Ed. 10*: 628-629.
- Sonia R, Vartoukian, Richard M, Palmer and William GW (2010) Minireview strategies for culture of 'unculturable' bacteria. *FEMS Microbiology Letter* 309: 1-7.
- Tamura K, Dudley J (2007) MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 8: 1596-1599.
- Tsiamis G, Katsaveli K, Ntougias S, Kyrpides N, Andersen G, Piceno Y, Bourtzis K (2008) Prokaryotic community profiles at different operational stages of a Greek solar saltern. *Research of Microbiology* 159: 609-627.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S (2011) MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution* 28: 2731-2739.
- Truper HG (1992) Prokaryotes: an overview with respect to biodiversity and environmental importance, *Biodiversity and Conservation* 1: 227-236.
- Turner S, Pryer KM, Miao VPW, Palmer JD (1999) Investigating deep phylogenetic relationships among cyanobacteria and plastids by small subunit rRNA sequence analysis. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 46: 327-338.
- Xuwei X, Min W, Yuehong W, Huibin Z (2007) Culturable halophilic archaeal diversity of Ayakekumu salt Lake located in Xinjiang, China. *Acta Ecologica Sinica* 27: 3119-3123.
- Zafrilla B, Martínez-Espinosa RM, Alonso MA, Bonete MJ (2010) Biodiversity of Archaea and floral of two inland saltern ecosystems in the Alto Vinalopó Valley, Spain. *Saline Systems* 13:10.

Zhang H, Schroder JL, Pittman JJ, Wang JJ, Payton ME (2005) Soil Salinity Using Saturated Paste and 1:1 Soil to Water Extracts. Soil Science Society of American Journal 69:1146-1151.

Van HT, Pham and Jaisoo K (2012) Cultivation of unculturable soil bacteria. Trends in Biotechnology 30: 475-484.

Ventosa A, Gutiérrez M, Kamekura M, Dyall-Smith M (1999) Proposal to transfer *Halococcus turkmenicus*, *Halobacterium trapanicum* JCM 9743 and strain GSL-11 to *Haloterrigena turkmenica* gen. nov., comb. nov.

International Journal of Systematics Bacteriology 49:131-136.

Vibha B, Neelam G (2012) Bhardwaj Vibha and Garg Neelam., Importance of Exploration of Microbial Biodiversity. ISCA Journal of Biological Sciences 1: 78-83.

Vreeland RH (ed.) (2013) Advances in Understanding the Biology of Halophilic Microorganisms, Chapter 2 Media and Conditions for the Growth of Halophilic and Halotolerant Bacteria and Archaea Springer Science+Business Media Dordrecht 35-58.

Archive of SID