بررسی تنوع زیستی باکتریهای نمک دوست نسبی و تحمل کننده نمک قابل کشت در تالاب پرشور اینچه برون

پریسا زرپرور[۱] ، محمدعلی آموزگار*[۲]و محمدرضا فلاحیان[۳]

[۱] تهران، دانشگاه آزاد اسلامی ، واحد علوم وتحقیقات، بخش زیست شناسی

[۲] تهران، دانشگاه تهران، پردیس علوم، دانشکده زیست شناسی و قطب تبارزایی موجودات زنده، بخش میکروبیولوژی

[۳] تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، دانشکده علوم پایه، گروه میکروبیولوژی

تاریخ دریافت: ۹۱/۳/۲۱ تاریخ پذیرش: ۹۱/۱۲/۵

چکیده

تالاب اینچه برون در شمال ایران در نزدیکی مرز ترکمنستان واقع شده و شوری و تغییرات pH آن قابل توجه است . در شهریور ۱۳۸۹ از آب ، خاک و نمک ۴ منطقه تالاب نمونه برداری شد. ۴۰۰ جدایه خالص سازی و ۵۵ سویه PCR گردید. جنسهای *Bacillus* (۱۸ درصد)، *Marinobacte* (۱۶ درصد)، *Halomonas* (۱۶ درصد)، *Kocuria* (۹ درصد)، *Oceanobacillus* (۷ درصد)، *Dietzia* (۷ درصد)،*Virgibacillus* (۶ درصد)، *Chromohalobacter* (۵ درصد)، *Rhodococcus* (۲ درصد) ، *Micrococcus* (۳ درصد)، *Paenibacillus* (۲ درصد)، *Halobacillus* (۳ درصد)، *Thalassobacillus* (۲ درصد)، *Arthrobacter* (۲ درصد) و *Desmospora* (۲ درصد) جدا شدند. در ۱۳ سویه میزان شباهت در ترادف ژن 16S rRNA بین ۹۸/۴-۹۷ درصد ودر ۷ سویه کمتر از ۹۷ درصد بود که بیانگر تفاوت قابل ملاحظه ای در سطح گونه و یا در برخی حتی جنس است . با بررسی بهینه رشد نمکی ۲۲ سویه نمک دوست نسبی و۳۳ سویه تحمل کننده نمک بودند. تولید ۴ آنزیم هیدرولیتیک بررسی گردید که عمده ترین تولید کنندگان آن باسیلهای گرم مثبت و بیشترین فراوانی متعلق به آنزیمهای ژلاتیناز و پروتئاز بود .

واژه های کلیدی: تنوع زیستی ، باکتری نمک دوست ، باکتریهای تحمل کننده نمک ،تالاب اینچه برون

* نویسنده مسئول، تلفن: ۶۱۱۱۳۵۵۷-۰۲۱ ، پست الکترونیکی: amozegar@khayam.ut.ac.ir

مقدمه

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. بی شک تاریخچه تکامل طولانی میکروارگانیسم ها و تواناییهای متابولیکی گسترده شان و نقش مهمی که در چرخه عناصر، پالایش زیستی، تولید آنتی بیوتیک ،تولید فرآورده های تخمیری و خوراکی، همزیستی با گیاهان، بیابان زدایی و افزایش حاصلخیزی خاک و.... ایفاء می کنند، اصلی ترین دلایل اهمیت بررسی تنوع زیستی میکربی بوده است(۲۸). امروزه یکی از شاخصهای سلامت هر زیست‌بوم و پایداری آن، تنوع میکروارگانیسم‌های آن در نظر گرفته می شود. به‌طوری که زیست‌بومهای با تنوع کم‌تر، محیطهایی در معرض خطر، حساس و نیازمند مراقبت خاص محسوب می‌شوند. رفتارهای انسانی و یا عوامل طبیعی که زیست‌بومها را به سوی کاهش تنوع میکربی آن هدایت می‌کنند، می توانند منجر به تخریب زیست‌بوم و یا بروز همه‌گیریها و آفتها شوند (۲ و ۱۷).

یکی از چالشهای عمده در تعیین تنوع زیستی میکروارگانیسم‌ها، مشکل جداسازی آنهاست . رایج‌ترین روش برای شناسایی انواع میکروارگانیسم‌ها، تهیه کشت از نمونه خاک، آب، رسوب و رشد روی محیط جامد حاوی ترکیبات مغذی است که انواع مختلفی از میکروارگانیسم‌ها روی آن قادر به رشد هستند. در طول سالهای اخیر، بررسی

Archive of SID
www.SID.ir

تنوع زیستی پروکاریوت‌ها با روشهای مولکولی، بیشتر بر اساس تکثیر ژن 16S rRNA و تعیین توالی ژنی سویه‌ها انجام شده است (۵) آنچه که روشهای وابسته به کشت از جامعه میکربی نشان می‌دهند بخش بسیار کوچکی از جامعه میکربی است که توان سازگاری بیشتری با شرایط کشت مصنوعی داشته اند که نمی توان آنها را نمونه شاخصی از وضعیت کلی دانست اما توسعه روشهای کشت به خصوص جایی که گروههای جدید میکربی مدنظر هستند به همراهی روشهای مولکولی ضروری است (۲ و ۲۹).

در زیست محیطهای آب و خاک ، فاکتور شوری تعیین کننده جمعیتهای میکربی محسوب می شود. خاکهای دارای بیش از ۰/۲ درصد نمک محلول، خاک شور نامیده می شود که در سراسر جهان و به ویژه در مناطق خشک فراوان وجود دارد (۲). اقیانوسها، دریاها، دریاچه های شور و مردابهای نمک از جمله محیطهای آبی شور شناخته شده اند. دریاچه های با میزان نمک بالا ی ۰/۳ درصد جزء دریاچه های شورمحسوب می شود. آبهای پرشور، تراکم نمک بسیار بالاتری نسبت به آب دریا دارند تنوع موجودات نمک دوست وتحمل کننده نمک در اکوسیستمهای آبی و خاکهای شور بسیار گسترده بوده و مجموعه ای از موجودات ماکروسکوپی ومیکروسکوپی را در برمی گیرد (۲ و ۲۲). امروزه مطالعه بر روی میکروارگانیسم های نمک دوست به دلیل تواناییهای ویژه ای که در تحمل شرایط دشوار، تولید انواع متابولیت ها، تجزیه ماکرومولکول های گوناگون و پالایش زیستی دارند در جنبه های مختلف فیزیولوژی، اکولوژی، ژنتیک و بیوتکنولوژی توسعه یافته است (۵).

از بررسیهای انجام گرفته بر روی مناطق پرشور ایران می توان به بررسی تنوع زیستی میکروارگانیسمهای نمک دوست قابل کشت و غیر قابل کشت سواحل غربی در یاچه ارومیه (۹) و تولید آنزیمهای هیدرولیتیک در باکتریهای نمک دوست این دریاچه اشاره کرد (۷).

همچنین دریاچه فصلی حوض سلطان (۶)، دریاچه نمک آران و بیدگل (۱، ۲و۵) و دریاچه بختگان واقع در غرب نی ریز (۴) نیز از نظر تنوع میکروارگانیسمهای نمک دوست وتحمل کننده نمک و تولید آنزیمهای هیدرولیتیک بررسی شده اند.

از مطالعاتی که بر روی تحمل پذیری و مقاومت هالوفیلها نسبت به ترکیبات سمی انجام گرفته می توان به بررسی مقاومت به اکسی آنیونهای سمی تلوریت ، سلنیت ، سلنات ، ارسنات و کرومات در باسیلوس های هالوفیل بومی ایران (۸) بررسی احیاء کروم شش ظرفیتی توسط باکتری هالوفیل نسبی مقاوم به کروم *Nesterenkonia* sp. strain *MF2* (۱۰) و بررسی اثر اکسی آنیونهای مختلف بر مقاومت به تلوریت در باکتریهای نمک دوست : *Halomonas elongate* ، *Halomonas maura* ، *Halobacillus litoralis* ، *Virgibacillus salexigenes* ، *Halobacillus karajensis* ، *Halobacillus halophillus* ، *Bacillus halophillus* ، *Salinococcus iranensis* ، *Salinivibrio proteolyticus* اشاره کرد(۸).

اهدف اصلی این پژوهش، بررسی یک اکوسیستم پرشور (تالاب اینچه برون) از نظر گوناگونی میکروارگانیسم های ساکن و درک گوشه ای از تنوع زیستی موجود در آن ، شناسایی توانمندی میکروارگانیسم های نمک دوست در تولید متابولیتهای ثانویه و امکان دستیابی به جنس و گونه های جدید برای افزودن به ذخایر ژنتیکی کشور در راستای در اختیار داشتن یک بانک میکربی غنی و بی نیازی از خرید سویه از بانکهای میکربی خارج از کشور بوده است.

مکان انجام این پژوهش تالاب پر شور اینچه برون است که در ۲۵ کیلومتری شمال شهر آق قلا ، در فاصله ۳ کیلومتری شرق جاده آق قلا – مرز پل در استان گلستان (*N :37.8.57* و *E: 54.51*)

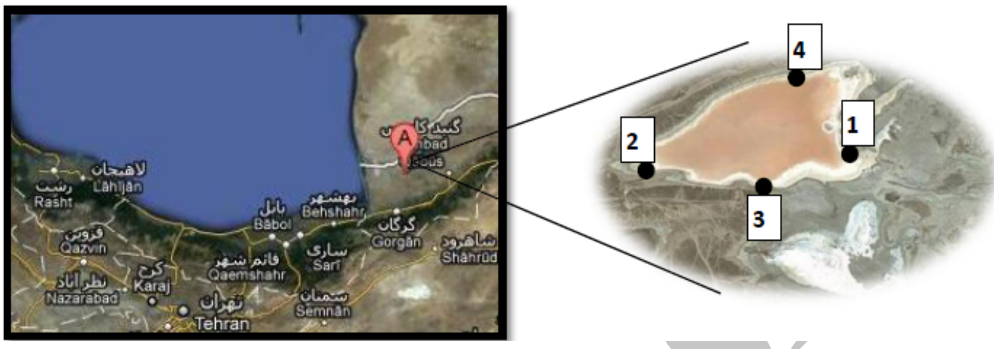
واقع گردیده است .این تالاب حدود ۱۰۰ هکتار مساحت دارد و ارتفاع عمیق ترین نقطه تالاب از سطح دریای آزاد

www.SID.ir

۴ متر است و در طبقه بندی کنوانسیون رامسر در گروه تالابهای داخلی لب شور و دائمی قرار می گیرد (۳).

مواد وروشها

نمونه گیری: در اواخر شهریور ۱۳۸۹ از آب، خاک ، لجن سطحی وعمقی ، کریستالها ولایه ضخیم نمک، ۴ منطقه این تالاب نمونه گیری انجام شد. تصویر ماهواره ای تالاب و نقاط نمونه برداری در شکل ۱ نشان داده شده است (شکل ۱).



شکل ۱- تصویر ماهواره ای از تالاب اینچه برون و مناطق نمونه برداری

نمونه ها در دمای محیط و در حداقل زمان به آزمایشگاه منتقل شد و pH و شوری آنها اندازه‌گیری گردید. آنالیز شیمیایی نمک دریاچه جهت سنجش عناصر موجود در محیط زیست طبیعی باکتریهای این دریاچه و به کار گیری آن در طراحی محیط کشت مناسب که امکان جداسازی طیف گسترده‌تری از باکتریها را فراهم سازد، توسط شرکت بهین خاک آزما صورت گرفت .

خالص سازی و شناسایی سویه ها: از نمونه های منتقل شده به آزمایشگاه برای جدا سازی و کشت باکتریهای نمک دوست نسبی و تحمل کننده نمک، تا رقت 10^{-6} سری رقت تهیه شد. برای کشت وخالص سازی از محیط جامد Moderate halophiles(12% salt) شامل(گرم در لیتر): NaCl : ۱۰۴، $MgCl_2.6H_2O$: ۵/۴، $MgSO_4.7H_2O$: ۸/۳، $CaCl_2.2H_2O$: ۰/۴۱، KCl : ۱/۶۶، $NaHCO_3$: ۰/۰۸، Yeast Extract: ۵، Glucose: ۱، Peptone from meat: ۸ و Agar: ۱۵ برای جداسازی نمک دوستهای نسبی ومحیط جامد Seawater Nutrient Agar (3% salt) شامل(گرم در لیتر): NaCl : ۲۰، $MgCl_2.6H_2O$: ۳، $MgSO_4.7H_2O$: ۵، $CaCl_2.2H_2O$: ۰/۵، KCl : ۰/۵، Yeast Extract: ۱، Extract: ۲ Meat from Peptone : ۵ و Agar: ۱۵ برای جداسازی تحمل کننده های نمک استفاده گردید(۲).

افتراق جدایه‌های تحمل کننده نمک و نمک دوست نسبی: باکتریهای تحمل کننده نمک علاوه بر توانایی رشد در محیط فاقد نمک می توانند غلظتهای بالای نمک را نیز تحمل کرده و در این شرایط نیز رشد کنند. به این دلیل که در ترکیب مواد مورد استفاده در تهیه محیط کشت مثل پپتون، عصاره مخمر و عصاره گوشت نمک وجود دارد و این نمک می تواند نیازمندی به نمک را در باکتریهای نمک‌دوست پوشش دهد و موجب رشد آنها در محیط فاقد نمک گردد، از محیطی که فقط دارای ۵ گرم در لیتر عصاره مخمر بود استفاده شد. این محیط کشت با درصدهای نمک ۰، ۰/۵، ۳، ۵، ۷/۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰ تهیه شد، pH محیط با استفاده از سود دو نرمال و HCl یک نرمال در ۷/۵ تنظیم شد و در دمای ۱۲۱ درجهٔ سانتی گراد و به مدت ۱۵ دقیقه اتوکلاو گردید. نکته‌ای که در افتراق این باکتریها مدنظر قرار گرفت بهینه رشد بود، زیرا تنها توانایی رشد در محیط فاقد نمک برای این‌که یک جدایه را تحمل کننده نمک در نظر گرفت، کافی نیست . برای انتخاب محیط بهینه از نظر درصد نمک، پس ازگذشت ۱۲ ساعت از

Archive of SID

www.SID.ir

زمان کشت، هر یک از این محیطها مورد مقایسه قرارگرفت و نمکی بهینه انتخاب شد که اولین رشد پایدار باکتری در آن درصد نمک صورت گرفته باشد (۲و۵). از ۴۰۰ جدایه خالص شده ، ۵۵ سویه به صورت تصادفی برای تعیین ترادف ژن 16S rRNA ومطالعات تکمیلی انتخاب گشته و پس از استخراج DNA ، انجام PCR و تعیین ترادف نتایج حاصله با توالیهای ثبت شده در بانکهای اطلاعاتی مقایسه گردید.

مطالعات فیلوژنتیک: پس از تهیهٔ تودهٔ زیستی، استخراج DNA باکتریها، طبق روش دستورزی شده پیشنهاد شده توسط Marmur (1994) انجام گرفت (۲۰). جهت تأیید استخراج انجام شده، الکتروفورز ژل آگارز براساس روش kolmodin (1997) صورت گرفت (۱۹). برای تکثیر ژن 16S rRNA از پرایمر های عمومی 27F باترادف:AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG ، پرایمر1488R با ترادف : CGG TTA CCT TGT TAC GAC TTC ACC وپرایمر 1492R با ترادف: GGT TAC CTT GTT ACG ACT T استفاده شد (۲۵). به دلیل اینکه تمام سویه ها با یک جفت پرایمر تکثیر نشد دو جفت پرایمر 27F -1492R و 27F-1488R به کار گرفته شد. با استفاده از این پرایمرها ژن 16S rRNA با طول حدود ۱۵۰۰ نوکلئوتید تکثیر شد. برای حصول اطمینان از عدم آلودگی مواد مورد استفاده در PCR شاهد منفی با افزودن آب به جای DNA الگو در ویال حاوی مخلوط واکنش به کار رفت. دمای اتصال پرایمرها ، مدت زمان اتصال وسنتز برای هر سویه به طور جداگانه بهینه گردید.

تعیین توالی محصول PCR از طریق شرکت ژن فن آوران انجام شد. ترادف‌های به دست آمده با استفاده از نرم افزار Chromasمرتب شده و با نرم افزار BLAST با توالیهای ثبت شده موجود در پایگاه اطلاعات ژنومی GenBank و Eztaxon مقایسه شد. به این ترتیب نزدیک‌ترین سویه‌ها با ترادف ژن 16S rRNA مشابه با سویه‌های منتخب PCR شده تعیین شد. آنالیز فیلوژنتیک باکتریهای منتخب با سویه‌های نزدیک به آنها با استفاده از نرم افزار Clustal x (ویرایش دوم) صورت گرفت. درخت فیلوژنی با استفاده از نرم افزار MEGA (ویرایش پنجم) با الگوریتمهای Maximum likelihood و Maximum parsimony رسم گردید (۲۷). بررسی اعتبار شاخه‌های درخت با استفاده الگوریتم Bootstrap analysis و با ۱۰۰۰ بار نمونه‌گیری صورت گرفت (۱۳).

جدایه های منتخب با آزمایشهای ریخت شناسی و بیوشیمیایی نظیر بررسی شکل کلنی، رنگ آمیزی گرم بر اساس روش Hucker (۲۱)، بررسی شکل میکروسکوپی باکتری، حرکت سلول باکتری به روش لام مرطوب (۱۴)، رنگ آمیزی اسپور بر اساس روش Schaeffer-Fulton (۱۴)، تولید کاتالاز با محلول ۳ درصد پراکسید هیدروژن (۱۶)، تست اکسیداز با استفاده از دیسکهای آماده (۱۵) احیای نیترات و شرایط بهینه رشد از نظر دما ، میزان نمک و pH بررسی گردیدند. تولید آنزیمهای هیدرولازی آمیلاز ، پروتئاز ، لیپاز و ژلاتیناز مطابق با دستور ذکر شده در جدول ۱ بررسی گردید. بسته به نیاز سویه NaCl به محیطهای آنزیمی افزوده شد و پس از تلقیح همگی به مدت ۲ هفته در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد گرما گذاری شدند. (جدول ۱)

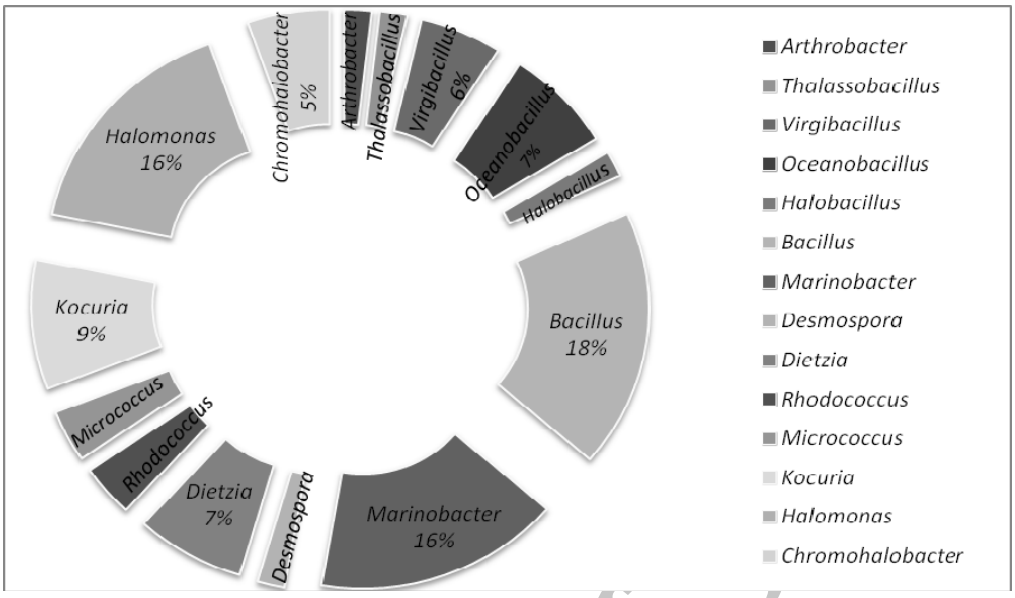
نتایج

جداسازی و شناسایی: با توجه به نتایج حاصل از آنالیز آب، به دلیل بالا بودن میزان یونهای Na^+ وCl^- ، تالاب اینچه برون در گروه مناطق پرشور تالازوهالین با منشاء دریایی قرارمی گیرد.

محل ۴ با cfu 5×10^5 باکتری بیشترین بار میکربی را داشت وکمترین تعداد جدایه متعلق به نمونه برداری از منطقه ۱ بود . در مجموع ۴۰۰ جدایه خالص سازی گردید که بیشترین جداسازی از محیط MH با ۱۲ درصد نمک و pH

Archive of SID
www.SID.ir

۵/۵ انجام گرفت. با توجه به نتایج ذکر شده در جدول ۲، بیشتر جدایه ها باسیلهای گرم مثبت بودند (جدول ۲).



شکل ۲- نمودار فراوانی و تنوع جنسهای جدا شده از پژوهش

جدول ۱- ترکیب محیطهای کشت بررسی تولید آنزیم

آنزیم	محیط تولید آنزیم(گرم در لیتر)	روش تشخیص
آمیلاز	Soluble starch : 10 , Beef extract : 3 Agar : 15 پس از آماده سازی pH محیط بر روی ۷/۵ تنظیم شده و در دمای ۱۱۵ درجه سانتی گراد برای مدت ۱۰ دقیقه اتوکلاو شد(۱۲).	افزودن لوگل (یدید پتاسیم) بر روی محل رشد باکتری و ایجاد هاله شفاف پاسخ مثبت در نظر گرفته شد.
پروتئاز	Meat extracts : 3 , Peptone : 5 , Skim milk : 20 Agar : 15 پودر Skim Milk در نیمی از حجم آب محیط حل شده و در دمای ۱۱۰ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه اتوکلاو شد و بعد از آن به محیط پایه آگاردار که پس از آماده سازی بر روی pH ۷/۵ تنظیم شده در دمای ۱۲۱ درجه سانتی گراد، ۱۵ دقیقه اتوکلاو شده است، اضافه شد(۲۴).	وجود هاله شفاف در اطراف کلونی‌ها نشانه هیدرولیز پروتئین کازئین بوده و به عنوان پاسخ مثبت در نظر گرفته شد
لیپاز	$CaCl_2.H_2O$: 0/1 , Peptone :10, Tween 80: 10 Agar : 15 توئین موجود در این محیط بعد از تهیه در دمای ۱۱۵ درجه سانتی گراد به مدت ۲۰ دقیقه اتوکلاو شد. محیط پایه نیز پس از آماده سازی بر روی pH ۷/۵ تنظیم شده و به صورت جداگانه در دمای۱۲۱ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ دقیقه اتوکلاو شد. دو محیط پس از اتوکلاو به هم اضافه شد(۲۳).	ایجاد نواحی رسوب اطراف کلنی ها، به صورت دانه های سفید همراه با هاله کدر نشان دهنده تولید آنزیم لیپاز توسط باکتری است.
ژلاتیناز	Meat extracts : 3 , Peptone : 5, Gelatin : 120 محیط ابتدا آب تا دمای نزدیک جوش گرم شده و نمک و محیط کشت به آرامی به این ترکیب اضافه شد. pH محیط آماده شده بر روی میزان ۷/۵ تنظیم شده و برای ۱۵ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سانتی گراد اتوکلاو شد. محیط آماده شده به روش Stab کشت داده شد. (۲۴)	محیطهای رشد کرده را به همراه یک نمونه منفی در دمای ۴ درجه سانتی گراد قرار داده پس از ۲۰ دقیقه در صورت مایع بودن محیط نتیجه تست مثبت گزارش شد.

Archive of SID
www.SID.ir

جدول ۲ – مختصات مناطق نمونه برداری وتعداد جدایه های خالص سازی شده به تفکیک محل و نتایج لام گرم

منطقه نمونه برداری	مختصات جغرافیایی	میانگین شوری	میانگین pH	باسیل گرم منفی	باسیل گرم مثبت	کوکوس گرم مثبت	جمع
بستر نمکی				17	22	2	41
محل ۱	*E: N :37.13.438 54.30.224*	26.8	4.2	24	35	6	65
محل ۲	*N: 37.13.932 E: 54.30.081*	28.7	5.2	40	50	5	95
محل ۳	*N :37.13.829 E:54.30.307*	28.4	5.2	39	37	2	78
محل ۴	*E: N: 37.13.517 54.30.657*	23.3	6.45	64	50	7	121
جمع کل				184	194	22	400

بررسی فیلوژنی: در ۵۵ سویه ترادف ژن 16S rRNA مورد بررسی قرار گرفت که با توجه به نتایج در ۱۵ جنس قرار گرفتند. ، از این تعداد جنسهای *Micrococcus* و *Rhodococcus* فقط از محل ۱ جدا شده اند .جنسهای *Kocuria* و *Dietzia* فقط محل ۳ و ۴ و *Desmospora* و *Chromohalobacter* فقط از محل ۴ جدا شدند. تنوع وفراوانی جنسهای جداشده در شکل ۲ آورده شده است (شکل ۲).

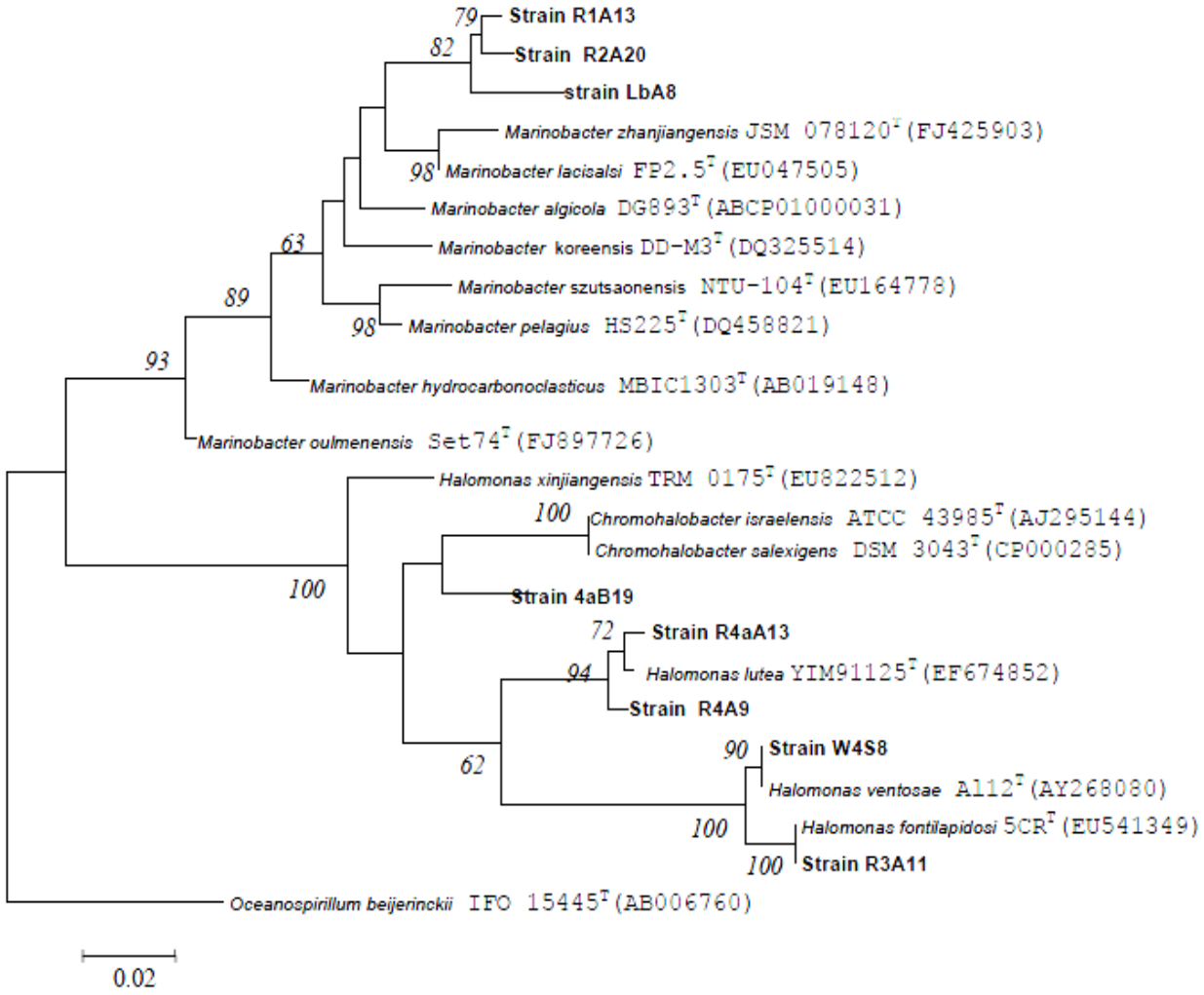
از ۵۵ سویه تعیین ترادف شده ، ۱۳ سویه که متعلق به گونه های مختلف از ۵ جنس , *Bacillus Virgibacillus* *Dietzia, Oceanobacillus* و *Halomonase* بودند ، شباهتی ۱۰۰ درصد در ترادف 16S rRNA داشتند، که آنها را از نظر ارائه به بانک میکربی به عنوان میکروارگانیسم بومی شناسایی شده حائز اهمیت می سازد. همچنین در ۱۳ سویه که متعلق به ۳ جنس *Bacillus, Marinobacter* و *Virgibacillus* بودند ، میزان شباهت بین ۹۷–۹۸/۴ درصد بود که با انجام هیبریداسیون DNA-DNA با گونه‌های نزدیک و بررسی صفات فنوتیپی ممکن است در گونهٔ جدیدی قرار گیرند. ۲۲ سویه شباهتی بین ۹۸/۵ تا ۹۹/۸ در تعیین ترادف داشتند .در ۷ سویه درصد شباهت کمتر از ۹۷ درصد بود که بیانگر تفاوت قابل ملاحظه ای در سطح گونه و یا در برخی حتی جنس، بین این جدایه ها و گونه‌های ثبت شده است و این جدایه ها بدون انجام هیبریداسیون DNA-DNA با گونه‌های نزدیک، می توانند به عنوان گونه‌های جدید مطرح شوند (۲۶). در این مطالعه براساس شباهتهای فنوتیپی در میان سویه های تعیین ترادف شده ، در نهایت ۲۲ سویه نمک دوست نسبی و۳۳ سویه تحمل کننده نمک جدا گردید که در نمک دوستهای نسبی بیشترین فراوانی متعلق به جنسهای *Marinobacter* و *Halomonas* بود وعمده ترین تحمل کننده های نمک به جنسهای *Oceanobacillus , Dietzia, Bacillus* و *Kocuria* قرابت داشتند .سویه های تعیین ترادف شده از نظر سیستماتیک در ۳ ردهٔ (۴۰ درصد *Firmicutes*)، (۲۴ درصد)*Actinobacteria* و رده (۳۶ درصد)*γ-Proteobacteria* قرار گرفتند . اغلب سویه‌ها متعلق به ردهٔ *Firmicutes* بودند که درختهای فیلوژنی رسم شده به روشMaximum likelihood برای هر رده و محل قرار گرفتن سویه های بررسی شده در آن، در شکلهای۳، ۴ و۵ نشان داده شده است (شکلهای۳، ۴ و۵).

تولید آنزیمهای هیدرولازی: ۵۵ سویه تعیین ترادف شده در این پژوهش، از نظر تولید آنزیمهای آمیلاز ، پروتئاز ، لیپاز و ژلاتیناز بررسی گردیدند و با توجه به نتایج ، باسیلهای گرم مثبت بیشترین سهم را در تولید انواع آنزیمهای هیدرولیتیک به ویژه ژلاتیناز وآمیلاز داشتند. توانایی۲۵ سویه در تولید آنزیم پروتئاز قابل توجه بود. سویه های تولید کننده این آنزیم در بین باسیلهای گرم

Archive of SID

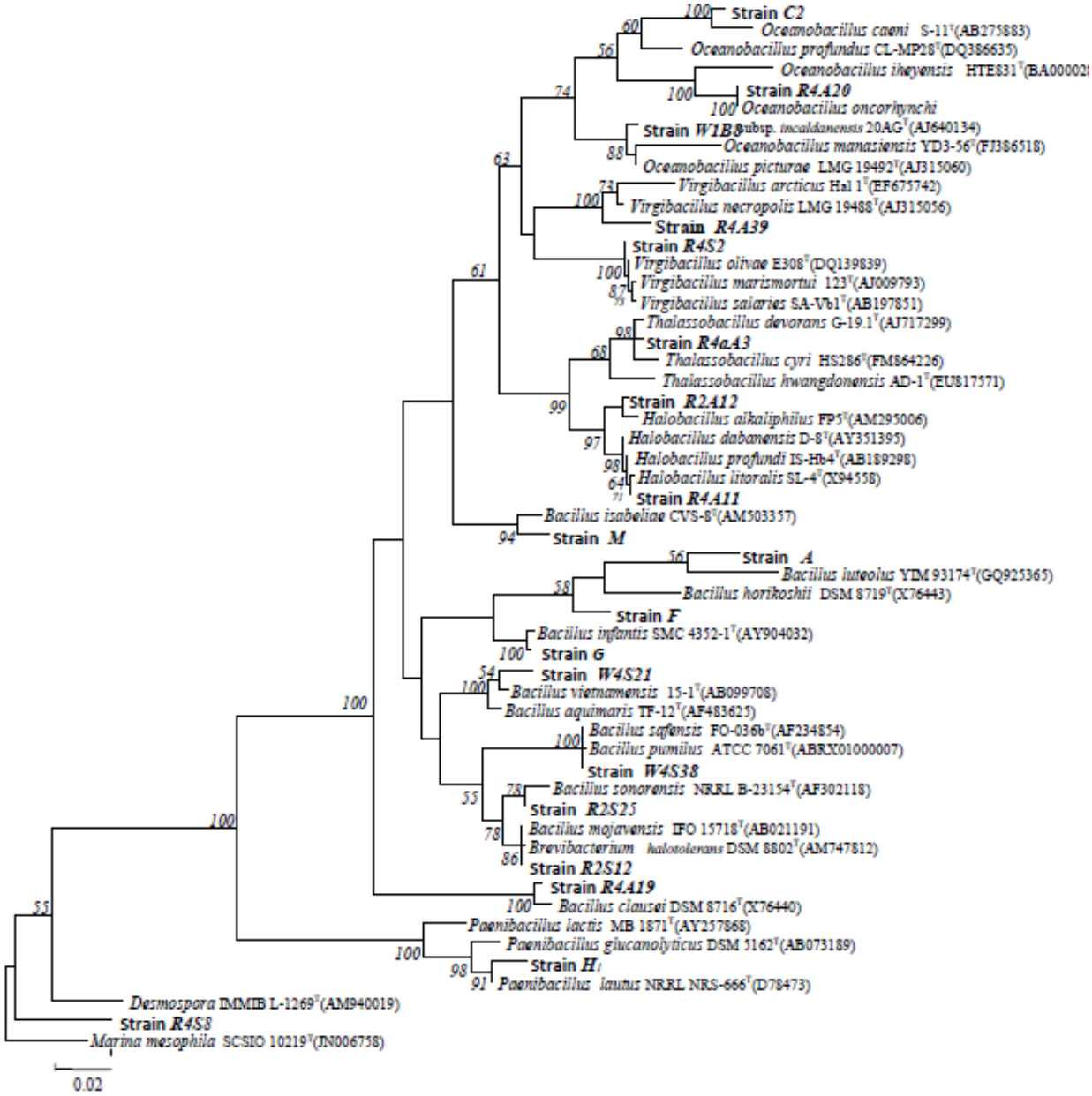
www.SID.ir

مثبت متعلق به جنسهای *Virgibacillus, Bacillus* , *Halobacillus, Oceanobacillus* و از بین باسیلهای گرم منفی به ۲ جنس *Marinobacter* و *Halomonas* تعلق داشتند .از کوکوس های گرم مثبت فقط ۲ جنس *Arthrobacter* و *Micrococcus* تولیدکننده پروتئاز بودند. در تولید آنزیم لیپاز علاوه بر سویه های متعلق به جنسهای *Bacillus* , *Thalassobacillus* و *Marinobacter* ،کوکوس های گرم مثبت متعلق به جنسهای *Rhodococcus* , *Micrococcus* , *Dietzia* و *Kocuria* نقش پررنگی داشتند. یکی دیگر از مهم ترین آنزیمهای هیدرولیتیک تولید شده توسط این سویه ها آمیلاز بود که تولید کنندگان آن گونه های مختلفی از جنس *Bacillus* بودند. کوکوس های گرم مثبت و باسیلهای گرم منفی شناسایی شده در این پژوهش هیچ کدام تولید کننده آمیلاز نبودند. در تولید آنزیم ژلاتیناز از کوکوس های گرم مثبت *Kocuria* و سپس *Micrococcus* در تولید این آنزیم نقش داشتند، از باسیلهای گرم منفی*Halomonas* و از باسیلهای گرم مثبت*Halobacillus, Oceanobacillus* تولید کننده ژلاتیناز بودند. مقایسه تولید آنزیم در گروههای مختلف باکتریهای جداشده در شکل ۶ نشان داده شده است (شکل ۶).



شکل۳ – درخت فیلوژنی سویه های وابسته به رده *γ-Proteobacteria* به روشMaximum likelihood

www.SID.ir



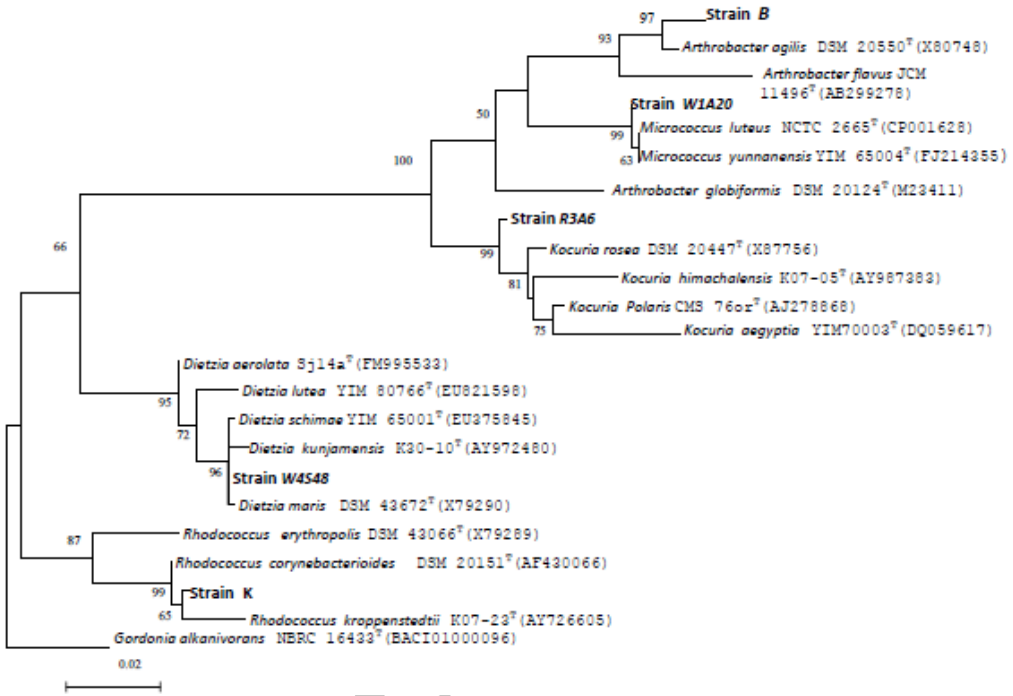
شکل ۴- درخت فیلوژنی سویه های وابسته به رده *Firmicutes* به روش Maximum likelihood

بحث

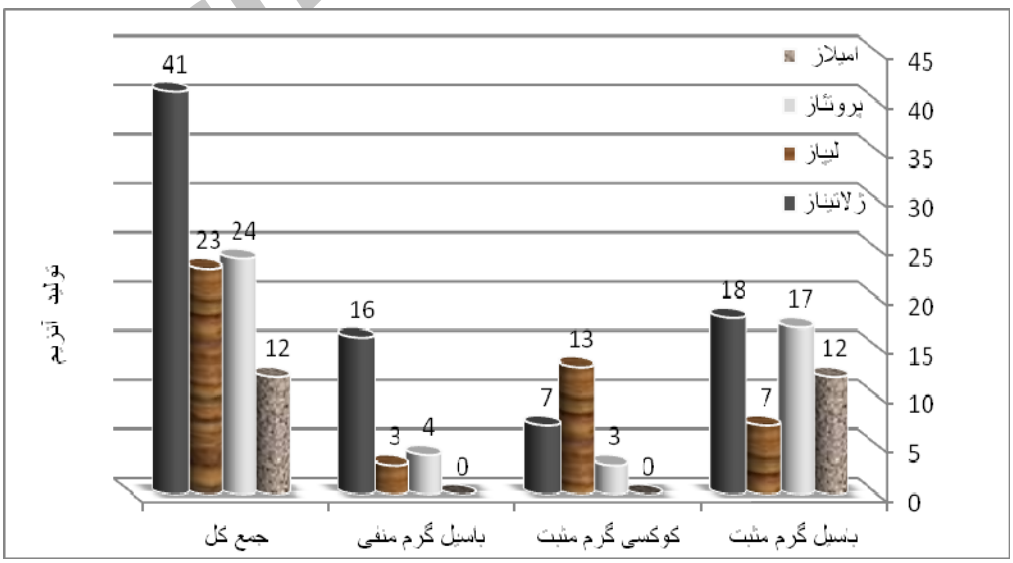
با توجه به اینکه این پژوهش با روشهای مبتنی بر کشت انجام گرفته است، آنچه که از بررسی نتایج آن به دست می‌آید تنها در مورد گروههای قابل کشت تالاب قابل بحث خواهد بود. بر این اساس و با در نظر گرفتن سهم کوچک میکروارگانیسم‌های قابل کشت در مقایسه با جامعه میکربی، همچنین با توجه به اینکه ، پیش از این پژوهشی بر روی میکروارگانیسم‌های غیرقابل کشت این دریاچه انجام نگرفته است، مقایسه نتایج به دست آمده از نظر بازده روشهای کشت به کار گرفته شده یا تعیین نقش گروههای میکربی جداسازی شده در حفظ عملکرد زیست‌بوم امکان‌پذیر نخواهد بود. تنوع میکربی مشاهده شده، باتوجه

www.SID.ir

به تفاوت اندازه‌های فیزیکی میکروارگانیسم‌ها با ابعاد مورد مطالعه در پژوهشهای بوم‌شناختی، تابعی از گستردگی فضاهای مورد بررسی و تعداد نمونه‌برداری است. به همین دلیل در بررسیهای میکربی، حتی در روشهای مستقل از کشت، بحث از تنوع شناسایی شده خواهد بود ولی عمومیت دادن آن به تنوع موجود و جامعه اصلی میکربی از نظر آماری صحیح نمی‌باشد(۱۸).



شکل ۵- درخت فیلوژنی سویه های وابسته به رده *Actinobacteria* به روش Maximum likelihood



شکل ۶ – نمودار تولید آنزیمهای هیدرولیتیک

www.SID.ir

نتایج حاصل از این پژوهش در مقایسه با مطالعات قبلی بر روی اکوسیستمهای پرشور به ویژه ، مطالعات Caton و همکارانش در سال ۲۰۰۴ برروی Great Salt Plains اوکلاهاما(۱۱) ، Ghozlan و همکارانش درمناطق پرشور کشور مصر (۱۵) و آموزگار و همکارانش بر روی دریاچه نمک آران و بیدگل (۱، ۲ و۵) از نظر فراوانی باسیلهای گرم مثبت جدا شده مشابه بود . اما تفاوتهای قابل ملاحظه ای نیز در آن مشاهده می شود .دراین پژوهش کوکوس گرم منفی جدا نگردید و کوکوس های گرم مثبت همگی به رده *Actinobacteria* متعلق بودند. بیشترین تعداد جدایه ها متعلق به رده*Firmicutes* بودند که بیشترین قرابت ژنتیکی را به جنسهای *Bacillus , Oceanobacillus , Virgibacillus, Thalassobacillus* و *Halobacillus* نشان دادند. تفاوتهای مشاهده شده را می توان به ویژگیهای متفاوت زیستگاههای مختلف نسبت داد. ویژگیهای مختلف آب و هوایی و زیستی هر منطقه و نوع بستر آن، در تعیین میزان و نوع تنوع زیستی مورد انتظار در آن تأثیرگذار خواهد بود بهطوریکه تنوع زیستی هر زیستگاه از ویژگیهای منحصربه فرد آن محسوب می شود. به همین دلیل هم اهمیت پژوهش بر روی محیطهای جدید با افزایش محیطهای دیگری که بررسی شدهاند کاهش پیدا نمیکند.

از نکات قابل توجه در این پژوهش می توان به جداسازی سه جنس *Dietzia , Desmospora* و *Rhodococcus* اشاره کرد که در پژوهشهای مشابه بر روی مناطق پرشور ایران به جداسازی آنها اشاره نشده است (۲، ۴، ۵، ۶ و ۹). همان طور که در بخش نتایج ذکر شده ، ۵۵ جدایه تعیین ترادف شده در این پژوهش ،از نظر تولید ۴ آنزیم آمیلاز ، پروتئاز ، لیپاز و ژلاتیناز بررسی گردیدند و با توجه به نتایج ، باسیلهای گرم مثبت بیشترین سهم را در تولید انواع آنزیمهای هیدرولیتیک به ویژه ژلاتیناز وآمیلاز داشتند . توانایی۲۵ سویه در تولید آنزیم پروتئاز قابل توجه بود . پروتئاز ها در تولید دترجنت ها، در صنایع غذایی و لبنیات ، در انعقاد و بهبود طعم شیر ودر صنعت تولید کاغذ دارای اهمیت زیادی هستند. سویه های تولید کننده این آنزیم در بین باسیلهای گرم مثبت متعلق به جنسهای *Bacillus , Virgibacillus, Oceanobacillus, Halobacillus*, و از بین باسیلهای گرم منفی به ۲ جنس *Marinobacter* و *Halomonas* تعلق داشتند .از کوکوس های گرم مثبت فقط ۲ جنس *Arthrobacter* و *Micrococcus* تولیدکننده پروتئاز بودند.

آنزیم مورد بررسی بعدی لیپاز بود که امروزه در تولید دترجنت ها برای حذف زنجیره لیپیدی ، در صنایع غذایی و لبنیات برای بهبود طعم پنیر ، در صنعت تولید نان برای بهبود کیفیت خمیر با خاصیت امولسیفایری و همچنین در صنعت تولید کاغذ ، خمیر کاغذ و صنایع چرم سازی مورد توجه زیادی قرار گرفته است .در تولید آنزیم لیپاز علاوه بر سویه های متعلق به جنسهای *Bacillus Thalassobacillus* و *Marinobacter* ،کوکوس های گرم مثبت متعلق به جنسهای *Rhodococcus , Micrococcus , Dietzia* و *Kocuria* نقش پررنگی داشتند که در مطالعات مشابه قبلی به آن اشاره ای نشده است .

از مهم ترین آنزیمهای هیدرولیتیک تولید شده توسط این سویه ها آمیلاز بود که تولید کنندگان آن گونه های مختلفی از جنس *Bacillus* بودند و جالب است که کوکوس های گرم مثبت و باسیلهای گرم منفی شناسایی شده در این پژوهش هیچ کدام تولید کننده آمیلاز نبودند. از کاربردهای این آنزیم در صنعت می توان به ساخت دترجنت برای حذف نشاسته ، نرم کردن و حجم دادن به خمیر نان ، تولید محصولات کم کالری، صنایع تولید کاغذ و صنایع نساجی اشاره کرد . در تولید آنزیم ژلاتیناز از کوکوس های گرم مثبت *Kocuria* و سپس *Micrococcus*در تولید این آنزیم نقش عمده داشتند ، از باسیلهای گرم منفی*Halomonas* و از باسیلهای گرم مثبت

Archive of SID

www.SID.ir

Oceanobacillus ,*Halobacillus* تولید کننده ژلاتیناز بودند.

فرآیندهای صنعتی معمولا" تحت شرایط فیزیکی وشیمیایی انجام می گیرند که غالباً مطلوب و بهینه فعالیت آنزیمهایی که امروزه استفاده می شود ،نیست ، بنا به این دلیل آنزیمهایی که بتوانند دارای بهینه فعالیت در شرایط سخت صنعتی از نظر دما و نمک باشند اهمیت بسیار بالایی دارند و نمک دوستها منبع احتمالی مناسب برای چنین آنزیمهایی هستند، در حقیقت آنزیمهای به دست آمده از نمک دوستها نه تنها به نمک تحمل داشته بلکه بسیاری از آنها تحمل پذیر حرارت نیز می باشند. جدا سازی سویه های نمک دوست قادر به تولید آنزیمهای خارج سلولی این امکان را فراهم می کند که در غلظتهای مختلف نمک فعالیتهای بهینه همچنان امکان پذیر باشد.

از دیگر نکات حائز اهمیت در مورد اکوسیستم این تالاب تغییرات pH آب این تالاب است .در پژوهشی که سالها قبل توسط بهروزی راد و همکاران بر روی این تالاب انجام گرفته ، pH آن حدود ۸ گزارش گردیده است(۳) اما به دلیل ورود پساب مملو از اسید سولفوریک کارخانه استخراج یدی که در سال ۱۳۸۵ در مجاورت این تالاب احداث گردیده ، تنها با گذشت ۴ سال، pH تالاب حداقل ۳ درجه کاهش یافته است ودر مناطق مجاور خروجی پساب به ۲/۸ نیز رسیده است . نکته قابل توجه این است که برخلاف انتظار نه تنها از این تالاب باکتری اسید دوست جدا نگردید بلکه ۲ سویه نزدیک به گونه های آلکالوفیل *Halobacillus alkaliphilus* و *Bacillus horikoshii* جدا شد و بهینه رشد برای اغلب جدایه ها در pH حدود ۸ مشاهده گردید . از سوی دیگر با استخراج نمک و بازگشت آب شیرین به تالاب تنش مضاعفی به اکوسیستم وارد شده که این مجموعه عوامل می توانند دلایل کاهش بار میکروبی این تالاب نسبت به سایر مناطق پرشور بررسی شده، باشند . طبیعی است بسیاری از تالابها درحال تغییر شکل هستند و به مرور زمان از بین می روند و نیازی نیست بشر تسریع کننده این وضعیت باشد.

تشکر وقدر دانی:

این پژوهش توسط مرکز ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران مورد حمایت مالی قرار گرفت .

منابع

۱ – باباولیان ، حمید .(۱۳۸۶) تنوع زیستی باکتریهای نمک دوست نسبی تولید کننده آنزیمهای هیدرولیتیک دریاچه نمک آران و بیدگل ، پایان نامه کارشناسی ارشد ، دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم ، ایران

۲- باقری، مریم . (۱۳۸۸) بررسی تنوع باکتریهای نمک دوست نسبی هتروتروف ، هوازی وقابل کشت در دریاچه آران وبیدگل ، پایان نامه کارشناسی ارشد ، دانشگاه تهران، ایران

۳-بهروزی راد، بهروز. (۱۳۸۷) تالابهای ایران . انتشارات سازمان جغرافیایی نیروهای مسلح،تهران

۴- جاوید، حسین. (۱۳۸۳) جداسازی میکروارگانیسم های هالوفیل و هالو تولرنت از دریاچه بختگان و اثر فاکتورهای فیزیکی – شیمیایی بر فراوانی آنها. ، پایان نامه کارشناسی ارشد ، دانشگاه آزاد اسلامی واحد جهرم، ایران

۵ – دیدری خمسه مطلق ، مریم . (۱۳۸۸) بررسی تنوع زیستی باکتریهای تحمل کننده نمک هتروتروف ، هوازی وقابل کشت در دریاچه آران وبیدگل ، پایان نامه کارشناسی ارشد ، دانشگاه تهران ، ایران

۶- رهبان ، رخساره .(۱۳۸۷) بررسی تنوع زیستی باکتری های نمک دوست تولید کننده آنزیمهای هیدرولیتیک ساکن در دریاچه حوض سلطان، پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم وتحقیقات ، تهران ، ایران

۷- زهرایی ، شیرین.(۱۳۸۶) تنوع میکروارگانیسم های نمک دوست تولید کننده آنزیمهای خارج سلولی در دریاچه ارومیه. ، پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه تهران ، ایران

۸ – متشرعی، زینب السادات.(۱۳۸۶) اثر اکسی آنیون های مختلف بر مقاومت به تلوریت در باکتریهای نمک دوست وغیر نمک دوست ، پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه تهران ، ایران

۹- مهرشاد، ملیحه . (۱۳۹۰) مطالعه تنوع باکتریهای نمک دوست نسبی و تحمل کننده نمک هتروتروف هوازی سواحل غربی

Archive of SID

www.SID.ir

دریاچه ارومیه باروش وابسته به کشت و غیر وابسته به کشت

20-Marmur, J. (1961). A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from micro-organisms. J Molec Biol 3 .208-218.

21-Murray, R. G. E., Doetsch, R. N. & Robinow, C. F. (1994).Determinative and cytological light microscopy. In Methods for General and Molecular Bacteriology.21–41. Edited by P. Gerhardt,R. G. E. Murray, W. A. Wood & N. R. Krieg. Washington, DC:American Society for Microbiology.

22-Rodriguez-Valera, F. (2003) Characteristics and microbial ecology of hypersaline environments. Halophilic bacteria, 1: 3–30.

23-Sanchez-Porro, C., Martin, S., Mellado, E., Ventosa, A.,(2003) Diversity of moderately halophilic bacteria producing extracellular hydrolytic enzymes, Applied microbiology. 94:295-300.

24-Smibert, R. M. & Krieg, N. R.(1994). Phenotypic characterization. In Methods for General and Molecular Bacteriology. 607–654. Edited by P. Gerhardt, R. G. E. Murray, W. A. Wood & N. R. Krieg.

25-Spencer, J., A. de Spencer, and A. de Spencer Alicia, (2004) Environmental microbiology: methods and protocols: Humana Press Inc., US.

26-Stackebrandt, E. and J. Ebers, (2006)Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards. Microbiology today. 33:152.

27-Tamura, K., J. Dudley, et al. (2007). "MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0." Molecular biology and volution..24:1596

28-Woese et al., 1998., Prokaryotes :an overview with respect to biodiversity and environmental importance, Biodiversity and conservation.227-236

29-Yeon, S. H., W. J. Jeong, et al. (2005). "The diversity of culturable organotrophic bacteria from local solar salterns." J. Microbiol .43:1-10.

پایان نامه کارشناسی ارشد ، دانشگاه تهران ، ایران

10- Amoozegar, M. Ghasemi, A. Razavi, M. Naddaf, S. (2007) Evaluation of hexavalent chromium reduction by chromate-resistant moderately halophile, Nesterenkonia sp. strain MF2

11- Caton, T. (2004) Halotolerant aerobic heterotrophic bacteria from the Great Salt Plains of Oklahoma. Microbial Ecology..48:449-462.

12-Cowan،D.A. (1991), Industrial enzymes in Biotechnology business.، Moses،V. and Cape،R.E، Harwood academic publishers.311-341

13-Felsenstein, J.(1993). PHYLIP (phylogenetic inference package), version3.5c. Department of Genetics, University of Washington, Seattle, WA, USA.

14-Gerhardt, P., Murray, R.,Wood ,W., and Krieg, N. (1994) Phenotypic haracterization Methods for General and Molecular Bacteriology. 607–654.

15-Ghozlan, H., Deif, H., Abu Kandil, R. and Sabry, S. (2006). Biodiversity of moderately halophilic bacteria in hypersaline habitats in Egypt. The Journal of General and Applied Microbiology.52: 63-72.

16-Grant, W., Kamekura, M.,McGenity, T.and Ventosa, A. (2001) Class III. Halobacteria class. nov, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.294–301.

17-Horner, D. and Pesole, G. (2003) The estimation of relative site variability among aligned homologous protein sequences, Oxford Univ Press. 600- 606.

18-Hughes, J., et al.,(2001) *Counting the uncountable: statistical approaches to estimating microbial diversity*. Am Soc Microbiol. 4399-4406

19-Kolmodin, L., and Williams, J. (1997) PCR. Basic principles and routine practice, Methods in molecular biology (Clifton, NJ)

Archive of SID

www.SID.ir

Diversity of culturable moderate halophilic and halotolerant bacteria in incheh boroun hyper saline wetland in Iran

Zarparvar P.[1]; Amoozegar M.A.[2,*] and Fallahian M.R.[3]

[1] **Biology Dept., Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, I.R. of Iran**

[2] **Extremophiles Laboratory, Microbiology Dept., School of Biology and Center of excellence in Phylogeny of Living Organisms , College of Science, University of Tehran, Tehran, I.R. of Iran**

[3] **Biology Dept., North Branch, Islamic Azad University, Tehran, I.R. of Iran**

Abstract

Incheh Borun hypersaline wetland is located near the border of Turkmenistan,in north of Iran. This wetland is remarkable because of salinity and variation in pH range. sampling was carried out from soil, water and salt in September 2010. 400 strains were purified and 55 strains were selected randomly for PCR. Genera: *Bacillus* (18%), *Marinobacter* (16%), *Halomonas* (16%), *Kocuria* (9%), *Oceanobacillus* (7%), *Dietzia* (7%), *Virgibacillus* (6%), *Chromohalobacte*r (5%), *Rhodococcus* (2%), *Micrococcus* (3%), *Paenibacillus* (2%), *Halobacillus* (3%), *Thalassobacillus* (2%), *Arthrobacter* (2%) and *Desmospora* (2%) were isolated 13 strains showing 97-98.4 % similarity and 7 strains had less than 97% similarity in 16S rRNA sequencing which is showed significant differences in the level of species or even genus. Optimum growth for salt was evaluated and 22 strains were moderate halophile and 33 strains were halotolerant. Producing 4 hydrolytic enzymes was evaluated which the main producers of hydrolytic enzymes were Gram-positive bacilli and the most frequent enzyme was Gelatinase and Protease.

Key words: Biodiversity, Moderate halophil bacteria, Halotolerant bacteria, Incheh Boroun wetland

Archive of SID

www.SID.ir