Modares Journal of Biotechnology. 2018;9(1):137-144

Evaluation of Prokaryotic Diversity in Hypersaline Environment by Culture-independent Method

ARTICLE INFO

Article Type
Original Research

Authors
Jookar Kashi F.* *PhD*,
Owlia P.[1] *PhD*,
Amoozegar M.A.[2] *PhD*

How to cite this article
Jookar Kashi F, Owlia P, Amoozegar M A. Evaluation of Prokaryotic Diversity in Hypersaline Environment by Culture-independent Method. Mo-dares Journal of Biotechnology. 2018;9(1):137-144.

*Biotechnology Department, Chemistry Faculty, University of Kashan, Kashan, Iran
[1]Molecular Microbiology Research Center, Shahed University, Tehran, Iran
[2]Microbiology Department, Biology & Center of Excellence in Phylogeny of Living Organisms Faculty, University of Tehran, Tehran, Iran

Correspondence
Address: University of Kashan, Kilometer 6 of Ghotb-e Ravandi Boulevard Kashan, Iran. Postal Code: 873175315
Phone: +98 (31) 55913042
Fax: +98 (21) 55911121
Jookar@kashanu.ac.ir

Article History
Received: April 9, 2017
Accepted: October 22, 2017
ePublished: March 20, 2018

ABSTRACT

Aims Microorganisms are present not only in common environment, but also in extreme environments. Salt lakes with near or at saturating salinity are spread all over the world. Urmia Salt Lake is one of these hypersaline environments. The present study aimed at evaluating prokaryotic diversity in hypersaline environment by culture-independent method.

Materials & Methods In this experimental study, different regions of Urmia Lake were sampled and the genomic material extracted from the water sample was used as a pattern for the amplification of 16S rDNA and a fragment of the *bop* gene via polymerase chain reaction. By cloning, each of the amplified fragments belonging to a single strain was amplified by T/A cloning vector. To further investigate the biodiversity of Haloarchaea, the biodiversity of *bop* gene was studied in addition to studying 16S rDNA.

Findings By cloning and sequencing, 6 bacteria genera, including Acaryochloris, Adhaeribacter, Brachybacterium, Gloeocapsopsis, Cesiribacter, and Bacillus were identified. Archaeal library belonged to 5 genera, including Halonotius, Halolamina, Haloquadratum, Halomicroarcula, and Halorhabdus. The clone libraries of bacterial belonged to 4 phyla, including Bacteroidetes, Cyanobacteria, Actinobacteria, and Firmicutes. . The clone libraries of bop gene (as a molecular marker) belonged to genera, including Halorubrum, Natrialba, Haloquadratum, and Natrinema. The *bop* phylogeny was closely related to the 16S rDNA phylogeny.

Conclusion By cloning and sequencing, 6 bacteria genera, including Acaryochloris, Adhaeribacter, Brachybacterium, Gloeocapsopsis, Cesiribacter, and Bacillus were identified. The *bop* phylogeny is closely related to the 16S rDNA phylogeny.

Keywords Hypersaline Environment; *bop* Gene; Metagenomics; Haloarchaea

CITATION LINKS

[1] Semantic and ... [2] Exploring prokaryotic diversity in the genomic ... [3] Determination of microbial diversity in environmental samples: Pitfalls of PCR-based rRNA ... [4] Culture-dependent and culture-independent diversity surveys target different bacteria: A case study in a freshwater ... [5] Molecular Techniques to assess microbial community structure, function and dynamics in the ... [6] Diversity of bacteriorhodopsins in different hypersaline waters from a single Spanish ... [7] Diversity of halophilic archaea in the crystallizers of an Adriatic solar ... [8] Bop gene cluster expression in bacteriorhodopsin-overproducing mutants of halobacterium ... [9] Archaeal biodiversity in crystallizer ponds from a solar saltern: Culture versus ... [10] Archaea in coastal marine ... [11] Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic ... [12] Investigating deep phylogenetic relationships among cyanobacteria and plastids by small subunit rRNA sequence ... [13] Clustal W and Clustal X version ... [14] BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor andanalysis program for Windows 95 ... [15] MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis ... [16] Confidence limits on phylogenies: An approach using ... [17] Cultivation of unculturable soil ... [18] Isolating “uncultivable” microorganisms in pure culture in a simulated natural ... [19] Advances in understanding the biology of halophilic ... [20] Biodiversity of moderately halophilic and halotolerant bacteria in the western coastal line of Urmia ... [21] Study of variety of extreme aerobic halophyte prokaryotes on the west coast of Lake Uromieh using by dependent and independent cultivated ... [22] Prokaryotic diversity in Aran-Bidgol salt lake, the largest hypersaline playa in ... [23] Cultivating the uncultured: Limits, advances and future ... [24] Counting the uncountable: Statistical approaches to estimating microbial ...

Copyright© 2018, TMU Press. This open-access article is published under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License which permits Share (copy and redistribute the material in any medium or format) and Adapt (remix, transform, and build upon the material) under the Attribution-NonCommercial terms.

www.SID.ir

بررسی تنوع پروکاریوت‌های اکوسیستم شور به روش غیرقابل کشت

فرشته جوکار کاش* PhD
گروه بیوتکنولوژی، دانشکده شیمی، دانشگاه کاشان، کاشان، ایران
پرویز اولیا PhD
مرکز تحقیقات میکروب‌شناسی ملکولی، دانشگاه شاهد، تهران ،ایران
محمدعلی آموزگار PhD
گروه میکروبیولوژی، دانشکده زیست‌شناسی و قطب تبارزایی موجودات زنده، دانشگاه تهران، تهران، ایران

چکیده
اهداف: میکروارگانیزم‌ها علاوه بر محیط‌های معمولی در محیط‌های افراطی هم حضور دارند. دریاچه‌های نمک با شوری در حد اشباع در سراسر جهان پراکنده هستند. یکی از این محیط‌های پرشور دریاچه ارومیه است. هدف مطالعه حاضر بررسی تنوع پروکاریوت‌های اکوسیستم شور دریاچه ارومیه به روش غیرقابل کشت بود.
مواد و روش‌ها: در پژوهش تجربی حاضر از مناطق مختلف دریاچه ارومیه نمونه‌برداری شد و ماده ژنومی استخراج‌شده از نمونه آب شاخص به‌عنوان الگو برای تکثیر قطعه 16S rDNA و قطعه‌ای از ژن *bop* از طریق واکنش زنجیره‌ای پلیمراز مورد استفاده قرار گرفت. با روش کلونینگ هر یک از قطعات تکثیرشده که مربوط به یک سویه منفرد بودند توسط کیت T/A وکتور تکثیر یافتند. برای بررسی بیشتر تنوع زیستی هالوآرکی‌ها به‌موزات بررسی 16S rDNA، تنوع زیستی ژن *bop* نیز مطالعه شد.
یافته‌ها: با روش کلونینگ و توالی‌یابی شش جنس باکتری شامل آکاریوکلوریس، ادهیری‌باکتر، براکی‌باکتریوم، گلوئوکپسوپسیز، سیزری‌باکتر و باسیلوس شناسایی شدند. کتابخانه ژنی آرکی‌ها متعلق به پنج جنس شامل هالونوتیوس، هالولامینا، هالوکوادراتوم، هالومیکروآرکولا و هالورهابدوس بودند. کتابخانه کلون‌های باکتریایی نیز در چهار راسته باکتریوئیدز، سیانوباکتر، اکتینوباکتر و فرمیتیکوس قرار داشتند. کلون‌های کتابخانه قطعه‌ای از ژن *bop* (به عنوان یک مارکر مولکولی) متعلق به چهار جنس شامل هالوروبروم، نتری‌آلبا، هالوکوادراتوم و نترینما بودند. فیلوژنی *bop* با فیلوژنی 16S rDNA رابطه تنگاتنگی نشان داد.
نتیجه‌گیری: با روش کلونینگ و توالی‌یابی شش جنس باکتری شامل آکاریوکلوریس، ادهیری‌باکتر، براکی‌باکتریوم، گلوئوکپسوپسیز، سیزری‌باکتر و باسیلوس شناسایی شدند. فیلوژنی *bop* با فیلوژنی 16S rDNA رابطه تنگاتنگی دارد.
کلیدواژه‌ها: محیط پرشور، ژن *bop*، متاژنوم، هالوآرکی

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۱/۲۰
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۷/۳۰
*نویسنده مسئول: jookar@kashanu.ac.ir

مقدمه

با وجود تعداد زیاد میکروارگانیزم‌ها، بشر نسبت به بخش بسیار اندکی از آنها دانش دارد. تاکنون ۰/۱ تا ۱% گونه‌های باکتریایی موجود توصیف شده‌اند[1, 2].

با توجه به محدودیت روش کشت در شناسایی تنوع میکروبی استفاده از روش‌های مولکولی غیروابسته به کشت برای بررسی تنوع زیستی میکروارگانیزم‌ها توسعه یافت که این روش‌ها نیز محدودیت‌هایی دارند[3].

دسترسی به تکنیک‌های مولکولی و مستقل از کشت که اغلب با ماده ژنتیکی استخراج‌شده کار می‌کنند، سبب شد گونه‌های غیرقابل کشت شناسایی شوند و به این ترتیب می‌توان بهتر و دقیق‌تر به دنیای میکروارگانیزم‌ها دسترسی پیدا کرد[4].

مجموعه‌ای از ژنوم (متاژنوم یا میکروبیوم) متعلق به میکروارگانیزم‌هایی که با هم زندگی می‌کنند و به‌طور اتفاقی از محیط نمونه‌برداری شده و تعیین ترادف می‌شوند را متاژنومیک می‌گویند. از طریق دسترسی مستقیم به ژنوم میکروارگانیزم‌ها می‌توان دیدگاه کاملی در مورد تنوع ژنتیکی، گونه‌ای، تکامل و میان‌کنش با اجتماع میکروبی محیط را فراهم کرد[5].

برای تشخیص میکروارگانیزم‌ها کل DNA/RNA نمونه محیطی استخراج و با روش‌های مبتنی بر PCR میکروارگانیزم‌ها شناسایی می‌شوند. محصولات PCR حاصل شامل مخلوطی از ژن‌های کل میکروارگانیزم‌های محیط شامل قابل کشت و غیرقابل کشت است. برای تکثیر، ژن‌های حفاظت‌شده اختصاصی پروکاریوت‌ها انتخاب می‌شوند که از نظر عملکرد و ساختار شامل مناطق حفاظت‌شده و متغیر هستند. این ژن‌ها اندازه‌ای مناسب دارند و می‌توانند استاندارد طلایی در مطالعات اکولوژی میکروبی باشند[2, 5].

اخیراً مطالعات پیرامون ژن‌هایی تمرکز یافته است که فعالیت‌های اکولوژیکی را کد می‌کنند. مطالعه تنوع با استفاده از توالی 16S rDNA به‌عنوان مارکر ژنتیکی محدودیت‌هایی دارد. توالی 16S rDNAبسیار حفاظت‌شده است و اطلاعات ژنتیکی در سطح گونه یا زیرگونه را فراهم می‌کند ولی اطلاعات فیزیولوژیکی/ اکولوژیکی ارایه نمی‌دهد[6].

برای مطالعه تنوع زیستی تاکسونومیک در یک حوضچه نمک بهتر است در کنار 16S rDNA، ژن‌های مرتبط با فعالیت اکولوژیکی نظیر *باکتریوردوپسین* نیز به‌عنوان یک مارکر بررسی شوند[7].

ردوپسین‌های پروکاریوتی برای اولین‌بار در آرکی‌های نمک‌دوست افراطی و هالوآرکی‌ها کشف شدند. ردوپسین‌ها گروهی متنوع از پروتئین‌های غشایی شامل رتینال به‌عنوان کروموفور هستند که تنوع قابل ملاحظه‌ای در عملکرد، فیزیولوژی و انتشار دارند. این پروتئین‌ها به‌عنوان پمپ پروتون در غشا، گرادیان الکتروشیمیایی ایجاد می‌کنند که منبع تولید انرژی از نور خورشید است.

در شرایط فقر غذایی باکتریوردوپسین مکانیزم بسیار مفیدی برای کسب انرژی فراهم می‌کند. این پروتئین در محیط‌های نمکی به میزان قابل توجهی حضور دارد که با آنالیز از طریق اسپکتروفتومتری یا روش‌های دیگر قابل شناسایی است. آنالیز ترادف باکتریوردوپسین‌های محیطی میزان تنوع زیستی قابل توجهی را در سطح زیرگونه نشان می‌دهد[7].

ساختار پروتئین باکتریوردوپسین توسط ژن *bop* کد می‌شود که در یک کلاستر حداقل با ۳ ژن دیگر شامل *brp* (پروتئین وابسته به باکتریوردوپسین)، *bat* (فعال‌کننده باکتریوردوپسین) و *blp* (محصولات مرتبط با باکتریوردوپسین) حضور دارند[8].

هدف مطالعه حاضر بررسی تنوع پروکاریوت‌های اکوسیستم شور به روش غیرقابل کشت بود.

مواد و روش‌ها

در پژوهش تجربی حاضر نمونه‌برداری از مناطق مختلف دریاچه نمک ارومیه انجام شد. مشخصات جغرافیایی دقیق مناطق نمونه‌برداری توسط GPS ثبت شد. نمونه‌های مختلف جمع‌آوری‌شده از هر منطقه درون لوله‌های فالکون استریل و کیسه‌های 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.

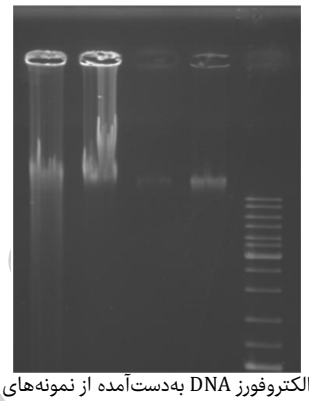
نمونه‌ها در دمای ۴°C و طی یک روز به آزمایشگاه منتقل شدند. از هر یک از نمونه‌های آب ۲۰۰میلی‌لیتر با هم مخلوط و نمونه شاخص تهیه شد. میزان شوری و pH نمونه‌ها با استفاده از

www.SID.ir
Archive of SID

دستگاه مالتی‌متر مدل Multiseven (متلرتولدو؛ ایالات متحده) محاسبه شد.

بررسی تنوع زیستی با استفاده از روش کلونینگ- تعیین توالی: تنوع زیستی با روش غیرقابل کشت برای نمونه‌های شاخص آب انجام شد. برای این منظور بدون جداسازی میکروارگانیزم‌ها، DNA به‌صورت مستقیم از محیط استخراج و با تکثیر و آنالیز ترادف 16S rDNA و قطعه‌ای از ژن *bop* تنوع میکروارگانیزم‌های موجود بررسی شد.

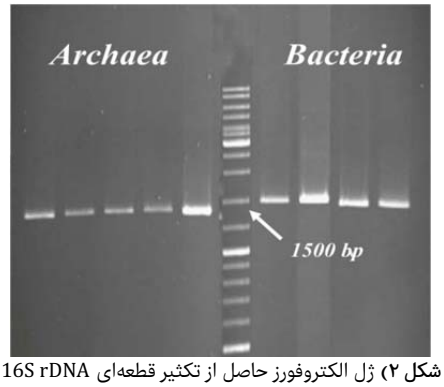
استخراج مستقیم DNA از محیط: در پژوهش حاضر روش ارایه‌شده توسط *بنلوک* و همکاران برای به‌دست آوردن DNA محیطی به کار رفت[9]، سپس DNA استخراج‌شده با انجام ژل الکتروفورز ارزیابی شد (شکل ۱).



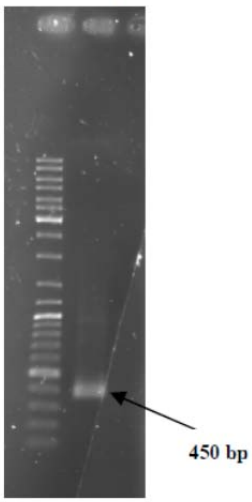
شکل ۱) ژل الکتروفورز DNA به‌دست‌آمده از نمونه‌های شاخص آب

تکثیر قطعه‌ای از ترادف 16S rDNA و ژن *bop* با استفاده از DNA محیطی: تکثیر قطعه‌ای از 16S rDNA با استفاده از آغازگرهای عمومی شامل 5´- 21F [10] TTCCGGTTGATCCYGCCGGA-3´ مخصوص آرکی‌ها و 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') [11] مخصوص باکتری‌ها و پرایمر جهان‌شمول برگشت[12] 5´- 1492R (GGTTACCTTGTTACGACTT-3´) برای هر دو قلمرو انجام شد. قطعه‌ای از ژن *bop* نیز با استفاده از آغازگرهای 5'-bop_1 GACTGGYTGTTCACSACRCC-3' و 5'- bop_2 ASGTCRAKSACCATGAA-3' تکثیر شد[6].

استخراج DNA ژنومی و تکثیر قطعه‌ای از 16S rDNA (۱۵۰۰جفت‌باز) و قطعه‌ای از ژن *bop* (۴۰۰جفت‌باز) با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز تایید شدند (شکل‌های ۲ و ۳). محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمراز تعیین ترادف شد، سپس نتایج حاصل از آن برای تجزیه و تحلیل‌های فیلوژنتیک مورد استفاده قرار گرفت.



شکل ۲) ژل الکتروفورز حاصل از تکثیر قطعه‌ای 16S rDNA



شکل ۳) ژل الکتروفورز حاصل از تکثیر قطعه‌ای ژن *bop*

به‌منظور تکثیر قطعات مورد نظر با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز بافر با غلظت 1X در ترکیب نهایی، کلریدمنیزیم با غلظت ۲/۵ تا ۰/۵میلی‌مول، دئوکسی‌نوکلئوتیدتری‌فسفات با غلظت ۰/۴میلی‌مول از هر کدام، آنزیم *Taq* DNAپلیمراز به میزان 1U و آغازگرهای رفت و برگشت ذکرشده از هر کدام به میزان ۰/۴ تا ۰/۵میلی‌مول و DNA الگو به میزان مناسب استفاده شد. برای حصول اطمینان از عدم آلودگی مواد مورد استفاده در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز شاهد منفی با افزودن آب به‌جای DNA الگو در ویال حاوی مخلوط واکنش به کار رفت.

برای انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، واسرشت اولیه با دمای ۹۵°C به‌مدت ۵دقیقه و ۳۰ چرخه تکرارشونده شامل واسرشت با دمای ۹۴°C به‌مدت یک‌دقیقه و اتصال با دمای بین ۵۰°C تا ۵۵°C به‌مدت ۵۰ تا ۶۰ثانیه و سنتز با دمای ۷۲°C به‌مدت ۶۰ثانیه و پس از اتمام ۳۰ چرخه برای سنتز نهایی با دمای ۷۲°C برای مدت ۷دقیقه در نظر گرفته شد.

محصول نهایی حاصل از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز توسط روش ختم سنتز DNA به شکل رفت و برگشت تعیین ترادف شد (ماکروژن؛ کره جنوبی).

خالص‌سازی قطعات ژن‌های تکثیرشده از ژل: صحت اندازه توالی محصولات واکنش PCR با مقایسه با توالی نشانگر مشخص شدند (شکل‌های ۲ و ۳)، سپس با استفاده از کیت استخراج DNA از ژل (Roche؛ سوییس) استخراج شد. محصولات فاقد باند غیراختصاصی و با غلظت مناسب به‌منظور انجام کلونینگ استفاده شدند. با استفاده از روش کلونینگ هر یک از قطعات تکثیرشده از قطعه 16S rDNA و قطعه‌ای از ژن *bop* که مربوط به یک سویه منفرد هستند با استفاده از کیت T/A وکتور (فرمنتاز؛ ایالات متحده) به وکتور pTZ57R/T انتقال یافتند و درون باکتری *E. coli* سویه XL1-Blue به‌عنوان میزبان کلونینگ تکثیر شدند.

واکنش اتصال در حجم نهایی ۳۰میکرولیتر شامل یک‌میکرولیتر آنزیم T4 ligase، ۳میکرولیتر وکتور، یک‌میکرولیتر rATP و ۶میکرولیتر بافر و DNA ورودی بسته به غلظت انجام شد. پس از افزودن همه ترکیبات، ویال در دمای ۲۲°C برای مدت ۱۶ساعت قرار داده شد. براساس توصیه کیت و فرمول‌های ارایه‌شده میزان ژن ورودی ۵/۷نانوگرم به دست آمد.

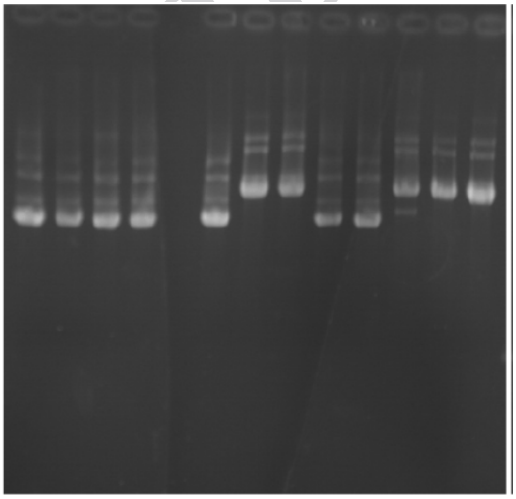
Archive of SID

www.SID.ir

حجم مورد نیاز از DNA ورودی با مقایسه آن با غلظت توالی نشانگر محاسبه شد.

سلول‌های میزبان برای انتقال وکتور ابتدا مستعد شدند و سپس فرآیند ورود وکتور به سلول انجام شد. از روش شوک حرارتی به‌مدت ۲دقیقه در دمای ۴۲°C برای انتقال پلاسمید درون باکتری مستعد استفاده شد. جداسازی سلول‌های واجد پلاسمید نوترکیب با استفاده از غربالگری سفید و آبی انجام و کلنی‌های سفید انتخاب شدند، سپس کتابخانه‌ای از آنها تهیه شد.

به این ترتیب دو کتابخانه ژنی (دو قلمرو آرکی و باکتری) برای ژن 16S rDNA و یک کتابخانه ژنی برای ژن *bop* ایجاد شد. تعدادی کلون از هر کتابخانه به‌صورت تصادفی انتخاب شدند. به‌منظور استخراج پلاسمید کلون‌های منتخب در ۵میلی‌لیتر محیط کشت لوریا-برتانی آگار (LB) واجد آنتی‌بیوتیک، تلقیح و پس از یک شب گرمخانه‌گذاری پلاسمیدها با استفاده از کیت استخراج پلاسمید Miniprep (Gene All؛ کره جنوبی) استخراج شدند. با انجام الکتروفورز صحت مراحل استخراج و ورود قطعه DNA به وکتور با توجه به اندازه پلاسمید روی ژل ارزیابی شد (شکل ۴).



شکل ۴) ژل استخراج پلاسمید واجد قطعه‌ای 16S rDNA و ژن *bop*

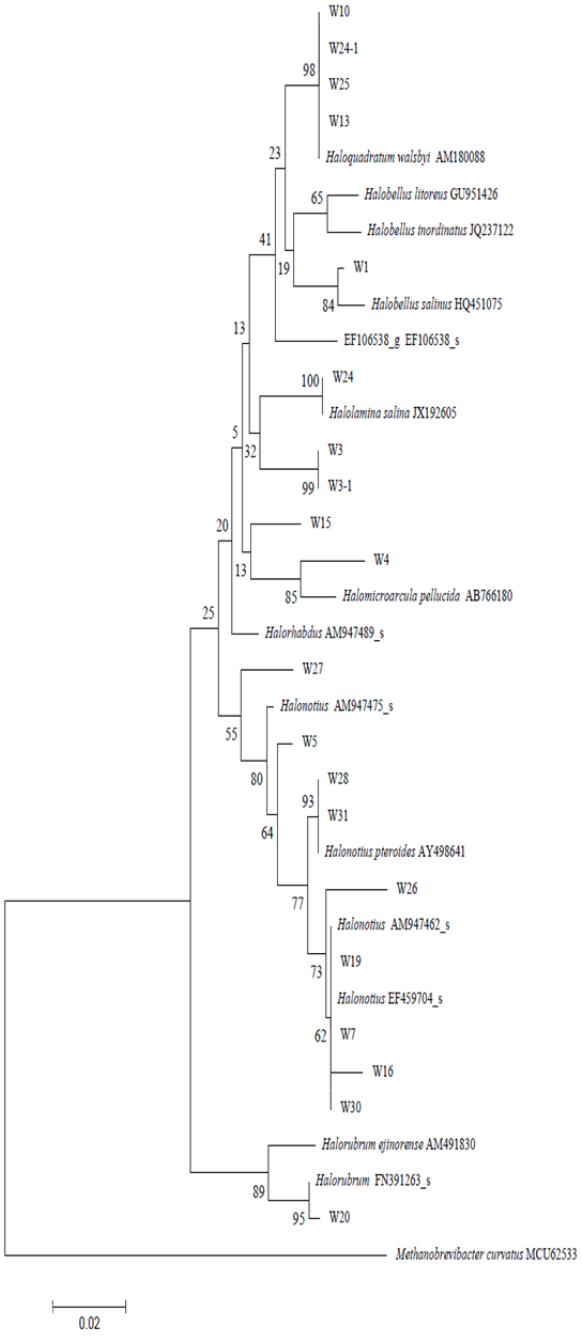
برای حصول اطمینان از ورود قطعه مورد نظر به پلاسمید با استفاده از پرایمرهای رفت و برگشت M13 و پلاسمید به‌عنوان قطعه DNA الگو واکنش PCR صورت گرفت و سپس محصول PCR روی ژل الکتروفورز ارزیابی شد. حضور باندهایی با طول بیش از ۱۵۰۰ و ۴۵۰جفت‌باز نشان‌دهنده ورود قطعه مورد نظر به پلاسمید بود. در نهایت پلاسمیدها با استفاده از پرایمرهای رفت و برگشت M13 مربوط به وکتور تعیین توالی شدند (ماکروژن؛ کره جنوبی).

توالی‌های به‌دست‌آمده با استفاده از نرم‌افزارهای Pro Chromas 2.1.8 و Bioedit ویرایش، همچنین از نظر وجود کایمر با نرم‌افزار Bellerphon بررسی شدند. توالی‌های ویرایش‌شده برای مطالعات فیلوژنتیکی بعدی ذخیره شدند.

توالی‌های 16S rDNA ویرایش‌شده با توالی‌های معتبر ثبت‌شده در پایگاه Eztaxon به آدرس http://eztaxon-e.ezbiocloud.net و توالی ژن *bop* در پایگاه NCBI با نزدیک‌ترین سویه از نظر توالی ژن‌های مذکور مقایسه شد. تحلیل فیلوژنتیک سویه‌ها پس از یافتن توالی‌های مشابه و همراستاسازی توالی‌ها، ویرایش و رسم درخت فیلوژنتیک (شکل‌های ۵ و ۶) با استفاده از نرم‌افزارهای Clustal X2 2.0 [13]، BioEdit [14] و MEGA 5 [15] و با الگوریتم اتصال- همسایگی (Neighbor-joining) انجام شد.

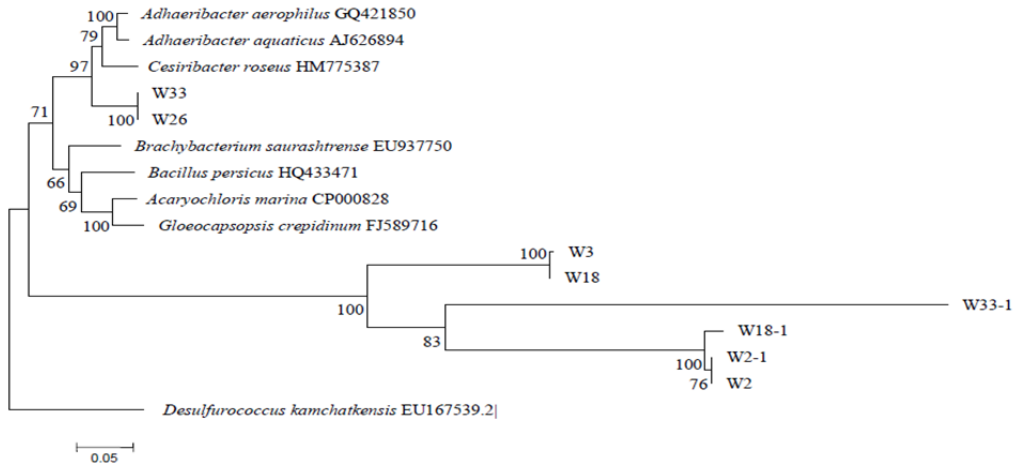
بررسی شاخه‌های درخت با استفاده از الگوریتم analysis Bootstrap با ۱۰۰۰ بار نمونه‌گیری انجام شد[16].

توالی‌های ویرایش‌شده با استفاده از نرم‌افزار MUSCLE و مرز تشابه ۹۷% به گروه‌های تاکسونومیکی مختلف تقسیم‌بندی، سپس توالی‌های به‌دست‌آمده پس از حذف توالی‌های کایمر در بانک ژنی NCBI ثبت شدند.



شکل ۵) درخت فیلوژنتیک جدایه‌های آرکی کتابخانه ژنومی برای نمایش روابط فیلوژنتیک سویه‌های جداسازی‌شده با استفاده از روش اتصال- همبستگی و اعداد ذکرشده در محل انشعاب نشانگر درصد نمونه‌گیری Bootstrap از ۱۰۰۰ نمونه است.
سویه MCU62533 از *متانوبریوبیاکتر کوروانوس* (*Methanobrevibacter curvatus* MCU62533) به‌عنوان outgroup قرار داده شد.

www.SID.ir



شکل ۶) درخت فیلوژنتیک اتصال- همسایگی توالی‌های 16S rDNA باکتریایی کتابخانه ژنومی به‌دست‌آمده در پژوهش حاضر با استفاده از روش کلونینگ و توالی‌یابی و اعداد ذکرشده در محل انشعاب نشانگر درصد نمونه گیری Bootstrap از ۱۰۰۰ نمونه است.
قرار داده شد.out group) به‌عنوان |Desulfurococcus kamchatkensis EU167539.2 از *دیسولفورکوکوس کامچاکنزیز* (EU167539.2سویه

یافته‌ها

میزان شوری نمونه‌های شاخص ۲۸% و pH برابر ۷/۲ بود.
طبق مقایسه میزان شباهت توالی 16Sr DNA کلون‌های منتخب از کتابخانه ژنی آرکی‌ها با سویه‌های استاندارد ثبت‌شده در پایگاه داده Eztaxon، بیشترین شباهت، ۹۹% و کمترین ۹۳/۲% در میان کلون‌ها مشاهده شد.
کلون‌های آرکی متعلق به جنس‌های هالونوتیوس (Halonotius)، هالولامینا (Halolamina)، هالوکوادراتوم (Haloquadratum)، هالومیکروآرکولا (Halomicroarcula) و هالورهابدوس (Halorhabdus) بودند.
از نظر فیلوژنی کلون‌های تعیین ترادف‌شده آرکی شامل سویه AY498641 از *هالونوتیوس پتروئیدز* (*Halonotius pteroides*AY498641؛ ۲۰%)، *Halonotius* EF459704_s EF459704 (۱۰%)، سویه JX192605 از *هالولامینا سالینا* (*Halolamina salina*JX192605؛ ۱۰%)، سویه AM180088 از *هالوکوادراتوم والسبی* (*Haloquadratum walsbyi* AM180088؛ ۱۵%)، سویه AB766180 از *هالومیکروآرکولا پلوسیدا* (*Halomicroarcula pellucida*AB766180؛ ۵%)، سویه EF127229 از *هالورهابدوس تیاماتا* (*Halorhabdus tiamatea* EF127229؛ ۵%)، سویه JQ237122 از *هالوبلوس اینوردیناتوس* (*Halobellus inordinatus* JQ237122؛ ۵%)، *Halonotius* AM947462_s AM947462 (۵%)، *Halorubrum* FN391263_s FN391263 (۵%)، سویه AM491830 از *هالوروبروم ایجینورنس* (*Halorubrum ejinorense*؛ ۵%)، *Halonotius* AM947475_s AM947475 (۵%)، سویه GU951426 از هالوبلوس لیتوروس (*Halobellus litoreus* GU951426؛ ۵%)، EF106538_s EF106538 (۵%) بودند.
تمام این کلون‌ها در راسته پهن‌باستانیان (Euryarchaeota) و خانواده هالوباکتریاسه قرار داشتند (جدول ۱).
طبق مقایسه میزان شباهت توالی 16S rDNA کلون‌های منتخب از کتابخانه ژنی باکتری‌ها با سویه‌های استاندارد ثبت‌شده در پایگاه داده Eztaxon، بیشترین شباهت، ۹۰/۷% و کمترین ۸۲/۲% در میان کلون‌ها مشاهده شد (جدول ۲).

جدول ۱) تقسیم‌بندی توالی‌های 16Sr DNA کلون‌های آرکی به گروه‌های تاکسونومیکی و نزدیک‌ترین میکروارگانیزم شناخته‌شده در پایگاه EzTaxon

کد کلون	سویه استاندارد با بیشترین میزان شباهت	درصد شباهت
W7	*Halonotius pteroides* AY498641	۹۶/۵۴
W19	*Halonotius* EF459704_s EF459704	۹۸/۶
W28	*Halonotius pteroides* AY498641	۹۹/۰۴
W24	*Halolamina salina* JX192605	۹۹/۰۹
W25	*Haloquadratum walsbyi* AM180088	۹۹/۰۳
W31	*Halonotius pteroides* AY498641	۹۸/۴۴
W10	*Haloquadratum walsbyi* AM180088	۹۶/۴۷
W4	*Halomicroarcula pellucida* AB766180	۹۴/۷۸
W13	*Halorhabdus tiamatea* EF127229	۹۱/۶۸
W15	*Halobellus inordinatus* JQ237122	۹۰/۴۲
W16	*Halonotius* AM947462_s AM947462	۹۶/۹۳
W20	*Halorubrum* FN391263_s FN391263	۹۷/۹۹
W27	*Halorubrum ejinorense* AM491830	۹۳/۸۷
W30	*Halonotius* EF459704_s EF459704	۹۸/۶۴
W1	*Halobellus salinus* HQ451075	۹۷/۲۸
W5	*Halonotius* AM947475_s AM947475	۹۷/۶۲
W3-1	*Halobellus litoreus* GU951426	۹۰/۴۹
W24-1	*Haloquadratum walsbyi* AM180088	۹۹/۰۳
W26	*Halonotius pteroides* AY498641	۹۳/۲۹
W3	EF106538_s EF106538	۹۰/۸۶

جدول ۲) تقسیم‌بندی توالی‌های 16S rDNA باکتری به گروه‌های تاکسونومیکی و نزدیک‌ترین میکروارگانیزم شناخته‌شده در پایگاه EzTaxon

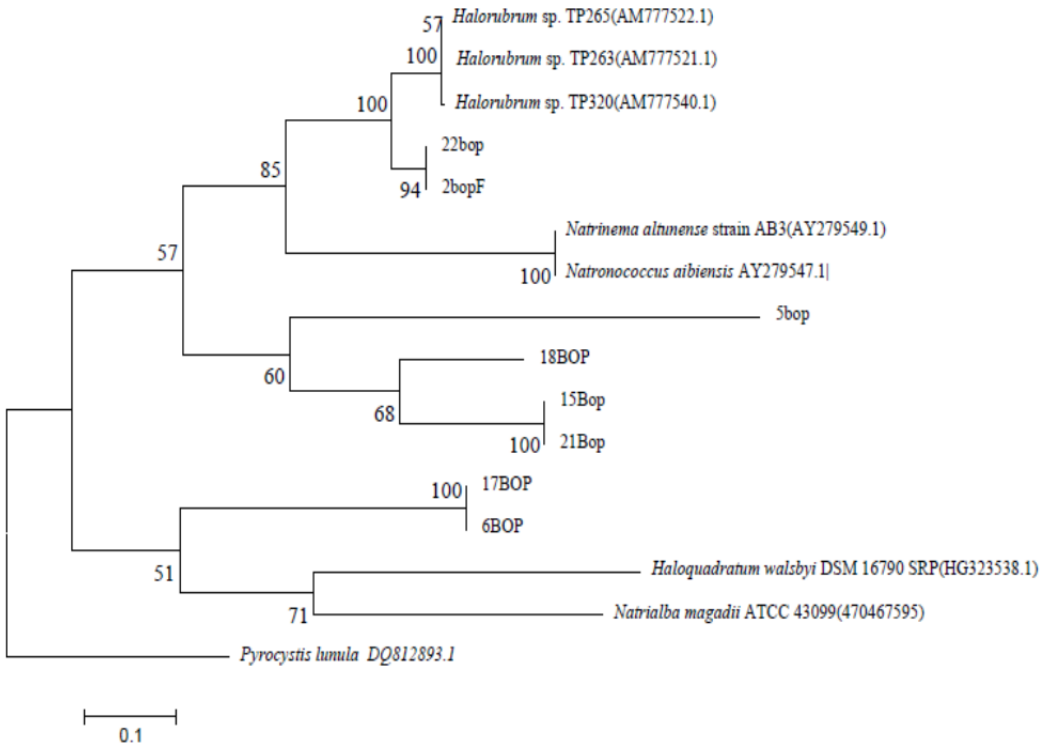
کد کلون	سویه استاندارد با بیشترین میزان شباهت	درصد شباهت
W3	*Acaryochloris marina* CP000828	۹۰/۷۶
W33	*Adhaeribacter aerophilus* GQ421850	۸۲/۸۲
W18	*Brachybacterium saurashtrense* EU937750	۸۲/۷۳
W2	*Gloeocapsopsis crepidinum* FJ589716	۸۷/۹۱
W26	*Adhaeribacter aquaticus* AJ626894	۸۲/۷۴
W33-1	*Cesiribacter roseus* HM775387	۸۸/۲
W18-1	*Bacillus persicus* HQ433471	۸۷/۴۳
W2-1	*Acaryochloris marina* CP000828	۹۱/۲۹

درخت فیلوژنتیک توالی‌های 16S rDNA باکتریایی کتابخانه ژنومی در شکل ۶ نشان داده شده است.
از نظر فیلوژنی کلون‌های تعیین ترادف‌شده شامل سویه CP000828 از *آکاریوکلوریس مارینا* (*Acaryochloris marina*

www.SID.ir

جدول ۳) تقسیم‌بندی توالی‌های قطعه‌ای از ژن *bop* به گروه‌های تاکسونومیکی و نزدیک‌ترین میکروارگانیزم شناخته‌شده در پایگاه NCBI

کد کلون	سویه استاندارد با بیشترین شباهت	بیشترین نمره	نمره کل	Query cover	E Value	Ident%
15 bop	*Natrinema altunense* strain AB3	۱۲۸	۱۲۸	%۶۲	4e-26	%۷۶
6 BOP	*Natrialba magadii* ATCC 43099	۳۷۵	۳۷۵	%۹۷	1e-100	%۸۶
18 Bop	*Halorubrum sp.* TP265 partial *bop* gene for bacteriorhodopsin, strain TP265	٤۱۱	٤۱۱	%۸۶	4e-111	%۸۷
21 bop	*Natrinema altunense* strain AB3	۱۲۸	۱۲۸	%۶۲	4e-26	%۷۶
2 bop	*Halorubrum sp.* TP320	۳۷۵	۳۷۵	%۸٤	1e-100	%۸۷
5 bop	*Haloquadratum walsbyi* DSM 16790	۱۰۰	۱۰۰	%۵۷	1e-18	%۶۹
17 bop	*Natrialba magadii* ATCC 43099	۳۸۱	۳۸۱	%۹٤	3e-102	%۸۶
22 bop	*Halorubrum sp.* TP265	۳۸۳	۳۸۳	%۷۷	8e-103	%۸۷



شکل ۷) درخت فیلوژنتیک اتصال- همسایگی توالی‌های قطعه‌ای از ژن *باکتریوردوپسین* به‌دست‌آمده*bop*
از ۱۰۰۰ نمونه بود.Bootstrapدر پژوهش حاضر با استفاده از روش کلونینگ، توالی‌یابی و اعداد ذکرشده در محل انشعاب نشانگر درصد نمونه‌گیری
قرار داده شد.outgroup) به‌عنوان *Pyrocystis lunula* DQ812893.1 از *پیروسیستیس لونولا* (DQ812893.1سویه

CP000828؛ ۲۵%)، سویه GQ421850 از *ادهیری‌باکتر آئروفیلوس* (*Adhaeribacter aerophilus* GQ421850؛ ۱۲/۵%)، سویه EU937750 از *براکوباکتریوم سارشترنس* (*Brachybacterium saurashtrense* EU937750؛ ۱۲/۵%)، سویه FJ589716 از *گلوئوکپسوپسیز کرپیدینیوم* (*Gloeocapsopsis crepidinum* FJ589716؛ ۱۲/۵%)، سویه AJ626894 از *ادهیری‌باکتر آکواتیکوس* (*Adhaeribacter aquaticus* AJ626894؛ ۱۲/۵%)،سویه HM775387 از *سیزری‌باکتر روزئوس* (*Cesiribacter roseus* HM775387؛ ۱۲/۵%)، سویه HQ433471 از *باسیلوس پریسیکوس* (*Bacillus persicus* HQ433471؛ ۱۲/۵%) بود.

کلون‌های باکتریایی در ۴ راسته باکتریوئیدز (۵۰%)، سیانوباکتر (۲۵%)، اکتینوباکتر (۱۲/۵%) و فرمیتیکوس (۱۲/۵%) قرار داشتند (جدول ۲).

ترادف‌های متعلق به کتابخانه ژن *bop* شامل سویه‌های آرکی شامل *نترینما آلتوننز* (*Natrinema altunense*؛ ۲۵%)، *نتری‌آلبا مگدی* (*Natrialba magadii*؛ ۲۵%)، *هالوکوادراتوم والسبی* (۱۲/۵%)، *Halorubrum sp.* TP265 (۲۵%) و *Halorubrum sp.* TP320 (۱۲/۵%) است (جدول ۳؛ شکل ۷).

بحث

هدف مطالعه حاضر بررسی تنوع پروکاریوت‌های اکوسیستم شور به روش غیرقابل کشت بود.

روش‌های مولکولی جدید نشان داد که تقریبا ۱% کل جمعیت میکروبی را می‌توان در محیط کشت‌های موجود کشت داد[17].

امروزه روش‌های مستقل از کشت متعددی برای بررسی تنوع زیستی زیست‌بوم‌های متنوع استفاده می‌شوند، که اغلب بر مبنای استفاده از ماده ژنتیکی استخراج‌شده به‌صورت مستقیم از نمونه محیطی است. با استفاده از روش‌های فیلوژنتیک و دسته‌بندی میکروارگانیزم‌ها براساس 16S rDNA اطلاعات زیادی در زمینه تنوع زیستی میکروارگانیزم‌های محیطی به دست آمده است و جدایه‌های زیادی با تفاوت بالا نسبت به گونه‌های موجود شناسایی شده‌اند. این ابزارها در بررسی شرایط و روابط اکولوژیکی اهمیت بالایی دارند.

Archive of SID
www.SID.ir

بسیاری از میکروارگانیزم‌های موجود در نمونه‌های محیطی در محیط کشت‌های مورد استفاده قابلیت جداسازی ندارند و این مساله را می‌توان با شرایط رشدی مد نظر برای میکروارگانیزم در محیط‌های کشت مرتبط دانست. در بسیاری از محیط‌های مصنوعی کشت میکروارگانیزم‌ها غلظت بالای یک فاکتور یا عاملی که باعث انتخابی‌شدن شرایط کشت می‌شود، یا عدم وجود یک فاکتور موثر در رشد میکروارگانیزم‌ها از جداسازی بخشی از میکروارگانیزم‌های محیطی جلوگیری می‌کند[18].

آنچه که در روش‌های مستقل از کشت به دست می‌آید شناختی است که براساس نشانه‌های حضور میکروارگانیزم در طبیعت حاصل می‌شود. براساس همین روش‌ها تنوع واقعی میکروارگانیزم‌ها تخمین زده شده است و فاصله روش‌های کشت با آن مشخص می‌شود[19].

در روش مولکولی سد کشت برداشته شده و دسترسی به میکروارگانیزم‌های محیط بدون نیاز به رشد آنها در شرایط مصنوعی آزمایشگاه مسیر است، با این وجود دسترسی به ماده ژنتیکی و توانایی تکثیر ژن مورد نظر در این روش محدودیت‌هایی ایجاد می‌کند. تمامی میکروراگانیزم‌های منطقه در برابر روش استخراج DNA به‌کاربرده‌شده پاسخ یکسانی ندارند. روش استخراج ملایم مانع از استخراج DNA بخشی از میکروراگانیزم‌های موجود شده و این دسته در جمعیت میکروبی شناسایی‌شده، جایی ندارند.

روش‌های شدید استخراج باعث شکسته‌شدن و حذف DNA میکروارگانیزم‌هایی می‌شود که ژنوم آنها ساده‌تر استخراج می‌شوند. در مرحله تکثیر نیز هر چند پرایمرهای جهان‌شمول به کار برده شده است ولی ویژگی پرایمرها و روش تکثیر به‌کاربرده‌شده برای تمامی سویه‌ها یکسان نیست، برخی ساده‌تر تکثیر شده و بخش بزرگ‌تری از جمعیت شناسایی‌شده را تشکیل می‌دهند.

در پژوهش حاضر با به‌کارگیری روش‌های مختلف تکثیر DNA محیطی به‌منظور کاهش جهت‌دارشدن نتایج تلاش شد.

در این پژوهش با روش کلونینگ و توالی‌یابی شش جنس باکتری شامل آکاریوکلوریس، ادهیری‌باکتر، براکی‌باکتریوم، گلوئوکپسوپسیز، سیزری‌باکتر و باسیلوس شناسایی شدند، در حالی که جنس‌های شناسایی‌شده در بررسی سواحل غربی دریاچه ارومیه با روش کلونینگ و توالی‌یابی توسط *مهرشاد* و همکاران در سال ۱۳۹۰ شامل ادهیری‌باکتر، سالینی‌باکتر و سیزری‌باکتر (همه به راسته باکتیوئیدز تعلق داشتند) بودند و سالینی‌باکتر جنس غالب بود. دو جنس سیزری‌باکتر و ادهیری‌باکتر در هر دو پژوهش به‌صورت مشترک گزارش شد[20].

بخش اصلی جمعیت آرکی‌باکتر دریاچه ارومیه که با روش کلونینگ و توالی‌یابی شناسایی شد اعضای راسته هالوباکتریال و اعضای شاخه پهن‌باستانیان (*Euryarchaeota*) بودند که این نتایج مشابه نتایج حاصل از بررسی *اسدی* و همکاران در سال ۱۳۹۰ برای نمونه‌های سواحل غربی دریاچه ارومیه است.

اسدی از سواحل غربی دریاچه ارومیه هشت جنس با روش کلونینگ و توالی‌یابی شناسایی کرد در پژوهش حاضر نیز از نمونه شاخص آب دریاچه ارومیه با روش کلونینگ و توالی‌یابی هشت جنس جداسازی شد. جنس‌های هالولامینا، هالوکوادراتوم، هالونوتیوس، هالوبلوس و هالوروبروم در هر دو پژوهش به‌صورت مشترک شناسایی شدند. توالی هالونوتیوس با اختصاص‌دادن ۴۰%، فراوان‌ترین جمعیت میان کلون‌های بررسی‌شده در سواحل غربی بود[21].

مطالعات صورت‌گرفته توسط *آموزگار* و همکاران روی تنوع زیستی آرکی‌های دریاچه پرشور آران و بیدگل با استفاده از روش کلونینگ و توالی‌یابی نشان داد که توالی‌های مرتبط با جنس هالورهابدوس فراوان‌ترین گروه کلون‌های بررسی‌شده بود. در همان پژوهش ۱۸% توالی‌های به‌دست‌آمده در کتابخانه ژنی آرکی‌ها، اعضای راسته ترموکوکالس (Thermococcales) بوده است[22].

در پژوهش حاضر و همچنین پژوهش سواحل غربی دریاچه تمام کلون‌ها متعلق به راسته هالوباکتریال بودند.

برای بررسی بیشتر تنوع زیستی هالوآرکی‌ها به‌موزات بررسی ژن 16SrRNA، تنوع زیستی ژن *باکتریوردوپسین* نیز مطالعه شد. این پژوهش نشان داد که فیلوژنی باکتریوردوپسین با فیلوژنی 16S rDNA رابطه تنگاتنگی دارد. پیشنهاد می‌شود هالوآرکی‌ها تنها پروکاریوت‌هایی هستند که در محیط‌های پرشور ردوپسین تولید می‌کنند، تنوع هالوآرکی‌ها با انتشار باکتریوردوپسین در محیط‌های نمکی موازی است[6].

تنوع ژن *باکتریوردوپسین* در سال ۲۰۰۳ در دریاچه نمکی سانتا پولا در اسپانیا و در سال ۲۰۰۵ در حوضچه‌های نمکی دریای آدریاتیک در اسلونی بررسی شد که با نتایج پژوهش حاضر در دریاچه ارومیه مشابهت داشت.

سویه‌های *هالوکوادراتوم والسبی* و *نتری‌آلبا مگدی* متعلق به دامین هالوآرکی‌ها که در دریاچه ارومیه گزارش شد، قبلاً در بررسی دو دریاچه مذکور در اسپانیا و اسلونی گزارش نشده بودند[6, 7]. در صورتی که دو جنس هالوآرکولا و هالوباکتریوم در پژوهش اسپانیا و اسلونی برای ژن *باکتریوردوپسین* مشاهده شد و در دریاچه ارومیه این دو جنس شناسایی نشدند.

سویه *نترینما آلتوننز* در دریاچه ارومیه شناسایی شد، این سویه در دریاچه نمک اسلونی نیز گزارش شده اما در دریاچه نمکی سانتا پولا در اسپانیا مشاهده نشد. این سویه در بررسی ژن 16S rDNA با روش کلون در این پژوهش شناسایی نشد. این آرکی در پژوهش *پاسیک* و همکاران در سال ۲۰۰۵ برای ژن *باکتریوردوپسین* نیز گزارش شده بود[7].

به میزان ۳۷/۵% کلون‌های حاصل از ژن *باکتریوردوپسین* به جنس هالوروبروم تعلق داشتند که البته دو کلون یکی متعلق به سویه TP265 و دیگری متعلق به سویه TP320 بود. این جنس در بررسی 16S rDNA در پژوهش حاضر نیز شناسایی شد. این آرکی در پژوهش دو دریاچه نمک در اسلونی و اسپانیا برای ژن *باکتریوردوپسین* نیز گزارش شده بود.

تعداد و تنوع نمونه‌های به‌کاررفته، فصل مختلف نمونه‌برداری، توزیع طبیعی میکروارگانیزم‌ها در محیط‌زیست و مشخصات بوم‌شناختی هر منطقه همگی از جمله مواردی هستند که در نوع میکروارگانیزم‌های جداسازی‌شده تاثیر دارند[23]. افزایش تعداد نمونه‌برداری، در افزایش تنوع میکروارگانیزم‌های موجود، تاثیرگذار خواهد بود[24]. در بررسی جوامع میکروبی با افزایش تعداد نمونه‌ها نتایج قابل‌قبول‌تری به دست می‌آید.

مطالعه حاضر محدودیت نداشت.

پیشنهاد می‌شود با مطالعه عمیق‌تر میکروارگانیزم‌های دیگر نیز مانند انواع باکتری‌های فتوسنتزکننده، باکتری‌های دخیل در متابولیزم گوگرد مانند سویه‌های بی‌هوازی احیاکننده گوگرد و انواع هوازی اکسیدکننده و دیگر باکتری‌های اتوتروف و غیره مطالعه و همچنین روش‌های دیگر مثل ژل الکتروفورز با گرادیان شیب ماده دناتوره‌کننده (DGGE) نیز برای شناسایی باکتری‌ها استفاده شود.

Archive of SID

www.SID.ir

نتیجه‌گیری

با روش کلونینگ و توالی‌یابی شش جنس باکتری شامل آکاریوکلوریس، ادهیری‌باکتر، براکی‌باکتریوم، گلوئوکپسوپسیز، سیزری‌باکتر و باسیلوس شناسایی شدند. کتابخانه ژنی آرکی‌ها متعلق به پنج جنس شامل هالونوتیوس، هالولامینا، هالوکوادراتوم، هالومیکروآرکولا و هالورهابدوس است. کتابخانه کلون‌های باکتریایی نیز در چهار راسته باکتریوئیدز، سیانوباکتر، اکتینوباکتر و فرمیتیکوس قرار دارند. کلون‌های کتابخانه قطعه‌ای از ژن *bop* (به عنوان یک مارکر مولکولی) متعلق به چهار جنس شامل هالوروبروم، نتری‌آلبا، هالوکوادراتوم و نترینما هستند. فیلوژنی ژن *bop* با فیلوژنی 16S rDNA رابطه تنگاتنگی دارد.

تشکر و قدردانی: نویسندگان این مقاله از دانشگاه شاهد برای حمایت مالی از این پژوهش تشکر می‌کنند.

تاییدیه‌اخلاقی: موردی از سوی نویسندگان گزارش نشده است.

تعارض منافع: موردی از سوی نویسندگان گزارش نشده است.

سهم نویسندگان: فرشته جوکارکاشی (نویسنده اول)، نگارنده مقدمه/پژوهشگر اصلی (۴۰%)؛ پرویز اولیاء (نویسنده دوم)، نگارنده بحث (۳۰%)؛ محمدعلی آموزگار (نویسنده سوم)، روش‌شناس (۳۰%)

منابع مالی: موردی از سوی نویسندگان گزارش نشده است.

منابع

1- Colwell RR, Grimes DJ. Semantic and Strategies. In: Colwell RR, editor. Nonculturable microorganisms in the environment. Berlin: Springer Science and Business Media Press; 2012. pp. 1-7.

2- Hugenholtz P. Exploring prokaryotic diversity in the genomic era. Genome Biol. 2002;3(2):reviews0003.1-reviews0003.8.

3- Von Wintzingerode F, Gobel UB, Stackebrandt E. Determination of microbial diversity in environmental samples: Pitfalls of PCR-based rRNA analysis. FEMS Microbiol Rev. 1997;21(3):213-29.

4- Vaz-Moreira I, Egas C, Nunes OC, Manaia CM. Culture-dependent and culture-independent diversity surveys target different bacteria: A case study in a freshwater sample. Antonie Van Leeuwenhoek. 2011;100(2):245-57.

5- Rastogi G, Sani RK. Molecular Techniques to assess microbial community structure, function and dynamics in the environment. In: Ahmad I, Ahmad F, Pichtel J, editors. Microbes and microbial technology. New York: Springer; 2011. pp. 7931-5.

6- Papke RT, Douady CJ, Doolittle WF, Rodríguez-Valera F. Diversity of bacteriorhodopsins in different hypersaline waters from a single Spanish saltern. Environ Microbiol. 2003;5(11):1039-45.

7- Pasić L, Bartual SG, Ulrih NP, Grabnar M, Velikonja BH. Diversity of halophilic archaea in the crystallizers of an Adriatic solar saltern. FEMS Microbiol Ecol. 2005;54(3):491-8.

8- Shand RF, Betlach MC. Bop gene cluster expression in bacteriorhodopsin-overproducing mutants of halobacterium halobium. J Bacreriol. 1994;176(6):1655-60.

9- Benlloch S, Acinas SG, Antón J, López-López A, Luz SP, Rodríguez-Valera F. Archaeal biodiversity in crystallizer ponds from a solar saltern: Culture versus PCR. Microb Ecol. 2001;41(1):12-19.

10- DeLong EF. Archaea in coastal marine environments. Proc Natl Acad Sci USA. 1992;89(12):5685-9.

11- Lane DJ, Pace B, Olsen GJ, Stahl DA, Sogin ML, Pace NR. Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. Proc Natl Acad Sci USA. 1985;82(20):6955-9.

12- Turner S, Pryer KM, Miao VP, Palmer JD. Investigating deep phylogenetic relationships among cyanobacteria and plastids by small subunit rRNA sequence analysis. J Eukaryot Microbiol. 1999;46(4):327-38.

13- Larkin MA1, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, et al. Clustal W and Clustal X version 2.0. Bioinformatics. 2007;23(21):2947-8.

14- Hall TA. BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor andanalysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symposium Series. 1999;41:95-8.

15- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. Mol Biol Evol. 2013;30(12):2725-9.

16- Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: An approach using bootstrap. Evolution. 1985;39(4):783-91.

17- Pham VH, Kim J. Cultivation of unculturable soil bacteria. Trends Biotechnol. 2012;30(9):475-84.

18- Kaeberlein T, Lewis K, Epstein SS. Isolating "uncultivable" microorganisms in pure culture in a simulated natural environment. Science. 2002;296(5570):1127-9.

19- Vreeland RH, editor. Advances in understanding the biology of halophilic microorganisms. New York: Springer; 2012. 1-33.

20- Mehrshad M, Amoozegar MA, Yakhchali B, Shahzedeh Fazeli A. Biodiversity of moderately halophilic and halotolerant bacteria in the western coastal line of Urmia lake. 2012;1(2):49-70. [Persian]

21- Asadi Asl B, Amouzegar MA. Study of variety of extreme aerobic halophyte prokaryotes on the west coast of Lake Uromieh using by dependent and independent cultivated methods. [Dissertation]. Tehran: University of Tehran; 2012. [Persian]

22- Makhdoumi-Kakhki A, Amoozegar MA, Kazemi B, Pašić L, Ventosa A. Prokaryotic diversity in Aran-Bidgol salt lake, the largest hypersaline playa in Iran. Microbes Environ. 2012;27(1):87-93.

23- 18-Alain K, Querellou J. Cultivating the uncultured: Limits, advances and future challenges. Extremophiles. 2009;13(4):583-94.

24- Hughes JB, Hellmann JJ, Ricketts TH, Bohannan BJ. Counting the uncountable: Statistical approaches to estimating microbial diversity. Appl Environ Microbiol. 2001;67(10):4399-406.

Archive of SID

www.SID.ir