تاکسونومی و بیوسیستماتیک، سال پنجم، شماره چهاردهم، بهار ۱۳۹۲، صفحه ۷۹-۱۰۰
دریافت مقاله: ۱۳۹۱/۰۴/۱۸ پذیرش نهایی: ۱۳۹۱/۱۲/۰۲

جداسازی و شناسایی باکتری‌های پلی‌اکستریموفیل قلیادوست، نمک‌دوست و تحمل‌کننده نمک تالاب قلیایی شور-دریایی گمیشان

آزاده شاهین‌پی [۱و۳]، محمد علی آموزگار [۲و۳]* و عباس اخوان سپهی [۴]
[۱] بخش میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران
[۲] بخش میکروبیولوژی، دانشکده زیست‌شناسی و قطب تبارزایی موجودات زنده، پردیس علوم، دانشگاه تهران، تهران، ایران
[۳] بانک میکروارگانیسم‌ها، مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران، کرج، ایران
[۴] گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، تهران، ایران

چکیده

تالاب گمیشان یک اکوسیستم طبیعی در ۳۵ کیلومتری شمال غربی گرگان، در جوار غربی شهر خواجه نفس و گمیشان واقع است. نمونه‌برداری از سه موقعیت جغرافیایی مختلف، در دو نوبت فصل خشک و بارش، منجر به جداسازی ۲۲۴ جدایه شد. از بین جدایه‌ها، ۵۷ سویه برای بررسی رفتارهای نمک‌دوستی و تحمل‌کنندگی نمک و همچنین، بهینه و محدوده رشد در اسیدیته و دماهای مختلف بررسی شدند. بیشتر سویه‌های نمک‌دوست نسبی و تحمل‌کننده نمک قادر به رشد بهینه در اسیدیته ۸/۵-۹ بودند و محدوده دمای رشد ۰-۴۰ درجه سانتیگراد را نشان دادند. سویه‌ها از نظر تولید آنزیم‌های هیدرولازی مطالعه شدند. فعالیت لیپازی در اغلب جدایه‌ها مشاهده شد و به ترتیب ۱۵، ۷ و ۳ سه سویه از کل سویه‌ها آمیلاز، پروتئاز و DNase تولید کردند. این آنزیم‌ها در برخی فرآیندهای صنعتی می‌تواند سودمند باشد. بررسی فیلوژنتیک ترادف 16S rDNA برای ۵۵ سویه انجام شد. این سویه‌ها از نظر فیلوژنتیک در ۲۲ جنس مختلف *Achromobacter*، *Aeromicrobium*، *Altererythrobacter*، *Bacillus*، *Caenispirillum*، *Cyclobacterium*، *Erythrobacter*، *Halobacillus*، *Halomonas*، *Idiomarina*، *Jonesia*، *Marinobacter*، *Martelella*، *Nesiotobacter*، *Paenibacillus*، *Planococcus*، *Pseudomonas*، *Rheinheimera*، *Saccharospirillum*، *Stappia*، *Thalassospira* و *Vibrio* قرار گرفتند. ۲۳ درصد از این سویه‌ها باکتری‌های نمک‌دوست قلیادوست بودند که به جنس‌های *Bacillus*، *Halobacillus*، *Halomonas*، *Idiomarina* و *Marinobacter* تعلق داشتند. این بررسی، نخستین مطالعه بر روی باکتری های قابل کشت تالاب گمیشان، یک اکوسیستم قلیایی شور-دریایی مهم، است.

واژه‌های کلیدی: تالاب گمیشان، تحمل‌کننده نمک، نمک‌دوست، 16S rDNA

* *amozegar@khayam.ut.ac.ir

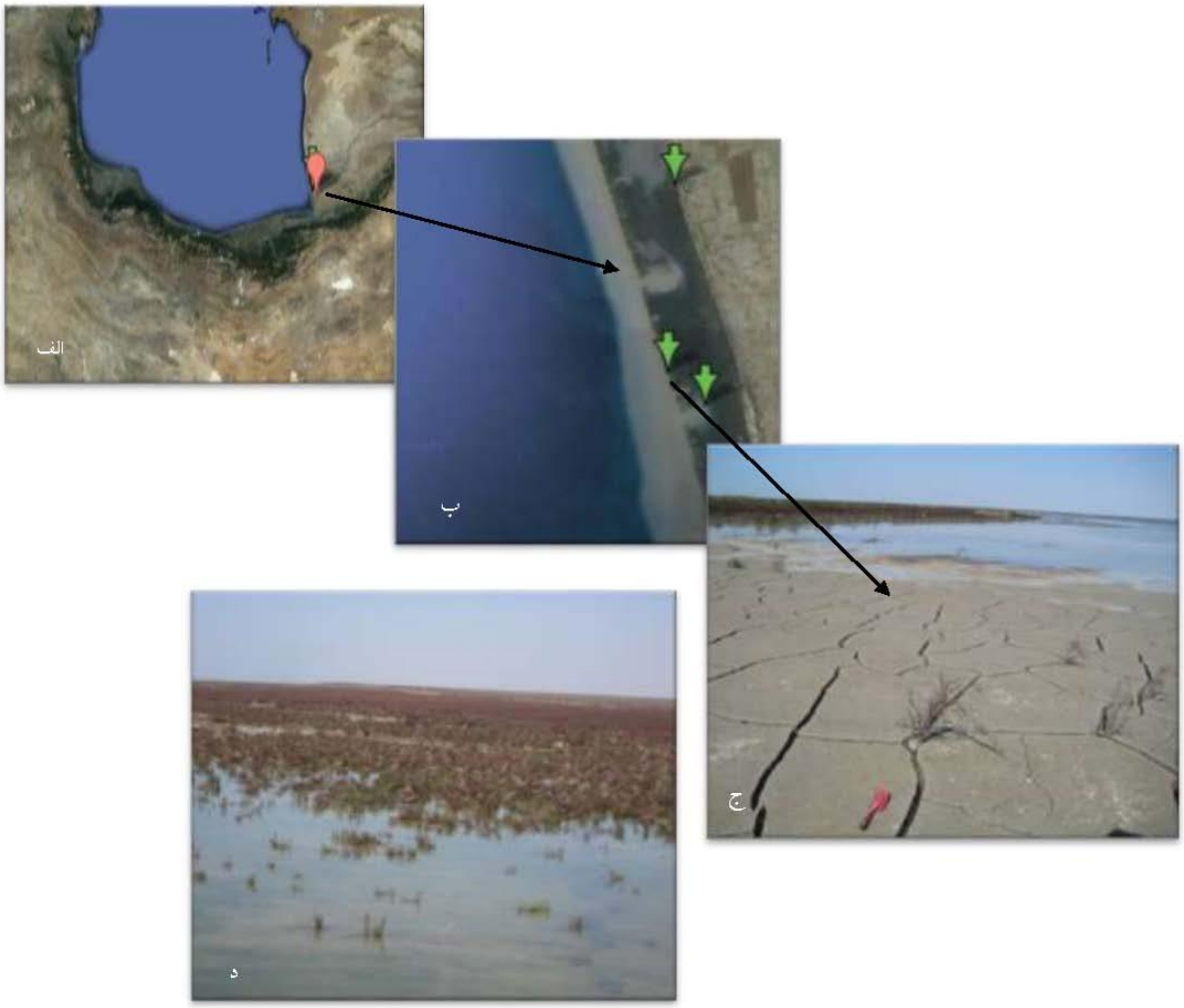
مقدمه

تالاب بین‌المللی گمیشان نوار نسبتاً باریکی است که با برای شمالی-جنوبی در امتداد سواحل شرقی دریای خزر قرار گرفته است. این تالاب تقریباً از دو کیلومتری شمال شهر گمیشان آغاز شده و تا مرز ترکمنستان و فراسوی آن یعنی تا هشت کیلومتر در خاک ترکمنستان نیز ادامه پیدا می‌کند. مساحت آن بیست هزار هکتار و ارتفاع آن ۲۷ متر پایین‌تر از سطح آب های آزاد است. این تالاب به لحاظ هم‌پیوندی با دریای خزر (حاشیه اقلیمی معتدل) در کنار یک اقلیم خشک، ایجاد میکرواقلیم‌هایی می‌کند که تبعات زیستگاهی با ارزشی را به ارمغان آورده است. کلر و سدیم بیشترین یون‌های موجود در تالاب بوده که تأییدی بر تقسیم‌بندی تالاب در گروه دریاچه‌های تالازوهالین است. مقدار نمک دریاچه ۳-۵ درصد و متوسط اسیدیته آن ۸/۸ است (بهروزی‌راد، ۱۳۸۶). هدف اصلی در اکولوژی میکروبی درک تنوع میکروبی در زیستگاه‌های طبیعی است. بنابراین، شناخت ما از میکروارگانیسم‌ها و همچنین زیستگاه‌ها ضروری است (Grant, 1992). توزیع و فراوانی نوع خاصی از محیط‌های افراطی برای تعیین رتبه ویژگی زیوگان (biota) بسیار مهم است (Rodriguez-Valera, 1993). مهم‌ترین اکوسیستم‌های پرشور که تاکنون بررسی شده است شامل دریاچه بزرگ شور ایالت یوتا آمریکا، دریای مرده، شورابه‌های به شدت قلیایی وادی ناترون مصر و دریاچه ماگادی (Magadi) کنیا هستند (Oren, 1994؛ Kamekura, 1998، Oren, 2002a). دریاچه‌های پرشور آران و بیدگل، ارومیه و حوض سلطان در ایران نیز اکوسیستم‌های با اهمیتی هستند که از نظر تنوع میکروارگانیسم‌های نمک‌دوست بررسی شده‌اند (Rohban *et al*., 2009؛ Makhdoumi Kakhki *et al*., 2012). محیط‌های پرشور به علت سختی شرایط، تنوع میکروبی کمتری نسبت به محیط های معمولی دارند، اما تنوع فیلوژنتیک میکروارگانیسم‌هایی که در غلظت‌های بالای نمک زندگی می‌کنند، شگفت‌انگیز است. تنوع متابولیسمی نمک‌دوست‌ها نیز به همان اندازه قابل توجه است (Oren, 2002b). آنها مدل‌های ارزشمندی برای بررسی مولکولی سازگاری اسمزی پروکاریوتی هستند که پتانسیل کاربرد در زیست‌فناوری و میکروبیولوژی کاربردی را دارند (Kushner and Kamekura, 1988). به طور طبیعی محیط‌هایی با مقادیر اسیدیته بالا که رشد میکروبی را حمایت می‌کنند در بسیاری از اکوسیستم ها پراکنده شده‌اند. اغلب ارگانیسم‌های در حال رشد در این محیط‌ها مقادیر اسیدیته به مراتب بالاتر از خنثی را تجربه می‌کنند. ارگانیسم‌هایی که در محیط‌های بسیار قلیایی زیست می‌کنند، ارائه‌دهنده سازگاری‌های گسترده فرآیندهای زیستی برای غلبه بر شرایط مختلف محیطی هستند (Ulukanli, 2002). هدف از این پژوهش، بررسی تنوع زیستی باکتری‌های نمک‌دوست و تحمل‌کننده نمک ساکن در تالاب قلیایی شور-دریایی گمیشان و نیز امکان دستیابی به جنس، گونه یا سویه جدید از میکروارگانیسم‌های بومی این منطقه است.

مواد و روش‌ها

نمونه ها از سه موقعیت تالاب (مناطق شمال شرقی (C)، جنوب شرقی (B) و جنوب غربی تالاب (A)) در دو فصل خشک و بارش به ترتیب در شهریور و بهمن ماه سال ۱۳۸۹ جمع آوری شد. طول و عرض جغرافیایی دقیق مناطق نمونه‌برداری توسط GPS ثبت و روی

تصویر ماهواره‌ای علامت‌گذاری شد (شکل ۱). نمونه های مختلف جمع آوری شده از هر منطقه درون کیسه‌های پلاستیکی و لوله‌های فالکون استریل ریخته شد و دما، اسیدیته و میزان ذرات جامد محلول در آب (Total Disolved Solids) نمونه‌ها به ترتیب با دماسنج، pHمتر و TDSمتر قابل حمل در محل اندازه گیری و ثبت شد. انتخاب این مناطق بر اساس نقاط قابل نمونه برداری تالاب و ویژگی‌های ظاهری هر منطقه بود. نمونه‌ها در دمای محیط و در طی یک روز به آزمایشگاه منتقل و میزان شوری آنها نیز اندازه گیری شد. آنالیز شیمیایی آب تالاب برای سنجش عناصر موجود در محیط‌زیست طبیعی باکتری‌های این اکوسیستم و به‌کارگیری آن در طراحی محیط‌کشت مناسب که امکان جداسازی طیف گسترده‌تری از باکتری ها را فراهم سازد، توسط شرکت خاک بهین آزما صورت گرفت.



شکل ۱- الف) موقعیت تالاب گمیشان در نقشه ایران، ب) موقعیت سه نقطه نمونه‌برداری (earth.google.com)، ج) جنوب‌غربی (منطقه باتلاقی) د) گیاهان شورپسند غوطه‌ور در آب تالاب

متعاقباً نگهداری نمونه ها در دمای ۴ درجه سانتیگراد صورت گرفت. برای جداسازی باکتری‌های نمک‌دوست و تحمل کننده نمک از محیط کشت مارین آگار (MA, Marine agar) با ترکیبات زیر استفاده شد

($g\ l^{-1}$):

NaCl, 19.45; $MgCl_2$,8.8; Peptone, 5.0; Na_2SO_3, 3.24; $CaCl_2$, 1.8; Yeast extract, 1; KCl, 0.55; $NaHCO_3$, 0.16; Ferric Citrate, 0.1; KBr, 0.08; H_3BO_3, 0.02; Na_2HPO_4, 8.0 mg; NaF, 2.4 mg; NH_4NO_3, 1.6 mg; Agar, 15.0; Distilled water, 1000ml

اسیدیته محیط ۷/۵ تنظیم شد (Ronald, 2005). برای کشت و جداسازی احتمالی باکتری‌های نمک‌دوست قلیادوست و تحمل کننده قلیا از محیط کشت MAHA (Modified Alkalophilic Halophile Agar) استفاده شد. مقدار نمک این محیط ۵ درصد در نظر گرفته شد و اسیدیته آن ۹/۵ تنظیم شد. برای ایجاد شرایط قلیایی مجموعاً ۱۹ گرم در لیتر از Na_2CO_3,10.6 و $NaHCO_3$,8.42 استفاده شد (gl^{-1}) (Ronald, 2005):

NaCl, 30.0; Peptone, 5.0; Yeast extract, 2.0; Meat extract, 1.0; Tri-Soidum Citrate, 0.12; KCl, 0.08; $MgSO_4.7H_2O$, 0.04; $FeSO_4.7H_2O$, 2.0 mg; $MnCl_2.4H_2O$, 0.36 mg; Agar, 15.0; Distilled water, 1000ml

برای بررسی میکروارگانیسم‌ها در سیستم‌های طبیعی- بر حسب تعداد کل، تعداد جوامع خاص یا فعالیت‌های متابولیکی آنها- نمونه های شاخص آنالیز شد و نتایج آن به کل جامعه تعمیم داده می‌شوند. نمونه باید نمایان‌گر تنوع و تراکم موجودات در کل محیط نمونه‌برداری باشد. برای مثال نمونه‌های خاک جمع آوری شده از مکان A با هم مخلوط شده و به عنوان نمونه شاخص در نظر گرفته شد (Atlas and Bartha, 1998) سپس، از این نمونه‌های شاخص سری رقت متوالی تهیه و در محیط‌های تعریف شده کشت شد. تمام محیط‌های فوق در دماهای ۳۴ درجه سانتیگراد گرماگذاری شد. تمامی کلونی‌های رشد یافته روی محیط‌های جامد پس از ۲۴، ۴۸، ۷۲ ساعت و همچنین، به منظور جداسازی کلونی‌های کند رشد تا شش ماه پس از گرماگذاری روی محیط‌های جامد مشابه، جداسازی و خالص شد. خالص‌سازی سویه ها، پس از رشد و ظاهر شدن کلونی، حتی‌المقدور از تک کلونی‌ها کشت خالص به عمل آمد (Caton, 2004). برای تأیید خالص بودن کلونی‌ها رنگ‌آمیزی گرم بر اساس روش Hucker انجام شد (Gerhardt and Murray, 1994). به منظور تسهیل بررسی جدایه‌ها از نمونه های مختلف، سویه ها خالص شده بر مبنای مکان جدا شده، نوع نمونه و همچنین نوع محیط کشت استفاده شده به صورت زیر نام‌گذاری شدند:

A: مکان A، B: مکان B، C: مکان C، G: تالاب گمیشان، P: نمونه گیاهی، F: رسوبات، S: خاک، W: آب، X: (Marine agar): محیط مارین آگار؟، Y: (Modified Alkalophilic Halophile agar): محیط تغییر یافته هالوفیل آلکالوفیل آگار.

بررسی خصوصیات فنوتیپی و بیوشیمیایی تمامی سویه ها با استفاده از روش Simbert و Krieg (۱۹۹۴) انجام شد.

برای افتراق باکتری های نمک دوست و تحمل کننده نمک از محیطی با ترکیب زیر استفاده شد ($g\ l^{-1}$):

Yeast extract, 5; SW medium: NaCl, 234; $MgCl_2.6H_2O$, 39; $CaCl_2$, 1; $MgSO_4.7H_2O$, 61; KCl, 6; $NaHCO_3$, 0.2; KBr, 0.7

محیط SW با غلظت نمکی ۳۰ درصد تهیه شد و به نسبت‌های متفاوت برای درصدهای نمکی ۰ تا ۲۵ به محیط پایه اضافه شد. اسیدیته محیط ۸/۵ تنظیم شد. در

شیکر انکوباتور با دمای ۳۴ درجه سانتیگراد و ۱۵۰ دور در دقیقه گرماگذاری شدند. سویه‌هایی که علاوه بر توانایی رشد در محیط فاقد نمک دارای رشد بهینه در کمتر از ۳ درصد نمک (معادل غلظت نمک دریا) بودند، به عنوان سویه‌های تحمل‌کننده نمک و آن دسته که بهینه رشد در بالای ۳ درصد نمک داشتند و قادر به رشد در محیط فاقد نمک نبودند به عنوان نمک‌دوست در نظر گرفته شدند و محدوده رشد نمک در این باکتری‌ها تعیین گردید.

برای بررسی محدوده اسیدیته رشد و نیز میزان بهینه آن از محیط‌های مایع با ترکیب زیر استفاده شد ($g\ l^{-1}$):

Nutrient broth, 8; NaCl, 30; HEPES, 50mM; CAPS, mM

از بافر HEPES در دامنه اسیدیته ۴ تا ۹ و برای اسیدیته بالاتر ۱۰ و ۱۱ از بافر CAPS در محیط‌ها استفاده شد. اسیدیته محیط ها پیش از اتوکلاو در بازه بین ۴ تا ۱۱ با فاصله‌های ۱ و نیم واحدی تنظیم شد و پس از اتوکلاو نیز تأیید شد.

برای بررسی محدوده دمای رشد از محیط کشت نوترینت آگار برای دماهای ۵ تا ۱۰ درجه سانتیگراد و نوترینت براث برای دماهای بین ۱۰ تا ۵۰ درجه سانتیگراد استفاده شد و میزان اسیدیته بر روی ۸/۵ تنظیم شد. برای هر یک از سویه های انتخاب شده میزان مورد نیاز از نمک NaCl نیز اضافه شد.

فعالیت آنزیم‌های هیدرولازی: این بررسی تنها روی سویه های منتخب برای مطالعه فیلوژنتیک صورت گرفت. در این مرحله سنجش به روش پلیت انجام گردید. محیط ها همگی دارای ۳ درصد NaCl بودند و اسیدیته آنها ۸/۵ تنظیم شد (Rohban *et al.*, 2009).

تولید خارج سلولی آمیلاز: برای بررسی تولید آنزیم آمیلاز از محیط‌کشت با ترکیب زیر استفاده شد ($g\ l^{-1}$):

Soluble starch, 10; Beef extract, 3; Agar, 15

پس از رشد در محیط، لوگل (یدید پتاسیم)، بر روی محل رشد باکتری اضافه شد. ایجاد هاله شفاف نشانه تولید آنزیم خارج سلولی آمیلاز و هیدرولیز نشاسته در برون سلول است (Amoozegar *et al.*, 2003).

تولید خارج سلولی پروتئاز: برای بررسی تولید آنزیم پروتئاز، از یک محیط‌کشت با ترکیب زیر استفاده شد ($g\ l^{-1}$):

Meat extract, 3; Peptone, 5; Skim milk, 20; Agar, 15

وجود هاله شفاف در اطراف کلونی‌ها پس از دو هفته گرماگذاری نشانه هیدرولیز پروتئین کازئین بوده، به عنوان پاسخ مثبت در نظر گرفته شد (Amoozegar *et al.*, 2008).

تولید خارج سلولی لیپاز: برای بررسی هیدرولیز توئین ۸۰ از محیط‌کشت زیراستفاده شد ($g\ l^{-1}$):

Peptone, 10; Tween80, 10; $CaCl_2.H_2O$, 0.1; Agar, 15

ایجاد نواحی رسوب اطراف کلونی‌ها به صورت دانه‌های سفید همراه با هاله کدر، نشان‌دهنده تولید آنزیم لیپاز توسط باکتری است. به تناسب ضعف و قوت آنزیم لیپاز گستردگی محوطه رسوب کمتر یا بیشتر شد (Martin *et al.*, 2003).

تولید خارج سلولی داکسی ریبونوکلئاز: برای بررسی فعالیت داکسی‌ریبونوکلئازی سویه‌ها از محیط داکسی‌ریبونوکلئاز تست-آگار به میزان ۴۰ گرم در لیتر استفاده شد. برای تشخیص بهتر، مقدار ۰/۰۰۰۸

گرم در لیتر تولوئیدن بلو به محیط فوق اضافه شد. پس از رشد از کلریدریک اسید یک نرمال به عنوان معرف استفاده شد. مشاهده هاله روشن‌تر در اطراف رشد به عنوان پاسخ مثبت گزارش شد.

تکثیر 16S rRNA توسط واکنش زنجیره‌ای پلیمراز: برای استخراج DNA باکتری‌ها از روش دست‌ورزی شده استخراج DNA پیشنهاد شده توسط Marmur در سال ۱۹۹۴ استفاده شد.

برای تکثیر ژن 16S rRNA از پرایمرهای عمومی 27F (5'- AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG) و 1492R (5'- GGT TAC CTT GTT ACG ACT) استفاده شد (Spencer, *et al*., 2004). غلظت مواد به کار رفته در تهیه مخلوط واکنش زنجیره پلیمراز برای حجم واکنش ۵۰ میکرولیتر به این صورت است:

PCR buffer (10X), 50µl; $MgCl_2$ (5 mM), 1.5µl; dNTP mix (10 mM), 1 µl; Primers (10 µM each), 1.25µl; Taq DNA polymerase, 0.25 µl; Template DNA, 2-3µl; Sterilized distilled water, 38-39µl

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با این روش صورت گرفت: دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه انجام شد. چرخه تکثیر شامل ۳۰ سیکل تکرار شونده با دمای دناتوراسیون ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۶۰ ثانیه، دمای اتصال ۵۵ تا ۶۰ درجه سانتیگراد (دمای اتصال پرایمرها برحسب سویه‌های مختلف متفاوت بود، لذا، برای بهینه‌سازی دمای اتصال هر سویه از روش گرادیان استفاده شد) به مدت ۴۵ ثانیه و دمای سنتز ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۴۵-۵۰ ثانیه بود. پس از اتمام چرخه‌ها و به منظور تکمیل نهایی ساختار DNA تکثیر شده، نمونه ها به مدت ۷ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد نگهداری شد.

۵ میکرولیتر از محصول PCR به همراه شاهد مثبت و منفی PCR و شاخص وزن مولکولی با طیف ۱۰۰-۱۰۰۰۰ bp روی ژل آگاروز ۰/۵ تحلیل شد و برای ترادف‌خوانی به شرکت ماکروژن در کره جنوبی فرستاده شد. ترادف‌های به دست آمده با نرم‌افزار Chromas Pro مرتب شده، با نرم‌افزار BLAST با توالی‌های ثبت شده موجود در پایگاه اطلاعات ژنومی GenBank و Eztaxon مقایسه شد. به این ترتیب، نزدیک‌ترین سویه‌ها با ترادف 16S rRNA مشابه با سویه‌های منتخب PCR شده تعیین شد. تحلیل فیلوژنتیک باکتری‌های منتخب با سویه‌های نزدیک به آنها با نرم افزار ClustalX (نسخه ۲/۰) انجام شد. بررسی ارتباط فیلوژنتیکی توالی‌های به دست آمده با یکدیگر و دیگر سویه‌ها توالی‌های مرتبط به دست آمده حاصل از جستجو در پایگاه‌های اطلاعاتی Genbank و Eztaxon با نرم افزار MEGA (نسخه ۵/۰) درخت فیلوژنتیک با الگوریتم‌های Maximum likelihood، Neighbour-joining و Maximum parsimony نیز رسم گردید (Tamura and Dudley, 2007). بررسی اعتبار شاخه‌های درخت با الگوریتم bootstrap analysis و با ۱۰۰۰ بار نمونه‌گیری صورت گرفت. توالی‌های به دست آمده در این پژوهش در بانک ژنی NCBI ثبت و شماره ژنی مربوط به هر توالی دریافت گردید.

نتایج

بررسی‌های فیزیکوشیمیایی: اطلاعات مربوط به مشخصات فیزیکوشیمیایی نمونه‌ها در جدول ۱ آورده شده است. در نمونه‌گیری شهریور ماه بیشترین دما مربوط به منطقه C یعنی ۳۵ درجه سانتیگراد است،

شوری آب این منطقه حدود ۳۶ گرم بر لیتر برآورد شد، که نسبت به دو منطقه دیگر بالاتر بود. با توجه به بستر جلبکی این تالاب، اسیدیته قلیایی آن قابل توجیه است. این بستر در منطقه جنوب شرقی وسعت بالاتری دارد و به همان نسبت اسیدیته این منطقه نسبت به دو منطقه دیگر بالاتر است. در نمونه های خاک نیز میزان شوری و TDS در هر سه مکان نمونه‌گیری در فصل خشک نسبت به فصل بارش بیشتر گزارش شد. جدول ۱ نتیجه سنجش غلظت برخی از آنیون‌ها و کاتیون‌های مهم موجود در ساختار نمک تالاب را نشان می‌دهد.

جدول ۱- مشخصات فیزیکوشیمیایی نمونه‌های آب و خاک در دو نوبت نمونه‌گیری و غلظت برخی از یون‌های مهم نمونه آب از تالاب گمیشان

نمونه آب	فصل خشک				فصل بارش			
	اسیدیته	دما (°C)	TDS ($g\ l^{-1}$)	شوری ($g\ l^{-1}$)	اسیدیته	دما (°C)	TDS ($g\ l^{-1}$)	شوری ($g\ l^{-1}$)
منطقه جنوب‌غربی (A)	۸/۸۴	۲۷/۳	۲۳/۵	۲۶/۲۵	۷/۶	۸	۸/۰۷	۹/۴۲
منطقه جنوب‌شرقی (B)	۹/۴۲	۳۳/۴	۲۱/۳	۲۷/۱۶	۸/۴۴	۹/۳	۴/۲۶	۴/۸۰
منطقه شمال‌شرقی (C)	۷/۶۰	۳۵/۳	۲۶/۷	۳۵/۹۵	۸/۱۶	۸/۱	۱۵/۴۷	۱۹/۸

نمونه خاک	TDS ($g\ l^{-1}$) بر حسب محلول ۱۰۰ (m) مولال خاک	شوری ($g\ l^{-1}$)	TDS ($g\ l^{-1}$) بر حسب محلول ۱۰۰ (m) مولال خاک	شوری ($g\ l^{-1}$)
منطقه جنوب‌غربی (A)	۷/۰۴	۸/۱۴	۸۵۷mg/l	۰/۸۳
منطقه جنوب‌شرقی (B)	۲/۲۴	۲/۳۸	۲/۰۴	۲/۱۴
منطقه شمال‌شرقی (C)	۹/۱۶	۱۰/۸۲	۱۵۳۱mg/l	۱/۵۷

غلظت برخی یون‌ها در نمونه آب (ppm)									
	۰/۱	Mn	۱۹۶/۹۱	K	۱۹۲۱/۲۸	Mg	۱۴۴۶۷/۶۷	Cl
	۰/۰۲۵	Ni	۱۴/۸۵	Zn	۷۲۹/۴۵	Ca	۹۷۳۰/۱۵	Na
	۰/۰۱	Cu	۵/۰۱	Fe	۲۷۴/۵۴	HCO_3	۵۱۰۷	SO_4

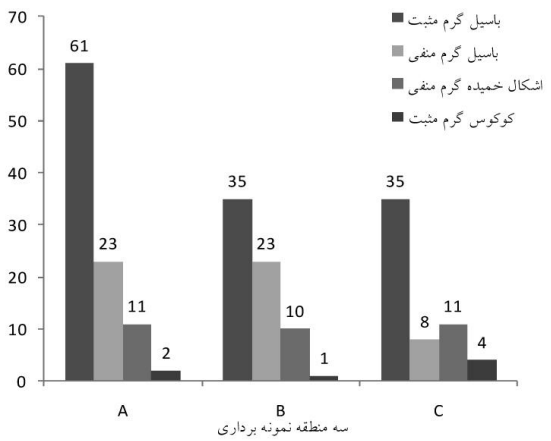
تنوع میکروارگانیسم های جداسازی شده از تالاب گمیشان: از نمونه‌های مختلف جمع آوری شامل شورابه‌ها، خاک، رسوبات و گیاهان در مجموع، ۲۲۴ باکتری جدا شد. از این تعداد، ۱۶۴ سویه مربوط به نمونه گیری در فصل خشک و ۶۰ سویه در رابطه با نمونه گیری در فصل بارش است. متوسط میزان کلونی‌های به دست آمده در روش کشت (شمارش زنده) در دو نوبت نمونه‌گیری در هر منطقه در نمونه های آب و خاک محاسبه شد و نتایج آن در جدول ۲ آمده است. بیشترین تعداد جدایه از محیط MA دارای اسیدیته ۷/۵ بود. شایان ذکر است که حدود ۲۹/۵ درصد کل جدایه ها معادل با ۶۶ سویه از محیط قلیایی جدا شد.

در میان مناطق نمونه برداری، منطقه A با ۹۷ و منطقه B با ۶۹ جدایه، بیشترین و منطقه C با ۵۸ کمترین تعداد جدایه را داشت. در شکل ۲ رابطه بین مناطق مختلف نمونه‌برداری و نوع جدایه‌ها بر مبنای رنگ‌آمیزی گرم نشان داده شده است. تفکیک کل جدایه‌ها بر اساس رنگ‌آمیزی گرم نشان داد که باسیل‌های گرم‌مثبت غیررشته‌ای با تعداد ۱۳۱ جدایه و پس از آن باسیل‌های گرم‌منفی با ۵۴ جدایه بیشترین تعداد و اشکال خمیده گرم‌منفی با ۳۲ جدایه و کوکوس‌های گرم‌مثبت با ۷ جدایه با فراوانی بسیار کمتری جداسازی شد.

جدول ۲- شمارش زنده در دو نوبت نمونه‌برداری از آب و خاک

مناطق نمونه‌برداری	فصل بارش: متوسط میزان کلونی‌های به دست آمده CFU/ml	
	آب	خاک
منطقه جنوب‌غربی (A)	$۲/۵\times۱۰^{۳}$	$۲/۵–۷/۲\times۱۰^{۶}$
منطقه جنوب‌شرقی (B)	$۲/۹\times۱۰^{۳}$	$۲/۲–۷/۲\times۱۰^{۶}$
منطقه شمال‌شرقی (C)	$۲/۹\times۱۰^{۴}$	$۱/۹–۳/۲\times۱۰^{۶}$
	فصل خشک: متوسط میزان کلونی‌های به دست آمده CFU/ml	
	آب	خاک
منطقه جنوب‌غربی (A)	$۱/۲–۸/۸\times۱۰^{۳}$	$۱/۴–۳/۲\times۱۰^{۷}$
منطقه جنوب‌شرقی (B)	$۲/۳\times۱۰^{۴}$	$۱/۵–۶/۸\times۱۰^{۶}$
منطقه شمال‌شرقی (C)	$۲/۲–۴/۸\times۱۰^{۴}$	$۱/۵–۶\times۱۰^{۶}$

باسیل‌های گرم‌مثبت، باسیل‌ها و اشکال خمیده گرم‌منفی و کوکوس‌های گرم‌مثبت به ترتیب ۵۸/۵، ۳۸/۴ و ۳/۱ درصد از جدایه‌های را در برگرفتند. همچنین، مشاهده لام رنگ‌آمیزی اسپور نشان داد که بیش از ۵۰ درصد باسیل‌های گرم‌مثبت اسپوردار بودند. در نهایت، بر اساس ویژگی‌های فنوتیپی بررسی شده، سویه‌ها به چندین گروه تقسیم و در هر گروه سویه‌هایی با خصوصیات بسیار مشابه قرار داده شد. سپس، از میان این گروه‌ها ۵۷ سویه به صورت تصادفی برای مطالعات بیوشیمیایی بیشتر انتخاب گردید. از این ۵۷ سویه، ترادف‌یابی 16S rRNA برای ۵۵ سویه صورت گرفت. جدول ۳ ویژگی‌های ریخت‌شناسی، فیزیولوژیک و بیوشیمیایی برای ۵۷ سویه را نشان می‌دهد.



شکل ۲- فراوانی باکتری‌های جدا شده از سه نقطه نمونه‌برداری و نوع جدایه‌های هر منطقه بر اساس رنگ‌آمیزی گرم

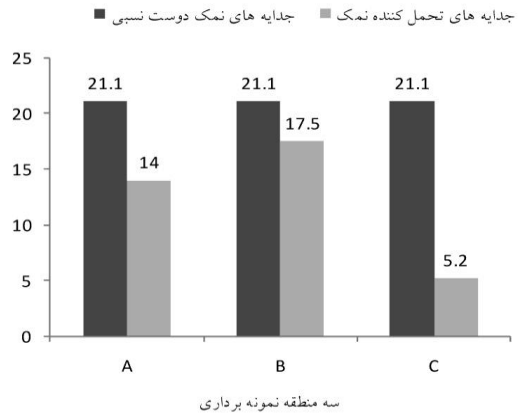
افتراق سویه‌های نمک‌دوست نسبی و تحمل‌کننده نمک: از مجموع ۵۷ سویه منتخب، ۶۳/۲ درصد آنها نمک‌دوست نسبی و ۳۶/۸ درصد سویه‌ها تحمل‌کننده نمک بودند.

در بین سویه‌های نمک‌دوست نسبی که رشد بهینه خود را در محیط ۳–۱۵ درصد نمک دارند، در برخی سویه‌ها رشد در ۲۵ درصد نمک هم مشاهده شد. سویه‌هایی که رشد بهینه در محیط‌های پایین‌تر از ۳ درصد نمک داشتند و همچنین، توانایی رشد در محیط فاقد نمک به عنوان باکتری‌های تحمل‌کننده نمک انتخاب شدند. در باکتری‌های تحمل‌کننده نمک رشد بهینه در محیط حاوی ۱ درصد نمک مشاهده شد. درصد سویه‌های نمک‌دوست نسبی و تحمل‌کننده نمک به تفکیک مناطق جداسازی آنها در شکل ۳ آمده است. در هر سه منطقه میزان جدایه‌های نمک‌دوست نسبی نسبت به تحمل‌کننده نمک بیشتر است.

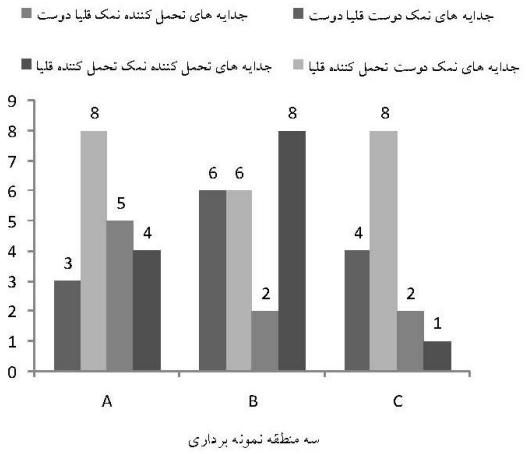
جدول ۳- ویژگی‌های ریخت‌شناسی، فیزیولوژیک و بیوشیمیایی بررسی شده در سویه‌های منتخب

سویه	شکل سلول	رنگ کلونی	رنگ‌آمیزی گرم	KOH	حرکت	اکسیداز	کاتالاز	اسپور		
								موقعیت اسپور	شکل اسپور	سلول مولد
GAA_x1	باسیل	کرم	−	+	+	+	−	−	−	−
GAA_x7	باسیل کوتاه	کرم روشن	−	+	−	+	+	−	−	−
GAA_x6	ویبریو فرم	قرمز	−	+	+	−	+	−	−	−
GAA_x9	باسیل ریز	کرم-قهوه‌ای	−	+	+	+	+	−	−	−
GAA_y3	کوکسی	نارنجی	+	−	−	−	+	−	−	−
GAA_y5	خمیده	بی‌رنگ	−	+	+	+	+	−	−	−
GAA_y6	باسیل	کرم	−	+	+	+	+	−	−	−
GAS_x6	باسیل	سفید	+	−	−	−	+	انتهایی	بیضی	متورم
GAS_x9	باسیل	صورتی-قهوه‌ای	v	+	−	+	+	−	−	−
GAS_x17	باسیل ریز	کرم	−	+	+	+	+	−	−	−
GAS_x19	خمیده	زرد	−	+	+	+	+	−	−	−
GAS_x20	خمیده	بی‌رنگ	−	+	+	+	+	−	−	−
GAS_x25	باسیل	کرم	+	−	+	−	+	−	−	−
GAS_x41	باسیل	صورتی کم‌رنگ	−	+	−	+	−	−	−	−
GAS_y1	باسیل	کرم	+	−	−	−	+	−	−	−
GAS_y9	باسیل	کرم	+	−	+	−	+	نیمه انتهایی	بیضی	متورم
GAW_x1	باسیل ریز	نارنجی	−	+	−	+	−	−	−	−
GAW_x3	باسیل ریز	زرد	−	+	+	+	+	−	−	−
GAW_y5	باسیل	کرم	−	+	+	+	+	−	−	−
GAW_y6	باسیل	کرم	−	+	+	+	+	−	−	−
GBF_x3	باسیل	صورتی-قهوه‌ای	v	+	−	+	+	−	−	−
GBF_y1	باسیل	کرم	+	−	+	−	+	انتهایی	بیضی	متورم
GBP_x2	باسیل	صورتی کم‌رنگ	−	+	−	+	−	−	−	−
GBP_x3	ویبریو فرم	کرم	−	+	+	+	+	−	−	−
GBP_x9	باسیل	کرم	−	+	+	+	+	−	−	−
GBP_y5	باسیل	بی‌رنگ	−	+	+	+	+	−	−	−
GBP_y7	خمیده	بی‌رنگ	−	+	+	+	+	−	−	−
GBP_y11	باسیل	زرد تیره	+	−	−	−	+	−	−	−
GBP_y13	کوکسی	نارنجی	+	−	+	−	+	−	−	−
GBP_y15	باسیل	زرد	+	−	+	+	+	−	−	−
GBP_y16	باسیل	کرم	+	−	−	−	+	نیمه انتهایی	بیضی	متورم
GBS_x1	باسیل ریز	کرم	−	+	+	+	+	−	−	−
GBS_x2	باسیل	کرم	−	+	−	+	+	−	−	−
GBS_x4	باسیل	کرم	−	+	−	+	+	−	−	−
GBS_y1	خمیده	کرم	−	+	+	+	+	−	−	−
GBW_x7	باسیل	کرم	v	+	+	+	+	−	−	−
GBW_x8	باسیل	کرم	−	+	+	−	+	−	−	−
GBW_x15	باسیل	کرم تیره	+	−	−	+	+	مرکزی	بیضی	متورم
GBW_x29	باسیل	کرم	−	+	−	+	+	−	−	−
GBW_y1	باسیل	کرم	+	−	+	−	+	−	−	−
GBW_y4	خمیده	کرم	−	+	+	+	+	−	−	−
GBW_y6	خمیده	کرم تیره	−	+	+	+	+	−	−	−

سویه	شکل سلول	رنگ کلونی	رنگ‌آمیزی گرم	KOH	حرکت	اکسیداز	کاتالاز	اسپور		
								موقعیت اسپور	شکل اسپور	سلول مولد
GCF_x1	خمیده	کرم	−	+	−	+	+	−	−	−
GCF_x3	باسیل ریز	کرم	−	+	+	+	+	−	−	−
GCF_x8	باسیل کوتاه	کرم	−	+	+	+	+	−	−	−
GCF_x14	باسیل	کرم	+	−	−	+	+	مرکزی	بیضی	متورم
GCF_x16	باسیل کوتاه	کرم	−	+	+	+	+	−	−	−
GCF_x20	باسیل	کرم	−	+	−	+	+	−	−	−
GCF_y1	باسیل	کرم	−	+	+	+	+	−	−	−
GCF_y5	خمیده	کرم	−	+	+	+	+	−	−	−
GCS_x7	باسیل	کرم	+	−	+	+	+	مرکزی	بیضی	متورم
GCS_x17	باسیل کوتاه	کرم-زرد	+	−	−	−	+	−	−	−
GCS_x21	باسیل کوتاه	زرد	+	−	−	−	+	−	−	−
GCS_x25	باسیل ریز	قرمز	−	+	−	+	+	−	−	−
GCS_y1	باسیل	کرم	+	−	+	−	+	−	−	−
GCW_x8	باسیل	کرم-نارنجی	−	+	+	−	+	−	−	−
GCW_y1	خمیده	کرم	−	+	+	+	+	−	−	−



شکل ۳- درصد سویه‌های نمک‌دوست نسبی و تحمل کننده نمک در هر منطقه



شکل ۴- فراوانی سویه‌ها بر اساس پاسخ به غلظت نمک و اسیدیته متفاوت

محدوده اسیدیته رشد سویه‌های نمک‌دوست و تحمل کننده نمک: بیشتر سویه‌های نمک‌دوست نسبی و تحمل کننده نمک رشد بهینه خود را در اسیدیته ۸/۵-۹ نشان دادند. ۶۱ درصد سویه‌های بررسی شده تحمل کننده قلیا بودند و در ۳۹ درصد جدایه‌ها رفتار قلیادوستی مشاهده شد. فراوانی جدایه ها در هرمنطقه با توجه به پاسخ آنها به غلظت های مختلف نمک و اسیدیته متفاوت در شکل ۴ آورده شده است. بیشترین فراوانی در نمک‌دوست‌های تحمل کننده قلیا (۳۸ درصد) و کمترین فراوانی در تحمل کننده‌های نمک قلیادوست (۱۶ درصد) مشاهده شد. میزان فراوانی نمک‌دوست‌های آلکالوفیل و تحمل کننده‌های نمک آلکالوتلورنت، یکسان برآورد شد.

محدوده دمای رشد سویه‌های نمک‌دوست و تحمل کننده نمک: اغلب سویه‌ها نمک‌دوست و تحمل کننده نمک محدوده دمای رشدی ۰-۴۰ درجه سانتیگراد را نشان دادند. در برخی سویه‌ها رشد در دماهای

بالاتر یعنی ۴۵ درجه سانتیگراد هم مشاهده شد.

فعالیت آنزیم‌های هیدرولازی در سویه‌های نمک‌دوست و تحمل کننده نمک: فعالیت هیدرولازی در میان سویه‌های منتخب انجام گرفت. از ۵۷ جدایه بررسی شده تنها در ۷ سویه از باکتری‌های نمک‌دوست نسبی و تحمل کننده نمک فعالیت پروتئاز خارج سلولی دیده شد. فعالیت لیپازی در بیش از نیمی از جدایه‌ها نمایان شد و بیشترین فعالیت در بین آنزیم‌های بررسی شده را به خود اختصاص داد. ۱۵ سویه واجد فعالیت آمیلازی بودند و کمترین فعالیت در آنزیم‌های هیدرولازی بررسی شده مربوط به آنزیم داکسی ریبونوکلئاز بود که تنها در سه سویه مثبت گزارش شد.

شناسایی مولکولی سویه‌های منتخب: با مقایسه توالی ژن 16S rRNA به دست آمده از سویه‌های منتخب با توالی‌های موجود در پایگاه اطلاعاتی Eztaxon، نزدیک‌ترین میکروارگانیسم شناخته شده به هر سویه مشخص گردید. از بین ۵۵ جدایه منتخب، ترادف‌یابی ژن 16S rRNA برای ۱۸ جدایه به صورت کامل و برای ۳۷ جدایه به صورت نسبی و با خواندن توالی در برای رفت انجام شد. بر اساس این نتایج، ۵۵ جدایه بررسی شده متعلق به چهار شاخه باکتریایی *Actinobacteria*، *Bacteroidetes*، *Firmicutes* و *Proteobacteria* بود. جدول ۴ میزان شباهت هر سویه با نزدیک‌ترین میکروارگانیسم شناخته شده را نشان می‌دهد. بیشتر سویه‌ها به شاخه *Proteobacteria* متعلق بودند به طوری که، سویه‌های نمک‌دوست و تحمل کننده نمک، شامل باسیل‌های گرم‌منفی جدا شده در این شاخه در سه رده *Alphaproteobacteria*، *Gammaproteobacteria* و *Betaproteobacteria* قرار گرفتند.

در رده *Alphaproteobacteria* جنس‌های *Talassospira*، *Stappia*، *Caenispirillum*، *Erythrobacter*، *Altererythrobacter*، *Martelella* و *Nesiotobacter* به دست آمد و از رده *Gammaproteobacteria* جنس‌های *Pseudomonas*، *Vibrio*، *Halomonas*، *Idiomarina*، *Marinabacter*، *Saccharospirillum* و *Rheinheimera* جدا شد. از رده *Betaproteobacteria* تنها جنسی که به دست آمد *Achromobacter* بود. سه جنس *Bacillus*، *Halobacillus* و *Paenibacillus* شامل باسیل‌های گرم‌مثبت و کوکوس‌های گرم‌مثبت جنس *Planococcus* در شاخه *Firmicutes* قرار گرفت. دو جدایه با اعضای جنس‌های *Aeromicrobium* و *Jonesia* در شاخه *Actinobacteria* قرابت داشت. تنها یک جنس *Cyclobacterium* از شاخه *Bacteroidetes* به دست آمد که شامل دو سویه باسیل گرم‌منفی بود.

همان طور که جدول ۴ نشان می‌دهد، میزان شباهت ترادف 16S rRNA در دو سویه GCFx20 و GBWx7 به گونه‌های ثبت شده نزدیک، ۱۰۰ درصد بود. این میزان شباهت برای ۱۵ سویه بین ۹۷-۹۸/۹ درصد بود که با انجام هیبریداسیون DNA-DNA با گونه‌های نزدیک و بررسی صفات فنوتیپی ممکن است در گونه جدیدی قرار گیرند. برای ۸ سویه، درصد شباهت کمتر از ۹۷ درصد نشان داده شده که بیانگر تفاوت قابل ملاحظه در سطح گونه و یا حتی جنس بین این سویه‌ها و گونه‌های ثبت شده بوده، این سویه‌ها می‌توانند بدون انجام هیبریداسیون DNA-DNA با گونه‌های نزدیک در گونه‌های جدید قرار گیرند (Stackebrandt and Woese, 1984). سویه GCWy1 با ۹۱ درصد شباهت با گونه‌های ثبت شده در رده *Gammaproteobacteria* نامزد معرفی یک جنس جدید است.

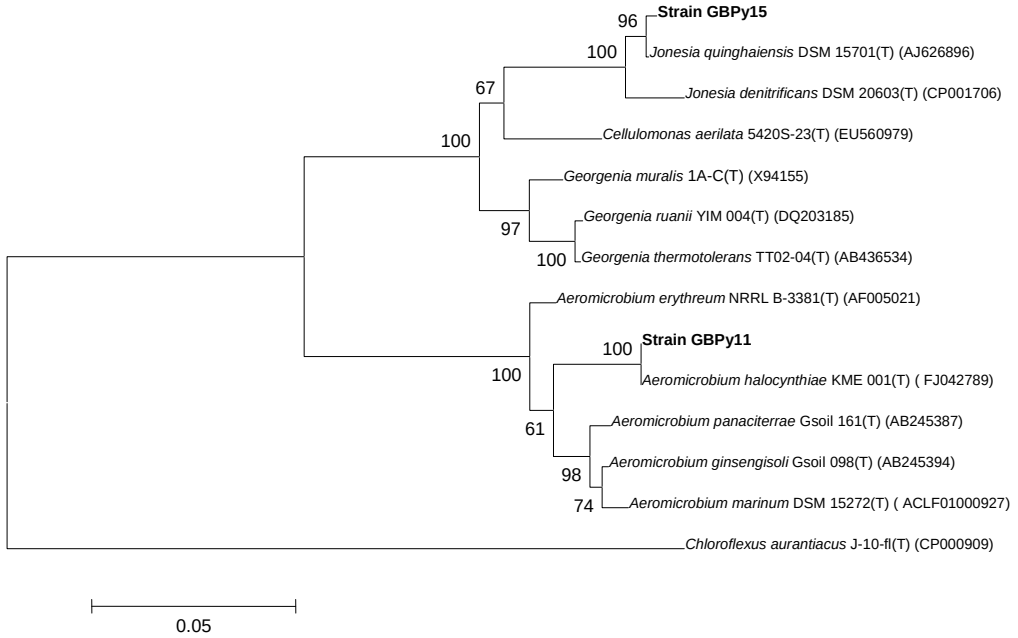
جدول ۴- میزان شباهت سویه‌ها منتخب با نزدیک‌ترین گونه ثبت شده در پایگاه Eztaxon

سویه	سویه‌های نزدیک	شماره دستیابی در بانک ژن	میزان شباهت (درصد)
GAA_x1	*Pseudomonas pachastrellae* KMM 330(T)	AB125366	98.1
GAA_x7	*Martelella mediterranea* MACL11(T)	-	97
GAA_x6	*Vibrio ruber* VR1(T)	AF462458	99.5
GAA_x9	*Rheinheimera aquimaris* SW-353(T)	EF076757	99.6
GAA_y3	*Planococcus rifietoensis* M8(T)	AJ493659	99.6
GAA_y5	*Saccharospirillum impatiens* EL-105(T)	-	95.7
GAA_y6	*Halomonas boliviensis* LC1(T)	AY245449	99.2
GAS_x6	*Bacillus circulans* ATCC 4513(T)	AY724690	99.3
GAS_x9	*Bacillus cohnii* DSM 6307(T)	-	97
GAS_x17	*Idiomarina zobellii* KMM 231(T)	AF052741	99.7
GAS_x19	*Idiomarina zobellii* KMM 231(T)	AF052741	99.8
GAS_x20	*Marinobacter santoriniensis* NKSG1(T)	-	96.4
GAS_x25	*Paenibacillus chungangensis* CAU 9038(T)	-	97.8
GAS_x41	*Cyclobacterium lianum* HY9(T)	-	94.6
GAS_y1	*Bacillus neizhouensis* JSM 071004(T)	-	97.2
GAS_y9	*Bacillus cohnii* DSM 6307(T)	-	97
GAW_x1	*Altererythrobacter ishigakiensis* JPCCMB0017(T)	-	98.1
GAW_x3	*Idiomarina zobellii* KMM 231(T)	AF052741	99.8
GAW_y5	*Marinobacter hydrocarbonoclasticus* MBIC1303(T)	AB019148	97.6
GAW_y6	*Halomonas andesensis* LC6(T)	EF622233	99.5
GBF_x3	*Stappia stellulata* IAM 12621(T)	D88525	99
GBF_y1	*Bacillus cohnii* DSM 6307(T)	X76437	99.6
GBP_x2	*Cyclobacterium lianum* HY9(T)	-	97
GBP_x3	*Vibrio ordalii* ATCC 33509(T)	X74718	99.6
GBP_x9	*Halomonas sulfidaeris* ATCC BAA-803(T)	AF212204	97.7
GBP_y5	*Pseudomonas sabulinigri* J64(T)	–	95.4
GBP_y7	*Idiomarina fontislapidosi* F23(T)	–	93.8
GBP_y11	*Aeromicrobium halocynthiae* KME 001(T)	FJ042789	99.7
GBP_y13	*Planococcus rifietoensis* M8(T)	AJ493659	99
GBP_y15	*Jonesia quinghaiensis* DSM 15701(T)	AJ626896	99.6
GBP_y16	*Bacillus horikoshii* DSM 8719(T)	X76443	99.3
GBS_x1	*Idiomarina zobellii* KMM 231(T)	AF052741	99.6
GBS_x2	*Marinobacter szutsaonensis* NTU-104(T)	EU164778	98.7
GBS_y1	*Idiomarina fontislapidosi* F23(T)	–	94.6
GBW_x7	*Nesiotobacter exalbescens* LA33B(T)	AF513441	100
GBW_x8	*Marinobacter hydrocarbonoclasticus* MBIC1303(T)	AB019148	99.9
GBW_x15	*Bacillus hwajinpoensis* SW-72(T)	AF541966	99.4
GBW_x29	*Achromobacter marplatensis* B2(T)	–	96.7
GBW_y1	*Bacillus horikoshii* DSM 8719(T)	X76443	98.9
GBW_y4	*Marinobacter hydrocarbonoclasticus* MBIC1303(T)	AB019148	98.4
GBW_y6	*Halomonas andesensis* LC6(T)	EF622233	99.5
GCF_x1	*Caenispirillum salinarum* AK4(T)	FN995238	99.4
GCF_x3	*Idiomarina zobellii* KMM 231(T)	AF052741	99.6
GCF_x8	*Thalassospira profundimaris* WP0211(T)	AY186195	99.4
GCF_x14	*Halobacillus trueperi* DSM 10404(T)	AJ310149	99.7
GCF_x16	*Idiomarina seosinensis* CL-SP19(T)	–	97.8
GCF_x20	*Halomonas ventosae* Al12(T)	AY268080	100
GCF_y1	*Marinobacter lipolyticus* SM19(T)	AY147906	96.5
GCF_y5	*Halomonas andesensis* LC6(T)	EF622233	99.3
GCS_x7	*Bacillus vietnamensis* 15-1(T)	AB099708	97.8
GCS_x17	*Halobacillus alkaliphilus* FP5(T)	AM295006	99.3

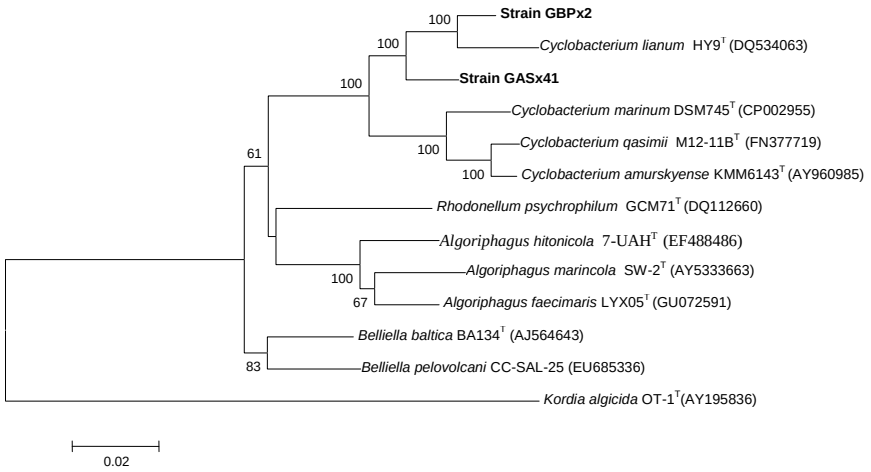
سویه	سویه‌های نزدیک	شماره دستیابی در بانک ژن	میزان شباهت (درصد)
GCS_x21	*Halobacillus alkaliphilus* FP5(T)	AM295006	99.4
GCS_x25	*Erythrobacter nanhaisediminis* T30(T)	FJ654473	99.6
GCSy1	*Bacillus neizhouensis* JSM 071004(T)	-	97
GCW_x8	*Marinobacter hydrocarbonoclasticus* MBIC1303(T)	AB019148	99.9
GCW_y1	*Saccharospirillum impatiens* EL-105(T)	-	91.1

رسم درخت فیلوژنتیک سویه‌های نمک‌دوست و تحمل‌کننده نمک: برای سویه‌های ترادف‌یابی شده پس از هم‌راستا کردن ترادف‌ها با ترادف گونه‌های نزدیک، درخت فیلوژنتیک با الگوریتم‌های Maximum Parsimony، Maximum likelihood و Neighbor-Joining رسم شد. در مقایسه درخت‌های رسم شده، محل قرارگیری زیرشاخه‌ها و شاخه‌ها در هر سه روش با یکدیگر هم‌خوانی داشت.

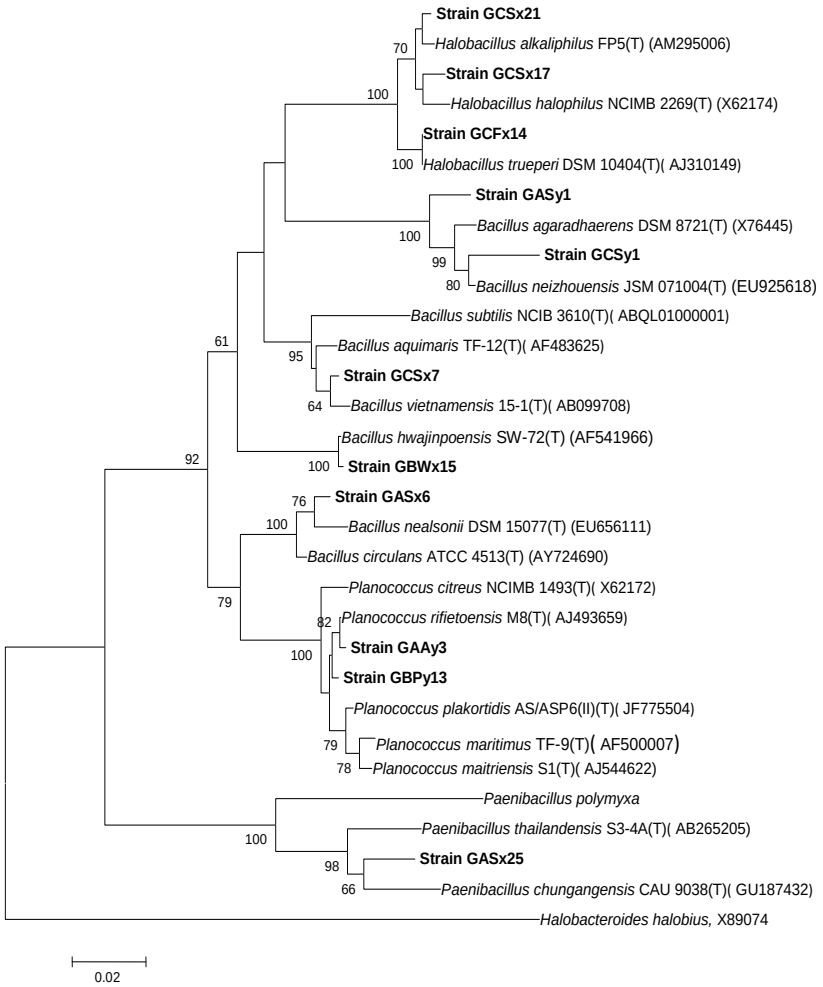
درخت فیلوژنتیک سویه هایی که با گونه های متعلق به شاخه *Actinobacteria* قرابت دارند در شکل ۵ نشان داده شده است. در شکل ۶ درخت فیلوژنتیک سویه‌هایی که با گونه‌های متعلق به شاخه *Bacteroidetes* قرابت دارند نشان داده شده است. شکل ۷ درخت فیلوژنتیک باسیل‌های گرم‌مثبت و کوکوس‌های گرم‌مثبت ترادف‌یابی شده با سویه‌های ثبت شده نزدیک به آنها در رده *Firmicute* را نشان می‌دهد. در شکل ۸ درخت فیلوژنتیک سویه‌هایی که با گونه‌های متعلق به سه رده *α-Proteobacteria*، *γ-Proteobacteria* و *β-Proteobacteria* قرابت دارند نشان داده شده است. این سویه ها بیشترین فراوانی را در بین جدایه‌هایی که ترادف‌یابی برای آنها انجام شده است به خود اختصاص داده‌اند.



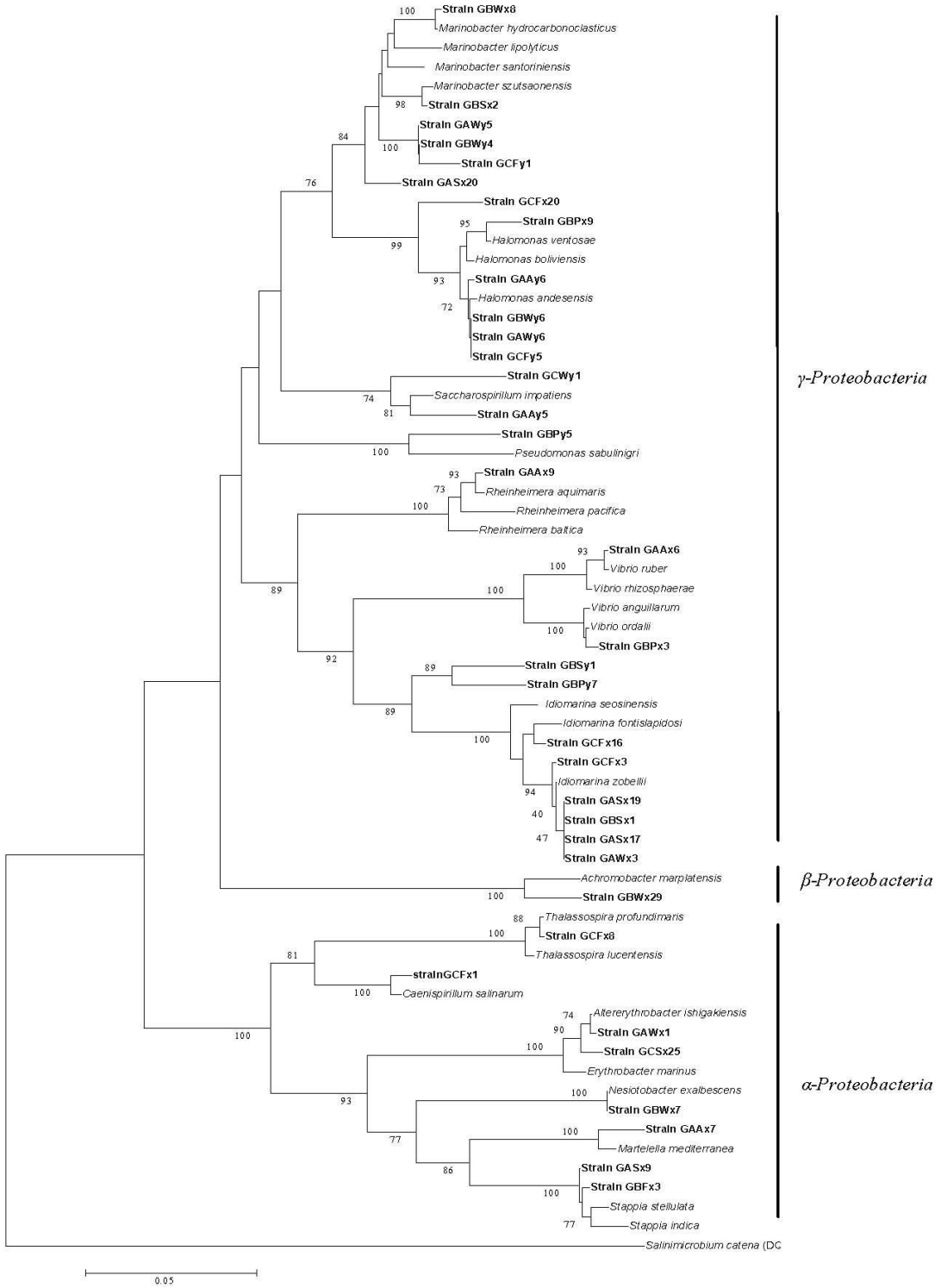
شکل ۵- دندروگرام 16S rRNA باکترهای ترادف‌یابی شده که به جنس‌های موجود در شاخه *Actinobacteria* قرابت نشان دادند. اعداد ذکر شده در محل انشعاب نشانگر درصد نمونه‌گیری bootstrap از ۱۰۰ نمونه است. سویه *Chloroflexus aurantiacus* به عنوان outgroup قرار داده شد.



شکل۶- دندروگرام 16S rRNA باکتری‌های ترادف‌یابی شده که به جنس‌های موجود در شاخه *Bacteroidetes* قرابت نشان دادند. اعداد ذکر شده در محل انشعاب نشانگر درصد نمونه‌گیری bootstrap از ۱۰۰۰ نمونه است. سویه *Kordia algicida* OT-1^T به عنوان outgroup قرار داده شد.



شکل ۷- دندروگرام16S rRNA باکتری‌های ترادف‌یابی شده که به جنس‌های باسیلوس و جنس‌های وابسته و کوکوس‌های گرم‌مثبت موجود در شاخه *Firmicute* قرابت نشان دادند. اعداد ذکر شده در محل انشعاب نشانگر درصد نمونه گیری bootstrap از ۱۰۰۰ نمونه است. سویه *Halobacteroides halobius*, X89074 به عنوان outgroup قرار داده شد.



شکل ۸- دندروگرام 16S rRNA باکتری‌های ترادف‌یابی شده که به جنس‌های موجود در سه رده *α-Proteobacteria*، *γ-Proteobacteria* و *β-Proteobacteria* شاخه عظیم *Proteobacteria* قرابت نشان دادند. اعداد ذکر شده در محل انشعاب نشانگر درصد نمونه گیری bootstrap از ۱۰۰۰ نمونه است. سویه *Salinimicrobium catena* (DQ640642) به عنوان outgroup قرار داده شد.

بحث

به منظور درک چگونگی عمل جامعه میکروبی و کل اکوسیستم، به طور محض شناسایی اجزای مختلف جامعه مقدماتی‌ترین مرحله است، که نیاز به داده‌هایی در مورد عملکرد آنها، میان‌کنش و دینامیک فضایی و زمانی و شاخص‌های محیطی برای تکمیل آن دارد. گسترش الگوهای اکوسیستم بر طبق همه این اطلاعات ضروری است، اما نظر به اینکه داده‌های اولیه ارتباط‌دهنده اکثر میکروب‌ها به عملکردشان هنوز ناشناخته است، این یک هدف دراز مدت است (López-García and Moreira, 2008). شوری پایین تالاب گمیشان همچنین اسیدیته قلیایی آن، این محیط را از دیگر اکوسیستم‌های شور بررسی شده در ایران نظیر دریاچه ارومیه، دریاچه آران و بیدگل با شوری بالا و اسیدیته خنثی و دریاچه پرشور حوض سلطان متمایز می‌کند. بنابراین، امکان دستیابی به جمعیت‌های میکروبی متفاوت از سایر اکوسیستم‌های بررسی شده وجود دارد. در این پژوهش، جداسازی و شناسایی سویه‌های نمک‌دوست نسبی و تحمل‌کننده نمک قابل کشت تالاب قلیایی شور-دریایی گمیشان واقع در شمال‌شرق ایران، سنجش شد. جدایه‌های حاصل از محیط MA نظیر GAA_x6، GAA_x9، GAA_x7، GAS_x9، GAS_x19، GAS_x41، GAW_x1، GAW_x3، GBFx3، GBP_x2، GBP_x9، GBS_x1 و GCS_x25 قرابت زیادی با گونه‌های *Aeromicrobium halocynthiae*، *Altererythrobacter ishigakiensis*، *Bacillus neizhouensis*، *Cyclobacterium lianum*، *Erythrobacter nanhaisediminis*، *Halomonas sulfidaeris*، *Idiomarina zobellii*، *Martelella mediterranea*، *Rheinheimera aquimaris*، *Stappia stellulata* و *Vibrio ruber* که منشأ دریایی دارند، نشان دادند. به دلیل اینکه این تالاب منشأ دریایی دارد و یک تالاب دریایی-ساحلی است چنین نتیجه‌ای قابل پیش‌بینی بود. قابل توجه است که بیشترین جدایه‌های منسوب به گونه‌های دریایی از نقطه A جداسازی شد و این منطقه در واقع نزدیک‌ترین فاصله را از نظر موقعیت جغرافیایی با دریای خزر نسبت به دو منطقه دیگر نمونه گیری دارد. از این رو، فراوانی بیشتر این نوع جدایه‌ها از این مکان دور از انتظار نیست.

با توجه به اسیدیته قلیایی تالاب گمیشان، استفاده از محیط‌های کشت با اسیدیته قلیایی ضروری به نظر می‌رسید و منجر به جداسازی سویه‌هایی گردید که قرابت زیادی به گونه‌های قلیادوست از قبیل قبیل *Halobacillus alkaliphilus* FP5(T) و *Bacillus horikoshii* DSM 8719(T) نشان دادند. از آنجا که گونه‌های جنس *Bacillus* توانایی گسترده‌ای در تولید آنزیم‌های هیدرولازی دارند، ارزیابی این سویه‌ها از نظر تولید آنزیم‌های قلیایی می‌تواند در زیست فناوری حایز اهمیت باشد.

مطالعات نشان داد که بیشترین جدایه‌ها حاصل از کشت، متعلق به باسیل‌های گرم‌مثبت (۵۹ درصد) به ویژه باسیل‌های گرم‌مثبت اسپوردار است که چنین یافته ای، تأییدی بر شرایط سخت این مکان اکولوژیک متغیر و پویاست. اسپور این باکتری‌ها قابلیت مقاومت نسبت به شرایط سخت و حالت خفتگی را دارا بوده، می‌تواند شرایط سخت و نامطلوب را تحمل نماید. دلیل دیگر آن می‌تواند استفاده از محیط‌های کشت انتخابی و شرایط آزمایش باشد که منجر به جداسازی بیشتر باسیل‌های گرم‌مثبت شده است. در مطالعه باباولیان (۱۳۸۶)، جداسازی و شناسایی باکتری‌های نمک‌دوست

نسبی بومی دریاچه نمک آران و بیدگل انجام شد و بر اساس شباهت‌های فنوتیپی در میان جدایه‌های جداسازی شده، در نهایت، ۸۳ سویه نمک‌دوست نسبی جدا شد که ۴۴ سویه آنها باسیل گرم‌مثبت بودند (باباولیان، ۱۳۸۶). همین نتیجه در بررسی‌های بعدی بر روی دریاچه آران و بیدگل با فراوانی بیشتری از باسیل‌های گرم‌مثبت به دست آمده است (دیدری خمسه مطلق، ۱۳۸۸؛ باقری، ۱۳۸۸). در مطالعه مشابهی بر روی دریاچه پرشور ارومیه نیز باسیل‌های گرم‌مثبت دارای بیشترین فراوانی بودند و ۵۹/۹ درصد جدایه‌ها را به خود اختصاص دادند (مهرشاد، ۱۳۹۰)، که این فراوانی به نتایج به دست آمده در پژوهش حاضر نزدیک‌تر است. در بررسی تنوع زیستی دریاچه‌های شور در مغولستان داخلی توسط Ventosa و همکاران (۲۰۰۶) ۱۶۳ باکتری نمک‌دوست نسبی جدا شد که ۱۰۲ سویه آن به جنس‌های *Bacillus*، *Halobacillus*، *Oceanobacillus*، *Gracilibacillus*، *Virgibacillus*، *Filobacillus* و *Thalassobacillus* تعلق داشتند. اما در مطالعات مشابه توسط Ghozlan و همکاران (۲۰۰۶) در محیط‌های شور مصر به جداسازی ۷۶ باکتری نمک‌دوست نسبی گرم‌منفی و ۱۴ باکتری نمک‌دوست نسبی گرم‌مثبت منجر شد (Ghozlan *et al*., 2006).

در مرحله بعد باسیل‌های گرم‌منفی با ۲۴ درصد فراوانی و اشکال خمیده که شامل سلول های ویبریوفرم و مارپیچی بود، ۱۴ درصد جدایه ها را به خود اختصاص دادند. در بررسی مشابه دیگر توسط دیدری خمسه مطلق (۱۳۸۸) و باقری (۱۳۸۸) به ترتیب بر روی جدایه‌های تحمل‌کننده نمک و نمک‌دوست نسبی دریاچه شور آران و بیدگل، اشکال ویبریوفرم و مارپیچی گزارش نشده است. با توجه به این مطلب که تالاب گمیشان بر خلاف دریاچه نمکی آران و بیدگل که یک دریاچه اتالازوهالین است، یک تالاب دریایی-ساحلی است و وجود جدایه‌های گرم‌منفی ویبریوفرم و مارپیچی قابل انتظار است. بنابراین، تفاوت‌های مشاهده شده را می توان به ویژگی‌های متفاوت زیستگاه های مختلف نسبت داد و صحت این موضوع که تنوع زیستی هر زیستگاه از ویژگی‌های منحصر به فرد آن محسوب می‌شود و پژوهش روی هر محیط جدید اهمیت خاص خود را دارد، تأیید کرد. کوکوس‌های گرم‌مثبت تنها ۷ درصد سویه‌ها را تشکیل دادند.

در هر سه منطقه نمونه‌برداری در تالاب گمیشان میزان جدایه های نمک دوست نسبی بیشتر بود. این حالت در منطقه C با توجه به میزان شوری سنجش شده بالاتر نسبت به دو مکان دیگر نمونه گیری (A و B) برجسته‌تر بود. از سوی دیگر، استفاده از محیط های انتخابی احتمالاً تمایل را به سمت فراوانی بیشتر باکتری‌های نمک‌دوست سوق داده است.

با توجه به اسیدیته قلیایی این اکوسیستم، جداسازی سویه‌های قلیادوست و تحمل‌کننده قلیا قابل انتظار بود. ۳۹ درصد سویه های بررسی شده قلیادوست بودند، به طوری که بهینه رشد خود را در اسیدیته ۹ نشان دادند و توانایی رشد در اسیدیته ۱۰ را داشتند. ۲۳ درصد این سویه‌ها را جدایه‌های نمک‌دوست قلیادوست تشکیل دادند. یعنی این سویه ها رشد بهینه خود را در دو نوع شرایط تنشی فیزیکوشیمیایی نشان دادند و می توان آنها را جزو باکتری‌های پلی‌اکستریموفیل در نظر گرفت. از طرف دیگر، بیشترین فراوانی مربوط به سویه‌های تحمل‌کننده قلیا بود که ۳۸ درصد آنها هالوآلکالوتلورنت بودند و ۲۳ درصد باقی مانده تحمل‌کننده نمک آلکالوتلورنت بودند. در بررسی تنوع

زیستی باکتری‌های نمک‌دوست و تحمل کننده نمک دریاچه ارومیه، دو سویه نمک دوست قلیادوست که به گونه قلیادوست *Alkalibacterium putridalgicola* قرابت داشتند، به دست آمد (مهرشاد، ۱۳۹۰). به طور کلی، ۹۵ باکتری نمک‌دوست قلیادوست از زیستگاه‌های نمکی مختلف جدا شده است. بیشتر این سویه‌ها می‌توانند در دامنه ۵-۲۵ درصد کلرید سدیم و اسیدیته ۸-۱۰ رشد کنند. در تحقیقی Dodia و همکاران (۲۰۰۶) بر اساس همسانی ژن 16S rRNA، ۵ سویه از ۱۳ جدایه جدید بود در حالی که ۸ سویه دیگر با بیش از ۹۰ درصد همسانی توالی با نمک دوست‌ها و قلیادوست‌های متفاوت جداسازی شده از دریاچه‌های قلیایی و سایر زیستگاه‌های پرشور مختلف در سراسر کره خاکی ظاهر شدند (Dodia *et al*., 2006). در بررسی دیگر توسط Foti و همکاران (۲۰۰۸) بر روی دریاچه‌های قلیایی روسیه، هیچ یک از گونه‌های توصیف شده به واقع به عنوان نمک دوست قلیادوست و نمک‌دوست تحمل کننده قلیا تعریف نشد. سایر مطالعات بر روی دریاچه‌های قلیایی کنیا و مصر بر اساس تکنیک مستقل از کشت کلون انجام شد، سویه های به دست آمده به نمک دوست‌های قلیادوست توصیف شده وابسته بودند (Foti *et al*., 2008).

باکتری های نمک دوست قلیادوست در طی دهه گذشته مورد توجه شایانی بوده و هستند و به طور وسیعی تنوع فیلوژنتیک آنها بررسی شده است. اطلاعات محدودی روی پتانسیل آنزیمی و خصوصیات آنزیمی این ارگانیسم‌ها در دسترس است (Singh *et al*., 2006). از ۵۷ سویه مطالعه شده از نظر وجود آنزیم‌های هیدرولیتیک ۳۲ جدایه لیپاز، ۱۵ جدایه آمیلاز، ۷ جدایه پروتئاز و ۳ جدایه DNase تولید می‌کنند. ۱۵ سویه از نظر تولید آنزیم هیدرولازی بررسی شده فاقد فعالیت هستند. تمام سویه‌های پروتئاز مثبت (تولیدکننده پروتئاز) از باکتری های نمک‌دوست و تحمل کننده نمک تحمل کننده قلیا هستند. فعالیت لیپازی در بیش از نیمی از جدایه ها مثبت بود. جالب توجه است که ۷ سویه از جدایه‌های نمک‌دوست قلیادوست به دست آمده مولد آنزیم لیپاز خارج سلولی هستند، این آنزیم‌ها می‌توانند در زیست فناوری حایز اهمیت باشند. فعالیت آنزیم آمیلاز نیز در چهار سویه نمک دوست قلیادوست مشاهده شد. علاوه برآن در سویه‌های تحمل کننده نمک قلیادوست و تحمل کننده قلیا نیز این آنزیم شناسایی شد. تنها در یک سویه از جدایه ها نمک‌دوست قلیادوست فعالیت آنزیم داکسی ریبونوکلئاز مشاهده شد. پژوهش انجام شده بر روی دریاچه حوض سلطان منجر به جداسازی ۲۳۱ جدایه نمک‌دوست شد که طیف وسیعی از آنزیم‌های هیدرولازی را تولید می‌کردند و میکروارگانیسم نمک دوست فاقد فعالیت هیدرولیتیک مشاهده نشد. از بین آنزیم‌های مطالعه شده، ۱۹۵ سویه تولید آمیلاز، ۱۷۷ سویه پروتئاز، ۶۵ سویه DNase و ۲۸ سویه مولد لیپاز بودند. در مقایسه با نتایج حاصل از پژوهش حاضر که سویه های مولد آنزیم لیپاز بیشترین فراوانی را در جدایه‌های مورد بررسی دارند، باکتری‌های نمک‌دوست جدا شده مولد لیپاز از دریاچه حوض سلطان کمترین فراوانی را به خود اختصاص دادند (Rohban *et al*., 2009). در بررسی تنوع زیستی میکروارگانیسم‌های نمک‌دوست تولید کننده آنزیم‌های هیدرولیتیک خارج سلولی در دریاچه ارومیه توسط آموزگار و همکاران (۱۳۸۶)، ۱۸۸ جدایه نمک‌دوست جداسازی شد که از نظر تولید آنزیم های هیدرولازی

ارزیابی شدند. ۱۰۶ جدایه قادر به تولید آنزیم داکسی ریبونوکلئاز، ۶۳ جدایه لیپاز و ۵۷ جدایه آمیلاز و ۴۹ جدایه پروتئاز مثبت بودند. برخلاف پژوهش حاضر که کمترین فراوانی مربوط به سویه‌های مولد داکسی ریبونوکلئاز است، در بررسی انجام شده روی جدایه‌های نمک‌دوست دریاچه ارومیه سویه‌های مولد این آنزیم بیشترین فراوانی را به خود اختصاص دادند (زهرایی، ۱۳۸۶).

۵۵ سویه منتخب با توالی‌یابی 16S rRNA در ۲۲ جنس مختلف قرار گرفتند، که به شش رده باکتریایی *Actinoacteria*، *Bacteroidetes*، *Firmicutes*، *α-Proteobacteria*، *γ-Proteobacteria* و *β-Proteobacteria* تعلق داشتند و اغلب سویه ها به رده *Gammaproteobacteria* متعلق بودند و در مجموع، ۲۳ سویه نمک‌دوست و تحمل‌کننده نمک در این رده قرار گرفت که شامل ۱۱ باسیل گرم‌منفی و مابقی اشکال خمیده گرم‌منفی شامل ویبریوفرم و مارپیچی بود. باسیل های گرم‌منفی در جنس های *Halomonas*، *Idiomarina*، *Marinobacter*، *Pseudomonas* و *Rheinheimera* قرار گرفتند و سلول‌های مارپیچی و ویبریو فرم به چهار جنس *Idiomarina*، *Marinobacter*، *Saccharospirillum* و *Vibrio* تعلق داشتند. ۱۵ سویه به رده *Firmicutes* متعلق بود که شامل ۱۳ باسیل گرم‌مثبت و ۲ کوکوس گرم‌مثبت بود. باسیل‌های گرم‌مثبت در جنس‌های *Bacillus*، *Halobacillus* و *Paenibacillus* قرار گرفتند و کوکوس‌های گرم‌مثبت به جنس *Planococcus* قرابت نشان دادند. در رده *Alphaproteobacteria* ۸ باسیل گرم‌منفی متعلق به جنس های *Altererythrobacter*، *Caenispirillum*، *Erythrobacter*، *Martelella*، *Nesiotobacter*، *Stappia* و *Thalassospira* مشاهده شد. تنها جنسی که به رده *Betaproteobacteria* تعلق داشت جنس *Achromobacter* بود. از شاخه *Actinobacteria* دو باسیل گرم‌مثبت متعلق به جنس‌های *Aeromicrobium* و *Jonesia* جداسازی شد. تنها جنس جدا شده از شاخه *Bacteroidetes*، جنس *Cyclobacterium* بود که دو باسیل خمیده گرم منفی را به خود اختصاص داد. در مطالعه باباولیان (۱۳۸۶)، جداسازی و شناسایی باکتری‌های نمک‌دوست نسبی بومی دریاچه نمک آران و بیدگل و توانایی این میکروارگانیسم‌ها در تولید آنزیم‌های هیدرولازی خارج سلولی بررسی شده است. بر اساس شباهت‌های فنوتیپی در میان جدایه های جداسازی شده، در نهایت، ۸۳ سویه نمک‌دوست نسبی جدا شد که به جنس های نمک‌دوست نسبی *Bacillus*، *Thalassobacillus*، *Salinicoccus*، *Halobacillus*، *Halomonas*، *Staphylococcus*، *Marinococcus*، *Idiomarina* و *Salicola* قرابت داشته، بیشترین فراوانی مربوط به جنس های *Salicola* و *Halobacillus* گزارش گردید (باباولیان، ۱۳۸۶). مطالعات مشابه توسط آموزگار و همکاران (۱۳۸۸) بر روی دریاچه نمک آران و بیدگل انجام شد و به طور مجزا تنوع زیستی باکتری‌های نمک‌دوست نسبی و تحمل‌کننده نمک بررسی شده است. در بررسی که روی باکتری‌های تحمل‌کننده نمک دریاچه صورت گرفت، اغلب سویه ها به رده *Firmicutes* متعلق بود و در مجموع، ۴۱ سویه تحمل‌کننده نمک در این رده قرارگرفت که شامل ۳۵ باسیل گرم‌مثبت و ۶ کوکوس گرم‌مثبت بود. باسیل های گرم‌مثبت شامل جنس‌های *Aneurinibacillus*، *Bacillus*، *Brevibacillus*، *Marinilactibacillus*،

Oceanobacillus، *Ornithinibacillus*، *Paenibacillus* و *Virgibacillus* بود. کوکوس‌های گرم‌مثبت رده *Firmicutes* در چهار جنس *Staphylococcus*، *Aerococcus*، *Jeotgalicoccus* و *Salinicoccus* قرار گرفت. چهار جدایه با اعضای رده *Actinobacteria* قرابت داشت که دو جدایه متعلق به جنس *Arthrobacter* و دو جدایه در جنس‌های *Kocuria* و *Microbcterium* گزارش شدند. در رده *γ-Proteobacteria* سه باسیل گرم‌منفی گزارش شد که با اعضای جنس‌های *Pseudomonas*، *Halomonas* و *Acinetobacter* قرابت نشان دادند. یک کوکوس گرم منفی متعلق به جنس *Paracoccus* و یک باسیل گرم‌منفی متعلق به جنس *Brevundimonas* در رده *α-Proteobacteria* نیز گزارش شدند (دیدری خمسه مطلق، ۱۳۸۸). همچنین، مطالعه‌ای بر روی باکتری‌های نمک دوست نسبی دریاچه آران و بیدگل به جداسازی سویه‌های گرم‌مثبت که از نظر فیلوژنتیک در جنس‌های *Aquisalibacillus*، *Bacillus*، *Gracilibacillus*، *Halobacillus*، *Oceanobacillus*، *Ornithinibacillus*، *Paraliobacillus*، *Piscibacillus*، *Salinicoccus*، *Salirhabdus*، *Thalassobacillus* و *Virgibacillus* قرار می‌گرفتند، منجر شد. سویه‌های گرم‌منفی از جنس‌های *Salicola*، *Marinobacter*، *Chromohalobacter*، *Halomonas* و *Idiomarina* جداسازی و شناسایی شدند (باقری، ۱۳۸۸). بررسی تنوع زیستی باکتری‌های نمک‌دوست نسبی و تحمل کننده نمک سواحل غربی دریاچه ارومیه به جداسازی جدایه‌های گرم‌مثبت در جنس‌های *Halobacillus*، *Planococcus*، *Gracilibacillus*، *Basillus*، *Staphylococcus*، *Ornithinibacillus*، *Alkalibacterium*، *Kocuria*، *Pontibacter*، *Sanguibacter*، *Micrococcus*، *Oceanobacillus*، *Microbacterium*، *Thalassobacillus* و *Piscibacillus* و جدایه‌های گرم‌منفی در جنس‌های *Halomonas*، *Paracoccus*، *Marinobacter*، *Providencia*، *Lysobacter*، *Pontibacter*، *Salicola* و *Brevundimonas* منجر شد (مهرشاد، ۱۳۹۰).

برخلاف پژوهش حاضر، در هر چهار پژوهش تفسیر شده، باسیل‌های گرم‌مثبت بیشترین میزان فراوانی را به خود اختصاص دادند. سویه‌های جداسازی شده در این بررسی تنوع فیلوژنتیک بالاتری نسبت به مطالعات گذشته دارد و این تنوع در شش رده باکتریایی پراکنده شده است. در هیچ یک از این پژوهش‌ها جنس‌های *Achromobacter*، *Aeromicrobium*، *Altererythrobacter*، *Caenispirillum*، *Cyclobacterium*، *Erythrobacter*، *Jonesia*، *Martelella*، *Nesiotobacte*، *Planococcus*، *Rheinheimera*، *Saccharospirillum*، *Stappia*، *Thalassospira* و *Vibrio* مشاهده نشد. تعداد و تنوع نمونه‌ها، فصل‌های مختلف نمونه‌برداری، تعداد و تنوع نمونه‌های به کار گرفته شده، توزیع طبیعی میکروارگانیسم‌ها در محیط‌زیست و مشخصات اکولوژی هر منطقه همگی از جمله مواردی هستند که در نوع باکتری‌های جداسازی شده اثر خواهند داشت (Alain and Querellou, 2009). احتمال افزایش تنوع موجود با افزایش هر بار نمونه‌برداری، بدون رسیدن به آستانه شناخت تنوع کامل در تعداد نمونه‌برداری امکان‌پذیر نیز در تفاوت نوع و تعداد میکروارگانیسم‌های جدا شده در هر پژوهش تأثیرگذار خواهد بود (Hughes *et al.*, 2001).

منابع

باباولیان، ح. (۱۳۸۶) تنوع زیستی باکتری‌های نمک‌دوست نسبی تولید کننده آنزیم‌های هیدرولیتیک دریاچه نمک آران و بیدگل. پایان‌نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم، قم، ایران.

باقری، م. (۱۳۸۸) بررسی تنوع باکتری‌های نمک‌دوست نسبی هتروتروف هوازی و قابل کشت در دریاچه آران و بیدگل. پایان‌نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه تهران، تهران، ایران.

دیدری خمسه مطلق، م. (۱۳۸۸) بررسی تنوع باکتری‌های تحمل‌کننده نمک هوازی هتروتروف قابل کشت در دریاچه آران و بیدگل. پایان‌نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه تهران، تهران، ایران.

بهروزی‌راد، ب. (۱۳۸۶) تالاب‌های ایران. سازمان جغرافیایی نیروی‌های مسلح، تهران.

زهرایی، ش. (۱۳۸۶) بررسی تنوع زیستی میکروارگانیسم‌های نمک‌دوست تولید کننده آنزیم‌های هیدرولیتیک خارج سلولی در دریاچه ارومیه. پایان‌نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه تهران، تهران، ایران.

مهرشاد، م. (۱۳۹۰) بررسی تنوع زیستی باکتری‌های نمک‌دوست وتحمل‌کننده نمک سواحل غربی دریاچه ارومیه. پایان‌نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه تهران، تهران، ایران.

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

Amoozegar, M. A., Malekzadeh, F. and Malik, K. A. (2003) Production of amylase by newly isolated moderate halophile Halobacillus sp. Strain MA-2. Microbiology Methods 52: 353-359.

Amoozegar, M. A., Schumann, P., Hajighasemi, M. and Fatemi, A. Z. (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.

Atlas, R. M. and Bartha, R. (1998) Microbial ecology: fundamentals and applications. 4th edition. Addison-Wesley. California.

Caton, T. (2004) Halotolerant aerobic heterotrophic bacteria from the Great Salt Plains of Oklahoma. Microbial Ecology 4: 449-462.

Dodia, M. S., Patel, R. K., Rupal, H., Joshi, R. H., Patel, B. K. C. and Singh, S. P. (2006) Diversity and molecular phylogeny of the haloalkaliphilic bacteria isolated from Western coast of India. The sixth International Congress on Extremophiles. Brest, France.

Foti, M. J., Sorokin, D. Y., Zacharova, E. E., Pimenov, N. V., Kuenen, J. G. and Muyzer, G. (2008) Bacterial diversity and activity along a salinity gradient in soda lakes of the Kulunda Steppe (Altai, Russia). Extremophiles 12: 133-145.

Gerhardt, P. and Murray, R. G. E. (1994) Methods for general and molecular bacteriology. American Society for Microbiology. Washington.

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

Grant, W. D. (1992) Hypersaline environments. Proceedings of the Sixth International Symposium on Microbial Ecology. Barcelona, Spain.

Hughes, J. Hellmann, J. Ricketts, T. H. and Bohannan B. J. M. (2001) Counting the uncountable:

statistical approaches to estimating microbial diversity. Applied Environmental Microbiology 10: 4399-4406.

Kamekura, M. (1998) Diversity of extremely halophilic bacteria. Extremophiles 2: 289-295.

Kushner, D. J. and Kamekura, M. (1988) Physiology of halophilic eubacteria. CRC Press, Boca Raton.

López-García, P. and Moreira D. (2008) Tracking microbial biodiversity through molecular and genomic ecology. Research in Microbiology 1: 67-73.

Makhdoumi Kakhki, A., Amoozegar, M. A., Kazemi, B., Paši, L. and Ventosa, A. (2012) Prokaryotic diversity in Aran-Bidgol salt lake, the largest hypersaline playa in Iran. Microbes and Environments 1: 87-93.

Martin, S., Marquez, M., Sanchez-Porro, C., Mellado, E., Arahal, D. R. and Ventosa, A. (2003) Marinobacter lipolytic sp. nov. a novel moderate halophile with lipolytic activity. International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology 53: 1383-1387.

Oren, A. (1994) The ecology of the halophilic archaea. Federation of European Materials Societies Microbiology 13: 415-440.

Oren, A. (2002a) Halophilic microorganisms and their environments. Kluwer Scientific Historical Survey, Dordrecht.

Oren, A. (2002b) Molecular ecology of extremely halophilic archaea and bacteria. Federation of European Materials Societies Microbiology 1: 1-7.

Rodriguez-Valera, F. (1993) Introduction to saline environments. The biology of halophilic bacteria. CRC Press Incorporation. Boca Raton.

Rohban, R., Amoozegar, M. A. and Ventosa, A. (2009) Screening and isolation of halophilic bacteria producing extracellular hydrolyses from Howz Soltan Lake, Iran. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology Official Journal of the Society for Industrial Microbiology 36: 333-340.

Ronald, M. (2005) Media for environmental microbiology. 2nd edition, Taylor and Francis Group, Boca Raton.

Simbert, R. M. and Krieg, N. R. (1994) Phenotypic characterization. In: Methodes for general and molecular bacteriology (eds. Gerhard, P., Murray, R. G. E., Wood, W. A. and Krieg, N. R.) 607-655. American Society for Microbiology, Washington.

Singh, S. P., Dodia, M. S. and Joshi, R. H. (2006) Diversity among haloalkaliphilic bacteria isolated from Western India with respect to the occurrence and properties of extracellular alkaline proteases. The Sixth International Congress on Extremophiles. Brest, France.

Spencer, J. F. T. and Ragout de Spencer, A. L. (2004) Environmental microbiology: methods and protocols. Humana Press Incorporation, New Jersey.

Stackebrandt, E. and Woese, C. R. (1984) The phylogeny of prokaryotes. Microbiological sciences 5: 117-122.

Tamura, K. and Dudley, J. (2007) MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. Molecular Biology and Evolution 8: 1596-1599.

Ulukanli, Z. (2002) Alkaliphilic micro-organisms and habitats. Turkish Journal of Biology 26: 181-191.

Isolation and identification of poly-extremophilic alkalophilic, halophilic and halotolerant bacteria from alkaline thalassohaline Gomishan wetland

Azadeh Shahinpei [1,2], Mohammad Ali Amoozegar [2, 3*] and Abbas Akhavan-Sepahi [4]

[1] Department of Microbiology, Faculty of Basic Science, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
[2] Department of Microbiology, Faculty of Biology and Center of Excellence in Phylogeny of Living Organisms, College of Sciences, University of Tehran, Tehran, Iran
[3] Microorganisms Bank, Iranian Biological Resource Centre, Karaj, Iran
[4] Department of Microbiology, Faculty of Biological Sciences, Islamic Azad University, North Tehran Branch, Tehran, Iran

Abstract

Gomishan wetland is a natural ecosystem located in 35 km north west of Gorgan, in the west vicinity of Khajeh Nafas city and Gomishan. Twice sampling from 3 different geographic positions in dry and rainy seasons, led to the isolation of 224 isolates. For 57 isolates, halophilic and halotolerant behaviors and also optimum and growth range in different pH and temperatures were determined. Most of the moderately halophilic and halotolerant strains were capable of growing optimally in media with pH 8.5-9 and optimum growth temperatures ranging from <4 to 40 °C. The isolates were examined for hydrolytic enzymes production. Most of the isolates showed lipase activites and a total of 15, 7 and 3 strains produced amylases, proteases and DNases, respectively. The enzymes could be useful in some industrial processes. 16S rDNA phylogenetic analysis were done for 55 strains. According to this analysis, strains were placed in 22 different genera: *Achromobacter*, *Aeromicrobium*, *Altererythrobacter*, *Bacillus*, *Caenispirillum*, *Cyclobacterium*, *Erythrobacter*, *Halobacillus*, *Halomonas*, *Idiomarina*, *Jonesia*, *Marinobacter*, *Martelella*, *Nesiotobacter*, *Paenibacillus*, *Planococcus*, *Pseudomonas*, *Rheinheimera*, *Saccharospirillum*, *Stappia*, *Thalassospira and Vibrio*. 23% of these strains were haloalkalophilic bacteria and belonged to the *Bacillus*, *Halobacillus*, *Halomonas*, *Idiomarina* and *Marinobacter*. This was the first study on the culturable bacteria at Gomishan wetland, an area of considerable alkaline thalassohaline ecosystem.

Key words: Gomishan wetland, Halophile, Halotolerant, 16S rDNA

* amozegar@khayam.ut.ac.ir