تاکسونومی و بیوسیستماتیک، سال پنجم، شماره شانزدهم، پاییز ۱۳۹۲، صفحه ۱۰۱-۱۱۶
دریافت مقاله: ۱۳۹۱/۰۴/۱۷ پذیرش نهایی: ۱۳۹۱/۱۱/۱۶

جداسازی و شناسایی آرکی‌های نمک‌دوست اجباری قابل کشت تالاب پُر شور اینچه‌برون، استان گلستان

مهرنوش رسولی [۱و۲]، محمد علی آموزگار [۳]* و عباس اخوان سپهی [۱]
۱ بخش میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، تهران، ایران
[۲] بانک میکروارگانیسم‌ها، مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران، جهاد دانشگاهی، کرج، ایران
[۳] بخش میکروبیولوژی، دانشکده زیست‌شناسی وقطب تبارزایی موجودات زنده، پردیس علوم، دانشگاه تهران، تهران، ایران

چکیده

تنوع آرکی‌های نمک‌دوست تالاب اینچه‌برون واقع در استان گلستان ایران با روش‌های مبتنی بر کشت بررسی شد. نمونه‌برداری در دو فصل پُر بارش و کم بارش (اردیبهشت و شهریورماه ۱۳۸۹) انجام گرفت. در هر نمونه‌برداری چهار منطقه مشخص از تالاب با استفاده از محیط های پیچیده نظیر MGM، JCM168، MH1 و یک محیط قلیایی حاوی ۲۳ درصد نمک بررسی شد. پس از گرماگذاری (incubation) در دمای ۴۰ درجه سانتیگراد، ۴۰۶ جدایه به دست آمد. متوسط تعداد کلونی‌های به دست آمده در روش کشت، $۲/۱\times۱۰^{۶}$ CFU/ml بود. ۳۶۱ جدایه از محیط MGM، ۳۹ جدایه از محیط JCM168، سه جدایه از محیط MH1 و سه جدایه از محیط قلیایی به دست آمد. تعدادی از ویژگی‌های ریخت‌شناسی، بیوشمیایی و فیزیولوژیکی اولیه برای این سویه‌ها بررسی شد و از میان این جدایه‌ها، ۴۵ سویه بر اساس صفات بررسی شده انتخاب و با تکثیر و تعیین ترادف ژن 16S rRNA شناسایی شدند. از این تعداد ۴۰ سویه به خانواده *Halobacteriaceae* جنس‌های *Haloarcula*، *Halorubrum*، *Haloferax*، *Halobellus*، *Halogeometricum*، *Halobacterium*، *Halolamina*، *Halorhabdus* و *Halostagnicola* (به ترتیب: ۳۰، ۲۷/۵، ۱۷/۵، ۱۰، ۵/۲، ۲/۶، ۲/۶، ۲/۶ و ۲/۶ جدایه های مربوط به قلمرو آرکی ها) تعلق داشتند و پنج سویه به سلسله باکتری‌ها، جنس‌های *Rhodovibrio*، *Pseudomonas* و *Salicola* (به ترتیب ۴۰، ۴۰ و ۲۰ درصد سویه‌های باکتریایی) متعلق بودند. با توجه به تعداد محدود جنس‌های آرکی نمک‌دوست شناسایی شده در جهان، بررسی‌ها بیانگر تنوع نسبتاً بالای آرکی‌های نمک‌دوست قابل کشت در این تالاب است.

واژه‌های کلیدی: آرکی نمک‌دوست، تنوع زیستی، ژن 16S rRNA

مقدمه

محیط‌های پُر شور مانند حوضچه‌های استحصال نمک و دریاچه‌های شور طبیعی، بوم نظام‌های (اکوسیستم) نسبتاً ساده با تنوع پایین و تراکم جمعیت

* amozegar@khayam.ut.ac.ir

بالا را در اختیار بوم شناسان قرار می‌دهند. انواع متفاوت میکروارگانیسم‌های نمک‌دوست مشکل سازگاری با تنش شوری زیاد (و سایر انواع تنش) را به طرق مختلف حل نموده‌اند. بنابراین، مطالعه حیات میکروبی در غلظت‌های بالای نمک، می‌تواند پاسخگوی بسیاری از پرسش های اساسی درباره سازگاری میکروارگانیسم‌ها با محیط‌هایشان باشد (Ma *et al*., 2010). دریاچه‌های نمک و نمک‌های تولید شده از این دریاچه‌ها حاوی تعداد زیادی آرکی‌های نمک‌دوست اجباری خانواده *Halobacteriaceae* هستند. در چنین محیط‌هایی تعداد $۱۰^{۷}$–$۱۰^{۸}$ واحد تشکیل‌دهنده کلونی در هر میلی‌لیتر آب غیر طبیعی نیست. همچنین، نمک های غیر فرآوری شده این دریاچه‌ها اغلب حاوی $۱۰^{۵}$–$۱۰^{۶}$ واحد تشکیل‌دهنده کلونی در هر گرم هستند. اعضای خانواده *Halobacteriaceae*، میکروارگانیسم‌های غالب محیط‌های پُر شور سراسر جهان شامل دریاچه‌های نمک، حوضچه‌های استحصال نمک، معادن نمک و همچنین دریاچه‌های پُر شور قلیایی هستند (Birbir *et al*., 2007).

میکروارگانیسم‌های نمک دوست به دلیل توانایی زندگی در محیط شور، در زمینه‌های مختلف زیست‌فناوری دارای توانمندی‌های بالقوه و بالفعل بسیاری هستند. تولید پلیمرهای زیستی مانند: بیوسورفاکتانت‌ها و اگزو پلی‌ساکاریدها (که سبب افزایش بازیافت نفت می‌شوند) و همچنین آنزیم‌های مختلف مثل ایزومرازها و هیدرولازها از کاربردهای این میکروارگانیسم‌ها است. از این دست پژوهش‌های انجام شده در ایران می‌توان به تولید آمیلاز خارج سلولی تحت تنش حرارت و شوری بالا توسط باکتری *Halobacillus* sp. Strain MA-2 (Amoozegar *et al*., 2003)، ارزیابی احیای کروم توسط باکتری نمک دوست نسبی مقاوم به کرومات *Nesterenkonia* sp. Strain MF2 (Amoozegar *et al*., 2007)، غربالگری و جداسازی باکتری‌های نمک‌دوست تولیدکننده هیدرولازهای خارج سلولی از دریاچه نمک حوض سلطان (Rohban *et al*., 2009) اشاره نمود.

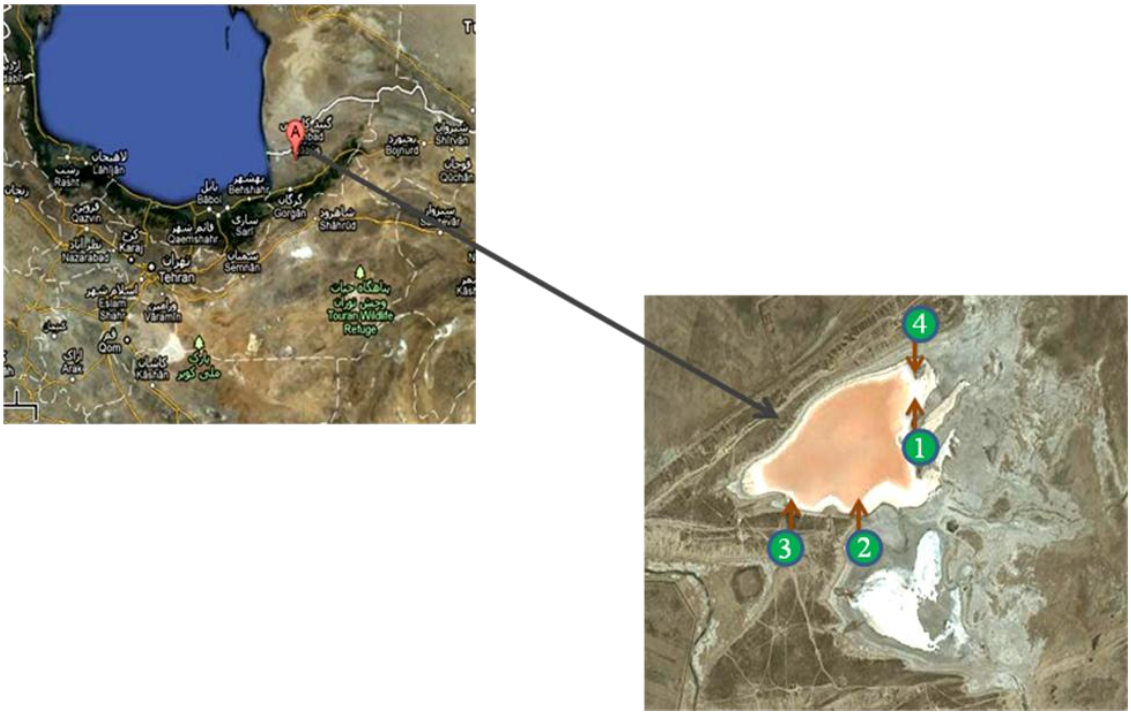
ایران از نظر وجود محیط‌های پُر شور به ویژه دریاچه‌ها و تالاب‌های پر شور از تنوع بسیار بالایی برخوردار است. در سال‌های اخیر تمایل بسیار زیادی به بررسی دریاچه‌های پُر شور ایران نشان داده شده است که حاکی از اهمیت این محیط‌ها به عنوان گنجینه‌ای مهم از ذخایر زیستی و ژنتیکی کشور است. تالاب نمک اینچه برون نیز به عنوان گوشه‌ای از این اکوسیستم منحصر به فرد، محل مناسبی برای بررسی تنوع میکروارگانیسم‌ها به ویژه میکروارگانیسم‌های نمک‌دوست اجباری، نسبی و تحمل‌کننده نمک است. این تالاب، در سمت راست مسیر جاده آق قلا به اینچه‌برون و در ۲۶ کیلومتری شمال آق قلا، در ۵۴ درجه و ۵۱ دقیقه طول شرقی و ۳۷ درجه و ۸ دقیقه و ۵۷ ثانیه عرض شمالی واقع شده است.

نمونه برداری از این تالاب در دو فصل پُر بارش و کم بارش با هدف بررسی تغییر ترکیب جمعیت میکروارگانیسم‌های نمک‌دوست اجباری موجود در این منطقه انجام گرفت. مطالعه اخیر، نخستین بررسی در زمینه تنوع زیستی تالاب اینچه‌برون به عنوان محیطی منحصر به فرد با هدف بررسی گوناگونی و شناسایی آرکی‌های نمک‌دوست ساکن و تعیین نقشه زیستی این دریاچه است.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری و جداسازی میکروارگانیسم‌های نمک‌دوست اجباری

برای جداسازی سویه‌های نمک‌دوست افراطی از خاک، لجن‌های نمکی، آب‌های شور رنگی و کریستال‌های سفید و رنگی نمک در دو فصل پُر بارش و کم بارش (اردیبهشت‌ماه و شهریورماه ۱۳۸۹) از چهار منطقه تالاب نمونه‌برداری صورت گرفت. موقعیت جغرافیایی دقیق مناطق نمونه‌برداری با GPS ثبت و علامت‌گذاری شد (شکل ۱).



شکل ۱- موقعیت جغرافیایی تالاب اینچه‌برون و مناطق نمونه‌برداری در نقشه گوگل

نمونه‌های جمع‌آوری شده از هر محل در کیسه‌های پلاستیکی و فالکون‌های استریل به آزمایشگاه منتقل شد. دما و pH نمونه‌ها در محل نمونه‌برداری با دماسنج و pH متر قابل حمل در محل اندازه‌گیری و ثبت شد. نمونه‌ها در دمای محیط و در کمترین زمان ممکن به آزمایشگاه منتقل و شوری نمونه‌ها با دستگاه مالتی‌متر دیجیتال اندازه‌گیری شد.

تحلیل شیمیایی نمک تالاب برای سنجش عناصر شیمیایی موجود در محیط‌زیست تالاب در دو نوبت نمونه‌برداری، توسط شرکت خاک بهین‌آزما صورت گرفت.

برای جداسازی آرکی‌ها و باکتری‌های نمک‌دوست اجباری از نمونه‌های جمع‌آوری شده از محیط‌های کشت زیر استفاده شد:

۱- محیط کشت MGM23% (pH 7.2-7.3) با ترکیبات (گرم در لیتر):

NaCl, 184; $MgCl_2$ $6H_2O$, 23; $MgSO_4$ $7H_2O$, 26.8; KCl, 5.3; $CaCl_2$, 0.8; Peptone,10; Yeast extract, 2; Distilled water, 1000ml (Dyall-Smith, 2008).

۲- محیط کشت JCM 168 (pH 5.2) با ترکیبات (گرم در لیتر):

NaCl, 200; Sodium Glutamate, 1; Trisodium Citrate, 3; $MgSO_4.7H_2O$, 20; KCl, 2; $FeCl_2.4H_2O$, 0.0036mg; $MnCl_2.4H_2O$, 0.00036; Yeast extracts, 5; Casamino acids, 5; Agar, 20; Distilled water, 1000ml (Minegishi *et al*., 2009).

۳- محیط کشت MH1 (pH 5.2) با ترکیبات (گرم در لیتر):

NaCl, 200; L-Glutamic acid, 2; Trisodium Citrate, 2; K_2SO_4, 5; $MgCl_2.6H_2O$, 1; NH_4Cl, 1; $FeSO_4.7H_2O$, 0.004; Yeast extracts, 2; Casamino acids, 5; Agar, 20; Distilled water, 1000ml (Minegishi *et al*., 2008).

۴- محیط کشت قلیایی (pH 9.2) با ترکیبات (گرم در لیتر):

NaCl, 200; KH_2PO_4, 1; $MgSO_4.7H_2O$, 0.2; Na_2CO_3, 18; Casamino Acids, 5; Agar, 20; Distilled water, 1000ml (Dyall-Smith, 2008).

برای افزایش pH این محیط به دلیل بالا بودن میزان یون‌های منیزیم در محیط و ایجاد رسوب در محیط به جای ترکیب NaOH از ترکیب Na_2CO_3 استفاده شد که پس از اتوکلاو به صورت جداگانه به محیط افزوده شد.

برای جداسازی و کشت آرکی‌های نمک‌دوست از نمونه‌های خاک، لجن و رسوبات سری رقت متوالی تهیه شد و برای کشت نمونه های آب به دلیل تراکم پایین آرکی‌ها، پس از سانتریفیوژ مقداری از نمونه‌ها از مخلوط رسوب و مایع زیرین برای کشت در محیط های فوق استفاده شد. همچنین، حدود ۵۰۰ میلی‌لیتر از آب هر منطقه پس از صاف کردن با فیلتر ۰/۲۲ میکرون فیلتر شد، سپس فیلتر روی محیط های کشت مربوط قرار داده شد. پلیت‌ها به مدت یک هفته در گرمخانه ۴۰ درجه سانتیگراد گرماگذاری شد و سپس تا مدت ۶ ماه هر دو هفته یکبار از نظر وجود کلونی‌های جدید و کُند رشد بررسی شد.

کلونی‌هایی با لام گرم متفاوت یا ریخت‌شناسی متفاوت کلونی از پلیت‌های اولیه جداسازی و مجدداً کشت داده شد. برای نگهداری و تجدید کشت سویه‌ها از محیط‌های استفاده شده برای جداسازی سویه‌ها در مراحل اولیه استفاده و در یخچال ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شد.

برای اندازه‌گیری تعداد میکروارگانیسم‌ها در نمونه‌ها، تعداد کلونی‌ها در پلیت‌های اولیه در رقت‌های متفاوت نمونه‌های آب شمارش شد.

برای جداسازی جدایه‌های نمک‌دوست اجباری و غیر اجباری، جدایه‌ها در محیط‌های کشت جداسازی حاوی ۵ درصد نمک کشت داده شد. جدایه‌هایی که قادر به رشد در مقادیر بالاتر از ۵ درصد نمک بودند به عنوان جدایه‌های نمک‌دوست اجباری در نظر گرفته شدند.

بررسی ویژگی‌های ریخت‌شناسی، بیوشیمیایی و فیزیولوژیک: سویه‌های نمک‌دوست از نظر بعضی صفات و ویژگی‌های ریخت‌شناسی، فیزیولوژیک و بیوشیمیایی مطالعه شدند. رنگ‌آمیزی گرم بر اساس روش Dussault (۱۹۵۵) انجام شد. برای سنجش بهینه و محدوده رشد سویه‌ها از محیط‌های جامد و مایع MGM با درصدهای NaCl برابر با ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵ و ۳۰ استفاده شد. بررسی حرکت از طریق روش‌های لام مرطوب انجام شد (Gerhardt *et al*., 1994). فعالیت پراکسیدازی در

حضور محلول ۳ درصد پراکسید هیدروژن تعیین شد. فعالیت اکسیدازی با استفاده از دیسک‌های اکسیداز آماده (شرکت Himedia) تعیین شد.

استفاده از آنتی‌بیوتیک‌های خاص می‌تواند در تفکیک آرکی‌ها از باکتری‌ها مؤثر باشد، بر این اساس آزمون آنتی‌بیوگرام برای سویه‌ها با استفاده از دیسک آنتی‌بیوتیک‌هایی نظیر کلرامفنیکل، تتراسیکلین، اریترومایسین، نووبیوسین، باسیتراسین، پنی‌سیلین G و نیتروفورانتوئین انجام شد.

شناسایی فیلوژنتیک سویه‌های منتخب: برای شناسایی توالی نوکلئوتیدی ژن 16S rRNA در سویه‌های منتخب، سویه‌های نمک‌دوست اجباری از نظر ویژگی‌های بررسی شده دسته‌بندی شد و تعداد ۴۵ سویه به صورت تصادفی برای مطالعات فیلوژنتیکی انتخاب شد.

برای استخراج DNA از روش (Dyall- Wanlam Smith, 2008) و روش تغییر یافته Marmur (۱۹۶۱) استفاده شد. برای تأیید استخراج انجام شده، الکتروفورز ژل آگاروز بر اساس روش پیشنهاد شده توسط Kolmodin و Williams در سال ۱۹۹۷ صورت گرفت.

از جفت پرایمر عمومی 21F با ترادف:

5´-TTCCGGTTGATCCTGCCGGA-3´

و 1492R با ترادف:

5´-GGTTACCTTGTTACGACTT-3´

برای آرکی‌ها و از جفت پرایمر عمومی 27F با ترادف:

5´-AGAGTTTGATCMTGGGTCAG-3´

و 1492R برای باکتری‌ها استفاده شد (Jiang *et al.*, 2006).

غلظت مواد به کار رفته در تهیه مخلوط واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای حجم واکنش ۵۰ میکرو لیتر به این صورت است:

PCR buffer (10X), 5µl; $MgCl_2$ (5mM), 1.5µl; dNTP mix (10mM), 1µl; Primers (10µM each), 2µl; Taq DNA polymerase, 0.25µl; Template DNA, 2-4µl; Sterilized distilled water, 34-38µl

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای سویه‌های آرکی به این روش صورت گرفت: دناتوراسیون اولیه برای مدت ۳ دقیقه در ۹۴ °C انجام گرفت. سپس، چرخه تکثیر آغاز شد که شامل ۳۰ سیکل تکرار شونده با دمای دناتوراسیون ۹۴°C به مدت ۱۵ ثانیه، دمای اتصال ۵۱ °C به مدت ۳۰ ثانیه و دمای سنتز ۷۲ °C به مدت ۶۰ ثانیه بود. برای سویه های باکتریایی دناتوراسیون اولیه به مدت ۲ دقیقه در ۹۴ °C انجام شد. به دنبال آن چرخه تکثیر آغاز شد که شامل ۳۰ سیکل تکرار شونده با دمای دناتوراسیون ۹۴ °C به مدت ۶۰ ثانیه، دمای اتصال ۵۵ °C به مدت ۶۰ ثانیه و دمای سنتز ۷۲ °C به مدت ۶۰ ثانیه بود. در نهایت، پس از اتمام چرخه‌ها و به منظور تکمیل نهایی ساختارهای تکثیر شده نمونه ها به مدت ۷ دقیقه در دمای ۷۲ °C قرار داده شد. به دلیل متفاوت بودن سویه ها دمای اتصال هر سویه با استفاده از دستگاه PCR گرادیان بهینه‌سازی شد. برای بررسی صحت PCR و تأیید دستیابی به باند 16S rRNA جدایه‌های مورد نظر الکتروفورز انجام شد. ۵ ماکرو لیتر از محصول PCR به همراه شاهد مثبت و منفی PCR و شاخص وزن مولکولی با طیف ۱۰۰۰۰bp–۱۰۰ روی ژل آگاروز ۱ درصد تحلیل شد. خالص‌سازی و تعیین توالی نسبی محصول PCR توسط شرکت کره‌ای Macrogen به واسطه شرکت ژن فن‌آوران انجام شد. توالی‌های به دست آمده با نرم‌افزارهای Chromas و Chromas Pro مرتب و با

توالی‌های ثبت شده در پایگاه اطلاعات ژنومی EzTaxon مقایسه شد. به این ترتیب، نزدیک‌ترین سویه‌ها با ترادف 16S rRNA مشابه با سویه‌های منتخب تعیین شد. انطباق توالی‌ها با نرم‌افزار ClustalX (ویرایش دوم) انجام شد. ارتباط فیلوژنتیکی توالی‌های به دست آمده با یکدیگر و دیگر سویه ها- توالی‌های مرتبط به دست آمده حاصل از جستجو- در پایگاه‌های اطلاعاتی Genbank و Eztaxon با نرم‌افزار MEGA نسخه ۵/۰ (Kumar *et al.*, 2008) بررسی شد. در دسته‌بندی توالی‌ها از الگوی Maximum likelihood و Neighbour-joining (Saitou and Nei, 1987) استفاده شد. بررسی اعتبار شاخه‌های درخت با الگوریتم بوت‌استرپ و با ۱۰۰ بار نمونه‌گیری صورت گرفت (Felsenstein, 1985).

نتایج

نمونه‌برداری و جداسازی: انتخاب مناطق نمونه‌برداری بر اساس ویژگی‌های ظاهری تالاب انجام شد و بر این اساس تالاب به دو ناحیه اصلی تقسیم و در هر ناحیه دو منطقه انتخاب شد. در مناطق ۱ و ۴ دریاچه (به ویژه در فصل کم بارش) شورابه و نمک با رنگ‌های نارنجی، قرمز و سیاه غالب بود و در مناطق ۲ و ۳ بیشتر آب و قشر نمکی سفید رنگ قابل مشاهده بود که در برخی از مناطق با رگه‌های سیاه و صورتی همراه بود. جدول ۱ ویژگی‌های مناطق نمونه‌برداری و تعداد سویه های انتخاب شده از هر منطقه را به تفکیک نوع نمونه را نشان می‌دهد. دمای مناطق ۱ و ۴ مشابه یکدیگر و بیشتر از سایر مناطق بود. شوری آب هر یک از مناطق در نوبت دوم نمونه برداری نسبت به نوبت اول بیش از ۱/۵ برابر افزایش داشت.

نتایج آنالیز شیمیایی در جدول ۲ نشان داده شده است. از کاتیون‌ها، سدیم و از آنیون‌ها، کلر بیشترین مقدار را داشت. بنابراین، می‌توان تالاب اینچه‌برون را به عنوان محیطی با منشأ دریایی (thalassohaline) در نظر گرفت.

از نمونه‌های جمع‌آوری شده از گل، لجن، شورابه های رنگی و رسوبات در مجموع ۴۰۶ جدایه به دست آمد. فراوانی تعداد جدایه ها به تفکیک مناطق نمونه‌برداری در شکل ۲ نشان داده شده است.

در نمونه‌برداری اول ۲۲۹ جدایه به دست آمد که ۲۱ جدایه از محیط JCM، ۲۰۵ جدایه از محیط MGM، دو جدایه از محیط MH1 و یک جدایه از محیط قلیایی جداسازی شد. در نمونه‌برداری دوم نیز ۱۷۷ جدایه به دست آمد که ۱۸ جدایه از محیط JCM، ۱۵۶ جدایه از محیط MGM، یک جدایه از محیط MH1 و دو جدایه از محیط قلیایی به دست آمد. جدایه‌های به دست آمده از محیط‌های قلیایی و اسیدی در محیط MGM کشت داده شد که تمام جدایه‌های حاصل از محیط‌های اسیدی و قلیایی توانایی رشد در محیط MGM با pH خنثی را دارا بودند.

سویه‌های نمک‌دوست حاصل از دو نمونه‌برداری، در محیط جداسازی اولیه هر سویه که حاوی ۵ درصد نمک تام بود کشت داده شدند. ۱۸ سویه توانایی رشد در محیط ۵ درصد را داشتند. با توجه به این که هدف، جداسازی میکروارگانیسم‌های نمک‌دوست اجباری بود، این سویه‌ها در مراحل انتخاب سویه حذف شده، در نظر گرفته نشدند. بیشترین تعداد سویه‌ها از منطقه ۱ با تعداد ۱۰۸ سویه در نوبت اول و ۷۰ سویه در نوبت دوم به دست آمده است، کمترین جداسازی نیز از منطقه ۴ با تعداد ۱۰ سویه در نوبت اول و ۵۷ سویه در نوبت دوم انجام شده است.

جدول ۱- تعداد سویه‌های انتخاب شده از هر منطقه به تفکیک نوع نمونه و ویژگی‌های مناطق در دو نوبت نمونه‌برداری

منطقه نمونه‌برداری	مختصات جغرافیایی	نوع نمونه				شوری نوبت اول (g/l)	شوری نوبت دوم (g/l)	دمای متوسط (°C)	pH
		آب	نمک	خاک	لجن و گل				
۱	N 37°,13,438 E 054, 30, 224	۲	۰	۷	۲۲	۱۷۷	۲۸۶/۴	۳۹	۴/۳
۲	N 37°, 13, 932 E 054, 30, 081	۰	۰	۰	۳	۱۷۶/۷	۲۸۷	۳۱/۸	۵/۲
۳	N 37°, 13,829 E 054, 30, 307	۱	۲	۰	۰	۱۶۸	۲۸۳/۶	۳۰	۵/۲
۴	N 37°, 13, 517 E 059, 30, 657	۲	۰	۱	۴	۱۵۹/۸	۲۳۲/۶	۳۹	۶/۴

جدول ۲- نتایج آنالیز شیمیایی نمونه‌های آب در دو نوبت نمونه‌برداری

نوع آزمایش	غلظت (mg/ l) در نوبت اول	غلظت (mg/ l) در نوبت دوم
Cl^-	۱۳۴۷۴۸	۱۴۵۳۸۶
SO_4^{2-}	۱۴۴۴/۷	۷۸۲۴/۱
Mg^{2+}	۴۰/۴	۷۰۵۴/۲۵
Na^+	۵۶۱۲۰	۶۰۷۷۴/۴۹
Fe^{2+}	۰/۱۶	۹۶/۳۱
K^+	۲۷/۶	۱۵۳/۸۱

شکل ۲- فراوانی تعداد جدایه‌ها به تفکیک مناطق نمونه‌برداری

مشاهده لام‌های میکروسکوپی و رنگ‌آمیزی گرم نشان داد که از سویه‌های به دست آمده تعداد ۳۳ سویه باسیل و ۳۷۳ سویه دارای اشکال بی‌قاعده و چند شکل (پُلی‌مورف) بودند. همچنین، ۴۰۲ سویه گرم منفی و تنها ۴ سویه گرم مثبت رنگ گرفتند که در مورد سویه‌های باکتریایی، آزمون KOH (۳ درصد) این نتایج را تأیید کرد. آزمون کاتالاز و اکسیداز برای تمام سویه‌ها انجام شد، تمام سویه‌ها کاتالاز مثبت بودند و تنها در تعدادی از سویه‌ها واکنش کاتالاز به صورت ضعیف‌تری مثبت بود. واکنش اکسیداز نیز برای ۹۸ سویه منفی و برای سایر سویه‌ها مثبت بود. آزمون حرکت نیز برای تمام سویه‌ها انجام شد که ۴۵ سویه متحرک و بقیه غیرمتحرک بودند. آنتی‌بیوگرام برای ۱۳۰ سویه، با آنتی‌بیوتیک‌های نووبیوسین، نیتروفورانتوین، باسیتراسین، کلرامفنیکل، تتراسیکلین، اریترومایسین و پنی‌سیلین انجام شد. در ۱۰۱ سویه، حساسیت به نووبیوسین، نیتروفورانتوین و باسیتراسین و مقاومت به سایر آنتی‌بیوتیک‌ها مشاهده شد که احتمالاً به گروه آرکی‌ها تعلق دارند.

شناسایی فیلوژنتیک سویه‌های منتخب: برای تحلیل فیلوژنتیک، از نوبت اول نمونه‌برداری ۲۲ سویه و از نوبت دوم ۲۳ سویه به صورت تصادفی انتخاب شد (جدول ۱). نتایج برای ۴۱ سویه به صورت یک طرفه (در جهت رفت) و برای ۴ سویه به صورت کامل خوانده شد. جدول ۳ نتایج شناسایی مولکولی سویه‌های منتخب و میزان شباهت آنها با نزدیک‌ترین

گونه‌های شناخته شده را نشان می‌دهد. از این تعداد، ۴۰ سویه اعضای خانواده *Halobacteriacea* بودند. ۵ سویه به قلمرو باکتری‌ها متعلق بوده، در جنس‌های *Rhodovibrio*، *Pseudomonas* و *Salicola* (به ترتیب: ۴۰، ۴۰ و ۲۰ درصد سویه‌های باکتریایی) قرار گرفتند.

جدول ۳- نتایج شناسایی مولکولی جدایه‌های منتخب

ردیف	نام جدایه	نزدیکترین سویه	شماره دسترسی نزدیکترین گونه	درصد شباهت
۱	A6	*Haloferax prahovense* TL6(T)	AB258305	100
۲	A12A	*Haloferaxprahovense* TL6(T)	AB258305	99.51
۳	AC2	*Haloarcula japonica* JCM7785(T)	AB355986	98.42
۴	AC6	*Halobellus clavatus* TNN18(T)	GQ282620	94.70
۵	AC7	*Halogeometricum rufum* RO1-4(T)	EU887286	99.45
۶	AD1	*Halorubrum chaoviator* Halo-G(T)	AM048786	99.28
۷	AD3	*Halorubrum chaoviator* Halo-G(T)	AM048786	99.35
۸	AD7	*Halorubrum chaoviator* Halo-G(T)	AM048786	100
۹	AM1	*Haloarcula argentinensis* arg-1(T)	D50849	98.79
۱۰	AM2	*Haloarcula japonica* JCM7785(T)	AB355986	98.37
۱۱	AM5	*Haloarcula japonica* JCM7785(T)	AB355986	98.11
۱۲	AM14	*Halolamina pelagica* TBN21(T)	GU208826	98.26
۱۳	AM17	*Haloarcula marismortui* ATCC43049(T)	AY596297	97.77
۱۴	AO2	*Haloferax alexandrines* TM(T)	AB037474	99.84
۱۵	AO7	*Halobellus clavatus* TNN18(T)	GQ282620	93.98
۱۶	B1A	*Haloarcula quadrata* 801030/1(T)	AB010964	98.87
۱۷	B2	*Haloarcula hispanica* ATCC33960(T)	CP002921	99.57
۱۸	B4	*Halorubrum chaoviator* Halo-G(T)	AM048786	99.29
۱۹	B5	*Psuedomonas halophila* DSM3050(T)	AB021383	99.88
۲۰	B8	*Halorhabdus tiamatea* SARL4B(T)	EF127229	100
۲۱	B16	*Halorubrum chaoviator* Halo-G(T)	AM048786	98.62
۲۲	CW8	*Halorubrum chaoviator* Halo-G(T)	AM048786	100
۲۳	Ct1	*Halorubrum chaoviator* Halo-G(T)	AM048786	100
۲۴	Ct4	*Halorubrum chaoviator* Halo-G(T)	AM048786	99.88
۲۵	D19	*Halorubrum chaoviator* Halo-G(T)	AM048786	99.27
۲۶	DA5	*Haloferax prahovense* TL6(T)	AB258308	100
۲۷	DA7	*Haloarcula japonica* JCM7785(T)	AB355986	97.75
۲۸	DB3	*Halobellus clavatus* TNN18(T)	GQ282620	93.65

ردیف	نام جدایه	نزدیکترین سویه	شماره دسترسی نزدیکترین گونه	درصد شباهت
۲۹	DM1	*Halobellus clavatus* TNN18(T)	GQ282620	93.88
۳۰	DS16	*Haloarcula amylolytica* BD-3(T)	DQ826513	98.70
۳۱	DW4	*Halogeometricum rufum* RO1-4(T)	EU887286	99.55
۳۲	E4B	*Halobacterium salinarum* NRC-1	AE004437	99.61
۳۳	F4	*Rhodovibrio sodomensis* DSM9895(T)	FR733704	98.99
۳۴	H7	*Haloferax prahovense* TL6(T)	AB258305	100
۳۵	I1	*Haloarcula quadrata* 801030/1(T)	AB010964	99.34
۳۶	I3	*Haloarcula argentinensis* arg-1(T)	D50849	98.60
۳۷	I5	*Psuedomonas halophila* DSM3050(T)	AB021383	98.57
۳۸	I6A	*Haloarcula salaria* HST01-2R(T)	FJ429317	98.50
۳۹	I8	*Rhodovibrio sodomensis* DSM 9895(T)	FR733704	99.10
۴۰	J2	*Halorubrum lipolyticum* 9-3(T)	DQ355814	96.57
۴۱	J7	*Halostagnicola larsenii* XH-48(T)	AM117571	98.42
۴۲	O5	*Haloferax prahovense* TL6(T)	AB258305	99.31
۴۳	O6B	*Salicola salis* B2(T)	DQ129689	99.65
۴۴	R8	*Halorubrum chaoviator* Halo-G(T)	AM048786	98.57
۴۵	S1A1	*Haloferax prahovense* TL6(T)	AB258305	99.54

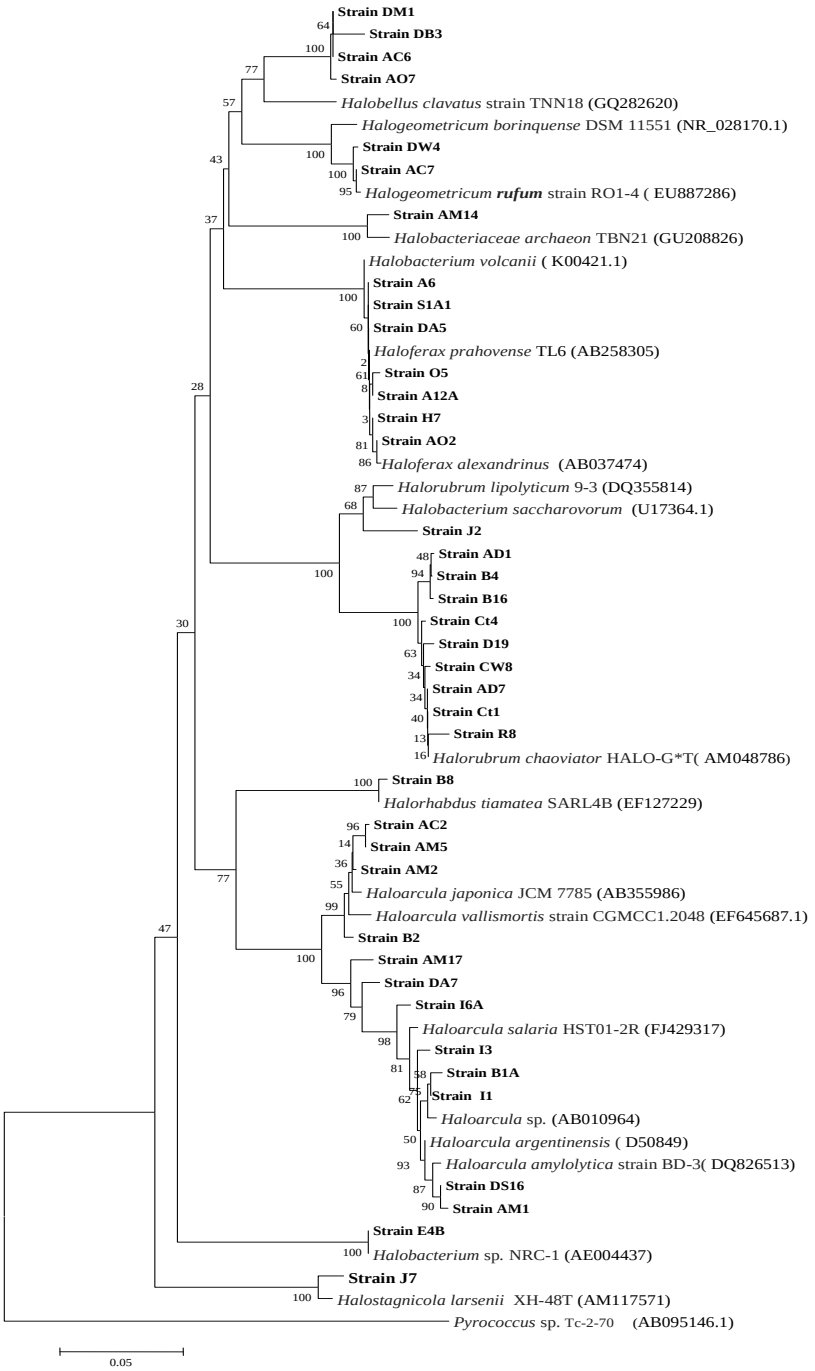
درصد فراوانی سویه‌های متعلق به جنس‌های آرکی در شکل ۳ نشان داده شده است که بیشترین فراوانی به جنس‌های *Haloarcula*، *Halorubrum* و *Haloferax* متعلق است. جدول ۴ جنس‌های آرکی جداسازی شده و تعداد سویه‌های مربوط به هر جنس را در دو نوبت نمونه‌برداری نشان می‌دهد.

شکل ۳- درصد فراوانی جدایه‌های متعلق به هر جنس

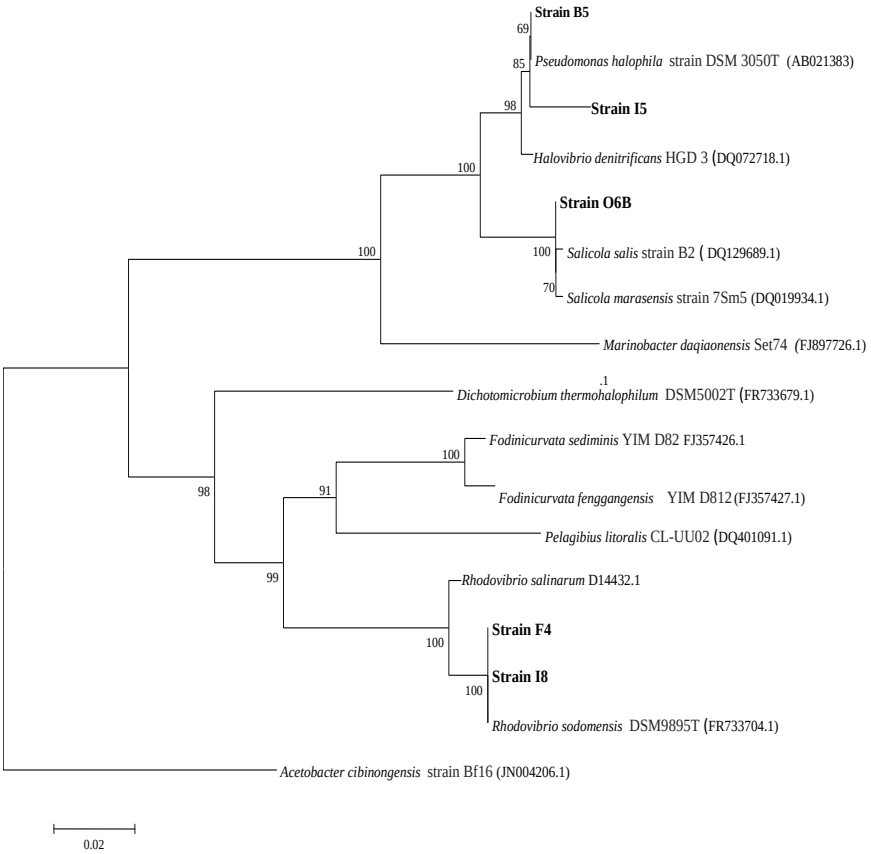
جدول ۴- جنس های آرکی جداسازی شده و تعداد جدایه های مربوط به هر جنس در دو نوبت نمونه‌برداری

ردیف	نام جنس	تعداد جدایه در نوبت اول	تعداد جدایه در نوبت دوم
۱	*Haloarcula*	۵	۷
۲	*Halorubrum*	۵	۶
۳	*Haloferax*	۴	۳
۴	*Halobellus*	۰	۴
۵	*Halogeometricum*	۰	۲
۶	*Halobacterium*	۱	۰
۷	*Halolamina*	۰	۱
۸	*Halorhabdus*	۱	۰
۹	*Halostagnicola*	۱	۰

پس از هم راستا کردن سویه های ترادف‌یابی شده با ترادف گونه‌های نزدیک درخت‌های فیلوژنتیکی سویه‌های باکتری و آرکی به صورت جداگانه با استفاده از الگوریتم‌های Maximum Likelihood و Neighbor-joining رسم شد که در هر دو روش جایگاه فیلوژنتیکی سویه‌ها در درخت‌های رسم شده با شباهت‌های 16S rRNA سویه‌ها مطابقت داشت. دندوگرام‌های ترسیم شده برای دو قلمرو آرکی ها و باکتری ها به ترتیب در شکل‌های ۴ و ۵ نشان داده شده است.



شکل ۴- درخت فیلوژنتیک جدایه‌های منتخب متعلق به قلمرو آرکی‌ها رسم شده به روش Neighbour-joining



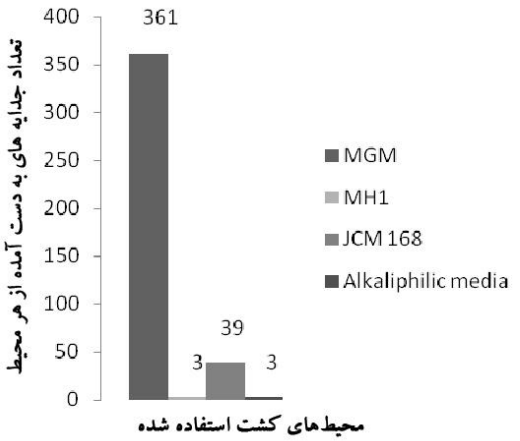
شکل ۵- درخت فیلوژنتیک باکتری‌های ترادف‌یابی شده با روش Neighbour-joining. *Acetobacter cibinongensis* JN004206.1 به عنوان Outgroup در نظر گرفته شده است و اعداد ذکر شده در بخش انشعاب، نشانگر درصد نمونه‌گیری بوت‌استرپ از ۱۰۰ نمونه است.

بحث

به دلیل اهمیت و کاربرد وسیع آرکی‌ها، تحقیقات وسیعی برای بررسی تنوع و شناسایی این گروه از میکروارگانیسم‌ها در سراسر جهان در حال انجام است. مطالعات انجام شده در زمینه شناسایی این گروه در ایران بسیار اندک است و اهمیت بررسی‌های بیشتر در مورد این گروه بسیار محسوس است. دریاچه‌ها و تالاب‌های پُر شور در ایران به عنوان نمونه‌ای از زیستگاه‌های آرکی‌ها از تنوع بالایی برخوردار هستند.

در پژوهش حاضر، برای نخستین بار بررسی تنوع آرکی‌های نمک‌دوست قابل کشت در تالاب اینچه‌برون، به عنوان محیطی منحصر به فرد با هدف بررسی گوناگونی و شناسایی آرکی‌های نمک‌دوست ساکن و تعیین نقشه زیستی این محل انجام شد. pH پایین این تالاب، آن را از سایر اکوسیستم‌های شور بررسی شده در ایران مانند: دریاچه آران و بیدگل و حوض سلطان با شوری بالا و pH خنثی و تالاب گمیشان با شوری پایین و pH قلیایی متمایز می‌کند. میزان یون Mg^{2+} در این دریاچه نسبت به دریاچه Tuz در ترکیه (Birbir *et al*., 2007) و دریاچه Maras در پرو (Maturrano *et al*., 2006) پایین‌تر، اما میزان شوری آن مشابه با دریاچه نمک Maras است. در مقایسه با دریاچه‌های بررسی شده در ایران، میزان یون Mg^{2+} در دریاچه ارومیه ۳/۵ برابر و دریاچه آران و بیدگل ۱/۵ برابر بیشتر از تالاب اینچه‌برون است. میزان شوری آن از دریاچه آران و بیدگل که شوری اشباع

دارد پایین‌تر بوده، اما در نوبت دوم نمونه برداری، از مناطق سواحل غربی دریاچه ارومیه بالاتر بوده است. شوری هر کدام از مناطق در نوبت دوم نمونه‌برداری نسبت به نوبت اول بیش از ۱/۵ برابر افزایش داشت که تقریباً ۱۰ برابر شوری آب دریا است و این مسأله شرایط را برای جداسازی باکتری‌ها که معمولاً نمک‌دوست نسبی هستند، در نوبت اول مناسب‌تر ساخت. در منطقه ۴ بالاترین میزان یون آهن وجود داشت و کمترین جداسازی از این منطقه انجام شد. با توجه به این که پس از منطقه ۲ این منطقه بالاترین میزان یون سولفات را دارد، می‌توان رنگ سیاه موجود در بخش‌هایی از این منطقه را به احیای سولفات و تشکیل رسوب با آهن به دلیل نزدیکی این مناطق به ویژه منطقه ۴ به معدن یُد نسبت داد. لذا، این منطقه برای جداسازی باکتری‌های احیا کننده سولفات مناسب‌تر است. در این پژوهش، به منظور افزایش احتمال جداسازی میکروارگانیسم‌های نمک‌دوست اجباری، از محیط‌های کشت متنوعی استفاده شد. شکل ۶ کارآیی محیط‌های کشت استفاده شده برای جداسازی میکروارگانیسم‌ها را نشان می‌دهد.



شکل ۶- کارآیی محیط‌های کشت استفاده شده در جداسازی میکروارگانیسم‌ها

در مجموع، محیط‌های MGM و JCM 168 از نظر جداسازی آرکی‌ها و باکتری‌های نمک‌دوست اجباری محیط‌های مناسبی بودند، اما از نظر تنوع، اغلب باکتری‌های جداسازی شده، باکتری‌هایی با کلونی‌های باسیلوسی و اسپوردار بودند و بیشتر آنها در محیط های حاوی ۵ درصد نمک تام نسبت به محیط های حاوی ۲۳ درصد نمک تام رشد مناسب‌تری داشتند.

استفاده از محیط‌هایی نظیر MH1 و JCM در پژوهش‌های مشابه به جداسازی میکروارگانیسم های اسید دوست یا قادر به رشد بهینه در pH اسیدی منجر شد (Minegishi *et al*.,2008; 2009).

به دلیل اسیدی بودن مناطقی از تالاب بررسی شده، در این پژوهش نیز از این دو محیط مناسب، برای جداسازی احتمالی میکروارگانیسم‌های اسید دوست استفاده شد. سویه‌های به دست آمده از محیط JCM برای بررسی توانایی رشد در pH خنثی در محیط MGM با pH=۷/۲ نیز کشت داده شدند، اما تمام این سویه‌ها قادر به رشد در pH خنثی بودند، بنابراین اسید دوست واقعی در نظر گرفته نمی‌شوند.

استفاده از روش‌های رقیق‌سازی متوالی همراه با گرماگذاری طولانی مدت، سبب جداسازی بیشترین تعداد میکروارگانیسم‌های نمک‌دوست شد. کلونی‌های به دست آمده اغلب دارای رنگیزه‌های قرمز و یا نارنجی بودند. با این وجود، کلونی‌های سفید یا بی‌رنگ و حتی صورتی نیز در برخی از محیط‌ها مشاهده شد. متوسط تعداد کلونی‌های میکروارگانیسم های نمک دوست اجباری به دست آمده در روش کشت cfu/ml، ۲/۱×۱۰۶ بود. تنوع آرکی‌های نمک‌دوست توصیف شده در پژوهش حاضر، بدون شک تنها بخش اندکی از تنوع حقیقی تالاب اینچه‌برون را نشان می‌دهد. در

آب‌های شور به ویژه شورابه‌های قرمز رنگ (red brines) انتظار 10^{7}–10^{8} کلونی آرکی وجود دارد که تعداد کلونی های بازیابی شده در این پژوهش پایین‌تر است و علت آن احتمالاً پایین بودن میزان شوری این تالاب در مقایسه با سایر تالاب‌ها و دریاچه‌های پُر شور است. همچنین، محیط های دارای نمک و مواد غذایی فراوان که در این پژوهش برای شمارش و جداسازی کلونی‌ها استفاده شد بسیار انتخابی عمل می‌کنند. بازیابی قوی‌تر تاکسون‌های موجود با استفاده از محیط‌های دارای مواد غذایی کم و گرماگذاری طولانی‌تر امکان‌پذیر است (Burns *et al*., 2004).

در قلمرو آرکی‌ها بیشتر جدایه‌ها به اعضای جنس‌های *Haloarcula* و *Halorubrum* (به ترتیب با ۳۰ و ۲۷/۵ درصد سویه‌ها) مربوط بود. نتایج پژوهش‌های انجام شده در سایر مناطق پُر شور دنیا از این قرار است: *Halorubrum* و *Haloarcula* گروه‌های اصلی جدا شده از دریاچه نمک Tuz در ترکیه بوده‌اند (Birbir *et al*., 2007)؛ اعضای جنس *Haloarcula*، ۵۰ درصد جدایه‌های به دست آمده از دریاچه Maras در پرو را تشکیل داده‌اند (Maturrano *et al*., 2006)؛ در حوضچه‌های نمکی استرالیا بیش از ۷۰ درصد جدایه‌ها به جنس *Halorubrum* متعلق بوده است (Burns *et al*., 2004). همچنین، بررسی‌های انجام شده در دریاچه Ayakekumu در چین ۴۷ درصد توالی‌ها به جنس *Halorubrum* و ۲۴ درصد توالی‌ها به جنس *Natrinema* متعلق بوده است (Kuwei *et al*., 2007).

بر خلاف تالاب اینچه برون، در دریاچه‌های آران و بیدگل و ارومیه بیشتر جدایه‌ها به ترتیب اعضای جنس‌های *Halorubrum* و *Haloarcula* بوده‌اند و در جنس‌های آرکی به دست آمده از تالاب اینچه‌برون با این مناطق تفاوت‌هایی دیده می‌شود. از این تفاوت‌ها می‌توان به عدم جداسازی اعضایی از جنس *Haloferax* از دریاچه‌های ارومیه و آران و بیدگل اشاره نمود (Asadi, 2011؛ Makhdoumi-Kakhki *et al*., 2012).

در این پژوهش، ۷ سویه متعلق به جنس *Haloferax* (۱۷/۵ درصد سویه‌ها) جداسازی شد که بررسی‌ها نشان داد که اعضای این جنس پایین‌ترین میزان بهینه نمک را در میان آرکی‌های نمک‌دوست دارند و به کمترین میزان NaCl برای حفظ ساختار سلولی خود نیازمندند (DSouza *et al*., 1997). با وجود پایین بودن میزان یون‌های سدیم و منیزیم در منطقه ۱، برخلاف انتظار بیشترین تعداد جداسازی میکروارگانیسم ها از این منطقه انجام شد، با توجه به این که از تعداد ۷ جدایه متعلق به جنس *Haloferax*، ۶ جدایه از این منطقه جداسازی شده است، می‌توان تعداد بالا و غیر قابل انتظار جداسازی از این منطقه را توجیه نمود.

بر اساس نظر Bardavid و همکاران (۲۰۰۸)، تلقیح آب نمک دریاچه بر روی پلیت حاوی غلظت بالای نمک و غنی از مواد غذایی پیچیده موجب جداسازی سویه‌های متعلق به جنس‌های *Halorubrum*، *Haloarcula* و *Haloferax* می شود. این مسأله بیشتر به دلیل توانایی رشد آنها در این شرایط است تا اینکه به واسطه فراوانی آنها در محیط باشد (Bardavid *et al*., 2008). همچنین، با توجه به pH پایین تالاب اینچه‌برون نسبت به دریاچه‌های آران و بیدگل و ارومیه، عدم جداسازی اعضایی از جنس‌های *Natronomonas* و *Natronococcus* که آرکی‌های نمک‌دوست و قلیادوست هستند دور از انتظار نیست.

جنس *Halobacterium* به عنوان گروه چیره در جمعیت های آرکیایی دریاچه‌های نمک شناخته نشده است (Oren, 2006). در میان جدایه‌های متعلق به اعضای *Halobacteriaceae* در این پژوهش تنها یک جدایه متعلق به جنس *Halobacterium* با نام E4B با شباهت توالی ۹۹/۶ درصد جداسازی شد. درصد نمک و ترکیبات آلی فراوان موجود در محیط جداسازی می‌تواند یک عامل انتخابی برای جداسازی اعضای این جنس باشد (Birbir *et al*., 2007).

در مجموع، میزان شباهت توالی 16S rRNA برای ۱۲ سویه بین ۹۷-۹۸/۷ درصد بود که با انجام هیبریداسیون DNA-DNA با گونه‌های نزدیک و بررسی صفات فنوتیپی ممکن است در گونه جدیدی قرار گیرند. برای ۵ سویه درصد شباهت کمتر از ۹۷ درصد با اعضای جنس‌های *Halobellus* و *Halorubrum* نشان داده شده که بیانگر تفاوت شایان توجه در سطح گونه و یا حتی جنس بین این سویه ها و گونه‌های ثبت شده بود، این سویه ها می‌توانند بدون انجام هیبریداسیون DNA-DNA با گونه‌های نزدیک در گونه های جدید قرار گیرند (Stackebrandt, 2006). در ۷ سویه درصد شباهت ۱۰۰ درصد بود و به عنوان سویه‌های بومی گونه‌های مشابه خود در نظر گرفته می‌شوند. در جدول ۵، سویه‌هایی که می‌توانند معرف جنس ها و گونه‌های جدید باشند نشان داده شده است.

جدول ۵- سویه‌هایی که می‌توانند معرف جنس‌ها و گونه‌های جدید باشند

شباهت ترادف 16S rRNA	نام سویه
۹۳-۹۷ درصد	AC6, AO7, DB3, DM1, J2
۹۷-۹۸/۹ درصد	AC2, AM1,AM5, AM14, AM17,B16, DA7, DS16, I3, I5, I6A, R8

با توجه به تأکید این پژوهش بر جداسازی میکروارگانیسم های نمک‌دوست اجباری، محیط های کشت مناسب برای جداسازی نمک‌دوست های نسبی و تحمل کننده نمک انتخاب نشده بود، در نتیجه امکان جداسازی مناسب اعضا این گروه وجود نداشت. با وجود این، در قلمرو باکتری‌ها بیشترین گروه‌های جداسازی شده اعضای جنس *Rhodovibrio* بود که باکتری‌های نمک‌دوست نسبی هستند و نخستین بار از رسوبات و آب‌های دریای مرده جداسازی شده‌اند و به *α*proteobacteria متعلق هستند. اعضای جنس‌های *Salicola* و *Pseudomonas* از دیگر جنس‌های جداسازی شده از قلمرو باکتری ها در این پژوهش بود. *Salicola* باکتری بدون رنگدانه و نمک دوست اجباری است که نخستین بار از دریاچه‌های نمک کم عمق در الجزایر جداسازی شده است (Kharroub *et al*., 2006). *Pseudomonas halophila* نیز باکتری نمک‌دوست نسبی است و نخستین بار از دریاچه Great Salt Lake در آمریکا جداسازی شد (Fendrich, 1988).

در مجموع، جداسازی و شناسایی میکروارگانیسم ها به عنوان گنجینه‌ای از ذخایر زیستی کشور از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است و دانش تنوع زیستی ابزار قدرتمندی برای رسیدن به این مهم فراهم می‌کند. در این پژوهش برای نخستین بار بررسی تنوع آرکی های نمک‌دوست اجباری از تالاب اینچه‌برون انجام شد که با توجه به تعداد محدود جنس های آرکی نمک‌دوست شناسایی شده، بررسی‌ها بیانگر تنوع نسبتاً بالای آرکی‌های نمک‌دوست در این تالاب است.

منابع

Amoozegar, M. A., Ghasemi, A., Razavi, M. R. and Naddaf, S. (2007) Evaluation of hexavalent chromium reduction by chromate-resistant moderately halophile, *Nesterenkonia* sp. Strain MF2. Process Biochemistry 42: 1475-1479.

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

Asadi, B. (2011) Diversity of aerobic extremely halophilic prokaryotes from western coastal line of Urmiah Lake using culture-dependent and culture-independent methods. MSc thesis, University of Tehran, Tehran, Iran (in Persian).

Bardavid, R. E., Khristo, P. and Oren, A. (2008) Interrelationships between *Dunaliella* and halophilic prokaryotes in saltern crystallizer ponds. Extremophiles 12: 5-14.

Birbir, M., Calli, B., Mertoglu, B., Bardavid, E. R., Oren, A., Mehmet, N.O. and Ogan, A. (2007) Exremely halophilc archaea from Tuz Lake, Turkey and the adjacent Kaldirim and Kayacil salterns. World Journal of Microbiology and Biotechnology 23: 309-316.

Burns, D. G., Camakaris, H. M., Janssen, P. H. and Dyall-Smith, M. L. (2004) Combined use of cultivation-dependent and cultivation-independent methods indicates that members of most haloarchaeal groups in an Australian crystallizer pond are cultivable. Applied and Environmental Microbiology 70: 5258-5265.

DSouza, S. E., Altekar, W., DSouza, S. F. (1997) Adaptive response of *Haloferax mediterranei* to low concentration of NaCl (<20%) in the growth medium. Archives of Microbiology 168: 682-689.

Dussault, H. (1955) An improved technique for staining red halophilic bacteria. Journal of Bacteriology 70: 484-485.

Dyall-Smith, M. L. (2008) The halohandbook: protocols for haloarchaeal genetics. Retrieved from http://www.haloarchaea.com/resources/halohandbook. On 2 April 2009.

Felsenstein, J. (1985) Confidence limits on phylogenies: an approach using bootstrap. Evolution 39: 783-791.

Fendrich, C. (1988) *Halovibrio variabilis* gen. nov. sp. nov., *Pseudomonas halophila* sp. nov. and a new halophilic aerobic coccoid Eubacterium from Great Salt Lake, Utah, USA. Systematic and Applied Microbiology 11: 36-43.

Gerhardt, P., Murray, R. G. E., Wood, W. A. and Krieg, N. R. (1994) Methods for general and molecular bacteriology. American Society for Microbiology, Washington, DC.

Jiang, H., Dong, H., Zhang, G., Yu, B., Chapman, L. R. and Fields, M. (2006) Microbial diversity in sediments of lake Chaka, an athalassohaline lake in northwestern China. Applied and Environmental Microbiology 72(6): 3832-3845.

Kharroub, K., Aguilera, M., Quesada, T., Morillo, J. A., Ramos-Cormenzana, A., Boulharouf, A. and Monteoliva-Sánchez, M. (2006) *Salicola salis* sp. nov., an extremely halophilic bacterium isolated from Ezzemoul sabkha in Algeria. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 56: 2647-2652.

Kolmodin, L. A. and Williams, J. F. (1994) PCR cloning protocols. In: Methods in molecular biology. (Ed. White, B. A.) 192: 3-15. Humana Press, New Jersey.

Kumar, S., Nei, M., Dudley, J. and Tamura, K. (2008) MEGA: A biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. Briefings in Bioinformatics 9(4): 299-306.

Kuwei, K., Min, W., Yuehong, W. and Huibin, Zh. (2007) Culturable halophic archaeal diversity of Ayakekumu salt lake located in Xinjiang, China. Acta Ecologica Sinicia 27(8): 3119-3123.

Ma, Y., Galinski, E. A., Grant, W. D., Oren, A. and Ventosa, A. (2010) Halophiles 2010: Life in saline environmen. Applied and Environmental Microbiology 76(21): 6971-6981.

Makhdoumi-Kakhki, A., Amoozegar, M. A., Kazemi, B., Pasic, L. and Ventosa, A. (2012) Prokaryotic diversity in Aran-Bidgol Salt Lake, the largest hypersaline playa in Iran. Microbes and Environments 27(1): 87-93.

Marmur, J. (1961) A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from micro-organisms. Journal of Molecular Biology 3: 208-218.

Maturrano, L., Santos, F., Rossello-Mora, R. and Anton, J. (2006) Microbial diversity in Maras salterns, a hypersaline environment in the Peruvian Andes. Applied and Environmental Microbiology 72: 3887-3895.

Minegishi, H., Echigo, A., Nagaokam S. h., Kamekura, M. and Usami, R. (2009) *Haloarchaeum acidophilum* gen. nov., sp. nov., a moderately acidophilic haloarchaeon isolated from commercial solar salt. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.

Minegishi, H., Mizuki, T., Echigo, A., Tadamasa, F., Kamekura, M. and Usami, R. (2008) Acidophilic haloarchaeal strains are isolated from varios solar salts. Saline Systems 4: 16.

Oren, A. (2006) The order Halobacteriales. In: The Prokaryotes (Eds. Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K. H. and Stachkebrandt, E.) 3: 113-164. Springer, New York.

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

Saitou, N. and Nei, M. (1987) The neighbor joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Molecular Biology and Evolution 4: 406-425.

Stackebrandt, E. and Ebers, J. (2006) Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards. Microbiology Today 33(4): 152-155.

Isolation and identification of culturable extremely halophilic archaea of Inche-Boroun wetland

Mehrnoosh Rasooli [1,2], Mohammad Ali Amoozegar [3]* and Abbas Akhavan Sepahy [1]

[1] Department of Microbiology, Faculty of Biology Sciences, Islamic Azad University North Tehran Branch, Tehran, Iran
[2] Microorganisms Bank, Irananian Biological Resource Centre, Karaj, Iran
[3] Department of Microbiology, Center of excellence in Phylogeny of Living Organisms, College of Sciences, University of Tehran, Tehran, Iran

Abstract

Haloarchaeal diversity of Inche-Boroun wetland in north of Iran in Golestan province was investigated by using culture-dependent methods. Sampling was carried out in May and September 2010. In each sampling, 4 distinct region of wetland were analyzed by using complex media like MGM, JCM168, MH1 and an alkaliphilic medium containing 23% salts. After incubation at 40ºC, a total of 406 isolates were prepared and 2.1×10^6 CFU/ml were obtained in culture media. Among all isolates, 361 isolates were obtained from MGM and 39 isolates from JCM 168, 3 isolates from MH1 and 3 isolate from alkaliphilic media. Initial morphological, biochemical and physiological tests were performed. According to the results, 45 isolates were selected and phylogenetic analysis of 16S rRNA was performed for them. Among selected strains, 40 isolates belonged to *Halobacteriacaea* and were related to *Haloarcula*, *Halorubrum*, *Haloferax*, *Halobellus*, *Halogeometricum*, *Halobacterium*, *Halolamina*, *Halorhabdus* and *Halostagnicola* (respectively 30, 27.5, 17.5, 10, 5.2, 2.6, 2.6, 2.6 and 2.6 percent of Haloarchaeal strains). A total of 5 strains belonged to the kingdom of Bacteria and were related to *Rhodovibrio*, *Pseudomonas* and *Salicola* (respectively 40, 40 and 20 percent of bacterial strains). According to our results and the limited numbers of haloarchaeal genera that having been discovered until now, it seemed that the culturable prokaryotic populations in this hypersaline environment was diverse.

Key words: Halophilic archaea, Biodiversity, 16S rRNA gene

* amozegar@khayam.ut.ac.ir