ژنتیک نوین
دوره نهم، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۳
صفحه ۳۲۸-۳۱۳

تنوع زیستی پروکاریوت‌های نمک دوست قابل کشت در دریاچه ارومیه

Culturable prokaryotic diversity of Urmia salt lake

فرشته جوکارکاشی[۱]، پرویز اولیا[۱]، محمدعلی آموزگار*[۲]، باقر یخچالی[۳]

۱- دانشجوی دکتری و استاد، دانشگاه شاهد، تهران، ایران
۲- دانشیار، پردیس علوم، دانشگاه تهران، ایران
۳- دانشیار، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فن آوری، تهران، ایران

Jookar Kashi F[1], Owlia P[1], Amoozegar MA*[2], Yakhchali B[3]

1. PhD student and Professor, Shahed University, Tehran, Iran
2. Associate Professor, University of Tehran, Iran
3. Associate Professor, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, Iran

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

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

چکیده

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

واژه‌های کلیدی

آرکی
باکتری‌های نمک دوست
تنوع زیستی
دریاچه ارومیه
16S rDNA

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-26]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1393.9.3.7.0]

مقدمه

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

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

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

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

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

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری و بررسی ویژگی‌های نمونه‌ها

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

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-26]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1393.9.3.7.0]

جدول۱- مشخصات نمونه‌های مناطق مختلف نمونه‌برداری

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

های پلاستیکی ریخته شدند و دمای نمونه‌ها با دماسنج در محل، اندازه‌گیری و ثبت شد. انتخاب این مناطق براساس نقاط قابل نمونه‌برداری و ویژگی‌های ظاهری هر منطقه از دریاچه بود. نمونه‌ها در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و در طی یک روز به آزمایشگاه منتقل شدند. نمونه‌ها پس از انتقال به آزمایشگاه به ۴ دسته آب، خاک، لجن و نمک دسته‌بندی شدند. ۲۰۰ گرم از هر یک از نمونه‌های خاک، لجن و نمک به منظور تهیه نمونه شاخص با هم مخلوط شد و همچنین از هر یک از نمونه آب نیز ۲۰۰ میلی‌لیتر با هم مخلوط و نمونه شاخص تهیه شد. از نمونه‌های شاخص لجن و خاک برای محاسبه شوری، pH و ترکیبات شیمیایی بر طبق روش استاندارد Rhoades (1982) گل اشباع تهیه شد. برای این منظور ابتدا خاک در معرض هوا کاملا خشک و سپس کوبیده شد و بعد با الکی با منافذ 10 mesh (< 2.0 mm) غربال شد. سپس به ۵±۲۰۰ گرم از آن به آرامی آب دیونیزه استریل افزوده شد تا کاملا یکنواخت شده و گل اشباع آماده شود. روی ظرف حاوی گل اشباع را پوشانده و بعد از ۴ ساعت خصوصیات گل اشباع بررسی شد و اگر لازم بود مجددا به آن خاک یا آب اضافه شد تا مجددا خصوصیات گل اشباع ایجاد شود باید توجه داشت که تمام منافذ و فضاهای خاک با آب پر شده و روی سطح گل، آب جمع نشده باشد. گل را از روی کاغذ صافی به کمک پمپ خلا عبور داده تا حدی که گل خشک شده و روی گل ترک ایجاد شود. فیلتر کردن تا زمان ایجاد ترک روی گل متوقف شد. در صورت کدر بودن مایع صاف شده توسط صافی، دوباره فیلتر شد. در همان ۵ دقیقه اول میزان $CO3^{2-}$ و $HCO3^{-}$ سنجیده وفاز آبی گل اشباع با ایجاد خلا جدا شد و از آن برای تعیین غلظت عناصر محلول، شوری و pH استفاده شد (Zhang et al. 2005). میزان شوری نمونه‌ها با استفاده از دستگاه مالتی‌متر شرکت Mettler Toledo مدل Multiseven محاسبه و سپس میزان عناصر سدیم، کلر، آهن، پتاسیم، منیزیم، کلسیم، کربنات و سولفات تشکیل‌دهنده نمونه‌ها در آزمایشگاه دانشکده زمین‌شناسی دانشگاه تهران اندازه‌گیری شد. یون کلر با تیتراسیون با نیترات نقره بر طبق روش Mohr در سال ۱۹۲۴ اندازگیری شد (Doughty 1924). یون منیزیم با اسپکتروفتومتری جذب اتمی و یون سدیم با اسپکتروفتومتری نشر شعله‌ای و یون کلسیم با روش

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-26]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1393.9.3.7.0]

کمپلکسومتری اندازگیری شدند (Sheen and Kahler 1938). مشخصات جغرافیایی محل نمونه‌برداری، pH و میزان شوری نمونه‌های جمع‌آوری شده از مناطق مختلف دریاچه در جدول۱ آورده شده است. جدول۲ میزان شوری و pH نمونه‌های شاخص را نشان می‌دهد که شوری نمونه‌های شاخص از ۱۴ درصد تا اشباع نمک بود و میزان pH بین ۷/۳۷–۶/۷۷ بود. جدول۳ ترکیب و نوع یون‌های موجود در هر یک از نمونه‌های شاخص تهیه شده از نمونه‌های آب، خاک، رسوب و نمک را نشان می‌دهد و یون-های سدیم و کلر به ترتیب بیشترین میزان کاتیون و آنیون را در ترکیب هر یک از نمونه‌های شاخص تهیه شده به خود اختصاص دادند که نشان‌دهنده ماهیت تالازوهالین این دریاچه است.

جدول۲- مشخصات نمونه‌های شاخص

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

کشت، جداسازی و خالص‌سازی میکروارگانیسم‌ها

برای دستیابی به تنوع کاملی از میکروارگانیسم‌های هتروتروف هوازی از محیط کشت‌های متنوعی استفاده شد. با توجه به شرایط اقلیمی دریاچه و همچنین نیازمندی‌های متنوع میکروارگانیسم‌ها، محیط کشت‌های MH، SWN و MGM با اسیدیته خنثی انتخاب شدند. تلقیح نمونه‌های خاک، رسوب و نمک با استفاده از روش رقت‌های متوالی تا رقت 10^{-10} بر روی محیط‌های مورد استفاده برای جداسازی انجام شد. برای تلقیح نمونه‌های آب، از رسوب حاصل از سانتریفوژ آب برای تلقیح مستقیم به محیط کشت استفاده شد. از هر کدام از رقت‌های حاصل مقدار ۱۰۰ میکرولیتر به محیط کشت‌های Modified Growth Medium (MGM) (Dyall-Smith 2008) با ۲۳ درصد نمک شامل ترکیبات به میزان گرم بر لیتر; $MgCl_2.6H_2O$ $MgSO_4.7H_2O$ (26.9); NaCl (184.8); (23.1); KCl (5.4); $CaCl_2.2H_2O$ (0.8); peptone (10.0); yeast extract (2.0); agar (15.0); و محیط moderate halophilic medium (MH) (Caton et al. 2004; Vreeland 2013) با ۱۲ درصد نمک شامل ترکیبات به میزان گرم بر لیتر yeast extract; (10); proteose peptone (5); glucose (1); NaCl (100); $MgCl_2.H_2O(7)$; $MgSO_4.7H_2O$ (9.6) $CaCl_2.2H_2O$ (0.36); KCl (2); $NaHCO_3$(0.06); NaBr (0.026); و محیط تغییر یافته Sea water Nutrient Agar (SWN) (Bowman et al. 2003) با نمک سه درصد حاوی ترکیبات به میزان گرم بر لیتر ;NaCl (20) $MgCl_2.6H_2O$ (3) ; $MgSO_4.7H_2O$ (5); $CaCl_2.7H_2O$ (0.05); KCl (0.5); peptone (5); yeast extract (1); meat extract (2); با pH برابر۷/۲ برای هر یک از محیط‌ها تلقیح شده و با استفاده از میله شیشه‌ای سرکج در سطح پلیت پخش و تمامی محیط‌های MH و SWN تلقیح شده در دمای ۳۴ درجه سانتی‌گراد و محیط MGM در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شدند. کلنی-های رشد کرده روی محیط‌های جامد MH وSWN در دوره‌های زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت جداسازی و خالص‌سازی شدند و به مدت ۶ ماه پلیت‌ها نگهداری شده و در بازه زمانی دو هفته‌ای بررسی و کلنی‌های جدید جداسازی شدند. کلنی‌های رشد کرده روی محیط MGM پس از گذشت حداقل هشت هفته بررسی و ضمن شمارش تعداد کلنی‌ها، هر کدام از جدایه‌های بدست آمده در محیط‌هایی که از آنها جدا سازی شده بودند مجددا کشت داده شدند. به منظور دسترسی به بیشترین میزان جداسازی، پلیت‌ها نگهداری شده و در بازه‌های زمانی چهار هفته‌ای مورد بررسی قرار گرفته و کلنی‌های رشد کرده جدید جداسازی شدند. در هر مرحله کلنی‌های دارای مشخصات ریخت‌شناسی (شکل، اندازه، رنگ، قوام، حاشیه و برآمدگی سطحی) متفاوت جداسازی شدند. کشت متوالی برای اطمینان از خالص بودن جدایه‌ها انجام شد. به منظور جداسازی کلنی‌های کند رشد تا شش ماه پس از گرماگذاری روی محیط‌های جامد مشابه جداسازی و خالص-سازی ادامه یافت و پس از رشد و ظاهر شدن کلنی، حتی المقدور از تک کلنی‌ها کشت خالص به عمل آمد (Caton et al. 2004). برای تایید خالص بودن کلنی‌ها رنگ‌آمیزی گرم بر اساس روش Hucker انجام شد (Gerhardt and Murray 1994). جدایه‌های خالص‌سازی شده بر اساس محل نمونه‌برداری نام‌گذاری شده و با تهیه دو پلیت ذخیره برای هر سویه با استفاده از کشت تک کلنی بر روی پلیت شش سانتی‌متری در سرد خانه با دمای چهار درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. به منظور جلوگیری از خشک شدن،

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-26]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1393.9.3.7.0]

جدول۳ - ترکیب و نوع یون‌های موجود در نمونه‌های شاخص دریاچه

نمونه / نوع یون	نمک (میلی گرم در لیتر)	آب (میلی گرم در لیتر)	لجن (میلی گرم در لیتر)	خاک (میلی گرم در لیتر)
Fe^{2+}	۰/۰۳۷	۱/۴۲۵	۰/۶	۱۴/۸
Na^{+}	۵۴۰۰۰۰	۴۲۰۰۰	۱۰۰۰۰۰	۶۰۵۰۰
Cl^{-}	۱۱۹۸۱۲۵۰	۱۵۶۲۰۰	۳۳۳۷۰۰۰	۱۸۶۳۷۵۰
K^{+}	۱۵۰۰	۱۸۰۰	۸۰۰۰	۱۵۰۰
Mg^{2+}	۸۱۰۰۰	۱۵۴۶۷	۱۴۰۰۰	۹۵۰
Ca^{2+}	۲۵۷۵۰	۸۰۰	۵۵۰	۱۲۰۰
HCO^{3-}	۷۲۲۰۰	۱۳۴۲۰۰	۳۶۶۰۰۰	۹۷۶۰۰۰
SO_4^{2-}	۱۶۵۰۰	۴۲۲۴	۲۴۰۰۰۰	۴۰۸۰

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

تفکیک سویه‌های نمک دوست نسبی و تحمل کننده نمک و تعیین محدوده نمک رشد سویه‌های منتخب

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

شناسایی ملکولی و آنالیز فیلوژنتیکی سویه‌های منتخب

شناسایی تکمیلی سویه‌های منتخب با تکثیر و تعیین توالی قطعه‌ای از 16S rDNA انجام گرفت. بدین منظور ابتدا DNA ژنومی سویه‌های منتخب به روش Marmur (1961)، به این شرح استخراج شد.

توده زیستی تهیه شده از سویه‌های منتخب در بافر TE حل شده و به آن لیزوزیم (۱۰ میلی گرم در میلی‌لیتر) اضافه شد و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شد. سپس به آن SDS، پروتئیناز K و RNase افزوده و چند بار به آرامی معکوس شد سپس به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی-گراد قرار داده شد. بعد از طی این دوره محلول کلرید سدیم ۵ مولار افزوده پس از چند بار معکوس کردن در بن ماری ۶۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه قرار داده شد. در مرحله بعد با استفاده فنل-کلروفرم-ایزوآمیل الکل خالص‌سازی انجام شد سپس DNA با استفاده از ایزوپروپانول رسوب داده شد و رسوب با الکل ۹۶ درصد و ۷۰ درصد شسته شد. رسوب نهایی در دمای اتاق خشک شده و در نهایت در ۵۰ µl بافر TE حل شد. DNA استخراج شده برای نگهداری به فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد منتقل شد. سپس تکثیر قطعه‌ای از 16S rDNA با استفاده از آغازگرهای عمومی شامل توالی‌های 21f 5′- (Cytryn et al. 2000) TTCCGGTTGATCCYGCCGGA -3′ و 1492R (5′-GGTTACCTTGTTACGACTT-3′) (Turner et al.1999) انجام گرفت. استخراج DNA ژنومی و تکثیر قطعه‌ای از 16S rDNA (۱۵۰۰ bp) با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز تایید شدند. محصول واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمراز تعیین ترادف شده و نتایج حاصل از آن برای تجزیه و تحلیل‌های فیلوژنتیک مورد استفاده قرار گرفتند. به منظور تکثیر قطعه‌ای از 16S rDNA با

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-26]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1393.9.3.7.0]

استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز بافر با غلظت 1X در ترکیب نهایی، $MgCl_2$ با غلظت ۲/۵ تا ۰/۵ میلی‌مول، dNTP با غلظت ۰/۴ میلی‌مول از هر کدام، آنزیم *Taq* DNA پلی مراز به میزان 1 U و آغازگرهای عمومی رفت و برگشت از هرکدام به میزان ۰/۵ تا ۰/۴ میلی‌مول و DNA الگو به میزان مناسب استفاده شد. برای حصول اطمینان از عدم آلودگی مواد مورد استفاده در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز شاهد منفی با افزودن آب به جای DNA الگو در ویال حاوی مخلوط واکنش به کار رفت. برای انجام واکنش زنجیره‌ای پلی مراز از واسرشت اولیه با دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه و ۳۰ چرخه تکرار شونده شامل واسرشت با دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه و اتصال با دمای بین ۵۶ تا ۵۹ سانتی‌گراد به مدت ۵۰ تا ۶۰ ثانیه وسنتز با دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه و پس از اتمام ۳۰ چرخه برای سنتز نهایی با دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای مدت ۷ دقیقه در نظر گرفته شد. محصول نهایی حاصل از واکنش زنجیره‌ای پلی مراز توسط روش ختم سنتز DNA به شکل رفت و برگشت تعیین ترادف شد (شرکت ماکروژن کره جنوبی).

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

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

توصیف اولیه سویه‌ها

توصیف اولیه سویه‌ها بر اساس تعیین صفات اولیه ماکروسکپی، میکروسکوپی و فیزیولوژیک انجام شد. برای مشاهدهِ ویژگی‌های ماکروسکپی کلنی، از محیط جامد با ترکیب مورد استفاده برای جداسازی استفاده شد و شکل، ارتفاع، حاشیه، سطح و رنگ کلنی سویه‌ها مورد توجه قرار گرفت. شکل میکروسکپی سویه‌ها توسط میکروسکوپ نوری و بزرگنمایی ۱۰۰۰ مشاهده شد. برای تایید نتایج حاصل از رنگ‌آمیزی گرم از روش KOH سه درصد توصیه شده توسط Baron and Finegold (1990) استفاده شد. حرکت سلول با استفاده از روش لام مرطوب بررسی شد. برای مشاهده حرکت از بزرگنمایی ۴۰۰ میکروسکوپ نوری استفاده شد. برای بررسی فعالیت کاتالازی از کشت ۲۴ ساعته جدایه‌ها و پراکسید هیدروژن سه درصد به عنوان معرف استفاده شده و تولید حباب به عنوان واکنش مثبت در نظرگرفته شد. برای بررسی فعالیت اکسیدازی از دیسک‌های آماده اکسیداز (شرکت پادتن طب) استفاده شد (Murray et al. 1994). به صورت تصادفی ۳۶ جدایه[1] برای شناسایی تکمیلی از نظر خصوصیات ظاهری و ریخت‌شناسی کلنی انتخاب شدند.

نتایج و بحث

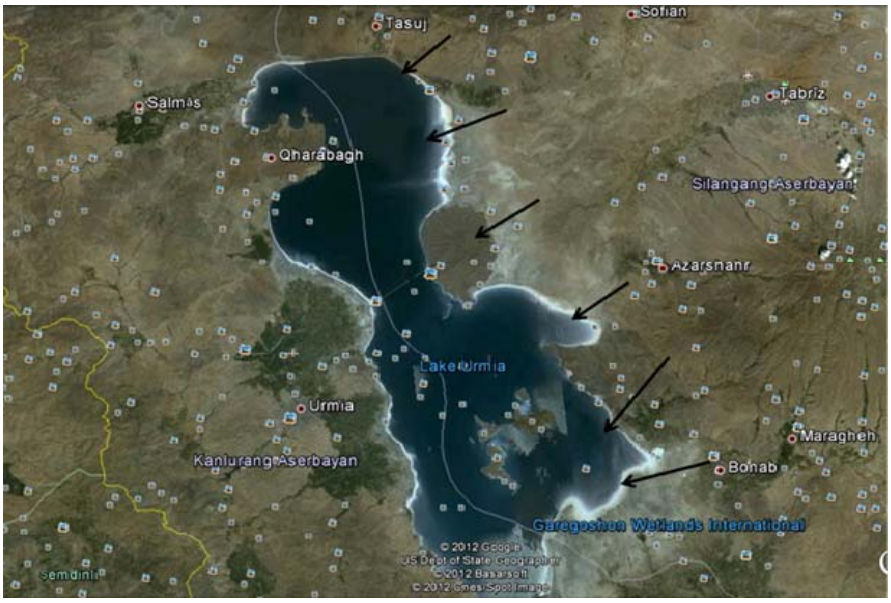
تصویر دریاچه و موقعیت جغرافیایی مناطق نمونه برداری بر روی نقشه در شکل ۱ نمایش داده شده است

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

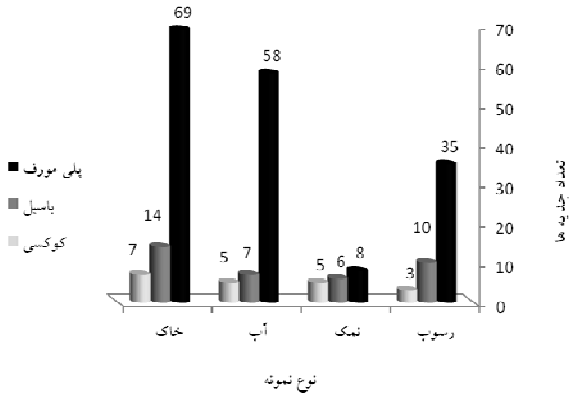
[1] Isolated

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-26]

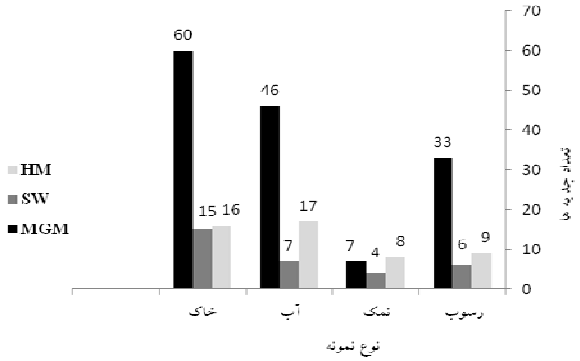
[DOR: 20.1001.1.20084439.1393.9.3.7.0]



شکل۱- نقشه مناطق جغرافیایی نمونه برداری در نقشه Googl Map در آدرس اینترنتی http: //earth.google.com که محل‌های نمونه‌برداری با فلش علامت-گذاری شده است.



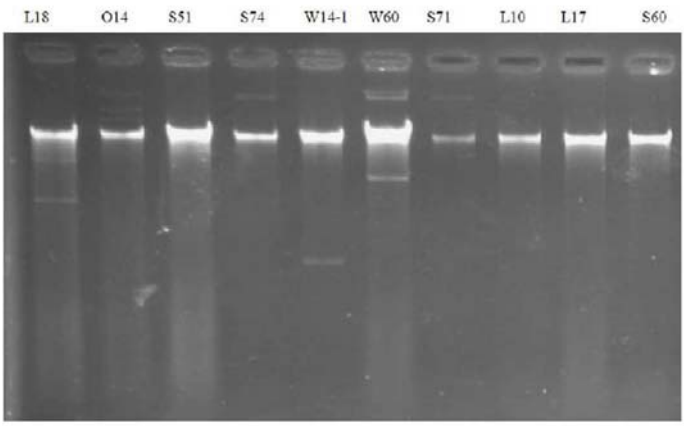
شکل۲- فراوانی تعداد جدایه‌های اولیه از نمونه‌های شاخص آب، خاک، نمک و رسوب به تفکیک ریخت‌شناسی



شکل ۳- نمودار تفکیک تعداد جدایه های اولیه از نمونه های شاخص آب، خاک، رسوب و نمک با استفاده از محیط کشت های مختلف

خاک، نمک و رسوب در محیط‌های مختلف در جدول۴ آمده است. طبق این نتایج تعداد سویه‌ها از محیط MGM ۱۰ برابر بیشتر از دو محیط MH و SWN بود. شکل۳ تعداد اولیه سویه‌ها به تفکیک محیط مورد استفاده برای جداسازی آورده شده است. در نمونه‌های آب و خاک شاخص بیشترین جدایه‌ها در محیط MGM جداسازی شدند. محیط‌های SWN و HM کمترین میزان جدایه‌های اولیه را به ترتیب به خود اختصاص دادند. شناسایی مولکولی سویه‌های منتخب مطابق روش توضیح داده شده انجام شد. DNA های ژنومی استخراج شده با الکتروفورز ارزیابی شدند. شکل ۴ ژل استخراج DNA ژنومی سویه‌های منتخب را نشان می‌دهد. توالی 16S rDNA سویه‌های منتخب آرکی و باکتری با استفاده از آغازگرهای عمومی مناسب (21F و 1492R مخصوص آرکی؛ 27F و 1492R مخصوص باکتری) تکثیر شدند. شکل۵ تصویر ژل تکثیر قطعه‌ای از 16S rDNA سویه‌های منتخب را نشان می‌دهد. 16S rDNA پروکاریوتی حدود bp ۱۵۰۰ طول دارد.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-26]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1393.9.3.7.0]



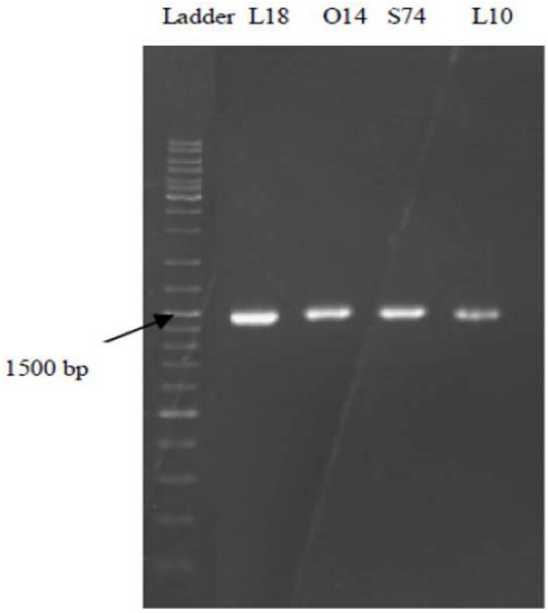
شکل ۴- تصویر ژل باندهای حاصل از استخراج DNA ژنومی چند سویه که اسامی آن در شکل مشخص شده است.

جدول۴- فراوانی تعداد کلنی‌های بدست آمده از نمونه‌های شاخص (CFU/ml)

محیط کشت / نمونه	MGM	SW	MH
خاک	۶/۵×۱۰^{۶}	۵/۶×۱۰^{۵}	۶×۱۰^{۵}
آب	۳/۲×۱۰^{۵}	۳/۲×۱۰^{۴}	۴/۷×۱۰^{۴}
نمک	۲/۲×۱۰^{۵}	۹/۱× ۱۰^{۳}	۱/۴×۱۰^{۲}
لجن	۶/۶×۱۰^{۶}	۲/۶×۱۰^{۴}	۴/۵×۱۰^{۴}

نتایج حاصل از مقایسه میزان شباهت توالی قطعه‌ای از 16S rDNA سویه‌های منتخب با سویه‌های استاندارد ثبت شده در پایگاه داده Eztaxon در جدول۵ آورده شده است. بیشترین شباهت، صددرصد و کمترین ۹۶/۵ درصد در میان سویه‌ها مشاهده شد. برای سویه‌های ترادف‌یابی شده پس از هم راستا کردن ترادف‌ها با ترادف گونه‌های نزدیک، درخت فیلوژنتیک با الگوریتم Maximum Likelihood ،Maximum Parsimony و Neighbor-Joining رسم شد (Tamura and Dudley 2007).

در مقایسه درخت‌های رسم شده، محل قرارگیری زیرشاخه‌ها و شاخه‌ها در هر سه روش با یکدیگر هم‌خوانی داشت. درخت فیلوژنتیک سویه‌هایی که با جنس آرکی *Halorubrum*، *Haloterrigena* و *Haloarcula* قرابت داشتند، در شکل ۷،۶ و ۸ نشان داده شده است. شکل۹ نیز درخت فیلوژنتیک باکتری‌های ترادف‌یابی شده جنس *Pseudomonas* و *Salicola* نشان داده شده است.



شکل۵- تصویر ژل محصول PCR قطعه‌ای از 16S rDNA تکثیر شده در چند سویه‌های منتخب با آغازگرهای عمومی که اسامی آن در شکل مشخص شده است.

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

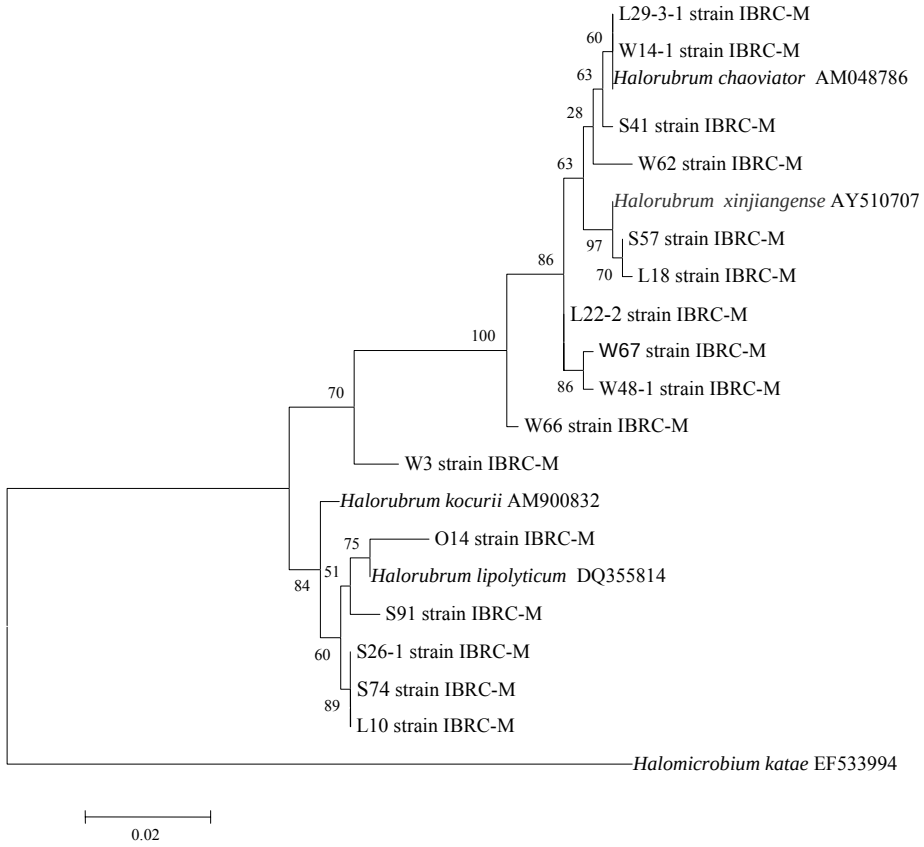
[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-26]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1393.9.3.7.0]

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

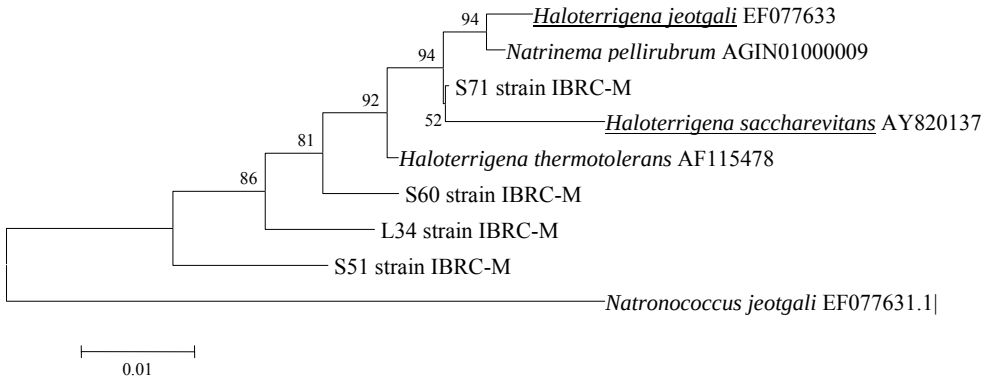
کد سویه منتخب	سویه استاندارد با بیشترین میزان شباهت	درصد شباهت	طول ترادف	Accession number
O14	*Halorubrum lipolyticum* 9-3(T)DG355814	97.8	778	KJ634458
L18	*Halorubrum xinjiangense* AY510707 BD-1(T)	99.6	751	KJ634439
L33-2	*Haloarcula amylolytica* DQ854818 BD-3(T)	99.3	759	KJ634442
S51	*Haloterrigena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

پایداری آنها در حضور حلال‌های آلی، دترجنت‌ها و فلزات سنگین، انتظار می‌رود ابزارهای قدرتمندی در تبدیلات زیستی در شرایط سخت باشند (Alquéres et al. 2007). تعداد زیادی دریاچه نمک در ایران وجود دارد. این دریاچه‌ها شامل انواع درون سرزمینی-ساحلی، دائمی-فصلی و با ترکیبات مختلف نمک می‌باشند. در این پژوهش تنوع زیستی سواحل شرقی و غربی دریاچه ارومیه با استفاده از روش کشت مورد بررسی قرار گرفت. دریاچه ارومیه واقع در شمال‌غربی ایران بزرگترین دریاچه داخلی است که در معرض خطر نابودی زیست‌بوم قرار دارد. محدوده درصد نمک در فصول پربارش سال ۲۲ درصد است و در فصول کم بارش این میزان به تقریبا ۲۸ درصد می رسد که این تغییر میزان نمک در فصول مختلف بر تنوع پروکاریوت‌های نمک دوست موثر است. نتایج این تحقیق که در فصل پر بارش انجام گرفت با نتایج حاصل از بررسی سواحل غربی توسط Amoozegar et al. (2008) در فصل کم بارش متفاوت بوده است. در کل این دریاچه با شوری بالا محیط بسیار مناسبی برای میکروارگانیسم‌های نمک‌دوست به عنوان گروه‌های هدف این پژوهش بود. این زیست‌گاه با توجه به محیط زیست منحصر به فرد از جمله سرمایه‌های طبیعی جهانی به شمار می‌رود و سلامت آن نقش مهمی در زندگی سایر موجودات زنده نواحی مجاور دارد.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-26]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1393.9.3.7.0]

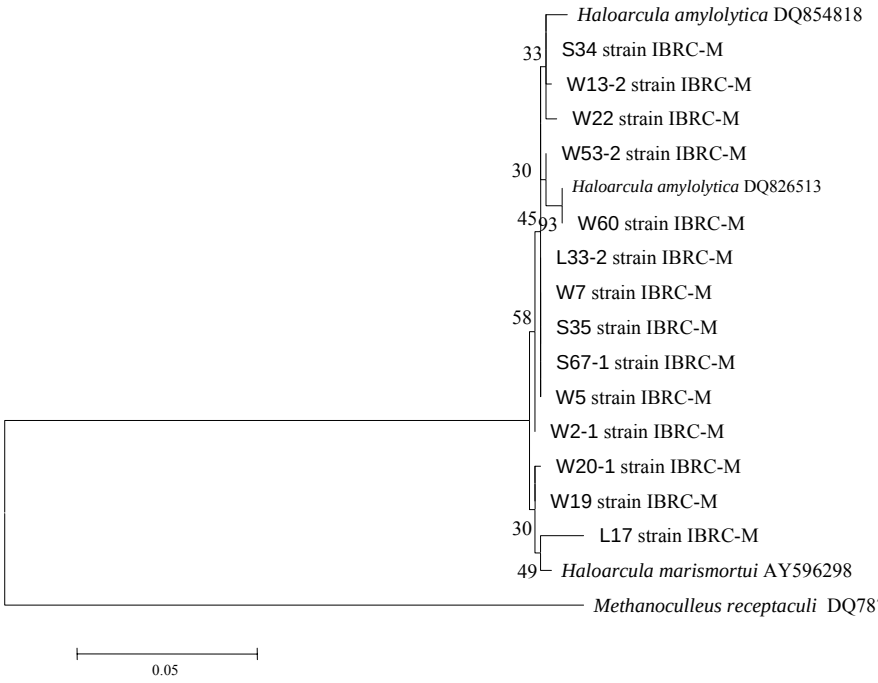


شکل۶– درخت فیلوژنتیک جدایه‌های جنس *Halorubrum* برای نمایش روابط فیلوژنتیک سویه‌های جداسازی شده با استفاده از روش Neighbor-joining و اعداد ذکر شده در محل انشعاب نشانگر درصد نمونه‌گیری Bootstrap از ۱۰۰۰ نمونه است. سویه *Halomicrobium katae* EF533994 به عنوان outgroup قرار داده شده است.

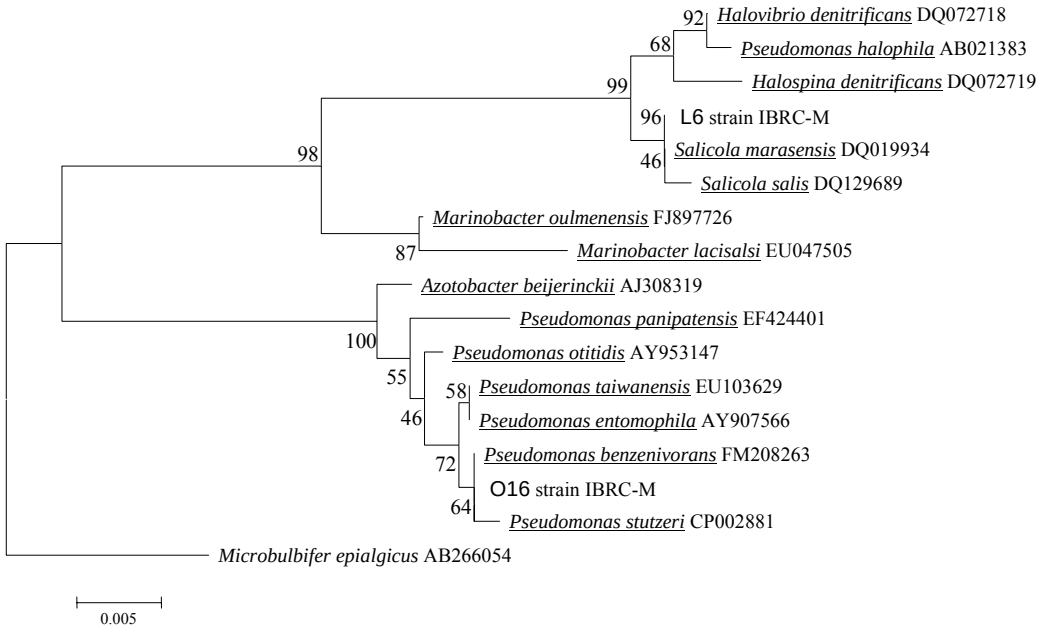


شکل۷– درخت فیلوژنتیک جدایه‌های جنس *Haloterrigena* برای نمایش روابط فیلوژنتیک سویه‌های جداسازی شده با استفاده از روش Neighbor-joining و اعداد ذکر شده در محل انشعاب نشانگر درصد نمونه‌گیری Bootstrap از ۱۰۰۰ نمونه است. سویه *Natronococcus jeotgali* EF077631.1| به عنوان outgroup قرار داده شده است.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-26]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1393.9.3.7.0]



شکل۸– درخت فیلوژنتیک جدایه‌های جنس ***Haloarcula*** برای نمایش روابط فیلوژنتیک سویه‌های جداسازی شده با استفاده از روش Neighbor-joining و اعداد ذکر شده در محل انشعاب نشانگر درصد نمونه‌گیری Bootstrap از ۱۰۰۰ نمونه است. سویه ***Methanoculleus receptaculi*** DQ787476.1| به عنوان outgroup قرار داده شده است.



شکل۹- درخت فیلوژنتیک جدایه‌های باکتری برای نمایش روابط فیلوژنتیک سویه‌های جداسازی شده با استفاده از روش Neighbor-joining و اعداد ذکر شده در محل انشعاب نشانگر درصد نمونه‌گیری Bootstrap از ۱۰۰۰ نمونه است. سویه ***Microbulbifer epialgicus*** AB266054 به عنوان outgroup قرار داده شده است.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-26]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1393.9.3.7.0]

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

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

بر طبق نظر Bardavid et al. (2008) تلقیح آب نمک دریاچه بر روی پلیت حاوی غلظت بالای نمک و غنی از مواد غذایی پیچیده موجب جداسازی سویه های متعلق به جنس های *Halorubrum*، *Haloarcula* و *Haloferax* می‌شود. این مطلب بیشتر بخاطر توانایی رشد آن‌ها در این شرایط بوده تا اینکه به واسطه فراوانی آن‌ها در محیط باشد.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-26]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1393.9.3.7.0]

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

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

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

در حالی‌که در پژوهش حاضر که از تمام نقاط شرق و غرب دریاچه ارومیه جداسازی انجام شده بود فقط سه جنس *Halorubrum*، *Haloarcula* و *Haloterrigena* شناسایی شد و جنس‌های *Natronomona*، *Halomicrobium*، *Halopelagius*، *Halosimplexs*، *Halovivax*، Halobiforma، *Halalkalicoccus*، *Natrinema* و *Natronococcus* گزارش نشدند. تفاوت نتایج این دو پژوهش علل مختلفی دارد نوع نمونه، اختلاف مکان نمونه-برداری، تفاوت فصل نمونه‌برداری و تهیه نمونه شاخص از جمله این علل می باشد. تنوع جنس‌های جداسازی شده به علل ذکر شده کمتر از نمونه‌های حاصل از سواحل غربی دریاچه گزارش شدند و جنس‌هایی که فراوانی بیشتر داشتند غالب شده و احتمالا از رشد بقیه جنس‌ها ممانعت کردند. برای بررسی میکروارگانیسم-ها در سیستم‌های طبیعی بر حسب تعداد کل، تعداد جوامع خاص یا فعالیت‌های متابولیک آنها نمونه شاخص آنالیز و نتایج آن به کل جامعه تعمیم داده می‌شوند. نمونه باید نمایانگر تنوع و تراکم موجودات در کل محیط نمونه‌برداری باشد. برای مثال نمونه‌های جمع‌آوری شده از یک منطقه با هم مخلوط شده و به عنوان نمونه شاخص در نظر گرفته می‌شود (Atlas and Bartha 1998). تعداد و تنوع نمونه‌های به کار گرفته شده، فصل مختلف نمونه‌برداری، توزیع طبیعی میکروارگانیسم‌ها در محیط زیست و مشخصات بوم‌شناختی هر منطقه همگی از جمله مواردی هستند که در نوع میکروارگانیسم‌های جداسازی شده اثر دارند (Alain and Querellou 2009). افزایش تعداد نمونه‌برداری، در افزایش تنوع میکروارگانیسم‌های موجود، تاثیرگذار خواهد بود (Hughes et al. 2001). در بررسی جوامع میکروبی با افزایش تعداد نمونه‌ها نتایج قابل‌قبول‌تری به‌دست می‌آید. در روش کشت علاوه بر محدودیت اصلی (دسترسی به تنها حدود یک درصد از میکروارگانیسم‌های موجود)، محیط‌ها و روش‌های کشت استفاده شده گستره زیادی نداشتند و تنها امکان رشد گروه خاصی از میکروارگانیسم‌ها را فراهم می کردند. بنابراین نتایج به‌دست آمده از این روش بیانگر واقعیت کامل جامعه میکروبی منطقه نیست. در روش مولکولی محدودیت‌های کشت برداشته شده و دسترسی به میکروارگانیسم‌های محیط بدون نیاز به رشد آن‌ها در شرایط مصنوعی آزمایشگاه حاصل شده با این وجود دسترسی به ماده ژنتیکی و توانایی تکثیر ژن مورد نظر در این روش محدودیت‌هایی ایجاد می‌کند.

با توجه به اساس این پژوهش که با روش‌های مبتنی بر کشت انجام گرفته است، آنچه از بررسی نتایج آن بدست می‌آید تنها در مورد گروه‌های قابل کشت قابل بحث خواهد بود. بر این اساس و با در نظر گرفتن سهم کوچک میکروارگانیسم‌های قابل کشت در مقایسه با کل جامعه میکروبی، مقایسه نتایج بدست آمده از نظر بازده روش‌های کشت به کار گرفته شده یا تعیین نقش گروه‌های میکروبی جداسازی شده در حفظ عملکرد زیست بوم امکان پذیر نخواهد بود (Hughes et al. 2001). در ایران دریاچه‌های پر شور مثل ارومیه، آران و بیدگل، حوض سلطان، مهارلو و تالاب گمیشان از دیگر اکوسیستم‌هایی هستند که بررسی شده‌اند (Rahban 2008; Bagheri 2009; Didari 2009; Mehrshad 2010; Asadi 2011). در طول سال‌های اخیر، بررسی تنوع زیستی

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-26]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1393.9.3.7.0]

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

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

سپاسگزاری

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

منابع

Amoozegar MA, Schumann P, Hajighasemi M, Fatemi AZ (2008) *Salinivibrio proteolyticus* sp. nov. a moderately halophilic and proteolytic species from a hypersaline lake in Iran. International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology 58: 1159-1163.

Alain K, Querellou J (2009) Cultivating the uncultured: limits, advances and future challenges. Extremophiles 13: 583-594.

Alquéres SMC, Almeida RV, Clementino MM, Vieira RP, Almeida WI, Cardoso AM, Martins OB (2007) Exploring the biotechnological applications in the archaeal domain. Brazilian Journal of Microbiology 38: 398-405.

Asadi B (2011) Diversity of aerobic extreme halophilic prokaryotes from western coastal line of Urmia Lake with culture-dependent and culture-independent methods. MSc Thesis, University of Tehran, Iran (In Farsi)

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

Bagheri M (2009) Diversity of culturable Moderate halophilic heterotrophic bacteria in Aran-Bidgol Lake. MSc Thesis, University of Tehran, Iran. (In Farsi).

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

Baron F, Finegold S (1990) Diagnostic Microbiology, 8Th ed. St. Loui; the CV Mosby Co.

Birbir M, Calli B, Mertoglu B, Bardavid RE, Oren A, Ogmen MN, Ogan A (2007) Extremely halophilic Archaea from Tuz Lake, Turkey, and the adjacent Kaldirim and Kayacik salterns. World Journal of Microbiology and Biotechnology 23: 309-316.

Bowman JP, McCammon SA, Gibson JAE, Nichols PD, Robertson L (2003) Prokaryotic metabolic activity and community structure within Antarctic continental shelf sediment. Applied Environmental Microbioliology 69: 2448-2462.

Burns DG, Camakaris HM, Janssen PH, Dyall-Smith ML (2004) Combined use of cultivation-dependent and cultivation-independent methods indicates that members of most haloarchaeal groups in an Australian crystallizer pond are cultivable. Applied Environmental Microbiology 70: 5258-5265.

Caton TM, Witte LR, Ngyuen HD, Buchheim JA, Buchheim MA, Schneegurt MA (2004) Halotolerant aerobic heterotrophic bacteria from the Great Salt Plains of Oklahoma. Microbiology Ecolology 48: 449-462.

Didari Khamseh Motlagh M (2009) Diversity of culturable halotolerant aerobic heterotrophic bacteria in Aran-Bidgol Lake. MSc Thesis, University of Tehran, Iran. (In Farsi)

Doughty HW (1924) Mohres method for the determination of silver and halogens in other than neutral solutions. Journal of the American Chemical Society 46: 2707-2709.

Dyall-Smith ML (2008) The Halohandbook: Protocols for haloarchaeal Genetics. http://www.haloarchaea.com/ resources/ halohandbook.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-26]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1393.9.3.7.0]

Felsenstein J (1985) Phylogenies and the comparative method. American Naturalist 1:1-15.
Gerhardt P, Murray RGE (1994) Methods for general and molecular bacteriology. American Society for Microbiology. Washington.
Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symposium. Series 41: 95-98.
Helm D, Hepburn C (2012) The economic analysis of biodiversity: an assessment, Oxford Review of Economic Policy 28:1-21.
Hughes JB, Hellmann JJ, Ricketts TH, Bohannan BJM (2001) Counting the uncountable: Statistical approaches to estimating microbial diversity**.** Applied Environmental Microbiology 67: 4399-4406.
Kharroub K, Aguilera M, Quesada T, Morillo JA, Ramos-Cormenzana A, Boulharouf A, Monteoliva-Sánchez M (2006) *Salicola salis* sp. nov., an extremely halophilic bacterium isolated from Ezzemoul sabkha in Algeria. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 56: 2647-2652.
Kim OS, Cho YJ, Lee K, Yoon SH, Kim M, Na H, Park SC, Jeon YS, Lee JH, Yi H, Won S, Chun J (2012) Introducing EzTaxon-e: a prokaryotic 16S rRNA gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 62:716-721.
Mehrshad M (2011) Diversity of aerobic heterotrophic moderately halophilic and halotolerant bacteria from western coastal line of Urmia Lake with culture-dependent and culture-independent methods. MSc Thesis, University of Tehran, Iran. (In Farsi)
Makhdoumi-Kakhki A, Amoozegar MA, Kazemi B, Pašic L, Ventosa A (2012) Prokaryotic diversity in Aran-Bidgol Salt Lake, the largest hypersaline playa in Iran. Microbes Environmentes 27: 87-93.
Maturrano L, Santos F, Rossello-Mora R, Anton J (2006) Microbial diversity in Maras salterns, a hypersaline environment in the Peruvian Andes. Applied Environmental Microbiology 72: 3887-3895.
Marmur JA (1961) Procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. Journal Molocular Biology 3: 207-208.
Murray RGE, Doetsch RN, Robinow CF (1994) Determinative and cytological light microscopy. In: Gerhardt P, Murray RGE, Wood WA, Krieg NR, editors; Gerhardt P, Murray RGE, Wood WA, Krieg NR, editors. Methods for general and molecular bacteriology. Washington, D.C: American Society for Microbiology 22-41.
Nee S (2004) More than meets the eye. Nature 429: 804-805.
Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. Bioinformatics 23: 2947-2948.
Oren A (2004) Prokaryote diversity and taxonomy: current status and future challenges. Philosophical Transactions: Biological Sciences 359: 623-638.
Philippot L, Spor A, nault CH, Bru D, Bizouard F (2013) Original Article. Loss in microbial diversity affects nitrogen cycling in soil. ISME Journal 7: 1609-1619.
Rhoades JD (1982) Soluble Salts. In A.L. Page et al. (ed.) Methods of soil analysis. Part 2. Agronomy 9: 167-l 78.
Rodriguez-Valera F (1988) Characteristics and microbial ecology of hypersaline environments. Halophilic bacteria. F. Rodriguez-Valera. Boca Raton Fla., CRC Press, Inc. 1: 3-30.
Rohban R (2008) Biodiversity of halophilic bacteria producing hydrolytic enzyme in Howz Soltan Lake. MSc Thesis, Science and Research Branch Islamic Azad University, Iran. (In Farsi)
Simbert RM, Krieg NR (1994) Phenotypic characterization. In: Methodes for general and molecular bacteriology (eds. Gerhard P, Murray, RGE, Wood WA, Krieg NR) American Society for Microbiology, Washington 607-655.
Sheen RT, Kahler HL (1983) Effects of Ions on mohr method for chloride determination, Industrial Engineering Chemistry Analysis. Ed. 10: 628-629.
Sonia R, Vartoukian, Richard M, Palmer and William GW (2010) Minireview strategies for culture of 'unculturable' bacteria. FEMS Microbiology Letter 309: 1-7.
Tamura K, Dudley J (2007) MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. Molecular Biology and Evolution 8: 1596-1599.
Tsiamis G, Katsaveli K, Ntougias S, Kyrpides N, Andersen G, Piceno Y, Bourtzis K (2008) Prokaryotic community profiles at different operational stages of a Greek solar saltern. Research of Microbiology 159: 609-627.
Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S (2011) MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. Molecular Biology and Evolution 28: 2731-2739.
Truper HG (1992) Prokaryotes: an overview with respect to biodiversity and environmental importance, Biodiversity and Conservation 1: 227-236.
Turner S, Pryer KM, Miao VPW, Palmer JD (1999) Investigating deep phylogenetic relationships among cyanobacteria and plastids by small subunit rRNA sequence analysis. Journal of Eukaryotic Microbiology 46: 327-338.
Xuewei X, Min W, Yuehong W, Huibin Z (2007) Culturable halophilic archaeal diversity of Ayakekumu salt Lake located in Xinjiang, China. Acta Ecologica Sinica 27: 3119-3123.
Zafrilla B, Martínez-Espinosa RM, Alonso MA, Bonete MJ (2010) Biodiversity of Archaea and floral of two inland saltern ecosystems in the Alto Vinalopó Valley, Spain. Saline Systems 13:10.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-26]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1393.9.3.7.0]

International Journal of Systematics Bacteriology 49:131-136.
Vibha B, Neelam G (2012) Bhardwaj Vibha and Garg Neelam., Importance of Exploration of Microbial Biodiversity. ISCA Journal of Biological Sciences 1: 78-83.
Vreeland RH (ed.) (2013) Advances in Understanding the Biology of Halophilic Microorganisms, Chapter 2 Media and Conditions for the Growth of Halophilic and Halotolerant Bacteria and Archaea Springer Science+Business Media Dordrecht 35-58.
Zhang H, Schroder JL, Pittman JJ, Wang JJ, Payton ME (2005) Soil Salinity Using Saturated Paste and 1:1 Soil to Water Extracts. Soil Science Society of American Journal 69:1146-1151.
Van HT, Pham and Jaisoo K (2012) Cultivation of unculturable soil bacteria. Trends in Biotechnology 30: 475-484.
Ventosa A, Gutiérrez M, Kamekura M, Dyall-Smith M (1999) Proposal to transfer *Halococcus turkmenicus*, *Halobacterium trapanicum* JCM 9743 and strain GSL-11 to *Haloterrigena turkmenica gen*. nov., comb. nov.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-26]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1393.9.3.7.0]