

## بررسی تنوع زیستی باکتریهای نمک دوست نسبی و تحمل کننده نمک قابل کشت در

### تالاب پرشور اینچه برون

پریسا زرپرور<sup>۱</sup>، محمدعلی آموزگار<sup>۲\*</sup> و محمدرضا فلاحیان<sup>۳</sup>

<sup>۱</sup> تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، بخش زیست‌شناسی

<sup>۲</sup> تهران، دانشگاه تهران، پردیس علوم، دانشکده زیست‌شناسی و قطب تبارزایی موجودات زنده، بخش میکروبیولوژی

<sup>۳</sup> تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، دانشکده علوم پایه، گروه میکروبیولوژی

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

#### چکیده

تالاب اینچه برون در شمال ایران در نزدیکی مرز ترکمنستان واقع شده و شوری و تغییرات pH آن قابل توجه است. در شهریور ۱۳۸۹ از آب، خاک و نمک ۴ منطقه تالاب نمونه برداری شد. ۴۰۰ جدایه خالص سازی و ۵۵ سویه PCR گردید. جنسهای *Bacillus* (۱۸ درصد)، *Marinobacte* (۱۶ درصد)، *Halomonas* (۱۶ درصد)، *Kocuria* (۹ درصد)، *Oceanobacillus* (۷ درصد)، *Dietzia* (۷ درصد)، *Virgibacillus* (۶ درصد)، *Chromohalobacter* (۵ درصد)، *Rhodococcus* (۲ درصد)، *Micrococcus* (۳ درصد)، *Paenibacillus* (۲ درصد)، *Halobacillus* (۳ درصد)، *Thalassobacillus* (۲ درصد)، *Arthrobacter* (۲ درصد) و *Desmospora* (۲ درصد) جدا شدند. در ۱۳ سویه میزان شباهت در ترادف ژن 16S rRNA بین ۹۷-۹۸/۴ درصد و در ۷ سویه کمتر از ۹۷ درصد بود که بیانگر تفاوت قابل ملاحظه ای در سطح گونه و یا در برخی حتی جنس است. با بررسی بهینه رشد نمکی ۲۲ سویه نمک دوست نسبی و ۳۳ سویه تحمل کننده نمک بودند. تولید ۴ آنزیم هیدرولیتیک بررسی گردید که عمده ترین تولید کنندگان آن باسیلهای گرم مثبت و بیشترین فراوانی متعلق به آنزیمهای ژلاتیناز و پروتئاز بود.

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

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

#### مقدمه

کم‌تر، محیطهایی در معرض خطر، حساس و نیازمند مراقبت خاص محسوب می‌شوند. رفتارهای انسانی و یا عوامل طبیعی که زیست‌بومها را به سوی کاهش تنوع میکربی آن هدایت می‌کنند، می‌توانند منجر به تخریب زیست‌بوم و یا بروز همه‌گیرها و آفتها شوند (۲ و ۱۷).

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

برای تضمین تولید مواد غذایی و دارویی در آینده و توسعه کشاورزی و صنعت، حفظ ذخایر توارثی موجود در طبیعت بکر و دست نخورده، امری ضروری است. بی‌شک تاریخچه تکامل طولانی میکروارگانیسمها و تواناییهای متابولیکی گسترده شان و نقش مهمی که در چرخه عناصر، پالایش زیستی، تولید آنتی‌بیوتیک، تولید فرآورده های تخمیری و خوراکی، همزیستی با گیاهان، بیابان زدایی و افزایش حاصلخیزی خاک و... ایفاء می‌کنند، اصلی ترین دلایل اهمیت بررسی تنوع زیستی میکربی بوده است (۲۸). امروزه یکی از شاخصهای سلامت هر زیست‌بوم و پایداری آن، تنوع میکروارگانیسمهای آن در نظر گرفته می‌شود. به طوری که زیست‌بومهای با تنوع

همچنین دریاچه فصلی حوض سلطان (۶)، دریاچه نمک آران و بیدگل (۱، ۲ و ۵) و دریاچه بختگان واقع در غرب نی ریز (۴) نیز از نظر تنوع میکروارگانیسمهای نمک دوست و تحمل‌کننده نمک و تولید آنزیمهای هیدرولیتیک بررسی شده‌اند.

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

اهداف اصلی این پژوهش، بررسی یک اکوسیستم پرشور (تالاب اینچه برون) از نظر گوناگونی میکروارگانیسم‌های ساکن و درک گوشه‌ای از تنوع زیستی موجود در آن، شناسایی توانمندی میکروارگانیسم‌های نمک دوست در تولید متابولیت‌های ثانویه و امکان دستیابی به جنس و گونه‌های جدید برای افزودن به ذخایر ژنتیکی کشور در راستای در اختیار داشتن یک بانک میکروبی غنی و بی‌نیازی از خرید سویه از بانکهای میکروبی خارج از کشور بوده است.

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

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

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

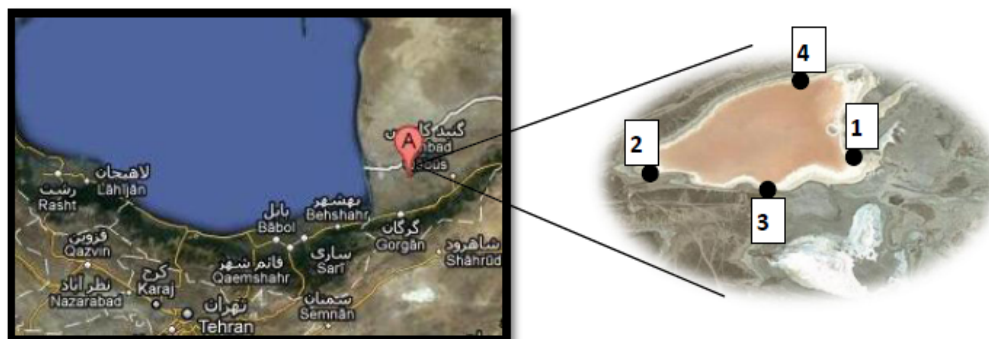
در زیست‌محیطهای آب و خاک، فاکتور شوری تعیین‌کننده جمعیتهای میکروبی محسوب می‌شود. خاکهای دارای بیش از ۰/۲ درصد نمک محلول، خاک شور نامیده می‌شود که در سراسر جهان و به ویژه در مناطق خشک فراوان وجود دارد (۲). اقیانوسها، دریاها، دریاچه‌های شور و مردابهای نمک از جمله محیطهای آبی شور شناخته شده‌اند. دریاچه‌های با میزان نمک بالا ۰/۳ درصد جزء دریاچه‌های شور محسوب می‌شود. آبهای پرشور، تراکم نمک بسیار بالاتری نسبت به آب دریا دارند تنوع موجودات نمک دوست و تحمل‌کننده نمک در اکوسیستمهای آبی و خاکهای شور بسیار گسترده بوده و مجموعه‌ای از موجودات ماکروسکوپی و میکروسکوپی را در برمی‌گیرد (۲ و ۲۲). امروزه مطالعه بر روی میکروارگانیسم‌های نمک دوست به دلیل تواناییهای ویژه‌ای که در تحمل شرایط دشوار، تولید انواع متابولیت‌ها، تجزیه ماکرومولکول‌های گوناگون و پالایش زیستی دارند در جنبه‌های مختلف فیزیولوژی، اکولوژی، ژنتیک و بیوتکنولوژی توسعه یافته است (۵).

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

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

### مواد و روشها

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



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

meat ۵ و Agar: ۱۵ برای جداسازی تحمل کننده های نمک استفاده گردید (۲).

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

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

**خالص سازی و شناسایی سویه ها:** از نمونه های منتقل شده به آزمایشگاه برای جدا سازی و کشت باکتریهای نمک دوست نسبی و تحمل کننده نمک، تا رقت  $10^{-6}$  سری رقت تهیه شد. برای کشت وخالص سازی از محیط جامد Moderate halophiles (12% salt) شامل (گرم در لیتر): NaCl : ۱۰/۴،  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$  : ۵/۴،  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  : ۸/۳،  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  : ۰/۴۱، KCl : ۱/۶۶،  $NaHCO_3$  : ۰/۰۸، Yeast Extract : ۵، Glucose : ۱، Peptone from meat : ۸ و Agar : ۱۵ برای جداسازی نمک دوستهای نسبی و محیط جامد Seawater Nutrient Agar (3% salt) شامل (گرم در لیتر): NaCl : ۲۰،  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$  : ۳،  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  : ۵،  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  : ۰/۵، KCl : ۰/۵، Yeast Extract : ۱، Peptone from Meat : ۲

شده تعیین شد. آنالیز فیلوژنتیک باکتریهای منتخب با سویه‌های نزدیک به آنها با استفاده از نرم افزار Clustal x (ویرایش دوم) صورت گرفت. درخت فیلوژنی با استفاده از نرم افزار MEGA (ویرایش پنجم) با الگوریتمهای Maximum parsimony و Maximum likelihood رسم گردید (۲۷). بررسی اعتبار شاخه‌های درخت با استفاده از الگوریتم Bootstrap analysis و با ۱۰۰۰ بار نمونه‌گیری صورت گرفت (۱۳).

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

### نتایج

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

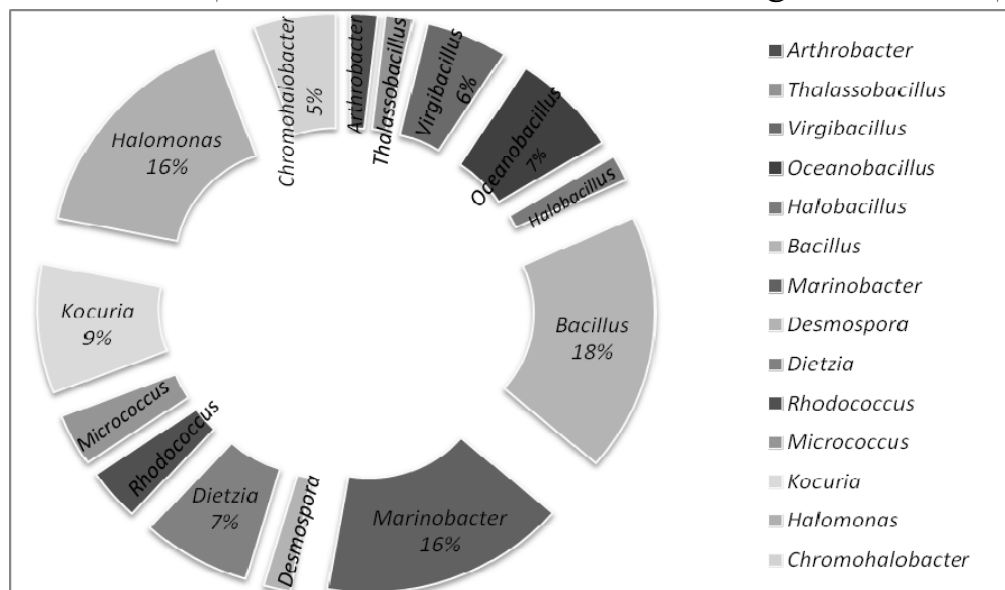
محل ۴ با  $5 \times 10^5$  cfu باکتری بیشترین بار میکروبی را داشت و کمترین تعداد جدایه متعلق به نمونه برداری از منطقه ۱ بود. در مجموع ۴۰۰ جدایه خالص سازی گردید که بیشترین جداسازی از محیط MH با ۱۲ درصد نمک و pH

زمان کشت، هر یک از این محیطها مورد مقایسه قرار گرفت و نمکی بهینه انتخاب شد که اولین رشد پایدار باکتری در آن درصد نمک صورت گرفته باشد (۲ و ۵). از ۴۰۰ جدایه خالص شده، ۵۵ سویه به صورت تصادفی برای تعیین ترادف ژن 16S rRNA و مطالعات تکمیلی انتخاب گشته و پس از استخراج DNA، انجام PCR و تعیین ترادف نتایج حاصله با توالیهای ثبت شده در بانکهای اطلاعاتی مقایسه گردید.

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

تعیین توالی محصول PCR از طریق شرکت ژن فن آوران انجام شد. ترادف‌های به دست آمده با استفاده از نرم افزار Chromas مرتب شده و با نرم افزار BLAST با توالیهای ثبت شده موجود در پایگاه اطلاعات ژنومی GenBank و Eztaxon مقایسه شد. به این ترتیب نزدیکترین سویه‌ها با ترادف ژن 16S rRNA مشابه با سویه‌های منتخب PCR

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



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

جدول ۱- ترکیب محیطهای کشت بررسی تولید آنزیم

روش تشخیص	محیط تولید آنزیم (گرم در لیتر)	آنزیم
افزودن لوگل (یدید پتاسیم) بر روی محل رشد باکتری و ایجاد هاله شفاف پاسخ مثبت در نظر گرفته شد.	Soluble starch : 10 , Beef extract : 3 Agar : 15 پس از آماده سازی pH محیط بر روی ۷/۵ تنظیم شده و در دمای ۱۱۵ درجه سانتی گراد برای مدت ۱۰ دقیقه اتوکلاو شد (۱۲).	آمیلاز
وجود هاله شفاف در اطراف کلونی‌ها نشانه هیدرولیز پروتئین کازئین بوده و به عنوان پاسخ مثبت در نظر گرفته شد	Meat extracts : 3 , Peptone : 5 , Skim milk : 20 Agar : 15 پودر Skim Milk در نیمی از حجم آب محیط حل شده و در دمای ۱۱۰ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه اتوکلاو شد و بعد از آن به محیط پایه آگاردار که پس از آماده سازی بر روی pH ۷/۵ تنظیم شده در دمای ۱۲۱ درجه سانتی گراد، ۱۵ دقیقه اتوکلاو شده است، اضافه شد (۲۴).	پروتئاز
ایجاد نواحی رسوب اطراف کلنی‌ها، به صورت دانه های سفید همراه با هاله کدر نشان دهنده تولید آنزیم لیپاز توسط باکتری است.	CaCl <sub>2</sub> .H <sub>2</sub> O: 0/1 , Peptone : 10, Tween 80: 10 Agar : 15 توتین موجود در این محیط بعد از تهیه در دمای ۱۱۵ درجه سانتی گراد به مدت ۲۰ دقیقه اتوکلاو شد. محیط پایه پس از آماده سازی بر روی pH ۷/۵ تنظیم شده و به صورت جداگانه در دمای ۱۲۱ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ دقیقه اتوکلاو شد. دو محیط پس از اتوکلاو به هم اضافه شد (۲۳).	لیپاز
محیطهای رشد کرده را به همراه یک نمونه منفی در دمای ۴ درجه سانتی گراد قرار داده پس از ۲۰ دقیقه در صورت مایع بودن محیط نتیجه تست مثبت گزارش شد.	Meat extracts : 3 , Peptone : 5, Gelatin : 120 محیط ابتدا آب تا دمای نزدیک جوش گرم شده و نمک و محیط کشت به آرامی به این ترکیب اضافه شد. pH محیط آماده شده بر روی میزان ۷/۵ تنظیم شده و برای ۱۵ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سانتی گراد اتوکلاو شد. محیط آماده شده به روش Stab کشت داده شد. (۲۴)	ژلاتیناز

جدول ۲ - مختصات مناطق نمونه برداری و تعداد جدایه های خالص سازی شده

به تفکیک محل و نتایج لام گرم

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

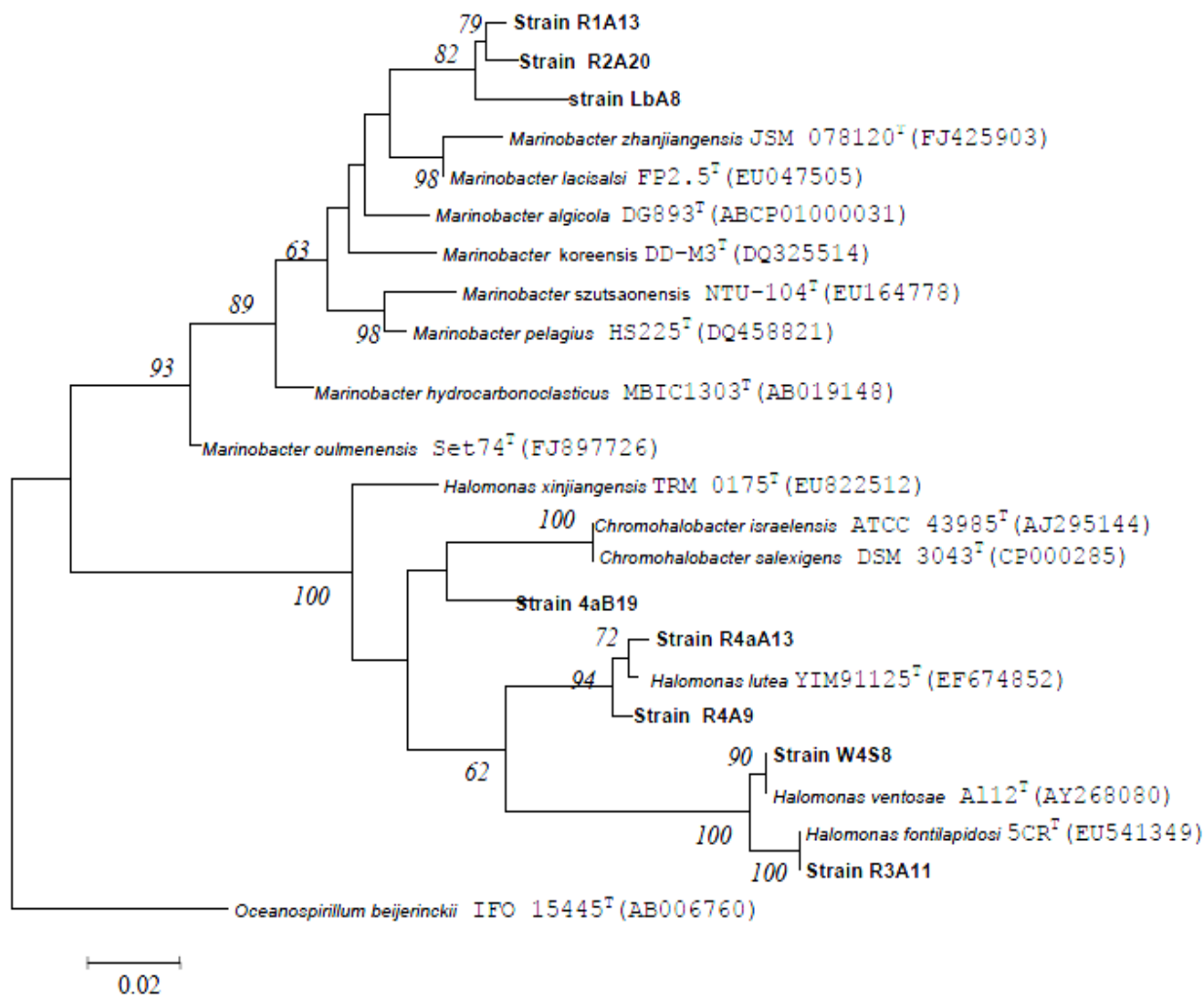
بدون انجام هیبریداسیون DNA-DNA با گونه‌های نزدیک، می‌توانند به عنوان گونه‌های جدید مطرح شوند (۲۶). در این مطالعه براساس شباهتهای فنوتیپی در میان سویه های تعیین ترادف شده، در نهایت ۲۲ سویه نمک دوست نسبی و ۳۳ سویه تحمل کننده نمک جدا گردید که در نمک دوستهای نسبی بیشترین فراوانی متعلق به جنسهای *Marinobacter* و *Halomonas* بود و عمده ترین تحمل کننده های نمک به جنسهای *Oceanobacillus*, *Dietzia*, *Bacillus* و *Kocuria* قرابت داشتند. سویه های تعیین ترادف شده از نظر سیستماتیک در ۳ رده (۴۰ درصد *Firmicutes* (۲۴ درصد) *Actinobacteria* و رده (۳۶ درصد) *γ-Proteobacteria* قرار گرفتند. اغلب سویه‌ها متعلق به رده *Firmicutes* بودند که درختهای فیلوژنی رسم شده به روش Maximum likelihood برای هر رده و محل قرار گرفتن سویه های بررسی شده در آن، در شکل‌های ۳، ۴ و ۵ نشان داده شده است (شکل‌های ۳، ۴ و ۵). تولید آنزیمهای هیدرولازی: ۵۵ سویه تعیین ترادف شده در این پژوهش، از نظر تولید آنزیمهای آمیلاز، پروتئاز، لپاز و ژلاتیناز بررسی گردیدند و با توجه به نتایج، باسیلهای گرم مثبت بیشترین سهم را در تولید انواع آنزیمهای هیدرولیتیک به ویژه ژلاتیناز و آمیلاز داشتند. توانایی ۲۵ سویه در تولید آنزیم پروتئاز قابل توجه بود. سویه های تولید کننده این آنزیم در بین باسیلهای گرم

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

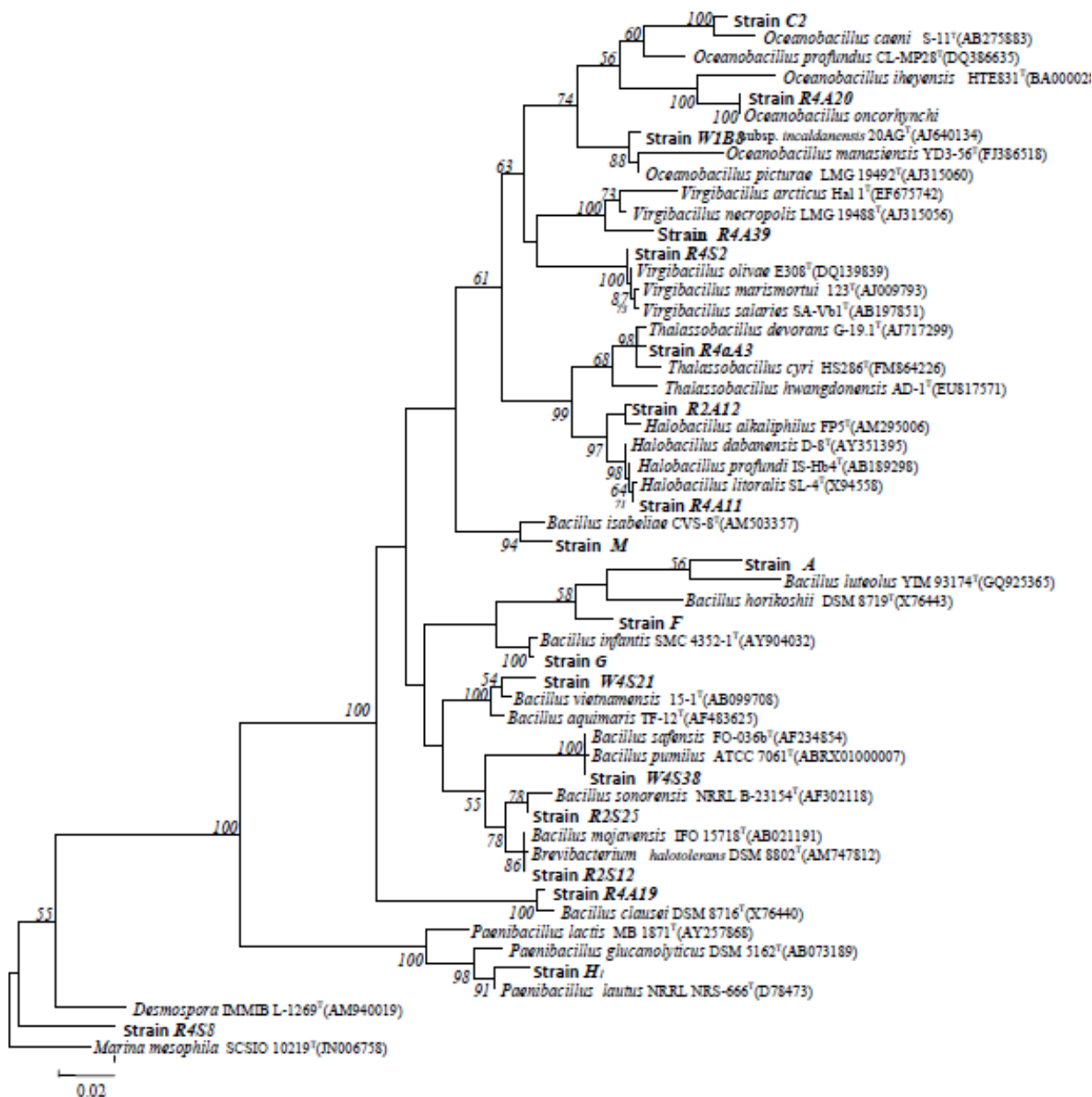
از ۵۵ سویه تعیین ترادف شده، ۱۳ سویه که متعلق به گونه های مختلف از ۵ جنس *Bacillus Virgibacillus*, *Dietzia*, *Oceanobacillus* و *Halomonas* بودند، شباهتی ۱۰۰ درصد در ترادف 16S rRNA داشتند، که آنها را از نظر ارائه به بانک میکربی به عنوان میکروارگانسیم بومی شناسایی شده حائز اهمیت می سازد. همچنین در ۱۳ سویه که متعلق به ۳ جنس *Bacillus*, *Marinobacter* و *Virgibacillus* بودند، میزان شباهت بین ۹۷-۹۸/۴ درصد بود که با انجام هیبریداسیون DNA-DNA با گونه‌های نزدیک و بررسی صفات فنوتیپی ممکن است در گونه جدیدی قرار گیرند. ۲۲ سویه شباهتی بین ۹۸/۵ تا ۹۹/۸ در تعیین ترادف داشتند. در ۷ سویه درصد شباهت کمتر از ۹۷ درصد بود که بیانگر تفاوت قابل ملاحظه ای در سطح گونه و یا در برخی حتی جنس، بین این جدایه ها و گونه‌های ثبت شده است و این جدایه ها

کنندگان آن گونه‌های مختلفی از جنس *Bacillus* بودند. کوکوس‌های گرم مثبت و باسیلهای گرم منفی شناسایی شده در این پژوهش هیچ‌کدام تولیدکننده آمیلاز نبودند. در تولید آنزیم ژلاتیناز از کوکوس‌های گرم مثبت *Kocuria* و سپس *Micrococcus* در تولید این آنزیم نقش داشتند، از باسیلهای گرم منفی *Halomonas* و از باسیلهای گرم مثبت *Halobacillus*, *Oceanobacillus* تولیدکننده ژلاتیناز بودند. مقایسه تولید آنزیم در گروه‌های مختلف باکتریهای جداشده در شکل ۶ نشان داده شده است (شکل ۶).

مثبت متعلق به جنسهای *Virgibacillus*, *Bacillus*, *Halobacillus*, *Oceanobacillus* و از بین باسیلهای گرم منفی به ۲ جنس *Marinobacter* و *Halomonas* تعلق داشتند. از کوکوس‌های گرم مثبت فقط ۲ جنس *Arthrobacter* و *Micrococcus* تولیدکننده پروتئاز بودند. در تولید آنزیم لیپاز علاوه بر سویه‌های متعلق به جنسهای *Bacillus*, *Thalassobacillus* و *Marinobacter*، کوکوس‌های گرم مثبت متعلق به جنسهای *Rhodococcus*, *Micrococcus*, *Dietzia* و *Kocuria* نقش پررنگی داشتند. یکی دیگر از مهم‌ترین آنزیمهای هیدرولیتیک تولید شده توسط این سویه‌ها آمیلاز بود که تولید



شکل ۳ - درخت فیلوژنی سویه‌های وابسته به رده *γ-Proteobacteria* به روش Maximum likelihood



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

## بحث

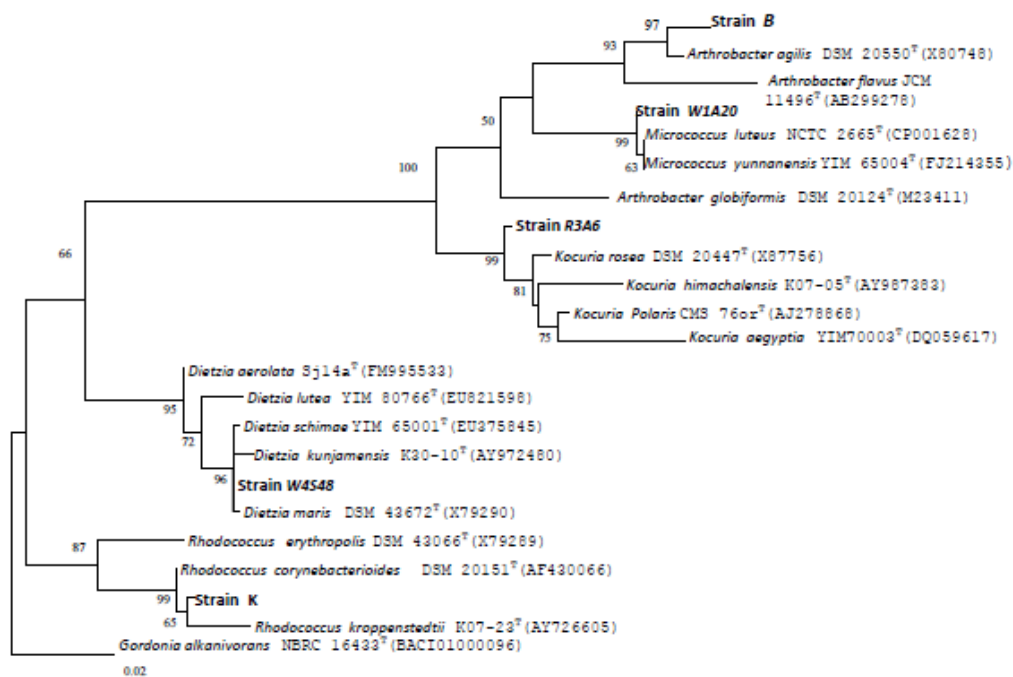
میکروبی، همچنین با توجه به اینکه، پیش از این پژوهشی بر روی میکروارگانسیم‌های غیرقابل کشت این دریاچه انجام نگرفته است، مقایسه نتایج به دست آمده از نظر بازده روشهای کشت به کار گرفته شده یا تعیین نقش گروههای میکروبی جداسازی شده در حفظ عملکرد زیست‌بوم امکان‌پذیر نخواهد بود. تنوع میکروبی مشاهده شده، باتوجه

با توجه به اینکه این پژوهش با روشهای مبتنی بر کشت انجام گرفته است، آنچه که از بررسی نتایج آن به دست می‌آید تنها در مورد گروههای قابل کشت تالاب قابل بحث خواهد بود. بر این اساس و با در نظر گرفتن سهم کوچک میکروارگانسیم‌های قابل کشت در مقایسه با جامعه

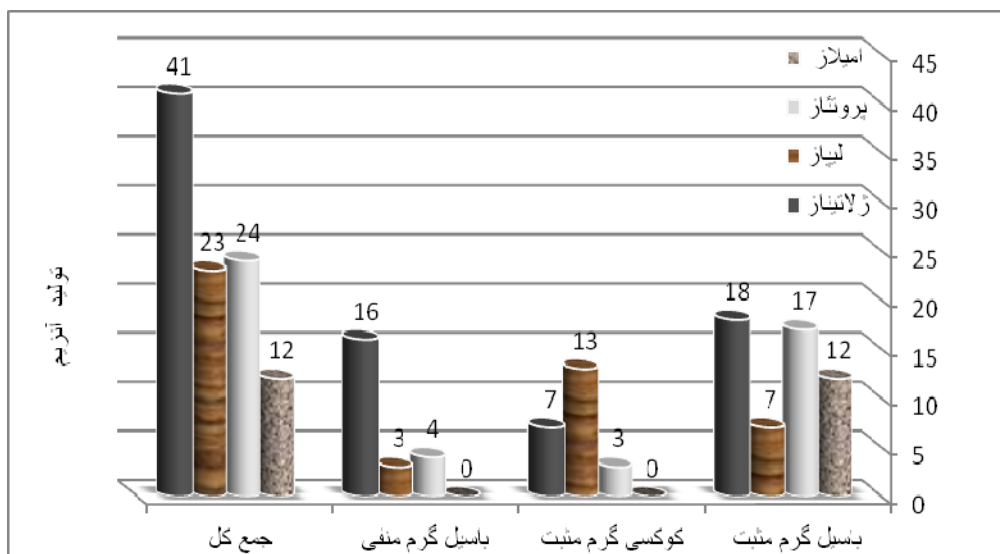


از کشت، بحث از تنوع شناسایی شده خواهد بود ولی عمومیت دادن آن به تنوع موجود و جامعه اصلی میکروبی از نظر آماری صحیح نمی‌باشد (۱۸).

به تفاوت اندازه‌های فیزیکی میکروارگانیسم‌ها با ابعاد مورد مطالعه در پژوهش‌های بوم‌شناختی، تابعی از گستردگی فضاهای مورد بررسی و تعداد نمونه‌برداری است. به همین دلیل در بررسی‌های میکروبی، حتی در روش‌های مستقل



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



شکل ۶ - نمودار تولید آنزیم‌های هیدرولیتیک

لبنیات، در انعقاد و بهبود طعم شیر و در صنعت تولید کاغذ دارای اهمیت زیادی هستند. سویه‌های تولیدکننده این آنزیم در بین باسیلهای گرم مثبت متعلق به جنسهای *Bacillus*، *Virgibacillus*، *Oceanobacillus*، *Halobacillus*، و از بین باسیلهای گرم منفی به ۲ جنس *Marinobacter* و *Halomonas* تعلق داشتند. از کوکوس‌های گرم مثبت فقط ۲ جنس *Arthrobacter* و *Micrococcus* تولیدکننده پروتئاز بودند.

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

از مهم‌ترین آنزیمهای هیدرولیتیک تولید شده توسط این سویه‌ها آمیلاز بود که تولیدکنندگان آن گونه‌های مختلفی از جنس *Bacillus* بودند و جالب است که کوکوس‌های گرم مثبت و باسیلهای گرم منفی شناسایی شده در این پژوهش هیچ کدام تولیدکننده آمیلاز نبودند. از کاربردهای این آنزیم در صنعت می‌توان به ساخت دترجنت برای حذف نشاسته، نرم کردن و حجم دادن به خمیر نان، تولید محصولات کم‌کالری، صنایع تولید کاغذ و صنایع نساجی اشاره کرد. در تولید آنزیم ژلاتیناز از کوکوس‌های گرم مثبت *Kocuria* و سپس *Micrococcus* در تولید این آنزیم نقش عمده داشتند، از باسیلهای گرم منفی *Halomonas* و از باسیلهای گرم مثبت

نتایج حاصل از این پژوهش در مقایسه با مطالعات قبلی بر روی اکوسیستمهای پرشور به ویژه، مطالعات Caton و همکارانش در سال ۲۰۰۴ بر روی Great Salt Plains اوکلاهاما (۱۱)، Ghozlan و همکارانش در مناطق پرشور کشور مصر (۱۵) و آموزگار و همکارانش بر روی دریاچه نمک آران و بیدگل (۱، ۲ و ۵) از نظر فراوانی باسیلهای گرم مثبت جدا شده مشابه بود. اما تفاوت‌های قابل ملاحظه‌ای نیز در آن مشاهده می‌شود. در این پژوهش کوکوس گرم منفی جدا نگردید و کوکوس‌های گرم مثبت همگی به رده *Actinobacteria* متعلق بودند. بیشترین تعداد جدایه‌ها متعلق به رده *Firmicutes* بودند که بیشترین قرابت ژنتیکی را به جنسهای *Bacillus*، *Oceanobacillus*، *Halobacillus*، *Virgibacillus*، *Thalassobacillus* نشان دادند. تفاوت‌های مشاهده شده را می‌توان به ویژگیهای متفاوت زیست‌گاههای مختلف نسبت داد. ویژگیهای مختلف آب و هوایی و زیستی هر منطقه و نوع بستر آن، در تعیین میزان و نوع تنوع زیستی مورد انتظار در آن تأثیرگذار خواهد بود به طوری که تنوع زیستی هر زیست‌گاه از ویژگیهای منحصر به فرد آن محسوب می‌شود. به همین دلیل هم اهمیت پژوهش بر روی محیط‌های جدید با افزایش محیط‌های دیگری که بررسی شده‌اند کاهش پیدا نمی‌کند.

از نکات قابل توجه در این پژوهش می‌توان به جداسازی سه جنس *Dietzia*، *Desmospora* و *Rhodococcus* اشاره کرد که در پژوهشهای مشابه بر روی مناطق پرشور ایران به جداسازی آنها اشاره نشده است (۲، ۴، ۵، ۶ و ۹). همان‌طور که در بخش نتایج ذکر شده، ۵۵ جدایه تعیین ترادف شده در این پژوهش، از نظر تولید ۴ آنزیم آمیلاز، پروتئاز، لیپاز و ژلاتیناز بررسی گردیدند و با توجه به نتایج، باسیلهای گرم مثبت بیشترین سهم را در تولید انواع آنزیمهای هیدرولیتیک به ویژه ژلاتیناز و آمیلاز داشتند. توانایی ۲۵ سویه در تولید آنزیم پروتئاز قابل توجه بود. پروتئازها در تولید دترجنت‌ها، در صنایع غذایی و

استخراج یدی که در سال ۱۳۸۵ در مجاورت این تالاب احداث گردیده، تنها با گذشت ۴ سال، pH تالاب حداقل ۳ درجه کاهش یافته است و در مناطق مجاور خروجی پساب به ۲/۸ نیز رسیده است. نکته قابل توجه این است که برخلاف انتظار نه تنها از این تالاب باکتری اسید دوست جدا نگردید بلکه ۲ سویه نزدیک به گونه های آلکالوفیل *Halobacillus alkaliphilus* و *Bacillus horikoshii* جدا شد و بهینه رشد برای اغلب جدایه ها در pH حدود ۸ مشاهده گردید. از سوی دیگر با استخراج نمک و بازگشت آب شیرین به تالاب تنش مضاعفی به اکوسیستم وارد شده که این مجموعه عوامل می تواند دلایل کاهش بار میکروبی این تالاب نسبت به سایر مناطق پرشور بررسی شده، باشند. طبیعی است بسیاری از تالابها در حال تغییر شکل هستند و به مرور زمان از بین می روند و نیازی نیست بشر تسریع کننده این وضعیت باشد.

#### تشکر و قدر دانی:

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

*Oceanobacillus, Halobacillus* تولید کننده ژلاتیناز بودند.

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

از دیگر نکات حائز اهمیت در مورد اکوسیستم این تالاب تغییرات pH آب این تالاب است. در پژوهشی که سالها قبل توسط بهروزی راد و همکاران بر روی این تالاب انجام گرفته، pH آن حدود ۸ گزارش گردیده است (۳) اما به دلیل ورود پساب مملو از اسید سولفوریک کارخانه

#### منابع

- ۱- بابولیان، حمید. (۱۳۸۶) تنوع زیستی باکتریهای نمک دوست نسبی تولید کننده آنزیمهای هیدرولیتیک دریاچه نمک آران و بیدگل، پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم، ایران
  - ۲- باقری، مریم. (۱۳۸۸) بررسی تنوع باکتریهای نمک دوست نسبی هتروتروف، هوازی و قابل کشت در دریاچه آران و بیدگل، پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه تهران، ایران
  - ۳- بهروزی راد، بهروز. (۱۳۸۷) تالابهای ایران. انتشارات سازمان جغرافیایی نیروهای مسلح، تهران
  - ۴- جاوید، حسین. (۱۳۸۳) جداسازی میکروارگانیسم های هالوفیل و هالو تولرنت از دریاچه بختگان و اثر فاکتورهای فیزیکی - شیمیایی بر فراوانی آنها. پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی واحد جهرم، ایران
  - ۵- دیدری خمسه مطلق، مریم. (۱۳۸۸) بررسی تنوع زیستی باکتریهای تحمل کننده نمک هتروتروف، هوازی و قابل کشت در
- دریاچه آران و بیدگل، پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه تهران، ایران
- ۶- رهبان، رخساره. (۱۳۸۷) بررسی تنوع زیستی باکتری های نمک دوست تولید کننده آنزیمهای هیدرولیتیک ساکن در دریاچه حوض سلطان، پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران
- ۷- زهرایی، شیرین. (۱۳۸۶) تنوع میکروارگانیسم های نمک دوست تولید کننده آنزیمهای خارج سلولی در دریاچه ارومیه. پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه تهران، ایران
- ۸- متشرعی، زینب السادات. (۱۳۸۶) اثر اکسی آنیون های مختلف بر مقاومت به تلوریت در باکتریهای نمک دوست و غیر نمک دوست، پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه تهران، ایران
- ۹- مهرشاد، ملیحه. (۱۳۹۰) مطالعه تنوع باکتریهای نمک دوست نسبی و تحمل کننده نمک هتروتروف هوازی سواحل غربی

پایان‌نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه تهران، ایران

- 10- Amoozegar, M. Ghasemi, A. Razavi, M. Naddaf, S. (2007) Evaluation of hexavalent chromium reduction by chromate-resistant moderately halophile, *Nesterenkonia* sp. strain MF2
- 11- Caton, T. (2004) Halotolerant aerobic heterotrophic bacteria from the Great Salt Plains of Oklahoma. *Microbial Ecology*.48:449-462.
- 12-Cowan.D.A. (1991), *Industrial enzymes in Biotechnology business.*, Moses.V. and Cape.R.E. Harwood academic publishers.311-341
- 13-Felsenstein, J.(1993). PHYLIP (phylogenetic inference package), version3.5c. Department of Genetics, University of Washington, Seattle, WA, USA.
- 14-Gerhardt, P., Murray, R.,Wood ,W., and Krieg, N. (1994) Phenotypic characterization Methods for General and Molecular Bacteriology. 607–654.
- 15-Ghozlan, H., Deif, H., Abu Kandil, R. and Sabry, S. (2006). Biodiversity of moderately halophilic bacteria in hypersaline habitats in Egypt. *The Journal of General and Applied Microbiology*.52: 63-72.
- 16-Grant, W., Kamekura, M.,McGenity, T.and Ventosa, A. (2001) Class III. Halobacteria class. nov, *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*.294–301.
- 17-Horner, D. and Pesole, G. (2003) The estimation of relative site variability among aligned homologous protein sequences, *Oxford Univ Press*. 600- 606.
- 18-Hughes, J., et al.,(2001) *Counting the uncountable: statistical approaches to estimating microbial diversity*. *Am Soc Microbiol*. 4399-4406
- 19-Kolmodin, L., and Williams, J. (1997) PCR. Basic principles and routine practice, *Methods in molecular biology* (Clifton, NJ)
- 20-Marmur, J. (1961). A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from micro-organisms. *J Molec Biol* 3 .208-218.
- 21-Murray, R. G. E., Doetsch, R. N. & Robinow, C. F. (1994).Determinative and cytological light microscopy. In *Methods for General and Molecular Bacteriology*.21–41. Edited by P. Gerhardt,R. G. E. Murray, W. A. Wood & N. R. Krieg. Washington, DC:American Society for Microbiology.
- 22-Rodriguez-Valera, F. (2003) Characteristics and microbial ecology of hypersaline environments. *Halophilic bacteria*, 1: 3–30.
- 23-Sanchez-Porro, C., Martin, S., Mellado, E., Ventosa, A.,( 2003) Diversity of moderately halophilic bacteria producing extracellular hydrolytic enzymes, *Applied microbiology*. 94:295-300.
- 24-Smibert, R. M. & Krieg, N. R.(1994). Phenotypic characterization. In *Methods for General and Molecular Bacteriology*. 607–654. Edited by P. Gerhardt, R. G. E. Murray, W. A. Wood & N. R. Krieg.
- 25-Spencer, J., A. de Spencer, and A. de Spencer Alicia, ( 2004) *Environmental microbiology: methods and protocols: Humana Press Inc., US*.
- 26-Stackebrandt, E. and J. Ebers, ( 2006 )Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards. *Microbiology today*. 33:152.
- 27-Tamura, K., J. Dudley, et al. (2007). "MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0." *Molecular biology and volution*.24:1596
- 28-Woese et al., 1998., *Prokaryotes :an overview with respect to biodiversity and environmental importance*, *Biodiversity and conservation*.227-236
- 29-Yeon, S. H., W. J. Jeong, et al. (2005). "The diversity of culturable organotrophic bacteria from local solar salterns." *J. Microbiol* .43:1-10.

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

Zarparvar P.<sup>1</sup>; Amoozegar M.A.<sup>2,\*</sup> and Fallahian M.R.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Biology Dept., Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, I.R. of Iran

<sup>2</sup> Extremophiles Laboratory, Microbiology Dept., School of Biology and Center of excellence in Phylogeny of Living Organisms, College of Science, University of Tehran, Tehran, I.R. of Iran

<sup>3</sup> Biology Dept., North Branch, Islamic Azad University, Tehran, I.R. of Iran

### Abstract

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

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