معرفی سویه های جدیدی از باکتری نمک دوست *Salinivibrio* sp. از دریاچهٔ ارومیه

عباس اخوان سپهی [۲و۱*]، شبنم ایران نژاد [۲و۱]، محمد علی آموزگار [۳و۲] و امیر توکمه چی [۴]

[۱] تهران، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، دانشکده علوم زیستی، گروه میکروبیولوژی

[۲] تهران، مرکز ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران

[۳] تهران، دانشگاه تهران، پردیس علوم، دانشکده زیست شناسی، گروه میکروبیولوژی، آزمایشگاه اکستریموفیلها

[۴] ارومیه، دانشگاه ارومیه، پژوهشکده آرتمیا و جانوران آبزی، گروه پاتوبیولوژی و کنترل کیفی

تاریخ دریافت: ۹۱/۶/۲ تاریخ پذیرش: ۹۲/۵/۳۱

چکیده

در این پژوهش برای اولین بار شناسایی میکروارگانیسم نمک دوست نسبی جنس *Salinivibrio* از دریاچهٔ شور ارومیه مورد مطالعه قرار گرفت که منجر به شناسایی سویه های جدیدی از این جنس گردید. دریاچهٔ ارومیه دریاچهٔ پرشوری است که در شمال غربی ایران واقع شده و شورترین دریاچهٔ دائمی ایران و از معدود دریاچه های فوق اشباع دائمی در جهان می باشد. ابتدا نمونه ها از مناطق مختلف دریاچه، جمع آوری و در شرایط استریل به آزمایشگاه منتقل شدند. بعد از غنی سازی و کشت نمونه ها در شرایط تعریف شده، برای دستیابی به کلنیهای خالص کشتهای متوالی انجام گرفت. سپس سویه های منتخب از نظر ویژگیهای فنوتیپی و فیلوژنتیکی (به وسیله تکنیک توالی یابی 16S rRNA) مورد مطالعه قرار گرفتند. از بین کل سویه های متعلق به *Salinivibrio* sp. ، ۵۷ و ۴۳ درصد سویه ها نزدیکترین تشابه را به ترتیب به *S. costicola* subsp. *alcaliphilus* و *S. sharmensis* نشان دادند. این پژوهش، سعی در ارائه ذخایر ژنتیکی جدید از منابع عظیم میکروبی دریاچهٔ ارومیه به خصوص انواع *Salinivibrio* دارد که پایه کاربردهای وسیعی در دانش بیوتکنولوژی می باشند.

واژه های کلیدی: شناسایی، باکتری نمک دوست، *Salinivibrio* sp. ، دریاچهٔ ارومیه

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۲۱۵۴۷۱۶۶، پست الکترونیکی: akhavansepahy@gmail.com

مقدمه

دریاچهٔ ارومیه از نظر زیست محیطی، یکی از جالب ترین محیطهای زیست در جهان است. در آب دریاچهٔ یونهای کلرید Cl^- ، سولفات SO_4^{2-} ، بیکربنات HCO_3^- به عنوان آنیون و سدیم Na^+ ، منیزیم Mg^{2+} ، پتاسیم K^+ ، کلسیم Ca^{2+} به عنوان کاتیون بیشترین فراوانی را در بین سایر یونها دارند. دریاچهٔ ارومیه شورترین دریاچهٔ داخلی ایران و بعد از دریاچه بحرالمیت (Dead Sea) شورترین دریاچه جهان محسوب می شود و به علت وجود غلظتهای بالای املاح گوناگون، دارای چگالی بالاست (۳ و ۴).

دریاچهٔ ارومیه از نوع محیطهای پر شور Thalassohalin می باشد که ترکیبات شوری این محیطها مشابه آب دریا بوده و یونهای غالب در آنها سدیم و کلرید می باشند (شکل ۱). این محیطها نتیجه تبخیر آب دریا بوده وpH تقریباً خنثی تا اندکی قلیایی دارند. مهم ترین محیطهای پر شور از این نوع، دریاچهٔ Great Salt Lake در ایالات متحده آمریکا می باشد (۹، ۱۰، ۱۸ و ۱۹).

هالوفیلها (نمک دوستها) ارگانیسمهایی هستند که قابلیت زنده ماندن در محیطهای شور را دارند. آنها شرایط سخت شوری را تحمل می کنند و ظرفیت تنظیم فشار اسمزی را

دارند. در نتیجه در برابر اثرات تخریبی نمک در محیطشان مقاومت می کنند (۱۰).

شکل ۱ – دریاچهٔ ارومیه

ارگانیسمهای هالوفیل در هر سه قلمروی حیات: آرکیها، باکتریها و یوکاریوتها وجود دارند. قلمرو باکتریها انواع زیادی از میکروارگانیسمهای نمک دوست (هالوفیل) و تحمل پذیر نمک (هالوتولرنت) – که به صورت شمار زیادی از گروههای فیلوژنتیک گسترده شده است – را شامل می شود (۱۷ و ۲۸).

تنوع بیولوژیکی یک موضوع کلیدی برای حفاظت طبیعی به شمار می رود (۲۱).

باکتریهای نمک دوست نسبی، که بیشتر آنها اعضای جنسهای *Salinivibrio* ، *Halomonas* و *Chromohalobacter* هستند، در محیط کشت حاوی ۱۵–۳ درصد نمک، رشد بهینه از خود نشان می دهند. این باکتریها به دلیل داشتن ویژگیهایی مانند رشد سریع، نیاز غذایی کم و توانایی استفاده از ماکرومولکولهای گوناگون به عنوان تنها منبع دریافت انرژی و عدم ایجاد آلودگی در محیط زیست، برای استفاده در فرآیند های صنعتی مطلوب هستند (۱۶ و ۲۴).

S. costicola قبلاً به عنوان *Vibrio costicola* طبقه بندی شده بود. اولین بار توسط Smith در سال ۱۹۸۰ کشف شد و سپس شامل ویرایشهای Bergey's Manual و Approved Lists of Bacterial Names قرار گرفت (۲۵).

در سال۱۹۸۷، Garcia و همکاران توصیف *V.costicola* را تصحیح کردند (۱۲). سرانجام در سال ۲۰۰۰، Huang و همکاران *S. costicola* subsp. *vallismortis* را شرح داده و توصیف *S. costicola* را مجدداً اصلاح کردند. جنس *Salinivibrio* شامل باکتریهای هالوفیل نسبی متعلق به خانواده *Vibrionaceae* از *Gamma-proteobacteria* می باشد. *S.costicola* به عنوان نماینده ای برای مطالعات باکتریهای هالوفیل نسبی مطرح شده و در بررسی مکانیسمهای فیزیولوژیکی و تنظیم اسمزی در هالوفیلهای نسبی مورد استفاده قرار گرفته است (۱۴ و ۲۰).

دلیل منحصر به فرد بودن *V.costicola*، احتیاج و تحمل گسترده آن برای NaCl می باشد (۱۱ و ۱۲).

پروتئاز های هالوفیلیک که گروه مهمی از آنزیمها هستند، از گونه های مختلف باکتریایی از جمله *salinivibrio* sp. جداسازی و شناسایی شده اند. (۷).

همچنین سلولازهای هالوفیل و هالوتولرنت از *salinivibrio* sp. مورد شناسایی واقع شده اند (۲۹).

باکتریوسینها و هالوسینها با عملکرد ضد باکتریاییشان، بیوسورفکتانت در اصلاح زیستی، اگزو پلی ساکارید ها در افزایش بازیافت میکروبی نفت، لیپوزوم ها در صنایع آرایشی و دارویی، پلی هیدروکسی آلکانوات ها (PHA) (ترکیبات ذخیره شده باکتریایی) در تولید بیوپلاستیکها، افزودنیها و رنگ دهنده های خوراکی در صنایع غذایی، انتقال خاصیت تحمل پذیری نمک از میکروارگانیسمهای نمک دوست به محصولات با ارزش کشاورزی و ... نمونه هایی از کاربردهای وسیع هالوفیلها به شمار می روند. همچنین میکروارگانیسمهای هالوفیل به عنوان تولید کننده های آنزیمهایی مثل آمیلاز، نوکلئاز، سلولاز، گزیلاناز، لیپاز

و پروتئاز و ... دارای کاربردهای بالقوه ای در زیست فناوری هستند (۱۵ و ۱۶).

از این رو مطالعه اکوسیستمهای شور می تواند گامی در جهت بررسی تنوع زیستی انواع ارگانیسمهای نمک دوست و شناخت پتانسیلهای آنها باشد. در پژوهش حاضر، گوشه ای از تنوع زیستی دریاچهٔ ارومیه به عنوان دومین دریاچهٔ شور دنیا، مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روشها

نمونه برداری: در اوایل اردیبهشت ماه ۱۳۹۰ با شروع بارشهای بهاری، نمونه گیری از مناطق مختلف دریاچه در دو نوبت صورت گرفت. نمونه ها توسط شیشه های استریل درب دار و از عمق ۳۰ تا ۵۰ سانتیمتری آب دریاچهٔ ارومیه جمع آوری و در شرایط استریل به آزمایشگاه منتقل شدند. همچنین در کنار نمونه گیری از آب هر منطقه، نمونه های نمک آن منطقه هم جمع آوری شد. سایر مشخصات نمونه ها از جمله دما، pH ، شوری و مشخصات جغرافیایی نقاط مربوطه در جدول ۱ آورده شده است.

جدول ۱ – مشخصات محلهای نمونه گیری

نمونه	محل نمونه گیری	طول و عرض جغرافیایی	زمان	دما (°C)	pH	شوری کل
۱	کاظم داشی	۳۸S ۰۵۱۶۹۱۴ ۴۲۱۲۳۵۰	۹:۵۵′	۱۴	۷,۲۰	٪۳۴
۲	باری	۳۸S ۰۵۰۸۱۹۳ ۴۲۰۵۹۱۵	۱۱:۱۰′	۱۶	۶,۹۰	٪۳۳
۳	پل شهید کلانتری ضلع غربی ، سمت جنوب	۳۸S ۰۵۲۷۷۷۶ ۴۱۸۰۰۹۱	۱۲:۳۰′	۱۶	۷,۳۷	٪۲۴
۴	پل شهید کلانتری ضلع شرقی ، سمت شمال	۳۸S ۰۵۳۰۹۵۲ ۴۱۸۱۹۴۰	۱۳:۰۰′	۱۶	۶,۶۵	٪۳۶
۵	سواحل گلمانخانه	۳۸S ۰۵۲۴۴۲۲ ۴۱۶۰۸۵۸	۱۳:۴۰′	۱۶	۶,۳۵	٪۳۳
۶	جزیره آرزو	۳۸S ۰۵۵۴۴۰۳ ۴۱۵۵۶۶۶	۸:۵۸′	۹	۷,۱۱	٪۳۴
۷	جزیره اسپیر	۳۸S ۰۵۴۹۵۷۹ ۴۱۵۵۰۴۶	۹:۱۵′	۱۳	۷,۱۴	٪۳۲
۸	تپه میانی	۳۸S ۰۵۴۰۷۱۲ ۴۱۵۴۰۱۱	۹:۲۸′	۱۳	۷,۱۱	٪۳۴
۹	وسط دریاچه	۳۸S ۰۵۳۴۳۰۳ ۴۱۵۷۴۳۵	۹:۵۶′	۱۳	۷,۱۳	٪۳۴
۱۰	گلمانخانه	۳۸S ۰۵۲۳۱۹۰ ۴۱۶۲۰۵۶	۱۰:۴۵′	۱۱	۷,۲۷	٪۳۰

غنی سازی: برای افزایش حضور باکتری، لازم بود نمونه ها غنی سازی شوند. از این رو نمونه ها در محیطهای عمومی و اختصاصی غنی سازی شدند.

الف: غنی سازی در محیط نوترینت براث بر اساس روش پیشنهادی Amoozegar et al., 2008 (۸) انجام گرفت. با این تفاوت که این روش به دو شکل صورت گرفت:

۱- افزودن نمونه ها بدون سانتریفیوژ کردن و انتقال نمونه های شوراب به طور مستقیم به محیط نوترینت براث.

۲- افزودن نمونه ها بعد از سانتریفیوژ کردن با دور ۳۰۰۰ و به مدت ۵ دقیقه به محیط نوترینت براث.

هر دو سری نمونه ها به محیط نوترینت براث با غلظت ۵ درصد نمک و pH= ۷,۲-۷,۴ منتقل و در انکوباتور شیکردار به مدت ۷۲-۴۸ ساعت، با r.p.m ۱۵۰ و در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد گرماگذاری شدند. در نتیجه رشد باکتریها در محیط نوترینت براث، کدورت ایجاد شد.

ب: برای جداسازی باکتری ویبریو، لازم بود نمونه ها در یک محیط اختصاصی ویبریو غنی سازی شوند.

غنی سازی در این محیط بر اساس روش پیشنهادی احمد هلاکو و همکارانش (۶) انجام گرفت. برای این منظور، ۱۰ میلی لیتر از هر نمونه با دور ۳۰۰۰ دور در دقیقه و به مدت ۵ دقیقه، سانتریفیوژ شد. سپس ۱ میلی لیتر از نمونه ته لوله در ۹ میلی لیتر محیط Alkaline Peptone Water، با دو غلظت مختلف ۵ و ۱۰ درصد، ریخته و به مدت ۴۸-۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد گرماگذاری شد و در نتیجه رشد باکتریها، کدورت ایجاد گردید.

کشت: پس از انجام غنی سازی، توسط لوپ از ۱ سانتیمتری قسمت بالایی محیط (بر اساس روش پیشنهادی کشت در Laboratory Procedure – Health products and food branch) (۱۳) برداشته شده و بر روی محیط آگاردار MacConkey Agar و Nutrient Agar (با غلظت ۵ و ۱۰ درصد) و pH=۸ منتقل گردید. کشت به صورت ۴ خطی انجام گرفت و پلیتهای فوق در دمای ۳۷-۳۵ درجه سانتی گراد گرماگذاری شدند. بعد از ۴۸-۲۴ ساعت شاهد رشد کلنیها بوده و برای دستیابی به کلنیهای خالص، کشتهای متوالی انجام شد.

بررسی مورفولوژیک: ابتدا از هر کدام از کلنیها لام تهیه شد. لامهای تهیه شده به روش رنگ آمیزی گرم، رنگ آمیزی گردید و در زیر میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرار گرفت. سپس نتایج توسط تست KOH تأیید شد. برای بررسی حرکت باکتری، از هر کدام از کلنیها لام مرطوب تهیه شده و در زیر میکروسکوپ با بزرگنمایی 40^{x} بررسی گردید.

تستهای تشخیصی و بیوشیمیایی: برای این منظور از محیطهای معمول برای تستهای بیوشیمیایی و نیز محیطهای اختصاصی ویبریو برای افتراق این باکتری استفاده شد. لازم به توضیح است تمامی تستها در محیطهایی همراه با درصدهای نمک مربوطه انجام گرفت. همان گونه که اشاره شد، ویبرو باکتری گرم منفی و متحرکی است که مهم ترین تستهای تشخیصی آن، رنگ آمیزی گرم و مورفولوژی آن در بررسیهای میکروسکوپی و نیز تستهای اکسیداز، کاتالاز و OF می باشند. سایر تستهای بیوشیمیایی نیز انجام گرفته و نتایج در جدول ۲ درج شدند.

شناسایی مولکولی: برای تکمیل کار پژوهشی و تشخیص دقیق کلنیهای جدا شده، استخراج DNA از نمونه ها، PCR و آزمون ژنتیکی توالی یابی 16S rRNA انجام گرفت. برای این منظور از بین ۸۰ سویه مورد مطالعه، سویه های نزدیک تر و مشکوک تر به ویبریو، بر اساس مقایسه با تستهای مرجع و نیز با توجه به تستهای اکسیداز، کاتالاز، OF (GLU)، تست حرکت و همچنین بررسی خواص مورفولوژی کلنیهای موجود از نظر شکل و رنگ و بو، تعداد ۱۵ سویه برای انجام تکنیک PCR ، انتخاب شدند.

برای استخراج DNA ژنومی سویه های جدا شده، از کیت استخراج باکتری گرم منفی IBRC (مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران-Gram negative bacteria mini prep genomic DNA extraction kit، نسخه سپتامبر ۲۰۱۱) استفاده شد و بر اساس دستور کار مربوطه ژنوم

نمونه ها استخراج گردید. سپس با انجام الکتروفورز نمونه های منتخب بررسی شده و استخراج DNA آنها مورد تأیید قرار گرفت. به منظور تکثیر ژنوم استخراج شده، با استفاده از دو پرایمر: 27F با توالی نوکلئوتیدی: 5′-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3′ و 1492R با توالی نوکلئوتیدی: 5′-GGTTACCTTGTTACGACTT-3′، تکنیک PCR در ۳۰ دور و با برنامه زیر انجام شد: واسرشتی اولیه: ۹۴ درجه سانتی گراد و به مدت ۳ دقیقه، واسرشتی: ۹۴ درجه سانتی گراد و به مدت ۱ دقیقه، اتصال: ۵۸–۵۷ درجه سانتی گراد و به مدت ۱ دقیقه، گسترش: ۷۲ درجه سانتی گراد و به مدت ۱/۵ دقیقه، گسترش نهایی: ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه، دمای نگهداری: ۲۵ درجه سانتی گراد و به مدت ۱۰ ثانیه.

برای اطمینان از تکثیر درست و مناسب ژن 16S rRNA سویه های منتخب، با انجام الکتروفورز نتایج بررسی شد. برای تعیین توالی 16S rRNA نتایج حاصل از PCR به کشور کره جنوبی فرستاده شد. سپس نتایج حاصل از تعیین توالی با استفاده از برنامه .Chromas Pro ویرایش شد و در پایگاه اطلاعاتی EzTaxon، تشابه توالیهای حاصل با توالی سویه های ثبت شده در Gen Bank مورد مقایسه قرار گرفته و درصد تشابه آنها با انواع شناخته شده تعیین و در جدول ۳ ثبت شد.

پس از هم راستا کردن ترادفها با برنامه ClustalX، درخت فیلوژنیکی سویه ها با استفاده از نرم افزار MEGA5 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) به روش Neighbour-joining رسم گردید.

نتایج

پس از رشد کلنیها، مورفولوژی هر یک مورد بررسی قرار گرفت و از هر کدام از آنها لام تهیه شد. در روش رنگ آمیزی گرم نیز به وضوح، باکتریهای گرم منفی قرمز رنگ، بدون اسپور و میله ای شکل کوتاه و خمیده مشاهده گردید. در نتایج حاصل از تست KOH نیز در تمامی نمونه ها، حالت چسبناکی مشاهده و گرم منفی بودن تمامی نمونه ها تأیید شد. طبق بررسیهای انجام گرفته توسط لام مرطوب، حرکت تند باکتری ویبریو به وضوح قابل مشاهده بود. همچنین ظهور رنگ بنفش تیره در دیسکهای اکسیداز و نیز آزاد شدن حبابهای گاز اکسیژن در حضور هیدروژن پراکسید ۳ درصد، نشانه اکسیداز و کاتالاز مثبت بودن نمونه ها بود. اسیدی شدن محیط OF و ظهور رنگ زرد در هر دو محیط OF (فاقد پارافین: هوازی – دارای پارافین: بی هوازی) به صورت OF مثبت گزارش شد. سایر تستها نیز انجام شد و مشخصات مورفولوژیک، تستهای تشخیصی و بیوشیمیایی سویه های شناسایی شده در جدول ۲ ثبت گردید.

جدول ۲ – مشخصات مورفولوژیک، تستهای تشخیصی و بیوشیمیایی

		URM 17	URM B	URM I
محیط کشت	سانتریفیوژ نمونه محیط غنی سازی محیط کشت جامد نمک محیط کشتها	Centrifuge APW Mac A 5%	Centrifuge APW Mac A 10%	Centrifuge NB NA 5%
رنگ کلنی		صورتی	صورتی تیره	کرمی
شکل کلنی		ریز ، گرد ، محدب ، گوشه های صاف	گرد ، محدب ، گوشه های صاف	ریز ، گرد ، محدب ، گوشه ها صاف ،کدر
شکل سلول		باسیل کوتاه خمیده	باسیل کوتاه خمیده	باسیل کوتاه خمیده

رنگ آمیزی گرم	منفی	منفی	منفی
KOH	+	+	+
حرکت	+	+	+
اکسیداز	+	+	+
کاتالاز	+	+	+
O / F	+/−	+/−	+/−
S / I / M	−/−/+	−/−/+	−/−/+
Urease	−	−	ضعیف
Nitrate	+	+	+
Simmons' Citrate	−	−	−
TSI	A/A	K/A	A/A
MR	−	−	+
VP	−	−	−
Gelatin	+	+	+
Aesculin	+	+	+
Lysine decarboxylase	−	−	−
Ornithine decarboxylase	−	−	−
Aarginine dihydrolase	−	−	−

NB :Nutrient Broth; NA :Nutrient Agar; APW :Alkaline Peptone Water; Mac A:MacConkey Agar

بر اساس توالی ژن 16S rRNA به دست آمده و آنالیز نتایج در پایگاه اطلاعاتی EzTaxon، تشابه سویه های منتخب با انواع شناخته شده مقایسه گردید و درصد تشابه آنها مشخص شد. از میان کل سویه های تعیین توالی شده، ۴۶,۷ درصد سویه ها متعلق به جنس *Salinivibrio* بود.

حدود ۵۷ درصد از سویه های جداسازی و شناسایی شده از جنس *Salinivibrio*، قرابت نزدیکی در گونه *Salinivibrio costicola* زیرگونه *alcaliphilus* و حدود ۴۳ درصد از این سویه ها، بیشترین شباهت را به گونه *Salinivibrio sharmensis* داشتند.

در میان کل سویه های شناسایی شده *Salinivibrio* در این پژوهش، سویه های URM B ، URM I و URM 17 تشابه بیش از ۹۹ درصد با *Salinivibrio costicola* subsp. *alcaliphilus* را داشتند. در حالی که سویه URM 7 درصد تشابه کمتر از ۹۷ درصد (۹۵/۸ درصد) را با *Salinivibrio costicola* subsp. *alcaliphilus* نشان داد که بیانگر تفاوت قابل ملاحظه ای در سطح گونه و یا حتی جنس بین این

سویه ها و سویه های ثبت شده در بانک ژن می باشد که بدون انجام هیبریداسیون DNA-DNA، می توانند در گونه جدیدی قرار بگیرند.

سویه های URM 9 و URM 15 با بیش از ۹۹ درصد تشابه و سویه URM 14 با تشابه ۹۲ درصد متعلق به *Salinivibrio sharmensis* بودند. نتایج حاصل از مقایسه میزان شباهت ژن 16S rRNA سویه های مورد مطالعه با سویه های استاندارد ثبت شده در پایگاه EzTaxon در جدول ۳ نشان داده شده است.

جدول ۳ – مقایسه میزان شباهت ژن 16S rRNA سویه های مورد مطالعه با سویه های استاندارد

سویه مورد مطالعه	سویه استاندارد ثبت شده در بانک ژن	درصد تشابه
URM 7	*Salinivibrio costicola* subsp. *alcaliphilus* DSM 16359(T)	۹۵,۸
	Salinivibrio sharmensis BAG(T)	۹۵,۶
	Salinivibrio costicola subsp. *costicola* NCIMB 701(T)	۹۵,۳
URM 9	*Salinivibrio sharmensis* BAG(T)	۹۹,۳
	Salinivibrio siamensis ND1-1(T)	۹۸,۶
	Salinivibrio proteolyticus AF-2004(T)	۹۸
URM 14	*Salinivibrio sharmensis* BAG(T)	۹۲,۱
	Salinivibrio costicola subsp. *alcaliphilus* DSM 16359(T)	۹۲
	Salinivibrio costicola subsp. *costicola* NCIMB 701(T)	۹۱,۴
URM 15	*Salinivibrio sharmensis* BAG(T)	۹۹,۱
	Salinivibrio costicola subsp. *alcaliphilus* DSM 16359(T)	۹۷,۹
	Salinivibrio siamensis ND1-1(T)	۹۷,۸
URM 17	*Salinivibrio costicola* subsp. *alcaliphilus* DSM 16359(T)	۹۹,۳
	Salinivibrio costicola subsp. *costicola* NCIMB 701(T)	۹۸,۵
	Salinivibrio costicola subsp. *vallismortis* DSM 8285(T)	۹۷,۳
URM B	*Salinivibrio costicola* subsp. *alcaliphilus* DSM 16359(T)	۹۹,۳
	Salinivibrio costicola subsp. *costicola* NCIMB 701(T)	۹۸,۶
	Salinivibrio costicola subsp. *vallismortis* DSM 8285(T)	۹۷,۴
URM I	*Salinivibrio costicola* subsp. *alcaliphilus* DSM 16359(T)	۹۹,۷
	Salinivibrio costicola subsp. *costicola* NCIMB 701(T)	۹۸,۹
	Salinivibrio sharmensis BAG(T)	۹۷,۸

درخت فیلوژنتیکی که نشان دهنده قرابت سویه های شناسایی شده با دیگر *Salinivibrio* sp. بر اساس توالی 16S rRNA می باشد، در شکل ۲ درج گردیده و سویه *Halomonas alkaliphila* 18bAGT(AJ640133) به عنوان outgroup انتخاب شده است.

بحث

همانگونه که اشاره شد، باکتریهای نمک دوست نسبی از جنس *Salinivibrio* به دلیل دارا بودن ویژگیهای خاص، اهمیت زیادی در فرآیندهای صنعتی و زیست فناوری دارند (۱۶ و ۲۴).

زیستگاه باکتریهالوفیل نسبی *Salinivibrio costicola* غذاهای نمک سود شده و شورابها معرفی شده است (۲۰).

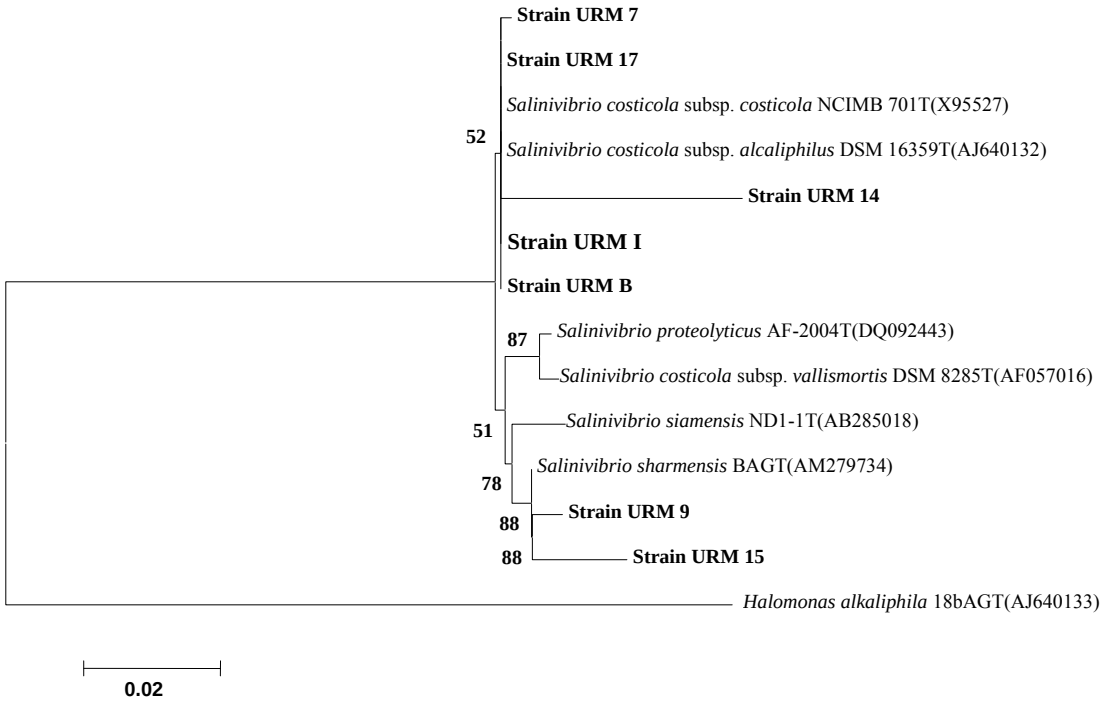
بیشترین جدایه های محیطی که قادر به تولید آنزیمهای هیدرولیتیکی هستند به دو جنس گرم منفی *Salinivibrio* و *Halomonas* تعلق دارند که به طور وسیعی در محیطهای پرشور توزیع شده اند (۲۶ و ۲۷).

انواع گونه های *Salinivibrio* در مطالعات انجام گرفته پیشین، از مناطق مختلف دنیا گزارش شده اند. *Salinivibrio costicola* subsp. *vallismortis* در بررسی انجام شده بر روی تالاب Death Valley در کالیفرنیا با

بهینه رشد در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و pH= ۷/۳ و ۲/۵ NaCl درصد جداسازی شد (۱۴).

آموزگار و همکارانش نیز *Salinivibrio proteolyticus* sp. را از دریاچهٔ بختگان با غلظت ۱۷ درصد از نمک کل جدا کردند (۸).

از این رو جداسازی اعضایی از این باکتری نمک دوست از دریاچهٔ پرشور ارومیه نیز بعید به نظر نمی رسید که پژوهش حاضر منجر به جداسازی و شناسایی *S. costicola* subsp. *alcaliphilus* و*Slinivibrio sharmensis* از این دریاچه شد.



شکل ۲- درخت فیلوژنتیکی سویه های شناسایی شده با استفاده از روش Neighbour-joining و ضریب Boot Strap صد

عدم رشد بی هوازی *S. costicola* subsp. *alcaliphilus* این زیرگونه را از سایر گونه های این جنس متمایز می کند. این زیرگونه نه تنها یک هالوفیل است بلکه به عنوان یک هالوآلکالیفیل شناخته شده است که توسط Romano و همکارانش از منطقه Campania در ایتالیا شناسایی شده است که در محدوده نمکی (w/v) NaCl ۲۵- ۲ درصد رشد داشته است (۲۲).

سویه های جداسازی شده در مطالعه حاضر که با این زیر گونه قرابت داشتند در محیط کشت دارای ۵ و ۱۰ درصد نمک (نمک دریاچه) رشد داشته اند.

همچنین محدوده دمایی بین ۴۵-۱۰ درجه سانتی گراد و۱۰- ۶ =pH نیز با شرایط جداسازی این زیرگونه در این تحقیق هماهنگی داشت (۲۲).

در پژوهش دیگری که توسط Romano و همکارانش در سال ۲۰۱۱ به انجام رسید، باکتریهالوآلکالیفیل *Slinivibrio sharmensis* از دریاچهٔ نمکی در مصر جداسازی شد که با بررسیهای لیپید قطبی، اسیدهای چرب سلولی، محتوای G+C و هیبرید DNA-DNA به صورت گونه جدیدی از *Slinivibrio* معرفی شد. مشخصات دمایی، pH و درصد نمکی (NaCl) برای رشد این باکتری به ترتیب بین ۴۰-

۲۵ درجه سانتی گراد، ۱۰- ۶ و ۱۶- ۶ درصد گزارش شده است (۲۳).

در این پژوهش نیز سویه های *S. sharmensis* جداشده از دریاچهٔ ارومیه، از محیط Alkaline Peptone Water – که pH نهایی آن ۰/۲ ± ۸/۶ می باشد و یک محیط قلیایی غنی کننده و افتراقی برای ویبریوناسه است- با ۵ و ۱۰ درصد نمک (نمک دریاچه) و دمای گرماگذاری ۳۷ درجه سانتی گراد جداسازی شدند.

در بررسی انجام شده توسط Sanchez-Porro و همکارانش بر روی محیطهای پرشور جنوب اسپانیا نیز بیشترین جدایه ها مربوط به جنس *Salinivibrio* بوده است (۲۴).

در صورتی که در پژوهش رهبان و همکاران بر روی دریاچهٔ حوض سلطان و تحقیقات باباولیان و همکاران بر روی دریاچهٔ آران و بیدگل هیچ سویه ای از جنس *Salinivibrio* گزارش نشد که این موضوع را به غلظت بسیار بالای نمکی این دریاچه ها تا حدود ۳۰ درصد نسبت دادند. چرا که بهینه رشد این باکتری NaCl ۱۰- ۲,۵ درصد بوده و حداکثر غلظتی که قادر به رشد و تکثیر است NaCl ۱۷ درصد است (۲ و ۵).

لازم به ذکر است در نمونه گیری نخست از دریاچهٔ ارومیه در بهمن ماه ۸۹ که در شرایط کم آبی شدید و غلظت بسیار بالای شوری انجام گرفت تمامی کشتها منفی بوده و هیچ سویه ای جداسازی نشد. لذا منتظر بارشهای بهاره و افزایش آب دریاچه و به دنبال آن کاهش غلظت شوری بوده که نتایج فوق پس از شروع بارشها و با نمونه گیری های بعدی حاصل شد.

همچنین در پژوهش امیرخانی و همکاران اعضایی از قلمرو آرکیها نیز از محیط پرشور دریاچهٔ ارومیه گزارش شد. آرکی بسیار نمک دوست *Haloarcula* sp. IRU1 ، جدا شده توسط این محققین، مقاومت بالایی را در برابر پرتو های یون ساز، پرتو های فرابنفش و پراکسید هیدروژن از خود نشان داد (۱).

پژوهش حاضر در راستای گسترش بانک میکروارگانیسمهای ایران، به گردآوری میکروارگانیسمهای پروکاریوت - با تأکید بر ویبریو های هالوفیل دریاچهٔ ارومیه- پرداخته است که به نوبه خود نمایانگر بخشی از ذخایر زیستی کشور ایران می باشد. بر اساس این مطالعه، دریاچهٔ ارومیه به عنوان یک محیط پر شور، زیستگاه بسیاری از میکروارگانیسمهای نمک دوست به خصوص جنس *Salinivibrio* می باشد که شناسایی این باکتری برای اولین بار از دریاچهٔ ارومیه و معرفی آن می تواند علاوه بر شناسایی ذخایر ژنتیکی میکروارگانیسمهای بومی این منطقه، کاربردهای بسیاری در صنعت و زیست فناوری داشته باشد.

تشکر و قدردانی:

این مطالعه حاصل همکاری و حمایت دانشگاه آزاد اسلامی، مرکز ملی ذخایر زیستی و ژنتیکی ایران و اداره کل حفاظت از محیط زیست استان آذربایجان غربی می باشد که بدین وسیله از مسئولین محترم این نهادهای علمی و دولتی کمال تشکر و قدردانی به عمل می آید.

منابع

۱- امیرخانی، ح.، عسگرانی، ع.، خدابنده، م.، ۱۳۹۱، تعیین شرایط بهینه رشد هالوآرکولای جدا شده از دریاچه ارومیه (درجه حرارات، نوع محیط کشت، مقدار pH، درصد NaCl) با استفاده از روش تاگوچی، مجله زیست شناسی ایران، جلد ۲۵، شماره ۱، ۱۵۶-۱۴۸.

۲- باباولیان، ح.، آموزگار، م.ع.، پوربابائی، ا.ع.، ۱۳۸۸، شناسایی و تعیین خصوصیات باکتریهای نمک دوست تولید کننده آنزیم های هیدرولیتیک جدا شده از دریاچه نمک آران و بیدگل، مجله زیست شناسی ایران، جلد۲۲، شماره ۱، ۴۶-۲۴.

۳- جبارلوی شبستری، ب.، ۱۳۷۸، دریاچه ارومیه اشک طبیعت ایران، انتشارات نقش مهر.

۴- جبارلوی شبستری، ب.، ۱۳۸۰، درآمدی بر مطالعات آبشناسی دریاچهٔ ارومیه، همایش دریاچهٔ ارومیه.

۵- رهبان، ر.، آموزگار، م.ع.، ۱۳۸۸، بررسی تنوع زیستی باکتریهای نمک دوست تولیدکننده آنزیم های هیدرولیتیک ساکن در دریاچهٔ حوض سلطان، علوم و تکنولوژی محیط زیست، دوره ۱۱، شماره ۴، ۲۶۷-۲۵۱.

۶- هلاکو، ا.، امیر مظفری، ن.، فروهش تهرانی، ه.، ۱۳۸۴، انتشار گونه های ویبریو در آب های دریای خزر، مجله افق دانش، دانشکده علوم پزشکی و خدمات بهداشتی گناباد، دوره ۱۱، شماره ۳، ۲۰-۱۶.

7- Amoozegar, M.A., Fatemi, Z.A., Karbalaei-Heidari, H.R., and Razavi, M.R., 2007, Production of an extracellular alkaline metalloprotease from a newly isolated, moderately halophile, *Salinivibrio* sp. strain AF-2004, Micrbiological Research. 162: 369-377.

8- Amoozegar, M.A., Schumann, P., Hajighasemi., M., Fatemi, A.Z., and Karbalaei-Heidari, H.R., 2008, *Salinivibrio proteolyticus* sp. nov., a moderately halophilic and proteolytic species from a hypersaline lake in Iran, Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 58: 1159-1163.

9- Azari Takami, G., 1993, Urmiah Lake as a valuable source of *Artemia* for feeding sturgeon fry, Journal of veterinary faculty. University of Tehran. 47: 2-14.

10- Das Sarma, S., and Arora, P., 2001, A general review on Halophiles, In Encyclopedia of life sciences, Nature publishing group / www.els.net.

11- Farmer, J.J., and Hickman Brenner, F.W., 2006, The Genera *Vibrio* and *Photobacterium*, P: 508-563, In Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.H, and Stackebrandt, E., (ed.), A Handbook on the Biology of Bacteria, 3nd ed., Vol. 6, Springer-Verlag. New York, N.Y.

12- Garcia, M. T., Ventosa, A., Ruiz-Berraquero, F., and Kocur, M., 1987, Taxonomic study and amended description of *Vibrio costicola*, Int. J. Syst. Bacteriol. 37: 251-256.

13- Government of Canada, 2006, Health produccte and food branch, Part 1: Detection of halophilic *Vibrio* species in seafood, Ottawa.

14- Huang, F., Garcia, C.Y., Cayot, B.K.C, and Mah, R.A., 2000, *Salinivibrio costicola* subsp. *Vallismortis* subsp. nov, a halotolerant facultative anaerobe from death valley, and emended description of *Salinivibrio*, Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 50: 615-622.

15- Kamekura, M., 1986, Production of enzymes of eubacterial halophiles, FEMS Microbiology Reviews. 39: 145-150.

16- Margesin, R., and Schinner, F., 2001, Potential of halotolerant and halophilic microorganisms for biotechnology, Extremophiles. 5: 73-83.

17- Oren, A., 1999, Life at high salt concentrations, In: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H. and Stackebrandt, E. (Eds.), The Prokaryotes, A handbook on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification, applications. 3rd. ed. Springer-Verlag, New York (electronic publication).

18- Oren, A., 2002, Diversity of halophilic microorganisms: Environments, phylogeny, physiology, and applications, Ind. Microbiol Biotechnol. 28: 56-63.

19- Oren, A., 2002, Molecular ecology of extremely halophilic Archaea and Bacteria, FEMS Microbiol. Ecol. 39: 1-7.

20- Oren, A., 2003, Halophilic Microorganisms and their Environments. Dordrecht: Kluwer Academic Press.

21- Ozcelik, R., Gul, A.U., Merganic, J., Merganicova, K., 2008, Tree species diversity its relationship to stand parameters and geomorphology features in the eastern black sea region forests of turkey, J. Environ. Biol., 29: 291-298. p: 4.

22- Romano, I., Gambacorta, A., Lama, L., Nicolaus, B., Giordano, A., 2005, *Salinivibrio costicola* subsp. *alcaliphilus* subsp. nov., a haloalkaliphilic aerobe from Campania Region (Italy), Syst Appl Microbiol. 28: 34-42.

23- Romano, I., Orlando, P., Gambacorta, A., Nicolaus, B., Dipasquale, L., Pascual, J., Giordano, A., Lama, L., 2011, *Salinivibrio sharmensis* sp. nov., a novel haloalkaliphilic bacterium from a saline lake in Ras Mohammed Park (Egypt), Extremophiles . 15: 213-220.

24- Sanchez-porro C., Martin, S., Mellado, E., Ventosa, A., 2003, Diversity of Moderately Halophilic Bacteria Producing Extracellular Hydrolytic Enzymes, Applied Microbiology. 94: 295-300.

25- Skerman, V.B.D., McGowan, V., & Sneath, P.H.A., (editors) , 1980, Approved lists of bacterial names, Int. J. Syst. Bacteriol. 30: 225–420.

26- Ventosa, A., 1988, Taxonomy of moderately halophilic heterotrophic eubacteria. In Halophilic bacteria ed. Rodrı´guez-Valera, F, pp.71–84. Boca Raton, FL, USA: CRC Press.

27- Ventosa, A., Marquez, M., Garabito, M., Arahal, D., 1998, Moderately halophilic Gram-positive bacterial diversity in hypersaline environments, Extremophiles 2: 297–304.

28- Ventosa, A., Nieto, J.J. and Oren, A., 1998, Biology of moderately halophilic aerobic bacteria, Microbial Molecular Biology Review 62: 504- 544.

29- Wang, C.Y., Hsieh, Y.R., Ng, C.C., Chan, H., Lin, H.T., Tzeng, W.S., Shyu, Y.T., 2009, Purification and characterization of a novel halostable cellulase from *Salinivibrio* sp. strain NTU-05, Enzyme Microb. Technol. 44: 373-379.

The presentation of Novel Strains of Halophile Bacteria *Salinivibrio* sp. from Urmia Lake

Akhavan Sepahy A.[1, 2], Irannejad Sh.[1,2], AmoozegarM.A.[2,3], Tukmechi A.[4]

[1] Microbiology Dept, College of Biological Sciences, Islamic Azad University of Tehran North Branch, Tehran, I.R. of Iran

[2] Iranian Biological Resource Center, Tehran, I.R. of Iran

[3] Extremophile lab., Microbiology Dept, School of Biology, College of Science, University of Tehran, Tehran, I.R. of Iran

[4] Pathobiology and Quality Control Dept, Artemia and Aquatic Animals Institute, University of Urmia, Urmia, I.R. of Iran

Abstract

In this research for the first time identification of moderate halophile microorganism of the genus *Salinivibrio* was studied, which leaded to identification of novel strains of this genus. Urmia Lake is a hypersaline lake located at the north-west region of Iran and it is the saltiest perennial lake of Iran and one of the rare perennial hyper saturation lakes in the world. At first, samples were collected from different sites of Urmia Lake and transferred to the laboratory under sterile conditions. After enrichment and culture of samples under defined conditions, repeated cultures were carried out to achieve pure cultures. Then selected strains were studied regarding phenotypic and phylogenetic (by sequencing 16S rRNA technique) characteristics. From total strains of belonging to *Salinivibrio* sp. , 57% and 43% of the strains showed closest similarity with *S. costicola* subsp. *alcaliphilus* and *S. sharmensis*, respectively. This study is attempted to present of novel genetic pools from great microbial sources of Urmia Lake and especially *Salinivibrio* sp. that they are the base of wide applications in biotechnological science.

Key words: Identification, Halophilic bacterium, *Salinivibrio* sp. , Urmia Lake