Journal of Microbial World
Volume 13, No. 3, September 2020

Original Article

Bacterial community structure in saline sediments from hypersaline wetland in south of Halghe Dare hills, Alborz province

Seyed Sina Seyedpour Layalestani[1], Mahmoud Shavandi[2], Azam Haddadi[3], Mohammad Ali Amoozegar[4], Seyed Mohammad Mehdi Dastgheib[5]

[1]Ph.D Candidate, Department of Microbiology, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran. [2]Assistant Professor Microbiology and Biotechnology Research Group, Research Institute of Petroleum Industry, Tehran, Iran. [3]Assistant Professor, Department of Microbiology, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran. [4]Professor, Department of Microbiology, College of Science, University of Tehran, Tehran, Iran. [5]Assistant Professor, Microbiology and Biotechnology Research Group, Research Institute of Petroleum Industry, Tehran, Iran.

Abstract

Background & Objectives: Survey of bacterial community structure in hypersaline ecosystems and identification of novel halophilic species can be very important from biotechnological and ecological aspects. In this study, we survey bacterial community structure in sediments from saline wetland in south of Halghe Dare hills as one of the hypersaline ecosystems in Alborz province.

Materials & Methods: This cross-sectional study was performed by sampling from saline wetland in south of Halghe Dare hills in June 2018. Isolation of heterotrophic bacteria was conducted using R2A agar medium. After differentiation of isolates based on morphological and biochemical characteristics, identification and phylogenetic relationships analysis of selected isolates were performed by 16S rRNA gene sequencing and analysis using NCBI databases and bioinformatics softwares. The Illumina next-generation sequencing was also applied to survey bacterial diversity by cultivation-independent method.

Results: Isolates included 13 species belonging to 8 genera including *Bacillus* (31.25%), *Halomonas* 25%, *Gracilibacillus* (12.50%), *Virgibacillus* (6.25%), *Streptomyces* (6.25%), *Nitratireductor* (6.25%), *staphylococcus* (6.25%) and *Planococcus* (6.25%). Illumina sequencing showed that *Aneurinibacillus migulanus* and *Paenibacillus polymyxa* were dominant species in soil sample.

Conclusion: The results showed that the microbial population of the studied wetland is similar to the community of the wetlands reported in other parts of the world and dominated by halotolerant and halophilic species. Presence of various bacterial species and some probable novel taxonomic groups in saline wetland in south of Halghe Dare hills presents a new genetic and microbial source for future studies.

Keywords: Hypersaline wetland, Halotolerant and halophilic species, Bacterial diversity, Next generation sequencing.

Correspondence to: Mahmoud Shavandi
Tel: +98 2148255166
E-mail: shavandim@ripi.ir

Journal of Microbial World 2020, 13(3): 215-227.
DOI:

Copyright © 2019, This article is published in Journal of Microbial World as an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License. Non-commercial, unrestricted use, distribution, and reproduction of this article is permitted in any medium, provided the original work is properly cited.

مجله دنیای میکروب‌ها
سال سیزهم شماره سوم (پیاپی ۴۴) پاییز ۱۳۹۹
صفحات ۲۲۷-۲۱۵

Original Article

ساختار جمعیت باکتریایی رسوبات نمکی تالاب پرشور جنوب تپه های حلقه دره استان البرز

سید سینا سیدپور لیالستانی[۱]، محمود شوندی[۲*]، اعظم حدادی[۳]، محمد علی آموزگار[۴]، سید محمد مهدی دستغیب[۵]

[۱]دانشجوی دکتری، گروه میکروبیولوژی، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران. [۲] استادیار ، گروه تحقیقاتی میکروبیولوژی و بیوتکنولوژی، پژوهشگاه صنعت نفت، تهران، ایران. [۳] استادیار، گروه میکروبیولوژی، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران. [۴] استاد، گروه میکروبیولوژی، پردیس علوم، دانشگاه تهران، تهران، ایران. [۵] استادیار، گروه تحقیقاتی میکروبیولوژی و بیوتکنولوژی، پژوهشگاه صنعت نفت، تهران، ایران.

چکیده

سابقه و هدف: بررسی ساختار جمعیت باکتریایی زیست بوم های پرشور و شناسایی گونه های جدید هالوفیل می تواند از نظر زیست فناوری و اکولوژی حائز اهمیت باشد. این تحقیق با هدف بررسی ساختار جمعیت باکتریایی رسوبات تالاب نمکی جنوب تپه های حلقه دره انجام شد.

مواد و روش ها: این پژوهش به صورت مقطعی با نمونه برداری از تالاب نمکی جنوب حلقه دره در خرداد ۹۷ انجام شد. جداسازی باکتری های هتروتروف با استفاده از محیط کشت R2A آگار انجام شد. پس از تفکیک جدایه ها بر اساس خصوصیات مورفولوژیک و بیوشیمیایی، تعیین هویت و ارتباطات فیلوژنتیک جدایه های منتخب با توالی یابی ژن 16S rRNA و بر اساس اطلاعات موجود در بانک ژنی NCBI و توسط نرم افزار های بیوانفورماتیک انجام شد. همچنین از توالی یابی نسل جدید ایلومینا به عنوان روش غیر وابسته به کشت به منظور بررسی تنوع باکتریایی استفاده شد.

یافته ها: جدایه ها شامل ۱۳ گونه در ۸ جنس *باسیلوس* (۳۱/۲۵)، *هالوموناس* (۲۵٪)، *گراسیلی باسیلوس* (۱۲/۵۰٪)، *ویرجی باسیلوس* (۶/۲۵٪)، *استرپتومایسس* (۶/۲۵٪)، *نیتراتی رداکتر*(۶/۲۵٪)، *استافیلوکوکوس* (۶/۲۵٪) و *پلانوکوکوس* (۶/۲۵) بودند. همچنین نتایج ایلومینا حاکی از غالبیت گونه های *آنورینی باسیلوس میگولانس* و *پانی باسیلوس پلی میکسا* بود.

نتیجه گیری: نتایج نشان داد که جمعیت میکروبی تالاب مورد مطالعه با سایر تالاب های پرشور گزارش شده در سایر نقاط دنیا مشابه است و بیشتر جدایه ها مربوط به گونه های هالوتولرانت و هالوفیل بودند. حضور گونه های متنوع می تواند نشان دهنده وجود گروه های جدید تاکسونومیک و غنای بالای ژنی در این اکوسیستم پرشور باشد که می تواند در پژوهش های تکمیلی مورد بهره برداری قرار گیرد.

واژگان کلیدی: تالاب نمکی، گونه های هالو تولرانت و هالوفیل، تنوع باکتریایی، توالی یابی نسل جدید.

دریافت مقاله: اردیبهشت ماه ۹۹ پذیرش برای چاپ: شهریور ماه ۹۹

مقدمه

میکروارگانیسم ها گروهی بسیار تاثیر گذار در تاریخ تکامل حیات هستند که مطالعه پراکنش و تنوع آن ها در محیط های گوناگون به منظور ارتقاء دانش بشر در زمینه های اکولوژی و زیست فناوری همواره مورد توجه بوده است. از سوی دیگر به دلیل ارتباط و پیوستگی بسیار نزدیک میان مطالعات اکولوژی و تکامل میکروارگانیسم ها، بررسی تنوع میکروبی در محیط های مختلف اطلاعات ارزشمندی را در حوزه های

*) آدرس برای مکاتبه: تهران، پژوهشگاه صنعت نفت، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی.
تلفن: ۰۲۱۴۸۲۵۵۱۶۶ پست الکترونیک: shavandim@ripi.ir

حقوق نویسندگان محفوظ است. این مقاله با دسترسی آزاد و تحت مجوز مالکیت خلاقانه (http://creativecommons.org/licenses/bync/4.0/) در فصلنامه دنیای میکروب‌ها منتشر شده است. هرگونه استفاده غیرتجاری فقط با استناد و ارجاع به اثر اصلی مجاز است.

ژئومیکروبیولوژی و میکروبیولوژی تکاملی در اختیار ما قرار می دهد (۱). در این میان باکتری های نمک دوست و تحمل کننده نمک به دلیل نقش قابل توجه در چرخه های عناصر و مواد ژئوشیمیایی در محیط های پرشور و توانایی ذاتی بالقوه آن ها در تولید مولکول های فعال زیستی و آنزیم های مقاوم در برابر تنش های اسمزی و دیگر شرایط نامساعد محیطی در دهه های اخیر بسیار مورد توجه قرار گرفته اند (۲ و ۳). زیرا که بسیاری ازانواع مختلف آنزیم های تولید شده توسط باکتری های نمک دوست همانند پروتئازها، آمیلازها، زایلنازها، سلولازها و لیپازها دارای کاربردهای گسترده ای در صنایع می باشند (۴). ایران به دلیل داشتن انواع مختلفی از زیست بوم های پرشور همانند دریاچه های نمک، تالاب های نمکی، غارهای نمکی و نمکزارهای وسیع، زیستگاه مناسبی برای طیف گسترده ای از گروه های فیلوژنی نمک دوست و تحمل کننده نمک می باشد که در این بین تالاب ها که به عنوان بوم مرزهایی (ecotone) مابین اکوسیستم های خشکی و آبی هستند، عمدتا به عنوان گنجینه هایی ارزشمند به لحاظ تنوع زیستی محسوب می شوند (۵). بنابرین به نظر می رسد تالاب های نمکی به دلیل میزان بالای شوری و قرار گرفتن در مرز بین دو اکوسیستم منبعی غنی از انواع باکتری های نمک دوست و تحمل کننده نمک هستند. تاکنون تنوع جمعیت میکروبی در بسیاری از محیط های پرشور ایران مورد مطالعه قرار گرفته است. ایران نژاد و همکاران در سال ۲۰۱۵ طی پژوهشی به جداسازی، شناسایی و تعیین خصوصیات باکتری های هتروتروف دریاچه ارومیه به عنوان یکی از شناخته شده ترین اکوسیستم های پرشور ایران پرداختند که نتایج حاصل از آن مطالعه حاکی از حضور تنوع بالایی از باکتری های تولید کننده آنزیم های هیدرولیتیک بود و احتمال حضور گونه های جدید را در این اکوسیستم پرشور تقویت کرد (۶). ناقونی (Naghoni) و همکاران در سال ۲۰۱۷ تنوع باکتری ها و آرکی های دریاچه نمک میقان را مورد بررسی قرار دادند که نتیجه آن تحقیق نشان داد که *گاماپروتئوباکتریا* (*Gammaproteobacteria*) و *هالوآرکیا* (*Haloarchaea*) به ترتیب فراوان ترین رده های باکتری ها و آرکی های غالب در دریاچه نمک میقان هستند. همچنین مطالعه دیگری که توسط مخدومی (Makhdoumi) و همکاران در سال ۲۰۱۲ انجام شد، حاکی از حضور طیف وسیعی از باکتری هایی مانند *سالینی باکتر* (*Salinibacter*)، *سالیکولا* (*Salicola*) و *رودوویبریو* (*Rhodovibrio*) و آرکی هایی همانند *هالوروبرم* (*Halorubrum*) و *هالوآرکولا* (*Haloarcula*) در دریاچه نمک آران-بیدگل بود (۷). تالاب نمکی شرق شهرستان اشتهارد، تالابی فصلی است که در فصول پر بارش در جنوب ارتفاعات رنگین کمانی هفت و نیم میلیون ساله حلقه دره شکل می گیرد و در فصول گرم به باتلاقی نمکی و نمکزار تبدیل می شود که به دلیل میزان بالای نمک و قرار گرفتن مابین دو اکوسیستم رودخانه نمکی ابهر رود و ارتفاعات و گنبدهای نمکیِ حلقه دره با قدمت میلیون ها ساله، احتمال شناسایی طیف وسیعی از باکتری های نمک دوست و تحمل کننده نمک در این اکوسیستم افزایش می یابد (۸). با توجه به اینکه تاکنون مطالعه ای در خصوص شناسایی تنوع میکروبی تالابهای این منطقه انجام نشده است در این مطالعه تنوع باکتریایی تالاب نمکی شرق شهرستان اشتهارد با استفاده از روش های وابسته به کشت و نسل جدید توالی یابی (Next Generation Sequencing) مورد بررسی قرار گرفت.

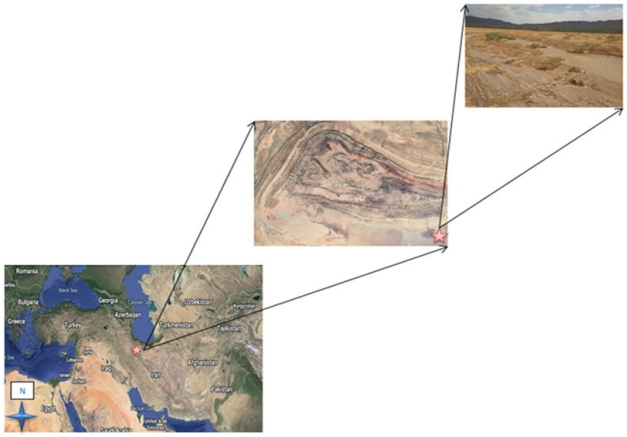
مواد و روش ها

الف) نمونه برداری و تعیین ویژگی های فیزیکوشیمیایی خاک: برای تهیه نمونه ای که نماینده نقطه مورد نظر باشد از روش نمونه برداری مرکب (Composite sampling) استفاده شد. در محل مورد نظر ۱۰ نمونه از یک شعاع صد متری و عمق ۰ تا ۲۵ سانتی متری خاک و رسوبات حاشیه تالاب نمکی جنوب تپه های نمکی حلقه دره واقع در شرق شهرستان اشتهارد در موقعیت جغرافیایی 35°46'26.9"N 50°35'15.7"E در اوایل ماه خرداد جمع آوری شده و سپس تمامی نمونه ها مخلوط شده و به عنوان نمونه مرکب مورد استفاده قرار گرفت (شکل ۱). پس از همگن سازی نمونه با استفاده از الک استریل با منافذ

۲ میلی متری، نمونه تحت شرایط استاندارد و در داخل ظرف پلاستیکی به آزمایشگاه منتقل شد و تا زمان آزمایش به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سلسیوس نگهداری شد. سپس به منظور تعیین خصوصیات فیزیکوشیمیایی، نمونه به آزمایشگاه خاکشناسی منتقل شد. به منظور ارزیابی میزان شوری، میزان هدایت الکتریکی (EC) با استفاده از دستگاه EC متر (Jenway، انگلستان) و درصد نمک های محلول با استفاده از رفرکتومتر (Mettler Toledo، چین) محاسبه شد. pH خاک به وسیله دستگاه pH متر (Metrohm، سوئیس) با نسبت وزن به حجم ۱ به ۵ خاک به آب محاسبه شد. همچنین میزان کربن ارگانیک با استفاده از روش والکلی-بلک (۹)، فسفر قابل دسترس به کمک روش اولسن و نیتروژن کل موجود در خاک نیز با روش کجلدال (Kjeldahl) محاسبه شد (۱۰ و ۱۱).

ب) جداسازی و خالص سازی باکتری های هتروتروف: به منظور جداسازی باکتری های هتروتروف از محیط کشت R2A آگار (Ibresco، ایران) حاوی ۰/۵۰ گرم عصاره مخمر، ۰/۵۰ گرم پروتئوس پپتون، ۰/۵۰ گرم کازآمینواسید، ۰/۵۰ گرم دکستروز، ۰/۵۰ گرم نشاسته قابل انحلال، ۰/۳۰ گرم سدیم پیروات، ۰/۳۰ دی پتاسیم فسفات، ۰/۵۰ گرم مگنزیوم سولفات و ۱۵ گرم آگار در یک لیتر آب مقطر استریل استفاده شد (۱۲). به منظور جلوگیری از ایجاد تنش های اسمزی و انطباق درجه شوری محیط های کشت با نمونه خاک مورد مطالعه، ۸۵ گرم نمک کلرید سدیم (مرک، آلمان) به هر لیتر از محیط کشت اضافه شد. سپس به منظور جداسازی و خالص سازی باکتری ها، از نمونه خاک مورد مطالعه رقت های متوالی از 10^{-1} تا 10^{-9} تهیه شد و ۱۰۰ میکرولیتر از هر رقت در محیط های کشت جامد R2A با شوری ۸/۵۰ درصد کلرید سدیم تلقیح شد و به مدت ۷ شبانه روز در دمای ۳۰ درجه سلسیوس گرماگذاری شدند. سپس کلنی های ظاهر شده بر روی محیط های کشت پس از گذشت ۲، ۳، ۷ شبانه روز بر اساس مورفولوژی کلنی جداسازی و تا ۳ مرتبه به صورت خطی کشت داده شدند تا از خلوص آنها اطمینان حاصل شود. از رنگ آمیزی گرم با استفاده از روش هاکر (Hucker) و مشاهده اشکال سلول های باکتریایی توسط میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ۱۰۰۰ به منظور تایید خلوص کلنی های خالص شده استفاده شد (۱۳).

ج) غربالگری: علاوه بر بررسی ویژگی های مورفولوژیک، به منظور غربالگری جدایه ها، برخی از آزمون های تشخیصی نظیر آزمون تحرّک ، دامنه تحمل نمک و توانایی تولید برخی از آنزیم های هیدرولازی مورد استفاده قرار گرفت. از روش لام مرطوب و با بزرگنمایی ۴۰×۱۰ میکروسکوپ نوری برای بررسی حرکت سویه های منتخب استفاده شد (۱۴). همچنین برای انجام آزمون اکسیداز و بررسی فعالیت اکسیدازی از دیسک های اکسیداز آماده (پادتن طب، ایران) و کشت های ۲۴ ساعته باکتری های خالص استفاده شد و فعالیت کاتالازی با استفاده از کشت های خالص ۲۴ ساعته و پراکسید هیدروژن ۳ درصد مورد ارزیابی قرار گرفت که در این آزمون تولید حباب نشانگر فعالیت کاتالازی مثبت بود. پس از افتراق جدایه ها بر اساس خصوصیات میکروسکوپی، مورفولوژیک، تحرّک و آزمون های اکسیداز و کاتالاز، از میان ۱۰۲ جدایه ۱۶ جدایه برای بررسی محدوده رشد هر یک در غلظت های مختلف نمک، توان تولید آنزیم های هیدرولازی شامل سیتراتاز پروتئاز، آمیلاز و ژلاتیناز و شناسایی مولکولی انتخاب شدند. تعیین محدوده رشد هر یک از جدایه های منتخب در غلظت های مختلف نمک و همچنین افتراق جدایه ها بر اساس میزان نمک دوستی و تحمل نمک با استفاده از محیط کشتی با



شکل ۱: محل نمونه برداری از تالاب نمکی شرق شهرستان اشتهارد.

حداقل میزان ترکیبات آلی به عنوان تامین کننده حداقلی رشد سویه ها انجام شد که بدین منظور از محیط کشت پایه ای که حاوی ۵ گرم بر لیتر عصاره مخمر و ۱۵ گرم بر لیتر آگار بود با درصد های نمک کلرید سدیم صفر تا ۲۵ درصد استفاده شد. سویه های منتخب بر اساس غلظت نمک مورد نیاز برای رشد بهینه به عنوان نمک دوست جزئی (۲ تا ۵ درصد)، نمک دوست نسبی (۵ تا ۲۰ درصد) و نمک دوست افراطی (۲۰ تا ۳۰ درصد) در نظر گرفته شدند (۱۵ و ۱۶). برای بررسی توانایی تولید آنزیم سیتراتاز از تلقیح هر یک از جدایه ها در محیط کشت سیمون سیترات آگار استفاده شد که پس از گذشت ۲۴ ساعت توانایی مصرف سیترات برای هر جدایه مورد ارزیابی قرار گرفت. توانایی سویه های منتخب در تولید آنزیم های پروتئاز، آمیلاز و ژلاتیناز با دستورالعملِ موجود در پژوهشِ ستاری فقیهی (Satari-Faghihi) و همکاران در سال ۲۰۱۸ مورد ارزیابی قرار گرفت (۱۷).

د) شناسایی مولکولی سویه ها: به منظور استخراج DNA از جدایه های منتخب، از کشت خالص ۲۴ ساعته در محیط کشت مایع R2A و کیت استخراج DNP™ (سیناکلون، ایران) استفاده شد. واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) و تکثیر ژن 16S rRNA جدایه ها با استفاده از آغازگرهای عمومی 9F (5'-GAGTTTGATYMTGGCTCAG-3') و 1541R (5'-AAGGAGGTGWTCCARCC-3') درون میکروتیوبهای ۲۰۰ میکرولیتری انجام شد. برای انجام واکنش زنجیره ای پلیمراز از ۲ میکرولیتر DNA الگو، ۱۲/۵۰ میکرولیتر مسترمیکس آنزیم Taq DNA پلی مراز آماده (سیناکلون، ایران) و ۰/۷۵ میکرولیتر از هر پرایمر (۱۰ پیکومول) استفاده شد که با ۱۴ میکرولیتر آب مقطر دوبار تقطیر به حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر رسیدند. واکنش زنجیره ای پلیمراز با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (Applied Biosystems Veriti، کشور امریکا) انجام شد. بدین منظور ابتدا دمای ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه به منظور واسرشتگی اولیه اعمال شد. واکنش در ۳۵ چرخه انجام شد که شامل واسرشتگی در دمای ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۲۵ ثانیه، اتصال پرایمرها به DNA الگو در دمای ۵۴ درجه سلسیوس به مدت ۲۰ ثانیه، طویل شدن در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه بود. در پایان طویل شدن نهایی در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. پس از تخلیص، محصولات PCR به منظور توالی یابی ژن 16S rRNA با استفاده از روش سنگر (Sanger) به شرکت Novogene (پکن، چین) فرستاده شدند. سپس توالی های بدست آمده از توالی یابی سنگر در بانک ژنی NCBI به منظور تطابق و مقایسه با توالی های سویه های موجود در بانک ژنی مورد بررسی قرار گرفتند و از نسخه شماره ۷ نرم افزار MEGA برای رسم درخت فیلوژنتیک استفاده شد (۱۸).

ه) بررسی ساختار جمعیت باکتریایی با استفاده از نسل جدید توالی یابی (NGS): ابتدا استخراج DNA کل از ۴۵۰ میلی گرم نمونه خاک با استفاده از کیت NucleoSpin® Soil (MachereyNagel، کشور آلمان) طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. ازدستگاه نانو دراپ اسپکتروفتومتر UV–Vi (ND-1000، کشور آمریکا) به منظور تعیین کیفیت DNA استفاده و پس از اطمینان از کیفیت مطلوب، DNA استخراج شده در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شد. به منظور تعیین ساختار جمعیت باکتریایی نمونه، توالی های ۴۲۰ نوکلئوتیدی از ناحیه V4 ژن های 16S rRNA توسط آغازگر مستقیم 515F (5′-GTG CCA GCM GCC GCG GTA A-3′) و آغازگر معکوس 806R (5′-GGA CTA CHV GGG TWT CTA AT-3′) تکثیر و کتابخانه ژنی تشکیل شد. واکنش PCR با استفاده از مستر میکس Phusion® High-Fidelity (Biolabs، کشور آمریکا) انجام و الکتروفورز محصول PCR بر روی ژل آگارز ۲ درصد انجام شد. توالی یابی کتابخانه ژنی 16S rRNA با خوانش های ۲۵۰ جفت بازی بر اساس پلتفرم Illumina HiSeq 2500 توسط شرکت Novogene (پکن، چین) انجام شد. به منظور تجزیه و تحلیل اطلاعات بیوانفورماتیک و آنالیز آماری داده های بدست آمده از توالی یابی ایلومینا، حذف خوانش های با کیفیت پایین با استفاده از

نرم افزار FLASH و مقایسه توالی ها با اطلاعات موجود در بانک اطلاعاتی مرجع (Gold database) با استفاده از الگوریتم UCHIME انجام شد (۱۹ و ۲۰). از نرم افزار UPARSE به منظور تجزیه و تحلیل توالی ها استفاده شد که به منظور طبقه بندی توالی های بدست آمده، توالی هایی با میزان شباهت بالای ۹۷ درصد به عنوان واحدهای عملکردی تاکسونومیک (Operational taxonomic units) یکسان در نظر گرفته شدند. تفسیر واحدهای عملکردی تاکسونومیک نیز با استفاده از اطلاعات موجود در بانک اطلاعاتی GreenGene بر اساس نقشه طبقه بندی بانک اطلاعاتی ریبوزومی (Ribosomal Database Project Classifier) انجام شد (۲۱ و ۲۲).

یافته ها

الف) ویژگی های فیزیکوشیمیایی خاک: خصوصیات فیزیکوشیمیایی نمونه خاک مورد مطالعه شامل محتوای نمک های محلول، هدایت الکتریکی، pH، محتوای کربن ارگانیک، نیتروژن، فسفر و مقدار یون های سدیم، پتاسیم، کلسیم و منیزیم در جدول ۱ اشاره شده است.

ب) تنوع و ویژگی های جدایه های باکتری های هتروتروف: از میان ۱۰۲ سویه جدا شده ۶۸ درصد جدایه ها گرم مثبت و مابقی گرم منفی بودند. همچنین ۶۲ و ۱۰۰ درصد سویه ها به ترتیب اکسیداز و کاتالاز مثبت بودند. نهایتا ۱۶ جدایه بر اساس خصوصیات میکروسکوپی، مورفولوژیک و بیوشیمیایی به منظور تعیین توالی ژن 16S rRNA و شناسایی مولکولی انتخاب شدند که خصوصیات مورفولوژیک، فیزیولوژیک و بیوشیمیایی آنها در جدول ۲ ذکر شده است. از ۱۶ جدایه منتخب ۵۰، ۶۲/۵۰ و ۴۳/۷۵ درصد از سویه ها به ترتیب توانایی تولید آنزیم های ژلاتیناز، پروتئاز و آمیلاز را داشتند. از بین مجموع جدایه های خالص شده، تعداد ۵۱ سویه (۵۰ درصد) تحمل کننده نمک و قادر به رشد در حضور و عدم حضور نمک بودند، ۱۳ سویه (۱۲/۷۴ درصد) نمک دوست جزئی بودند که محدوده بهینه رشد آنها در غلظت های مختلف نمک حدود ۲ تا ۵ درصد بود و ۳۸ (۳۷/۲۵ درصد) سویه ها با نشان دادن رشد بهینه در محدوده غلظت نمک ۵ تا ۲۰ درصد نمک دوست نسبی بودند. میزان شباهت ژن 16S rRNA سویه های منتخب جدا شده در این مطالعه با سویه های ثبت شده در بانک ژنی NCBI در جدول ۳ نشان داده شده است. پس از شناسایی

جدول ۱: ویژگی های فیزیکوشیمیایی نمونه خاک مورد بررسی.

درصد نمک	هدایت الکتریکی (dS/m)	کربن ارگانیک (٪)	pH	نیتروژن (٪)	فسفر (٪)	سدیم (mg/kg)	پتاسیم (mg/kg)	کلسیم (mg/kg)	منیزیم (mg/kg)
۸/۵۰	۱۳۲	۰/۸۰	۸	۰/۰۶	۱۶/۳۰	۳۹۲۵۶	۱۶۳۲	۴۴۲۰	۲۶۷۷

جدول ۲: ویژگی های مورفولوژیک، فیزیولوژیک و بیوشیمیایی جدایه ها.

نام جدایه	واکنش گرم	مورفولوژی	رنگدانه	حرکت	کاتالاز	اکسیداز	آمیلاز	پروتئاز	ژلاتیناز	سیتراتاز	محدوده رشد در غلظت های NaCl (w/v ٪)
Tal-1	+	میله ای	سفید	+	+	+	+	+	–	–	۰–۲۰
Tal-2	+	کوکسی	نارنجی	–	+	+	–	+	+	–	۰–۱۲
Tal-3	–	میله ای	کرم	+	+	+	–	–	–	–	۱–۱۸
Tal-4	+	میله ای	کرم	+	+	+	–	–	+	+	۱–۲۲
Tal-5	–	میله ای	بی رنگ	+	+	+	–	–	+	+	۴–۲۰
Tal-6	–	میله ای	سفید	+	+	+	–	–	–	–	۲–۱۹
Tal-7	+	میسیلیوم	زرد	–	+	+	+	+	–	+	۰–۹
Tal-8	–	میله ای	سفید	+	+	+	–	–	+	+	۳–۱۹
Tal-9	+	میله ای	سفید	+	+	+	+	+	+	+	۰–۱۰
Tal-10	–	میله ای	آجری	–	+	+	–	–	–	–	۰–۹
Tal-11	+	میله ای	سفید	+	+	–	+	+	+	–	۰–۲۰
Tal-12	+	میله ای	کرم	+	+	–	+	+	+	–	۰–۲۰
Tal-13	+	میله ای	کرم	+	+	–	+	–	+	–	۱–۲۲
Tal-14	+	میله ای	سفید	+	+	+	+	+	+	+	۰–۱۰
Tal-15	+	کوکسی	زرد	–	+	–	–	+	+	–	۰–۱۰
Tal-16	+	میله ای	صورتی	+	+	–	–	–	–	–	۰–۹

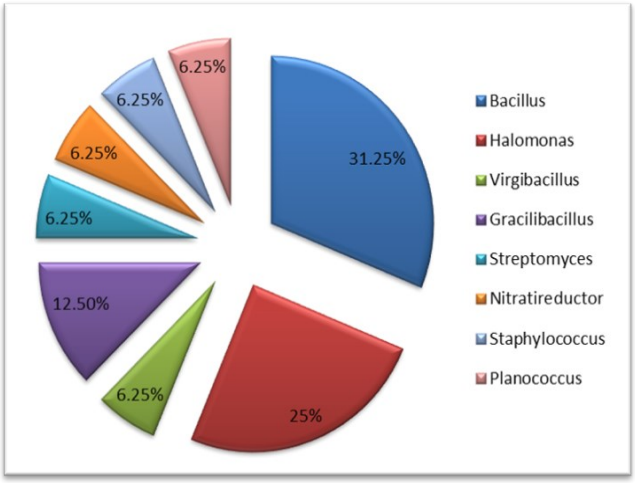
جدول ۳: 16S rRNA سویه های جدا شده با توالی های ثبت شده در بانک ژنی NCBI.

نام سویه جدا شده	نزدیکترین سویه ثبت شده در بانک ژنی NCBI	شماره دسترسی	میزان شباهت (٪)
Tal-1	*Virgibacillus sp.* J2B(2010)	HQ433442.1	۹۳/۰۲
Tal-2	*Planococcus donghaensis* strain s2	MK720493.1	۹۹/۸۷
Tal-3	*Halomonas nitritophilus strain* HB24	KC345032.1	۹۹/۳۳
Tal-4	*Gracilibacillus sp.* strain DYB124	MK968658.1	۹۹/۳۳
Tal-5	*Halomonas sp.* strain GSW-R-14	MK610791.1	۹۳/۷۱
Tal-6	*Halomonas nitritophilus* strain HB24	KC345032.1	۹۳/۱۶
Tal-7	*Streptomyces sp.* strain ZGB-7-9	MN371391.1	۹۴/۹۰
Tal-8	*Halomonas sp.* strain GSW-R-14	MK610791.1	۹۸/۷۲
Tal-9	*Bacillus sp. (in: Bacteria) strain* XIXJ160	MH801088.1	۹۱/۱۴
Tal-10	*Nitratireductor sp.* strain DYB141	MK968675.1	۹۱/۲۷
Tal-11	*Bacillus paralicheniformis* strain B-26	MN756664.1	۱۰۰
Tal-12	*Bacillus paralicheniformis* strain B-26	MN756664.1	۱۰۰
Tal-13	*Gracilibacillus sp.* strain HT4.1	KY827071.1	۱۰۰
Tal-14	*Bacillus subtilis* strain CFR08	MT641227.1	۱۰۰
Tal-15	Uncultured *Staphylococcus sp.* clone MN3211_D4	MN134331.1	۱۰۰
Tal-16	*Bacillus sp.* (in: Bacteria) strain SE34	MG963218.1	۱۰۰

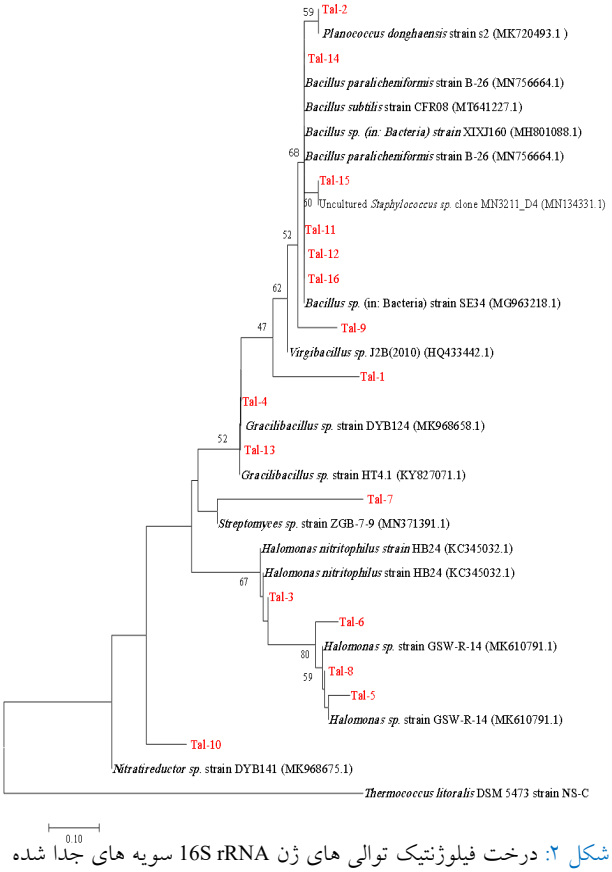
مولکولی سویه های منتخب مشخص شد که از میان ۱۶ جدایه اعضای جنس *باسیلوس* (*Bacillus*) با فراوانی نسبی ۳۱/۲۵ درصد شامل گونه های *باسیلوس سابتیلیس* (*Bacillus subtilis*)، *باسیلوس پارالیچینی فرمیس* (*Bacillus paralicheniformis*)، *Bacillus sp. strain* XIXJ1 و *Bacillus sp.* strain SE34 و جنس *هالوموناس* (*Halomonas*) با فراوانی نسبی ۲۵ درصد شامل گونه های *هالوموناس نیتریفیلوس* (*Halomonas nitritophilus*) و *Halomonas sp.* strain GSW-R-14 فراوانترین باکتری های هتروتروف موجود در نمونه خاک تالاب نمکی شرق شهرستان اشتهارد بودند. همچنین اعضای جنس *گراسیلی باسیلوس* (*Gracilibacillus*) با فراوانی ۱۲/۵۰ درصد و جنس های *ویرجی باسیلوس* (*Virgibacillus*)، *استافیلوکوکوس* (*Staphylococcus*)، *استرپتومایسس* (*Streptomyces*)، *نیتراتی رداکتر* (*Nitratireductor*) و *پلانوکوکوس* (*Planococcus*) هر کدام با فراوانی ۶/۲۵ درصد در نمونه مورد بررسی شناسایی شدند. نمودار ۱ توزیع فراوانی نسبی جدایه ها درسطح جنس را نشان می دهد. درخت فیلوژنتیکی که ارتباط مابین سویه های جدا شده و سویه های ثبت شده در بانک ژنی NCBI را نشان می دهد با استفاده از Neighbor-joining و ضریب Bootstrap بدست آمد و ارتباط مابین سویه ها در شکل ۲ نشان داده شده است. نتایج حاصل از این مطالعه نشان می دهد که ۶۲/۵۰

جدول ۴: فراوانی های نسبی باکتری های مشاهده شده با استفاده از پلتفرم HiSeq 2500 توالی یابی ایلومینا در سطوح رده، خانواده و گونه.

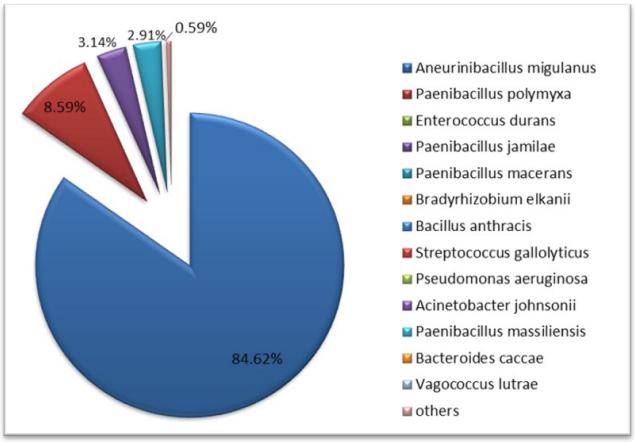
رده (Class)؛ خانواده (Family)؛ گونه (Species)	فراوانی نسبی (٪)
Aneurinibacillus migulanus ;*Paenibacillaceae* ;*Bacilli*	۸۴/۶۲
Paenibacillus polymyxa ;*Paenibacillaceae* ;*Bacilli*	۸/۵۹
Enterococcus durans ;*Enterococcaceae* ;*Bacilli*	۰/۰۰۵
Paenibacillus jamilae ;*Paenibacillaceae* ;*Bacilli*	۳/۱۴
Paenibacillus macerans ;*Paenibacillaceae* ;*Bacilli*	۲/۹۱
Bradyrhizobium elkanii ;*Bradyrhizobiaceae* ;*Alphaproteobacteria*	۰/۰۱
Bacillus anthracis ;*Bacillaceae* ;*Bacilli*	۰/۰۳
Streptococcus gallolyticus ;*Streptococcaceae* ;*Bacilli*	۰/۰۰۵
Pseudomonas aeruginosa ;*Pseudomonadaceae* ;*Gammaproteobacteria*	۰/۰۰۵
Acinetobacter johnsonii ;*Moraxellaceae* ;*Gammaproteobacteria*	۰/۰۱
Paenibacillus massiliensis ;*Paenibacillaceae* ;*Bacilli*	۰/۰۳
Bacteroides caccae ;*Bacteroidaceae* ;*Bacteroidia*	۰/۰۱
Vagococcus lutrae ;*Enterococcaceae* ;*Bacilli*	۰/۰۰۵
سایر گروه های باکتریایی	۰/۵۹



نمودار ۱: فراوانی نسبی باکتری های هتروتروف جدا شده در سطح جنس.



شکل ۲: درخت فیلوژنتیک توالی های ژن 16S rRNA سویه های جدا شده با استفاده از روش Neighbor joining و ضریب Boot Strap صد.



نمودار ۲: فراوانی های نسبی گونه های باکتریایی مشاهده شده با استفاده از پلتفرم HiSeq 2500 توالی یابی ایلومینا.

درصد از سویه های جدا شده دارای شباهتی بیش از ۹۸/۷۰ درصد با توالی های ثبت شده در بانک ژنی NCBI هستند. با این وجود جدایه های Tal-1، Tal-5، Tal-6، Tal-7، Tal-9 و Tal-10 با شباهت هایی کمتر از ۹۸/۷۰ درصد در توالی ژن 16S rRNA ممکن است متعلق به گونه های جدید بومی باشد و از منظر ارائه و ثبت در بانک های ژنی می تواند حائز اهمیت باشد.

ج) توالی یابی نسل جدید (NGS): نتایج حاصل از توالی یابی ایلومینا حاکی از غالبیت *فیرمی کوت های* (*Firmicutes*) عضو خانواده *Paenibacillaceae* با فراوانی نسبی بالای ۹۹ درصد بود. به طور کلی، مجموعا ۱۳ گونه باکتریایی با استفاده از روش توالی یابی ایلومینا در این تحقیق شناسایی شده است که فراوانی نسبی آن ها در نمودار ۲ نشان داده شده است که در این بین گونه های *آنورینی باسیلوس میگولانس* (*Aneurinibacillus migulanus*)، *پانی باسیلوس پلی میکسا* (*Paenibacillus polymyxa*)، *پانی باسیلوس جامیلا* (*Paenibacillus jamilae*) و *پانی باسیوس ماسرانس* (*Paenibacillus macerans*) به ترتیب فراوان ترین گونه های موجود در نمونه خاک بودند. همچنین گونه های *انترکوکوس دورانس* (*Enterococcus durans*)، *برادی ریزوبیوم الکانی* (*Bradyrhizobium elkanii*)، *باسیلوس آنتراسیس* (*Bacillus anthracis*)، *استرپتومایسس گالولیتیکوس* (*Streptococcus gallolyticus*)، *سودوموناس آئروژینوزا* (*Pseudomonas aeruginosa*)، *اسینتوباکتر جانسونی* (*Acinetobacter johnsonii*)، *پانی باسیلوس ماسیلینسیس* (*Paenibacillus massiliensis*)، *باکتروئیدس کاکائی* (*Bacteroides caccae*) و *واگوکوکوس لوتره* (*Vagococcus lutrae*) با فراوانی های کمتر از ۱ درصد در نمونه مشاهده شدند. فراوانی های نسبی در سطوح رده، خانواده و گونه نیز به صورت طبقه بندی شده در جدول ۴ مشخص شده است.

بحث

مطالعه جمعیت میکروبی تالاب نمکی شرق شهرستان اشتهارد به عنوان ناحیه ای بوم مرزی به دلایل متعددی از قبیل قرار گرفتن مابین تپه های رنگین کمانی نمکی اشتهارد به عنوان بازمانده ای بکر از دوران میوسن، مجاورت داشتن با حوزه آبخیز رودخانه نمکی ابهر رود به عنوان یکی از طولانی ترین

رودخانه های نمکی فلات مرکزی ایران و واقع شدن در مرکز یکی از کانون های اصلی غبار استان های تهران و البرز به لحاظ ژئومیکروبیولوژی، میکروبیولوژی تکاملی، زیست فناوری و اکولوژی بسیار حائز اهمیت می باشد (۸ و ۲۳). تاکنون مطالعات بسیاری بر روی تنوع جمعیت باکتریایی زیست بوم های تالابی پر شور ایران نظیر دریاچه ارومیه، حوض سلطان و تالاب اینچه برون انجام شده است (۶، ۲۴ و ۲۵). با این حال نواحی تالابی شهرستان اشتهارد تاکنون مورد مطالعه قرار نگرفته است و ما در این مطالعه برای اولین بار به بررسی جمعیت باکتری های تالاب نمکی شرق شهرستان اشتهارد با استفاده از روش های وابسته به کشت و نسل جدید توالی یابی (NGS) پرداختیم که منجر به شناسایی طیف متنوعی از باکتری های نمک دوست و تحمل کننده نمک شد. نتایج حاصل از هر دو روش وابسته به کشت و توالی یابی ایلومینا حاکی از غالبیت قابل توجه اعضای رده *باسیلای* (*Bacilli*) در تالاب نمکی شرق شهرستان اشتهارد به عنوان زیست بومی کوچک اما منحصر به فرد بود. در بسیاری از مطالعات پیشین نیز حضور گسترده و غالب اعضای *باسیلای* در مناطق تالابی و دریاچه های پرشور مناطق مختلف جهان گزارش شده است (۱۶، ۲۶ و ۲۷). مطالعه ای مشابه که توسط کی (Xie) و همکاران در سال ۲۰۱۷ بر روی تنوع باکتریایی دریاچه نمک قارهان کشور چین انجام شد نیز حاکی از غالبیت اعضای جنس *باسیلوس* در این دریاچه بود (۲۶). به نظر می رسد که اعضای رده *باسیلای* به خصوص جنس *باسیلوس* و جنس های نزدیک به لحاظ فیلوژنتیکی به دلیل داشتن دیواره سلولی ضخیم و غنی از پپتیدوگلیکان و محتوای بالای GC توانایی بسیار بالایی در سازگاری با محیط های پرشور همانند تالاب های پرشور و دریاچه های نمکی دارند (۲۸). همچنین نوع و ترکیب نمک های زیست بوم های پرشور از عوامل بسیار مهم دیگر در تعیین ساختار جمعیت باکتری های آن منطقه هستند (۲۹). دلگاردو-گارسیا (Delgado-García) و همکاران در سال ۲۰۱۸ در طی تحقیقی مشخص کردند که ارتباط مستقیمی میان غالبیت اعضای رده *باسیلای* و حضور یون های کربنات، بی کربنات، سولفات، منیزیم و کلسیم وجود دارد. بنابرین به نظر می رسد ترکیب نمک منطقه اشتهارد که غنی از یون های مذکور است می تواند عامل مهم دیگری بر غالبیت *باسیلای* در دریاچه نمکی شرق شهرستان اشتهارد باشد (۳۰ و ۳۱). جنس های *آنورینی باسیلوس* و *پانی باسیلوس* به عنوان اعضای رده *باسیلای* به تازگی در طبقه بندی جدید از جنس *باسیلوس* مشتق شده اند و ارتباط فیلوژنتیکی بسیار نزدیکی با جنس *باسیلوس* دارند. بر اساس نتایج به دست آمده از توالی یابی ایلومینا، مشاهده گونه *آنورینی باسیلوس میگولانس* با فراوانی نسبی بیش از ۸۴/۶۲ درصد در نمونه خاک مورد مطالعه از منظر اکولوژی و مدیریت و کنترل پوشش گیاهی این منطقه به عنوان منطقه ای غبار خیز می تواند بسیار حائز اهمیت باشد (۲۳). زیرا این باکتری به دلیل توانایی های بالقوه در بهبود رشد گیاهان، دفع پاتوژن های گیاهی از طریق تولید پپتید های ضد میکروبی و تثبیت فسفر خاک می تواند در مطالعات آینده به منظور ارتقا پوشش گیاهان شورپسند اطراف این تالاب شور که با فقر پوشش گیاهی رو برست مورد استفاده قرار گیرد (۳۲). حضور اعضای *هالوموناس* به عنوان دومین جنس غالب در میان جدایه های شناسایی شده به وسیله روش وابسته به کشت با فراوانی نسبی ۲۵ درصد در این مطالعه بسیار در خور توجه است. مطالعه ای که توسط ایران نژاد (Irannejad) و همکاران در سال ۲۰۱۵ با استفاده از روش وابسته به کشت انجام شد، غالبیت اعضای جنس *هالوموناس* در دریاچه نمک ارومیه را نشان داد (۶). همچنین در مطالعاتی دیگر با استفاده از روش های مبتنی بر کشت حضور قابل توجه *هالوموناس* در تالاب های پرشور دیگر از قبیل حوض سلطان توسط رهبان (Rohban) و همکاران در سال ۲۰۰۹ و دریاچه نمک میقان توسط ناغونی (Naghoni) و همکاران در سال ۲۰۱۷ گزارش شده است (۲۴ و ۳۳). به طور کلی اعضای جنس *هالوموناس* تحمل کنندگان نمک قوی هستند و در محیط های قلیایی پرشور به وفور یافت می شوند (۳۴). بنابر این غلظت بالای نمک و شرایط نسبتا قلیایی تالاب شرقی شهرستان اشتهارد می تواند دلیلی بر حضور گسترده اعضای جنس *هالوموناس* در

این محیط تالابی پرشور باشد (جدول ۱). برغم توانایی بسیار بالای اعضای جنس *هالوموناس* در سازش با محیط هایی با میزان بالای نمک، فراوانی اعضای جنس *باسیلوس* در رسوبات نمکی تالاب پرشور جنوب تپه های حلقه دره بیشتر بود. با توجه به اینکه *باسیلوس* ها به دلیل توانایی تولید اسپور نسبت به تنش های خشکی بسیار مقاوم هستند، به نظر می رسد که میزان رطوبت نمونه خاک رسوبی مورد مطالعه در این پژوهش که در فصل خشک جمع آوری شد، عامل تاثیر گذاری در افزایش فراوانی نسبی *باسیلوس* نسبت به *هالوموناس* بود که عمدتا در اکوسیستم های آبی پرشور مشاهده شده است و فاقد توانایی تولید اسپور می باشد (۲۸ و ۳۵). علاوه بر اعضای جنس های *باسیلوس* و *هالوموناس* به عنوان فراوانترین گروه باکتریایی از جدایه های جدا شده، جنس های *ویرجی باسیلوس*، *گراسیلی باسیلوس*، *استریتومایسس*، *نیتراتی رداکتر* و *پلانوکوکوس* نیز در میان جدایه ها مشاهده شدند. از میان سویه های جدا شده ۵۰ درصد توانایی هیدرولیز پروتئین و ۴۳/۷۵ درصد توانایی هیدرولیز نشاسته را داشتند. در ضمن از میان جدایه های مربوط به *باسیلوس* ۸۰ درصد دارای توان تولید آنزیم های پروتئاز و آمیلاز بودند و هیچ کدام از جدایه های مربوط به جنس *هالوموناس* توانایی تجزیه نشاسته و پروتئین را نداشتند. بر خلاف نتایج نام برده ، در تحقیق انجام شده در سال ۲۰۱۸ توسط قربانی رز (Ghorbani-raz) و قانع (Ghane) در موقعیت جغرافیایی نزدیک به منطقه اشتهارد، باکتری های نمک دوست تولید کننده پروتئاز از خاک های شور روستای احمد آباد ماهدشت جداسازی و شناسایی شدند که بیشترین قدرت تولید آنزیم پروتئاز مربوط به سویه *Halomonas* sp. strain HM_NG2 بود (۳۶). به طور کلی شاخص ترین باکتری های تولید کننده پروتئاز *آئروموناس* (*Aeromonas*)، *آرتروباکتر* (*Arthrobacter*) ، *آلکالیژنز* (*Alcaligenes*)، *سراشیا* (*Serratia*)، *باسیلوس*، *هالوموناس* و *سودوموناس* هستند که در این میان اعضای جنس *باسیلوس* شناخته شده ترین تولید کننده های پروتئاز می باشند (۳۷). بر اساس طبقه بندی تاکسونومیک پیشنهادی توسط استاکبرانت (Stackebrandt) و ابرز (Ebers) در سال ۲۰۰۶، جدایه های Tal-1، Tal-5، Tal-6، Tal-7، Tal-9 و Tal-10 به دلیل شباهت کمتر از ۷۰/۹۸ درصد در توالی ژن ۱۶S rRNA می توانند پس از انجام آزمایشات تکمیلی نظیر هیبریدیزاسیون DNA و مطالعات بیشتر کموتاکسونومیک و ریخت شناسی، به عنوان گونه های جدید بومی در نظر گرفته شوند (۳۸).

نتیجه گیری

در این پژوهش تنوع باکتریایی تالاب نمکی شرق شهرستان اشتهارد علاوه بر استفاده از روش وابسته به کشت و تعیین خصوصیات بیوشیمیایی، فیزیولوژیک، ریخت شناسی و توالی یابی ژن RNA ریبوزومی، با استفاده از روش غیر وابسته به کشت به واسطه نسل جدید توالی یابی (NGS) مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج حاصل از هر دو روش حاکی از حضور طیف متفاوتی از گروه های باکتریایی برغم غالبیت قابل ملاحظه اعضای جنس *باسیلوس* در این اکوسیستم تالابی شور بود. همچنین احتمال حضور گونه های جدید بومی با مشاهده تعدادی از جدایه ها با میزان شباهت کمتر از ۹۸/۷ درصد در توالی 16S rRNA در این زیست بوم پرشور منحصر به فرد وجود دارد که نیاز به پژوهش های تکمیلی دارد.

ملاحظات اخلاقی

نویسندگان تمامی نکات اخلاقی شامل عدم سرقت ادبی، انتشار دوگانه، تحریف داده ها و داده سازی را در این مقاله رعایت کرده اند.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله به دلیل همکاری های علمی در مراحل مختلف اجرای این پژوهش، از سرکار خانم آوا اسدی و سرکار خانم عاطفه صبوری زاده نهایت تشکر را دارند.

تعارض در منافع

وجود ندارد.

References

1. Darabi M, Amoozegar MA, Mehrshad M, Zamani N, Shahzadeh-Fazeli SA, Shavandi M. Molecular diversity of heterotrophic bacteria and archaea of Namakdan Cave in Qeshm. J Microb World. 2018; 11(1): 62-72. [In Persian].
2. Rahman SS, Siddique R, Tabassum N. Isolation and identification of halotolerant soil bacteria from coastal Patenga area. BMC Res Notes. 2017; 10:1-6.
3. Waditee-Sirisattha R, Kageyama H, Takabe T. Halophilic microorganism resources and their applications in industrial and environmental biotechnology. AIMS Microbiol. 2016; 2(1): 42–54.
4. Patel S, Jinal HN, Amaresan N. Isolation and characterization of drought resistance bacteria for plant growth promoting properties and their effect on chilli (*Capsicum annuum*) seedling under salt stress. Biocat Agric Biotechnol. 2017; 12: 85–89.
5. Doulatyari A, Ghaffari SM, Akhani, H. A cytological study of fourteen halophytic species of tribes *Caroxyloneae* and *Salsoleae* (Chenopodiaceae) from Iran. Cytologia. 2009; 74(1): 79–87.
6. Irannejad S, AkhavanSepahi A, Amoozegar MA, Tukmechi A, Motallebi-Moghanjoghi AA. Isolation and identification of halophilic bacteria from Urmia Lake in Iran. Iran J Fisheries Sci. 2015; 14(1): 45-59.
7. Makhdoumi A. Bacterial diversity in south coast of the Caspian sea: culture-dependent and culture-independent survey. Casp J Environ Sci. 2018; 16(3): 259-269.
8. Hosseinmardi Z, Ghorashi M, Ghassemi MR, Talebian M. Study of joints on the North Eshtehard fault related folding. Geosci Sci Quart J. 2012; 21(84): 153-160. [In Persian].
9. Walkley A, Black AI. Examination of the degtjareff method for determining soil organic matter and a proposed modification of the chromic and titration method. Soil Sci. 1934; 37(1): 29–38.
10. Olsen SR, Cole CV, Watanabe FS, Dean LA. Estimation of available phosphorus in soils by extraction with sodium bicarbonate. Washington DC. US Department of Agriculture. 1984.
11. Jackson ML. Soil chemical analysis. Prentice Hall, New Delhi. 1967.
12. Massa S, Caruso M, Trovatelli F, Tosques M. Comparison of plate count agar and R2A medium for enumeration of heterotrophic bacteria in natural mineral water. World J Microbiol Biotechnol. 1998;14(5):727-730.
13. Murray PR, Baron EJ. Manual of Clinical Microbiology: ASM Press; 2007.
14. Murray R, Doetsch RN, Robinow C. Determinative and cytological light microscopy. Method General Mol Bacteriol. 1994; 1: 22-41.
15. Obeidat M. Isolation and characterization of extremely halotolerant *Bacillus* species from Dead Sea black mud and determination of their antimicrobial and hydrolytic activities. Afr J Microbiol Res. 2017; 11(32): 1303-1314.
16. Irshad A, Ahmad I, Kim SB. Culturable diversity of halophilic bacteria in foreshore soils. Braz J Microbiol. 2014; 45(2): 563-571.
17. Satari-Faghihi L, Ahmady-Asbchin S, Seyedalipour B, Riazi G. Screening and isolation of extracellular lipase producing halophilic bacteria *Marinobacter* sp. S-14 isolated from Badab-e Surt hypersaline spring. Modares J Biotechnol. 2018; 9(3): 441-449. [In Persian].

18. Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. Mol Biol Evol. 2016; 33(7): 1870–1874.

19. Magoč T, Salzberg SL. FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies. Bioinformatics. 2011; 27(21): 2957-2963.

20. Edgar RC, Haas BJ, Clemente JC, Quince C, Knight R. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. Bioinformatics. 2011; 27(16):2194–2200.

21. Wang Q, Garrity GM, Tiedje JM, Cole JR. Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. Appl Environ Microbiol. 2007; 73(16):5261 –5267.

22. DeSantis TZ, Hugenholtz P, Larsen N, Rojas M, Brodie EL, Keller K, Huber T, Dalevi P, Hu D, Andersen GL. Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. Appl Environ Microbiol. 2006; 72(7): 5069–5072.

23. Tavaana-Mehrabani Farah. 2017. Investigate the effects of dust and urban management strategies to deal with it. Case Study: Tehran city. M.Sc. Alborz Campus University of Tehran.

24. Rohban R, Amoozegar MA, Ventosa A. Screening and isolation of halophilic bacteria producing extracellular hydrolyses from Howz Soltan Lake, Iran. J Ind Microbiol Biotechnol. 2009; 36(3): 333-340.

25. Zarparvar P, Amozegar MA, Babavalian H, Falahian MR, Tebyanian H. Isolation and identification of culturable halophilic bacteria with producing hydrolytic enzyme from Incheh Broun hypersaline wtland in Iran. Cell Mol Biol. 2016; 62(12): 31-36.

26. Xie K, DengY, Zhang S, Zhang W, Liu J, Xie Y, Zhang X, Huang H. Prokaryotic community distribution along an ecological gradient of salinity in surface and subsurface saline soils. Sci Rep. 2017; 7: 1-10.

27. Jiang H, Dong H, Yu B, Liu X, Li Y, Ji S, Zhang CL. Microbial response to salinity change in Lake Chaka, a hypersaline lake on Tibetan plateau. Environ Microbiol. 2007; 9: 2603–2621.

28. Jacob HJ. Classification of halophilic heterotrophic bacteria thriving in the Jordanian Dead Sea littoral zone. J Biol Sci. 2012; 12(4): 246-52.

29. Qianqian Z, Wakelin SA, Yongchao L, Guixin C. Soil microbial activity and community structure as affected by exposure to chloride and chloride-sulfate salts. J Arid Land. 2018; 10 (5):737–749.

30. Delgado-García MS, Contreras-Ramos M, Rodríguez JA, Mateos-Díaz JC, Aguilar CN, Camacho-Ruíz RM. Isolation of halophilic bacteria associated with saline and alkaline-sodic soils by culture dependent approach. Heliyon. 2018; 4(1):1-18.

31. Asri Y, Rabie M, Jarchi E. The study of plant associations of Eshtehard salt marshes in Karaj. Rostaniha (Botanical Journal of Iran). 2014; 15(1): 6-22. [In Persian].

32. Kaur C. Selvakumar G. Ganeshamurthy AN. 2019. Exploring the utility of *Aneurinibacillus* as a bioinoculant for sustainable crop Production and environmental applications. In: Islam MT, Rahman MM, Pandey P, Boehme MH, Haesaert G editors. *Bacilli* in climate resilient agriculture and bioprospecting. Berlin; Heidelberg: Springer. 2019: 135-142

33. Naghoni A, Emtiazi G, Amoozegar MA, Cretoiu MS, Stal LJ, Etemadifar Z, Shahzadeh-Fazeli SA, Bolhuis H. Microbial diversity in the hypersaline lake Meyghan, Iran. Sci Rep. 2017; 7(1): 1–13.

34. Shapovalova AA, Khijniak TV, Tourova TP, Muyzer G, Sorokin DY. Heterotrophic denitrification at extremely high salt and pH by haloalkaliphilic *Gammaproteobacteria* from hypersaline soda lakes. Extremophiles. 2008; 12(5): 619–625.

35. Cherekar MN, Pathak AP. Studies on Haloalkaliphilic *gammaproteobacteria* from hypersaline Sambhar Lake, Rajasthan, India. Indian J MarSci. 2015; 44(10): 1646-1653.

36. Ghorbani-raz N, Ghane M. Isolation and identification of moderately halophilic protease-producing bacteria from saline soils. J Microb World. 2018; 10(4): 322-332. [In Persian].

37. Nasre-Taheri M, Ebrahimipour G, Sadeghi H. Investigation of organic solvents-resistant extracellular alkaline protease from *Brevibacillus* borstelensis AMN isolated from hot spring of Iran. Modares J Biotechnol. 2019; 10(1): 143-150. [In Persian].

38. Stackebrandt E, Ebers J. Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards. Microbiol Today. 2006; 33: 152–155.