تنوع زیستی باکتری‌های گرم منفی نمک دوست در سواحل تنگه هرمز

تارا موسیوند[1*]، عباس اخوان سپهی[2] و شیلا صفاییان[3]

۱ و ۲- گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال
۳- گروه بیولوژی دریا، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۴/۴ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۹/۱۱

چکیده

خلیج فارس یا دریای پارس آبراهی است که در امتداد دریای عمان و در میان ایران و شبه جزیره عربستان قرار دارد. تنگه استراتژیک هرمز باریکه خمیده شکلی است که فلات ایران را از شبه جزیره عربستان جدا می‌کند و آب‌های خلیج فارس را به دریای عمان و اقیانوس هند پیوند می‌دهد. بررسی تنوع گونه‌های باکتری‌های نمک دوست موجود در سواحل تنگه هرمز که بخشی از تنوع زیستی این تنگه است، هدف از اجرای مطالعه حاضر بود. در بهمن ماه سال ۱۳۹۰ تعداد ۱۲ نمونه از آب و رسوب مناطق و عمق‌های مختلف سواحل تنگه هرمز جمع آوری و در شرایط استریل به آزمایشگاه منتقل شدند. غنی سازی نمونه‌ها در محیط اختصاصی Alkaline Peptone Water و محیط عمومی Nutrient Broth انجام گرفت. نمونه‌ها بر روی محیط‌های کشت جامد EMB، Endo و Mac Conkey Agar کشت داده شدند. در نهایت ۷۰ جدایه از محیط‌های کشت به دست آمد. سرانجام آزمون ژنتیکی بر پایه 16S rRNA Sequencing انجام گرفت. آنالیز فیلوژنتیکی سویه‌ها بر اساس 16S rRNA نشان داد که سویه‌هایی از هالوموناس به نام‌های *Halomonas alkaliphila*، *Halomonas sulfidaeris* و *Halomonas venusta* جدا سازی شد. این مطالعه نشان داد که سواحل تنگه هرمز می‌تواند محیط مطلوبی برای رشد باکتری‌های گرم منفی نمک دوست (هالوموناس) باشد که می‌توانند کاربردهای بیوتکنولوژیکی فراوان داشته باشند.

واژگان کلیدی: تنوع زیستی، تنگه هرمز، هالوموناس، 16S rRNA

* نگارنده پاسخگو: t.mousivand@yahoo.com

مقدمه

ایران دارای تنوعی از محیط‌های طبیعی است. این محیط‌ها شامل دریاها، رودخانه‌های نمکی، بیابان‌های شور، معادن نمکی و دریاچه‌های نمک است. خلیج فارس یا دریای پارس آبراهی است که در امتداد دریای عمان و در میان ایران و شبه جزیره عربستان قرار دارد. نام تاریخی این خلیج، در زبان‌های گوناگون، ترجمه عبارت خلیج فارس یا دریای پارس بوده است. مساحت آن ۲۳۷۴۷۳ کیلومتر مربع است. پس از خلیج مکزیک و خلیج هودسن سومین خلیج بزرگ جهان بشمار می‌آید. خلیج‌فارس از شرق از طریق تنگه هرمز و دریای عمان به اقیانوس هند و دریای عرب راه دارد و از غرب به دلتای رودخانه اروندرود، که حاصل پیوند دو رودخانه دجله و فرات و پیوستن رود کارون به آن است، ختم می‌شود. این خلیج توسط تنگه هرمز به دریای عمان و از طریق آن به دریاهای آزاد مرتبط است. از بین کشورهای همسایه خلیج فارس، کشور ایران بیشترین مرز آبی مشترک را با خلیج فارس دارا می‌باشد (عجم ، ۱۳۸۸).

باکتری‌های هالوفیل به عنوان منبع غذایی مهم برای تنوعی از ارگانیسم‌های دریایی به کار رفته و از محیط‌های طبیعی حمایت می‌کنند (صفاییان، ۱۳۸۳). همچنین این ارگانیسم‌ها به واسطه مداخله در پروسه‌های بیوژئوشیمیایی، به عنوان میانجی‌های بیولوژیک عمل می‌کنند (Capone, 2002). رهبان و آموزگار در سال ۱۳۸۸ تنوع زیستی باکتری‌های نمک دوست تولید کننده آنزیم‌های هیدرولیتیک ساکن در دریاچه حوض سلطان را بررسی کردند. مهرشاد و همکاران در سال۱۳۹۱تنوع زیستی باکتری‌های نمک دوست و تحمل کننده نمک سواحل غربی دریاچه ارومیه را بررسی کردند (مهرشاد و همکاران، ۱۳۹۱). باباولیان و همکاران در سال ۱۳۸۸ باکتری‌های نمک دوست تولید کننده آنزیم‌های هیدرولتیک جدا شده از دریاچه نمک آران و بیدگل را شناسایی کردند. هدف کلی در این پژوهش، بررسی اکوسیستم سواحل تنگه هرمز از نظر تنوع زیستی باکتری‌های گرم منفی نمک دوست موجود در این منطقه و شناسایی گونه‌های غالب و شاید به دست آوردن گونه‌ها یا سویه‌های جدیدی از این خانواده با هدف دستیابی به ژنوم آنها به عنوان ابزاری لازم در فناوری زیستی بود. این پژوهش در راستای گسترش بانک میکروارگانیسم‌های ایران، به گرد آوری این میکروارگانیسم‌ها می‌پردازد که به نوبه خود نمایانگر بخشی از ذخایر زیستی کشور می‌باشد. شناسایی مولکولی و همچنین تعیین سکوانس 16S rRNA و ثبت ژنتیکی سویه‌های جدا شده از سواحل تنگه‌هرمز، از اهداف دیگر این مطالعه محسوب می‌شود. در نتیجه، هدف کاربردی این پژوهش، ارائه ذخائر ژنتیکی جدید برای استفاده در زمینه‌های وسیع بیوتکنولوژی و نیز ایجاد بانک اطلاعاتی برای میکرو ارگانیسم‌های مربوطه در سواحل تنگه هرمز می‌باشد.

مواد و روش‌ها

نمونه برداری

نمونه برداری در بهمن ماه سال ۱۳۹۰ انجام گرفت، ۱۲ نمونه آب و رسوب از اعماق مختلف ۱، ۳، ۵ و ۷ متری آب‌های سواحل تنگه‌هرمز از ایستگاه‌هایی با آلودگی متفاوت (بندرعباس، میناب، بندر خمیر) جمع آوری و توسط شیشه‌های استریل درب‌دار در شرایط استریل و سرد ۴°C به آزمایشگاه منتقل شد. میزان دما، pH، شوری و اکسیژن محلول، هدایت الکتریکی و کدورت نمونه‌ها تعیین شد. نمونه برداری رسوبات در سواحل و از اعماق مختلف توسط قایق انجام گرفت. کلیه اعداد جدول (۱) بعد از اندازه‌گیری دقیق ثبت شدند.

جدول۱- مختصات و میانگین پارامترهای فیزیکوشیمیایی اندازه‌گیری شده آب‌های ساحلی استان هرمزگان

نام ایستگاه	مختصات جغرافیایی		T°C	Salinity ppt	pH	DO g/lit	Cond mSiemens/cm	Turb mg/ lit
	E	N						
بندر خمیر	۵۵°۳۶' ۱۳.۰۲"	۲۶°۵۶' ۸۴.۳۲"	۲۱/۰۲	۶۵/۳۵	۵۳/۸	۹۵/۸	۵۳/۹۴	۱۵/۵
بندر عباس	۵۴°۱۵' ۵۳.۵۶"	۲۷°۱۰' ۲۳.۱۶"	۲۰/۱۰	۴۰/۳۵	۵۲/۸	۲۳/۹	۵/۵۳	۳/۰
میناب	۵۴°۵۱' ۱۶.۴۰"	۲۷°۰۶' ۴۳.۴۷"	۲۱/۰۲	۴۰/۰	۷۹/۸	۹۶/۸	۶۲/۰۰	۱۷/۰

روش پورپلیت (Pour-Plate Method)

در ابتدا غنی‌سازی نمونه‌ها، در محیط مغذی Nutrient Broth و Alkaline Peptone Water انجام گرفت. نمونه‌ها پس از جمع‌آوری، به منظور بررسی تنوع زیستی بر روی محیط‌های مختلف از جمله (Mac Conkey ,Endo, Plate count Agar) Agar, EMB پورپلیت شد. برای جداسازی باکتری‌های متنوع و تهیه محیط کشت خالص، روش پورپلیت (Pour-Plate Method) که به آن روش رقت سریال در پلیت حاوی آگار نیز گفته می‌شود، به کار رفت (مهبد و همکاران،۱۳۹۰). در این روش، سوسپانسیون میکروبی بصورت سری رقیق شد. ۱۰ لوله حاوی ۹ میلی‌لیتر آب مقطر استریل تهیه شد. سپس توسط اتوکلاو استریل و شماره گذاری انجام گرفت. با استفاده از پی‌پت‌های استریل، یک میلی‌لیتر از نمونه مورد آزمایش را به لوله شماره یک اضافه و مخلوط گردید (رقت در لوله اول ۰/۱)، از لوله اول ۱ میلی لیتر به لوله دوم اضافه و این عمل مرتباً تا لوله آخر تکرار شد. برای برابر شدن حجم تمامی لوله‌ها از لوله آخر ۱ میلی‌لیتر بیرون ریخته شد. رقت هر لوله با لوله قبل ۰/۱ اختلاف داشت. سپس برای هر لوله یک پلیت استریل در نظر گرفته شد و بر روی پلیت‌ها شماره لوله و سایر مشخصات قید گردید. داخل هر پلیت ۱ میلی‌لیتر از هر کدام از رقت‌های مربوطه ریخته شد و به آن ۲۰-۱۵ میلی‌لیتر از انواع محیط‌های کشت استریل شده با تنظیم نمک و pH تا دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد خنک شده اضافه شد. پلیت‌ها به منظور مخلوط شدن سوسپانسیون میکروبی با محیط مغذی آگاردار با حرکت دورانی در جهت و در خلاف جهت عقربه‌های ساعت تکان داده شد تا یکنواخت پخش شده و سرد گردد و به حالت جامد درآید. پس از جامد شدن پلیت‌ها در دمای ۲۹ درجه سلسیوس به مدت ۴۸-۲۴ ساعت قرار شدند تا کلنی‌ها بخوبی و مجزا از هم رشد کنند. سپس جداسازی باکتری‌ها از هم صورت گرفت و برای تهیه کشت خالص از پلیت‌های مشابه محیط‌های کشت در پورپلیت استفاده گردید و در دمای ۲۹ درجه سلسیوس گرماگذاری شدند (مهبد و همکاران،۱۳۹۰).

کشت

پس از پورپلیت و ایجاد کدورت و ظاهر شدن کلنی‌ها، کلنی‌های تک بر روی محیط‌های آگار دار EMB, Endo Mac Conkey Agar به صورت کشت خطی ۴ مرحله‌ای کشت داده شدند (Baron & Finegold,2003). سترون سازی کلیه محیط‌ها در دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس، فشار ۱۵psi و زمان ۱۵ دقیقه انجام شده است. محیط‌های Endo, Mac EMB Conkey Agar با pH= ۸ و با شوری ذکر شده در جدول (۱) استفاده شدند.

شناسایی مولکولی سویه‌های منتخب

سویه‌های خالص شده از نظر ویژگی‌های ریخت

شناسی (شکل میکروسکوپی و ماکروسکوپی)، فیزیولوژیکی (حرکت) دسته بندی شدند. پس از حذف سویه‌های تکراری، تکنیک PCR و مطالعات فیلوژنتیکی انجام گرفت. شناسایی تکمیلی با تکثیر و تعیین توالی ژن 16S rRNA انجام شد. برای این منظور، ابتدا از جدایه‌ها توده زیستی تهیه شده و پس از استخراج DNA ژنومی تکثیر ژن مربوط به زیر واحد کوچک ریبوزومی صورت گرفت.

این تکثیر با استفاده از پرایمرهای عمومی 16S rRNA، 27F و R۱۴۹۲ شرکت سیناژن با توالی‌های (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') و (5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3') از طریق واکنش زنجیره‌ای پلیمراز انجام شد (Wilson, 1987).

استخراج DNA ژنومی و تکثیر ژن 16S rRNA با استفاده از الکتروفورز ژل آگاروز انجام شد. برای استخراج DNA ژنومی سویه‌های جدا شده، از کیت استخراج باکتری گرم منفی IBRC (مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران) استفاده شد. اندازه مارکرها 10000bp می‌باشد. واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر انجام گرفت. کمیت مواد PCR اضافه شده به لوله‌های اپندورف مخصوص واکنش به صورت زیر بود:

آب PCR: ۱۸/۳ میکرولیتر، بافر PCR: ۲/۵ میکرولیتر، dNTPs: ۱ میکرولیتر، پرایمر Reverse: ۱ میکرولیتر، پرایمر Forward: ۱ میکرولیتر، محصول استخراج: ۱ میکرولیتر، آنزیم Taq DNA پلیمراز به میزان ۰/۲ میکرولیتر. چرخه تکثیر شامل: ۳۰ سیکل می‌باشد. برنامه PCR مطابق جدول شماره (۲) انجام گرفت:

جدول۲- مشخصات زمانی و دمایی روش PCR

مراحل واکنش	دما (درجه سلسیوس)	زمان (دقیقه)
Pre denaturation	۹۴	۳
Denaturation	۹۴	۱
Annealing	۵۵-۵۸	۱
Extention	۷۲	۱/۵
Last Extention	۷۲	۱۰
Hold Time	۲۵	sec ۱۰

محصول نهایی حاصل از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز توسط روش ختم سنتز DNA به شکل رفت و برگشت تعیین ترادف شد (شرکت ماکروژن کره جنوبی). سپس توالی‌های حاصل از Sequencing با استفاده از برنامه Chromas Pro ویرایش شده و در فرمت FASTA ذخیره شدند. به کمک نرم‌افزار Blast در پایگاه EzTaxon، با سایر داده‌های مندرج در Gen Bank مورد مقایسه قرارگرفت و درصد تشابه سویه‌های به دست آمده با انواع شناخته شده آنها تعیین گردید (Chun *et al.*, 2007). در نهایت رسم درخت فیلوژنتیک با استفاده از نرم‌افزار MEGA (ویرایش پنجم) و با الگوریتم Neighbor-Joining صورت گرفت (Kumar *et al.*, 2012; Saitou *et al.*, 1987). بررسی اعتبار شاخه‌های درخت با استفاده از الگوریتم Analysis Bootstrap انجام شد. توالی‌های حاصل از این پژوهش در بانک ژنی NCBI ثبت گردید (Felsenstein, 1985).

نتایج

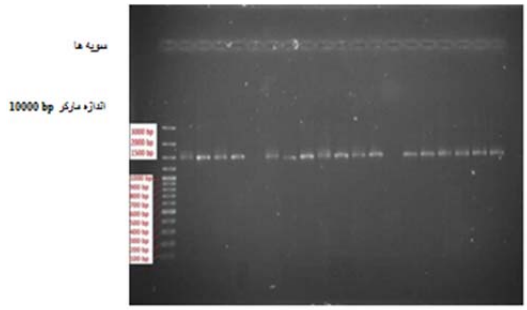
در نتیجه شناسایی مولکولی، تعداد ۱۰۰ جدایه از نمونه‌ها و محیط‌های مختلف جداسازی شد. تعداد

جدایه‌ها در بندرعباس ۴۲ در بندر خمیر ۳۳ و در سواحل میناب ۲۵ جدایه بود. در مجموع از ۱۰۰ باکتری خالص جدا شده، ۳۰ باکتری گرم مثبت و ۷۰ باکتری گرم منفی از نمونه‌های مختلف جدا شد.

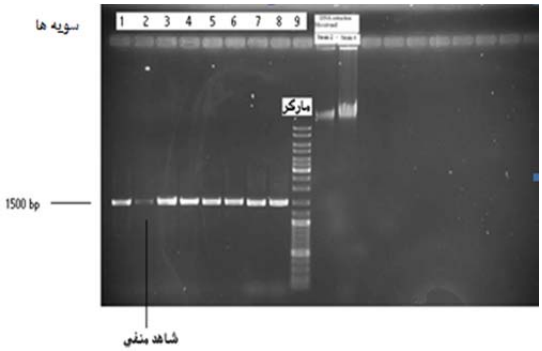
پس از استخراج DNA ژنومی جدایه‌های منتخب، با روش الکتروفورز ارزیابی و صحت استخراج بررسی شد (شکل ۱).

باندهای به دست آمده از استخراج DNA ژنومی جدایه‌های منتخب به دلیل اینکه به یک خانواده تعلق داشتند، دارای اشکال مشابه بودند. پس از انجام تکنیک PCR، ژن 16S rRNA سویه‌های منتخب تکثیر شده و باندهای به دست آمده توسط الکتروفورز بررسی شدند (شکل ۲).

نتایج حاصل از مقایسه سویه‌های منتخب از نظر میزان شباهت در توالی ژن 16S rRNA با سویه‌های استاندارد ثبت شده در پایگاه داده ExTaxon در جدول (۳) آورده شده است. درصد تشابه این سویه‌ها با انواع شناخته شده مقایسه شده است.



شکل۱- باند به دست آمده از استخراج DNA ژنومی جدایه‌های منتخب



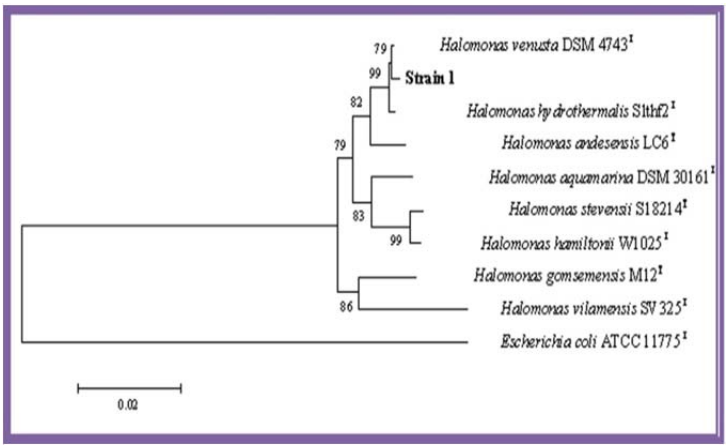
شکل۲- باند حاصل از PCR بر روی ژل آگاروز یک درصد

جدول۳- مقایسه میزان شباهت ژن 16S rRNA سویه‌های منتخب با سویه‌های استاندارد

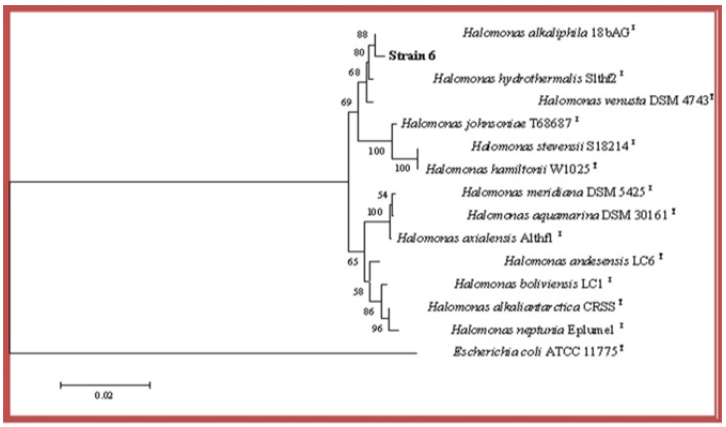
سویه بررسی شده	محدوده مورد انتظار
Strain 1 (RB)	نتایج حاصل از توالی خوانی ژن 16S rRNA نشان داد سویه مذکور با ۱۳۴۲ نوکلئوتید به میزان ۹۹/۶٪ باسویه Halomonas *venusta* DSM 4743(T) به شماره دسترسی AJ 306894 قرابت فیلوژنی دارد. (به دلیل تشابه ۹۹/۶٪ می‌تواند سویه جدیدی باشد.)
Strain 4 (B1)	نتایج حاصل از توالی خوانی ژن 16S rRNA نشان داد سویه مذکور با ۱۳۶۶ نوکلئوتید به میزان ۹۸/۸٪ باسویه *Halomonas sulfidaeris* ATCC BAA-803(T) به شماره دسترسیAF 212204 قرابت فیلوژنی دارد. (به دلیل تشابه ۹۸/۸٪ می‌تواند سویه جدیدی باشد.)
Strain 6 (RM)	نتایج حاصل از توالی خوانی ژن 16S rRNA نشان داد سویه مذکور با ۱۳۹۸ نوکلئوتید به میزان ۹۹/۹٪ باسویه *Halomonas alkaliphila* 18 bAG(T) به شماره دسترسی AJ 640133 قرابت فیلوژنی دارد. (به دلیل تشابه ۹۹/۹٪ می‌تواند سویه جدیدی باشد.)

درخت فیلوژنتیک کلی برای مقایسه وضعیت سویه‌های مورد بررسی و درخت فیلوژنتیک رسم شده برای سویه‌های متعلق به هر شاخه، به تفکیک شاخه‌های مختلف به ترتیب در شکل‌های (۳، ۴ و ۵)

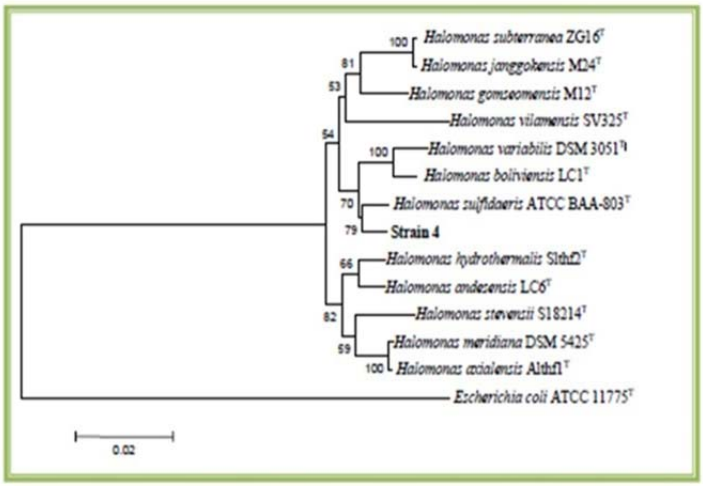
آورده شده است. درخت فیلوژنتیکی سویه‌های انتخاب شده به روش neighbor- joining و با نرم‌افزار MEGA 5 رسم شد. در این سویه‌ها *Escherichia coli* ATCC 11775^T به عنوان Outgroup انتخاب شده است و اعداد ذکر شده در بخش انشعاب نشانگر فاصله ژنی است.



شکل۳- درخت فیلوژنتیکی سویه منتخب Strain 1



شکل۴- درخت فیلوژنتیکی سویه منتخب Strain 6



شکل۵- درخت فیلوژنتیکی سویه منتخب Strain 4

بحث و نتیجه‌گیری

در این پژوهش برای جدا سازی باکتری‌های گرم منفی، از محیط‌های کشت اختصاصی گرم منفی‌ها (EMB Agar, Endo Agar, MacConkey Agar) استفاده شده است. این محیط‌های انتخابی پایه باعث جدا سازی باکتری‌های گرم منفی شده و از رشد گرم مثبت‌ها جلوگیری می‌کند، تمامی محیط‌ها حاوی درصدهای نمک و همچنین pH و دمای متناسب با محل‌های نمونه برداری بودند. با آزمایش‌های دقیق مولکولی سویه‌هایی از هالوموناس به نام‌های *Halomonas venusta*، *Halomonas alkaliphila*، *Halomonas sulfidaeris* جدا سازی شد. این پژوهش منجر به جدا سازی باکتری‌های گرم منفی نمک دوست نسبی شد که اعضای جنس هالوموناس هستند و 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 فرآیندهای صنعتی مطلوب هستند. ارگانیسم‌های هالوفیل در هر سه قلمرو از حیات، آرکی‌ها، باکتری‌ها و یوکاریوت‌ها وجود دارند. در بین قلمرو یوکاریوت‌ها، هالوفیل‌ها نادر هستند. قلمرو باکتری‌ها انواع زیادی از میکرو ارگانیسم‌های هالوفیل که به صورت شمار زیادی از گروه‌های فیلوژنتیک گسترده شده است را شامل می‌شود (Oren, 2002; Ventosa *et al*., 1998) .در مطالعات انجام گرفته پیشین، گونه‌های گرم منفی نمک دوست از مناطق مختلف دنیا گزارش شده است. در بررسی انجام شده برروی تالاب Death Valley در کالیفرنیا با رشد اپتیموم در دمای ۳۷°C و pH=۷/۳ و ۲/۵ NaCl درصد نمونه‌هایی از باکتری‌های هالوفیل نسبی جدا سازی شد. همچنین این دسته از باکتری‌ها قبلاً از غذاهای نمک سود شده نیز جدا سازی شده‌اند (Huang *et al*., 2000). بیشتر باکتری‌های گرم منفی هتروتروفیک متعلق به جنس‌های *Halomonas* توصیف شده‌اند و از این نظر با پژوهش حاضر مطابقت دارد (Kamekura, 1998; Ventosa *et al*., 1998). در تحقیقی که توسط زنجیربند و همکاران در سال ۱۳۸۸ انجام شد، باکتری‌های نمک‌دوست خلیج فارس و حوزه تحقیقاتی آب شور مرودشت و کارخانه‌ی چرم‌سازی مورد مطالعه و بررسی قرار گرفته و مورفولوژی و واکنش گرم باکتری‌ها تعیین شد. دامنه‌ی تحمل نمک در آن‌ها به عنوان اولین مرحله‌ی غربالگری مورد بررسی قرار گرفته بود و در دومین مرحله غربالگری باکتری‌های دارای پیگمان و آنزیم انتخاب و در حد گونه با استفاده از آزمایش‌های بیوشیمیایی شناسایی شدند. باکتری‌های جداسازی شده در این تحقیق متعلق به جنس‌های *Halomonas*, *Halobacillus* بودند. همچنین نتایج PCR نشان داد ۷۵ درصد باکتری‌ها متعلق به جنس *Halomonas* با پرایمرهای عمومی طراحی شده برای این جنس PCR مثبت بودند که دلالت بر حضور ژن ectC در این باکتری‌ها دارد و با توجه به جداسازی باکتری *Halomonas* با پژوهش حاضر شباهت دارد (زنجیر بند و همکاران، ۱۳۸۸). جنس *Halomonas* به طور وسیعی در دریاها و محیط‌های شور جدا شده است (Ventosa *et al*.,1998).

باکتری‌های گرم منفی بزرگ‌ترین و متنوع‌ترین گروه پروکاریوت‌های شیمیو هترو تروفیک دریایی هستند (Baumann *et al*., 1981). بر اساس مطالعات اولیه انجام شده توسط Zobell و همکاران در سواحل جنوبی کالیفرنیا، مشخص شد که بیشتر باکتری‌های دریایی گرم منفی می‌باشند و باکتری‌های گرم مثبت معمولاً به میزان کمتر از ۱۰ درصد کل جمعیت را شامل می‌شوند، به نظر می‌رسد که دیواره سلولی باکتری‌های گرم منفی با محیط دریا تطبیق بیشتری یافته‌اند. در همان تحقیق در آزمون با پلیت آگاردار که با آب دریا گرما گذاری شده بود، این درصد تا ۹۵ درصد هم افزایش یافت (Zobell *et al*., 2011). در آزمونی که بر روی آب‌های زیرزمینی نقاط مختلف از کوه‌های هارز واقع در آلمان صورت گرفت، روشن شد

که بیشتر باکتری‌های آب‌های زیرزمینی، گرم منفی، بدون اسپور و میله‌ای است (Safaeian *et al*., 2009). این یافته‌ها با نتایج پژوهش حاضر که ۷۰ درصد باکتری‌های جدا شده گرم منفی و ۳۰ درصد گرم مثبت گزارش شد، مطابقت نشان می‌دهد.

تنگه هرمز از جایگاهی بسیار مهم برای کشور ایران برخوردار است و در حقیقت دروازه ارتباطی ایران با جهان و منطقه شمرده می‌شود. به دلیل فقدان مدیریت صحیح و عدم آگاهی از بیماری‌های موجود، تعدادی از کشورها در سال‌های اخیر متحمل خسارات جبران ناپذیری شده‌اند. شماری از بیماری‌های گزارش شده در مراحل مختلف در سواحل جنوبی کشور مربوط به آلودگی‌های باکتریایی است. به همین دلیل تلاش برای بررسی تنوع گونه‌های مختلف باکتری‌های موجود در سواحل تنگه هرمز که بخشی از تنوع زیستی این تنگه است، حائز اهمیت می‌باشد. این مطالعه نشان داد که سواحل تنگه هرمز می‌تواند محیط مطلوبی برای رشد باکتری‌های گرم منفی هالوفیل باشد که می‌توانند کاربردهای بیوتکنولوژیکی فراوان داشته باشند. در بررسی جوامع میکروبی افزایش تعداد نمونه به اندازه افزایش تعداد نمونه در جوامع گیاهی و جانوری مؤثر و قابل تعمیم به واقعیت نیست. اما با افزایش تعداد نمونه‌ها نتایج قابل قبول‌تری به دست می‌آید. آنالیز فیلوژنتیکی سویه‌ها بر اساس rRNA 16S نشان داد که سویه‌هایی از هالوموناس به نام‌های *Halomonas alkaliphila*، *Halomonas sulFidaeris* و *Halomonas venusta* جدا سازی شده‌اند. در سال‌های اخیر با بکارگیری روش‌های فیلوژنتیک مولکولی در نمونه‌های محیطی و طبقه‌بندی میکروارگانیسم‌ها بر اساس توالی 16S rRNA آن‌ها، فراوانی قابل توجهی از میکروارگانیسم‌ها به دست آمده است که فاصله ژنتیکی زیادی با نزدیک‌ترین گونه‌های کشت شده نشان می‌دهد (Pace *et al*., 1977).

بر اساس نتایج به دست آمده، به کار گیری روش‌های پلی فازیک شامل استفاده همزمان از روش‌های سنتی وابسته به کشت و روش‌های مولکولی بهترین نتیجه در معرفی تنوع زیستی منطقه را ارائه می‌دهد.

سپاسگزاری

بدین وسیله از همکاری معاون وقت محترم محیط زیست دریایی سازمان حفاظت محیط زیست، جناب آقای دکتر کرباسی و همچنین از همکاری کارشناسان محترم اداره کل محیط زیست استان هرمزگان، سرکار خانم دودی و جناب آقای محوری که در نمونه برداری مشارکت داشتند و کارشناسان محترم آزمایشگاه محمودیه، خانم‌ها مظهر و رضوی پور صمیمانه سپاسگزاری می‌شود.

منابع

باباولیان، ح.، آموزگار، م. ع.، و پوربابایی، ا. ع. ۱۳۸۸. شناسایی و تعیین خصوصیات باکتری‌های نمک دوست تولید کننده آنزیم‌های هیدرولتیک جدا شده از دریاچه نمک آران و بیدگل. مجله زیست شناسی ایران، ۲۳(۱): ۴۵-۲۴.

رهبان، ر. و آموزگار، م. ع. ۱۳۸۸. بررسی تنوع زیستی باکتری‌های نمک دوست تولید کننده آنزیم‌های هیدرولیتیک ساکن در دریاچه حوض سلطان. فصلنامه علوم و تکنولوژی محیط زیست، ۱۱(۴): ۲۶۷-۲۵۱.

زنجیربند، م.، گلبانگ، ن. و کسری کرمانشاهی، ر. ۱۳۸۸. جداسازی باکتری‌های نمک دوست نسبی تولید کننده آنزیم‌های هیدرولاز خارج سلولی و تحمل کننده نمک و بررسی اثر غلظت نمک سدیم کلراید بر تولید آنزیم. مجله زیست شناسی ایران، ۲۲(۳): ۴۹۷-۴۹۰.

صفاییان، ش. ۱۳۸۳. میکروبیولوژی محیط‌های آبی. انتشارات احسن. تهران.

عجم، م. ۱۳۸۸. اسناد نام خلیج فارس، میراثی کهن و جاودان. انتشارات اوین. ایران.

مهبد، ا. س. ع.، محمدی، م.، حمیدی فرد، م. و موسوی، س. ر. ۱۳۹۰. تکنیک‌های عملی در آزمایشگاه تشخیصی. انتشارات کتاب میر. ایران.

مهرشاد، م.، آموزگار، م. ع.، یخچالی، ب. و شهزاده فاضلی، ا. ۱۳۹۱. تنوع زیستی باکتری‌های نمک دوست و تحمل کننده

نمک سواحل غربی دریاچه ارومیه. زیست شناسی میکروارگانیسم‌ها، ۲: ۷۰-۴۹.

Baron, E. J. & Finegold, S. M. 2003. Bailey & Scott's diagnostic microbiology. 11th ed. St. Louis. Mosby. USA.

Baumann, P. & Baumann, L. 1981. The marine gram-negative eubacteria: genera *Photobacterium*, *Beneckea*, *Alteromonas*, *Pseudomonas*, and *Alcaligenes*: In *The Prokaryotes*, Starr, M. P., Stolp, H., Trüper, H. G., Balows, A., Schlegel, H. G. (edit.). Springer. Berlin.

Capone, D. G. 2002. Microbial nitrogen cycle. In: Manual of environmental microbiology. Aurstic, C. J. & Crawford, R. L. (edit.). American Society for Microbiology (ASM) Press. Washington D.C.

Chun, J., Lee, J.H., Jung, Y., Kim, M., Kim, S., Kim, B. K. & Lim, Y.W. 2007. EzTaxon: a web-based tool for the identification of prokaryotes based on 16S ribosomal RNA gene sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology,* 57: 2259-2261.

Deborah, B., Melissa, A., Miller, S. C., Oates, B. A., Byrne, S. J., Michael, J. M., Verena, A. G. & David, A. J. 2011.Susceptibility of bacterial isolates from sea otters (*Enhydra lutris*). *Journal of Wildlife Diseases*, 47: 278-292.

Felsenstein, J. 1985. Phylogenies and the comparative method. *American Naturalist*, 125:1-15.

Huang, F., Garcia, C. Y., Cayot, B. K. C. & Mah, R. A. 2000. *Salinivibrio costicola* subsp. *Vallismortis* subsp. nov, a halotolerant facultative anaerobe from death valley, and emended description of *Salinivibrio*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology,* 50: 615-622.

Kamekura, M. 1998. Diversity of extremely halophilic bacteria. *Extermophils*, 2:289-295.

Kumar, S., Stecher, G., Peterson, D. & Tamura, K. 2012. MEGA-CC: Computing core of molecular evolutionary genetics analysis program for automated and iterative data analysis. *Bioinformatics*, 28:2685-2686.

Oren, A. 2002. Diversity of halophilic microorganisms: Environments, phylogeny, physiology and Applications. *Industrial Microbiology and Biotechnology*, 28: 56-63.

Oren, A. 2002. Molecular ecology of extremely halophilic Archaea and Bacteria. *FEMS Microbiology Ecology*, 39:1-7.

Pace, N. 1977. A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science*, 276: 734.

Safaeian, S., Hosseini, H., Abbas Pour, A. & Farmohamadi, S. 2009. Antimicrobial activity of marine sponge extracts of offshore zone from Nay Band Bay, Iran. *Journal of Medical Mycology Medical,* 19 (1): 11-16.

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

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

Ventosa, A., Nieto, J. J. & Oren, A. 1998. Biology of moderately halophilic aerobic bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews,* 62:504-544.

Wilson, K. 1987. Preparation of genomic DNA from bacteria. In: Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., Struhl, K. (editors). Current protocols in molecular biology. Vol. 1. N.Y. Wiley Interscience, Brooklyn.

Zobell, C. E. & Upham, H. C. 1944. A list of marine bacteria including sixty new species. *Bulletins of the Scripps Institution of Oceanography*, 5: 239- 292.