بررسی فنوتیپی و ژنوتیپی انواع باکتری‌های *Halomonas sp.* دریاچه ارومیه

شبنم ایران نژاد[۱]، عباس اخوان سپهی *[۱و۲]، محمد علی آموزگار[۲و۳]، امیر تکمه چی[۴] و راحله پوری[۵]

۱- گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال
۲- مرکز ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران، جهاد دانشگاهی دانشگاه تهران
۳- آزمایشگاه اکستریموفیل ها، گروه میکروبیولوژی، دانشکده زیست شناسی، پردیس علوم دانشگاه تهران
۴- گروه پاتوبیولوژی و کنترل کیفی، پژوهشکده آرتمیا و جانوران آبزی، دانشگاه ارومیه
۵- گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران

تاریخ دریافت: ۹۱/۳/۳۱ تاریخ پذیرش: ۹۱/۱۰/۲۸

چکیده

دریاچه ارومیه به عنوان دومین دریاچه شور دنیا و یکی از معدود دریاچه های فوق اشباع دائمی در جهان، دارای تنوع زیستی وسیعی از انواع میکروارگانیسم های هالوفیل و هالوتولرنت است. در این پژوهش اعضایی از جنس *Halomonas* که شامل باکتری های هالوفیل نسبی می باشند، از دریاچه ارومیه پس از جداسازی مورد بررسی های فنوتیپی و ژنوتیپی قرار گرفتند. نمونه ها از مناطق مختلف دریاچه ارومیه جمع آوری و در شرایط استریل به آزمایشگاه منتقل شدند. سپس برای جداسازی از محیط های Alkaline Peptone Water (APW)، Nutrient Broth (NB)، Nutrient Agar (NA)، MacConkey Agar (MAC) همراه با ۵ و ۱۰درصد نمک استفاده شد. کشت های مربوطه به مدت ۴۸-۲۴ ساعت در دمای ۳۷-۳۵ درجه سانتی گراد گرماگذاری شدند . برای دستیابی به کلنی های خالص، کشت های متوالی صورت گرفت. در نهایت ۸۰ سویه به دست آمد. این سویه‌ها بر اساس ویژگی های مورفولوژیک و فنوتیپی مورد مطالعه قرار گرفتند. همچنین تست‌های تشخیصی و بیوشیمیایی و تست تحمل نمکی بر روی سویه‌های جداسازی شده انجام شد. جهت انجام مطالعات ژنوتیپی و بررسی‌های فیلوژنتیکی، ۱۵ سویه برای آزمون ژنتیکی بر پایه Sequencing ۱۶S rRNA انتخاب شدند. برای این منظور DNA ژنومی باکتری های منتخب استخراج و توسط تکنیک PCR تکثیر شده و نتایج حاصل از Sequencing ۱۶S rRNA توسط نرم افزار های مربوطه ویرایش و تشابه توالی این سویه ها در مقایسه با انواع ثبت شده در بانک ژنی پایگاه اطلاعاتی EzTaxon آنالیز شد. ۶ سویه متعلق به *Halomonas* بودند که درخت

* نگارنده پاسخگو: akhavansepahy@gmail.com

فیلوژنتیکی آنها به روش neighbour-joining رسم گردید. این سویه ها از نظر فیلوژنتیک متعلق به گونه های *Halomonas janggokensis*, *Halomonas gomseomensis*, *Halomonas boliviensis*, *Halomonas andesensis* بودند. میزان تشابه برای *Halomonas janggokensis* و *Halomonas gomseomensis* بیش از ۹۹درصد بود. برای *Halomonas boliviensis* و نیز نیمی از *Halomonas andesensis* جداسازی شده، تشابه بین ۹۸/۹-۹۷درصد نشان داده شد. نیم دیگر از *Halomonas andesensis* تشابه ۹۴/۲ درصد را با نزدیکترین سویه های ثبت شده در ژن بانک داشتند. با انجام مطالعات تکمیلی مانند هیبریداسیون DNA-DNA و تعیین محتوای G+C و ... ، این سویه ها ممکن است در گونه های جدیدی قرار گرفته و نمایندگانی از سویه های بومی دریاچه ارومیه باشند.

واژگان کلیدی: فنوتیپ ، ژنوتیپ ، هالوفیل ، *Halomonas sp.* ، دریاچه ارومیه

مقدمه

میکروارگانیسم هایی که برای رشد احتیاج به محیط های دشوار (Extrim) دارند، اکستریموفیل (Extremophile) نامیده می شوند(MacElroy, ۱۹۷۴). هالوفیل ها (Halophiles) گروهی از اکستریموفیل ها هستند که قابلیت زنده ماندن در محیط های شور را دارند (Grant *et al.*, ۱۹۹۸).

محیط های شور با غلظت نمک در حد اشباع و یا حتی فوق اشباع ، شاید در نگاه نخست خالی از حیات به نظر برسند و تصور شود هیچ موجود زنده ای قادر به زیست در شرایط شوری بالای آن نباشد. حال آنکه این محیط ها جایگاه زندگی انواع گسترده ای از میکروارگانیسم های نمک دوست هستند. مطالعه زندگی میکروارگانیسم‌های محیط های پر شور به لحاظ بررسی و سنجش توانایی های ویژه آن ها در تحمل شرایط دشوار، تولید انواع متابولیت ها، تجزیه ماکرومولکول‌های گوناگون و پالایش زیستی دارند، مورد توجه پژوهشگران می باشد (Sanchez-Porro *et al.*, ۲۰۰۳).

هالوفیل ها در هر سه قلمرو حیات آرکی ها، باکتری ها و یوکاریوت ها یافت می شوند. محیط های پرشور به دلیل داشتن شرایط دشوار، تنوع میکروبی کمتری نسبت به محیط های معمولی دارند. اما تنوع فیلوژنتیکی میکروارگانیسم هایی که در غلظت‌های شوری بالا زندگی می کنند، شگفت انگیز است (Oren, ۲۰۰۲b).

میکرب های نمک دوست در حوضچه های استحصال نمک از دریاها که هاله های بنفش و صورتی تولید می‌نمایند در میان ابتدائی ترین میکروارگانیسم هایی هستند که شناخته و توصیف شده‌اند. اولین توصیف واقعی از میکروارگانیسم‌های نمک دوست (*Halobacterium*) توسط Klebahn در سال ۱۹۱۹ از ماهی های نمک سود شده که به رنگ قرمز درآمده بودند، گزارش شد (Klebahn, ۱۹۱۹). تلاش ها جهت جداسازی این گروه از میکروارگانیسم ها در دهه های بعد نیز ادامه یافت. در میان میکروارگانیسم های شدیدا نمک دوست، تمایز بین

آرکی ها و باکتری های نمک دوست در سال های دهه ۱۹۷۰ از طریق کارهای مولکولی و فیلوژنتیکی دکتر Carl Woeseمعلوم شد. وی وجود سه قلمرو زیستی را برای آنها مطرح کرد (DasSarma & Arora, ۲۰۰۱).

همچنین جنبه های مختلف تاکسونومی هالوفیل ها به ویژه هالوفیل های نسبی(میانه رو) توسط محققین، در چندین پژوهش مورد مطالعه و بررسی قرار گرفته است (Ventosa, ۱۹۸۸, ۱۹۹۴; Ventosa *et al.*, ۱۹۹۸). اکثر باکتری های هالوفیل نسبی هتروتروف و گرم منفی، به جنس های *Halomonas* و *Chromohalobacter* تعلق دارند (DasSarma & Arora, ۲۰۰۱). قلمرو باکتری ها نوعا شامل انواع زیادی از میکروارگانیسم های هالوفیل و هالوتولرنت هستند که در شمار زیادی از زیر گروه های فیلوژنتیکی پخش شده اند و بیشتر آنها در خانواده *Halomonadaceae* (رده Gammaproteobacter و راسته Oceanospirillales) قرار داشته و بیشتر هالوفیل های نسبی هستند تا هالوفیل های افراطی (Oren, ۲۰۰۲a).

خانواده هالوموناداسه (*Halomonadaceae*) شامل سه جنس هالوفیل: *Halomonas* ، *Chromohalobacter* و *Cobeta* و همچنین دو جنس غیر هالوفیل: *Zymobacter* و *Carnimonas* می باشد (Ventosa *et al.*, ۲۰۰۸).

گونه های متعددی از *Halomonas* توانایی احیای نیترات را دارند. همچنین برخی از آنها قادر به تولید اگزو پلی ساکاریدها بوده و عمدتا گلایسین، بتائین و اکتوئین را به عنوان مواد محلول همساز (Compatible Solutes) بکار می برند. (مواد محلول همساز ترکیبات آلی هستند که در این میکروارگانیسم ها ذخیره شده و اثرات زیان آور شوری های بالا را در آنها خنثی می کنند) (DasSarma & Arora, ۲۰۰۱; Oren, ۲۰۰۲a).

بیشتر تولید کننده های هیدرولازهای هالوفیلیک اختصاص به خانواده *Halomonadaceae* دارند و آنزیم های صنعتی مختلفی مانند: سلولاز، آمیلاز، گزیلاناز، پروتئاز و لیپاز را تولید می کنند (Sanchez-Porro *et al.*, ۲۰۰۳; Govender *et al.*, ۲۰۰۹; Rohban *et al.*, ۲۰۰۹).

دریاچه ارومیه شورترین دریاچه داخلی ایران است. بطوریکه بعد از دریاچه بحرالمیت در فلسطین اشغالی، شورترین دریاچه جهان محسوب می شود (جبارلوی شبستری، ۱۳۷۸،۱۳۸۰).

به دلیل قابلیت های ویژه میکروارگانیسم های هالوفیل در زمینه بیوتکنولوژی، این مطالعه با هدف بررسی دریاچه ارومیه از نظر وجود این میکروارگانیسم ها، انجام گرفت. این پژوهش در راستای گسترش بانک میکروارگانیسم های ایران، به گردآوری میکروارگانیسم های هالوفیل و هالوتولرنت از دریاچه ارومیه پرداخته است که ضمن معرفی بخشی از تنوع زیستی این اکوسیستم منحصر بفرد، نمایانگر بخشی از ذخایر زیستی کشور نیز می باشد.

مواد و روش کار

با توجه به بحران کم آبی بوجود آمده در سال های اخیر برای دریاچه ارومیه و به دلیل باتلاقی شدن برخی مناطق و کم بودن سطح آب دریاچه، مناطق نمونه گیری از این دریاچه محدود شد.

با شروع بارندگی ها در اوایل اردیبهشت ماه ۱۳۹۰، نمونه ها از ۱۰ نقطه تصادفی، توسط شیشه های استریل درب دار و از عمق ۳۰ تا ۵۰ سانتی متری سطح آب دریاچه جمع آوری و در شرایط استریل به آزمایشگاه منتقل شدند شکل(۱).

همچنین در کنار نمونه گیری از آب هر منطقه، نمونه های نمک آن منطقه هم جمع آوری گردید. دما و pH نمونه ها در محل و نیز شوری کل نمونه ها در آزمایشگاه اندازه گیری شد.

شکل ۱ – محل ایستگاه های نمونه گیری از دریاچه ارومیه در اردیبهشت ۱۳۹۰

مشخصات ایستگاه های نمونه گیری از دریاچه ارومیه در جدول (۱) ارائه شده است.

جدول ۱ – مشخصات ایستگاه های نمونه گیری از دریاچه ارومیه در اردیبهشت ۱۳۹۰

ایستگاه	محل نمونه گیری	طول و عرض جغرافیایی	زمان	دما (°C)	pH	شوری کل (درصد)
۱	کاظم داشی	۰۵۱۶۹۱۴S ۳۸ ۴۲۱۲۳۵۰	۹:۵۵'	۱۴	۷.۲۰	۳۴
۲	باری	۰۵۰۸۱۹۳S ۳۸ ۴۲۰۵۹۱۵	۱۱:۱۰'	۱۶	۶.۹۰	۳۳
۳	پل شهید کلانتری (ضلع غربی ، سمت جنوب)	۰۵۲۷۷۷۶S ۳۸ ۴۱۸۰۰۹۱	۱۲:۳۰'	۱۶	۷.۳۷	۲۴
۴	پل شهید کلانتری (ضلع شرقی ، سمت شمال)	۰۵۳۰۹۵۲S ۳۸ ۴۱۸۱۹۴۰	۱۳:۰۰'	۱۶	۶.۶۵	۳۶
۵	سواحل گلمانخانه	۰۵۲۴۴۲۲S ۳۸ ۴۱۶۰۸۵۸	۱۳:۴۰'	۱۶	۶.۳۵	۳۳

۶	جزیره آرزو	۰۵۵۴۴۰۳S ۳۸ ۴۱۵۵۶۶۶	۸:۵۸'	۹	۷.۱۱	۳۴
۷	جزیره اسپیر	۰۵۴۹۵۷۹S ۳۸ ۴۱۵۵۰۴۶	۹:۱۵'	۱۳	۷.۱۴	۳۲
۸	تپه میانی	۰۵۴۰۷۱۲S ۳۸ ۴۱۵۴۰۱۱	۹:۲۸'	۱۳	۷.۱۱	۳۴
۹	وسط دریاچه	۰۵۳۴۳۰۳S ۳۸ ۴۱۵۷۴۳۵	۹:۵۶'	۱۳	۷.۱۳	۳۴
۱۰	گلمانخانه	۰۵۲۳۱۹۰S ۳۸ ۴۱۶۲۰۵۶	۱۰:۴۵'	۱۱	۷.۲۷	۳۰

نمونه های جمع آوری شده در محیط های غنی سازی تلقیح شدند تا میزان جداسازی باکتری ها افزایش یابد. خانواده هالوموناداسه (*Halomonadaceae*) اعضایی از هالوفیل ها هستند که می توانند در هر محیط شوری رشد کنند. همچنین بعضی از اعضای این خانواده آلکالیفیل (قلیادوست) می باشند (Arahal & Ventosa, ۲۰۰۶).

لذا برای این منظور از محیط Alkaline Peptone Water که محیطی حاوی پپتون و اندکی قلیایی است و همچنین محیط Nutrient Broth که حاوی عصاره گوشت و پپتون است، استفاده گردید (هلاکو و همکاران، ۱۳۸۴ و Amoozegar *et al*., ۲۰۰۸). با توجه به اینکه اکثر هالوموناس ها توانایی رشد در درصد شوری های کل ۵ و ۱۰ درصد را دارند، درصد نمک‌های مربوطه برای محیط‌ها انتخاب شدند (Guzma´n *et al*., ۲۰۱۰; Kaye *et al*., ۲۰۰۴).

برای غنی سازی محیط،۱۰ میلی لیتر از هر نمونه با ۳۰۰۰ دور در دقیقه و به مدت ۵ دقیقه، سانتریفیوژ شدند. سپس۱ میلی لیتر از رسوب انتهای لوله را در ۹cc محیط Alkaline Peptone Water، با دو غلظت مختلف ۵ و ۱۰ درصد (نمک دریاچه)، ریخته و به مدت ۴۸- ۲۴ساعت در انکوباتور ۳۷ $^{\circ}C$ گرماگذاری شدند و سپس رشد باکتری ها با بررسی کدورت یا عدم کدورت تأیید شد.

غنی سازی در محیط نوترینت براث به دو شکل صورت گرفت:

۱- افزودن نمونه ها بدون سانتریفیوژ کردن و انتقال نمونه های شوراب بطور 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 از نمونه ها به محیط نوترینت براث (با pH ۷.۲-۷.۴) منتقل شده و در انکوباتور شیکردار به مدت ۷۲-۴۸ ساعت، با ۱۵۰ r.p.m و در دمای ۳۵ $^{\circ}C$ گرماگذاری شدند، پس از این مدت رشد باکتری ها با بررسی ایجاد کدورت و یا عدم کدورت تعیین گردید.

پس از انجام غنی سازی و بروز کدورت ناشی از رشد باکتری ها، بر روی محیط های MacConkey Agar و Nutrient Agar منتقل و کشت داده شدند. پس از گرماگذاری در دمای ۳۷ $^{\circ}C$- ۳۵ به مدت ۴۸- ۲۴ ساعت، رشد کلنی ها بررسی شد و برای دستیابی به کلنی های خالص، کشت های متوالی انجام گرفت. لازم به توضیح است

تمامی محیط ها همراه با ۵ و ۱۰ درصد نمک بودند. (کشت بر روی محیط Nutrient Agar به روش پیشنهادی (Amoozegar *et al.*, ۲۰۰۸) و MacConkey Agar به دلیل اینکه یک محیط انتخابی و افتراقی برای جداسازی گرم منفی ها می باشد، انتخاب شدند).

سپس رنگ آمیزی گرم و بررسی های میکروسکوپی و تست حرکت بر روی لام مرطوب انجام شد. سایر مشخصات فنوتیپی شامل تست های مورفولوژی(ریخت شناسی)، فیزیولوژی، بیوشیمیایی مورد بررسی قرار گرفت. جهت انجام تست تحمل نمکی، کلنی های حاصل به محیط های پایه براث حاوی ۰ ، ۳، ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰ و ۲۵ درصد NaCl منتقل و در دمای ۳۷ ˚C- ۳۵ و به مدت ۴۸ ساعت گرماگذاری شده و رشد و عدم رشد بررسی گردید.

برای شناسایی مولکولی و مطالعات ژنوتیپی، ابتدا با استفاده از کیت استخراج باکتری گرم منفی IBRC (مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران) DNA ژنومی سویه های منتخب، استخراج و توسط الکتروفورز بررسی شد.

برای تکثیر ژن ۱۶S rRNA ، از پرایمرهای عمومی (Universal primers) :

۲۷F (۵□-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-۳□) و ۱۴۹۲R (۵□-GGTTACCTTGTTACGACTT-۳□)

استفاده و PCR با برنامه زیر انجام شد:

دناتوراسیون اولیه (Pre dendturation): ۹۴ ˚C و به مدت ۳ دقیقه، دناتوراسیون (Dendturation): ۹۴ ˚C و به مدت ۱ دقیقه، اتصال (Annealing): ۵۸-۵۷ ˚C و به مدت ۱ دقیقه، طویل شدن (Extension): ۷۲ ˚C و به مدت ۱/۵ دقیقه، تکمیل نهایی (Last Extension): ۷۲ ˚C و به مدت ۱۰ دقیقه، دمای نگهداری (Hold time): ۲۵ ˚C و به مدت ۱۰ ثانیه و چرخه تکثیر شامل ۳۰ سیکل تکرار شد.

جهت اطمینان از دستیابی به باند های ۱۶S rRNA (با طول حدود ۱۵۰۰bp) و عدم آلودگی، محصولات PCR توسط تکنیک الکتروفورز و با استفاده از شاخص وزن مولکولی (لدر) (VersaLadder ۱۰۰-۱۰۰۰۰ bp) بررسی و تایید شدند.

برای تعیین توالی ۱۶S rRNA نتایج حاصل از PCR به شرکت Macrogene کره جنوبی فرستاده شد. سپس توالی های حاصل از Sequencing با استفاده از نرم افزار .Chromas Pro ویرایش گردید و در پایگاه اطلاعاتی EzTaxon با سایر سویه های ثبت شده در GenBank مورد مقایسه قرار گرفت و درصد تشابه سویه های بدست آمده با انواع شناخته شده آنها تعیین شد. پس از هم راستا کردن ترادف ها با برنامه Clustal X، نهایتاً با استفاده نرم افزار Mega۵ (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) درخت فیلوژنیک به روش neighbour-joining رسم گردید(Tamura *et al.*, ۲۰۱۱) .

نتایج

پس از رشد کلنی ها از محیط های مربوطه (جدول شماره ۲) مشخصات فنوتیپی سویه ها شامل رنگ آمیزی گرم و مشاهدات میکروسکوپی، تست های موفولوژی و بیوشیمیایی در جدول شماره (۳) ثبت گردید.

جدول ۲ - مشخصات جداسازی سویه های نمونه برداری شده از دریاچه ارومیه در اردیبهشت ۱۳۹۰

سویه های جداسازی شده	URM ۱۰	URM ۱۶	URM ۲۰	URM C	URM E	URM F
ایستگاه نمونه برداری	۹	۵	۱۰	۱۰	۱	۱۰
انجام سانتریفیوژ نمونه	+	+	+	–	+	–
محیط غنی سازی	NB	APW	APW	NB	APW	NB
محیط جامد کشت	MAC	NA	MAC	MAC	MAC	NA
درصد نمک تلقیحی	۵	۱۰	۱۰	۵	۱۰	۵

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

انتخاب اسامی سویه ها به صورت URM برگرفته از Urmia Lake می باشد.

جدول ۳ - مشخصات مورفولوژی، فیزیولوژی و بیوشیمیایی سویه های جداسازی شده از دریاچه ارومیه در اردیبهشت ۱۳۹۰

تست انجام شده	سویه‌های جدا شده					
	URM ۱۰	URM ۱۶	URM ۲۰	URM C	URM E	URM F
Pigmentation	صورتی	کرمی تیره تا قهوه ای روشن	صورتی	صورتی	صورتی کمرنگ	کرمی روشن
Colonies	گرد،کدر،محدب	گرد،کدر،محدب	گرد،کدر،محدب	گرد،کدر،محدب	گرد،کدر،محدب	گرد،کدر،محدب
Morphology	باسیل کوتاه	باسیلی شکل	باسیلی شکل	باسیلی شکل	باسیلی شکل	باسیلی شکل
Gram stain	-	-	-	-	-	-
KOH	+	+	+	+	+	+
Motility	+	+	+	+	+	+
Oxidase	+	-	-	+	-	+
Catalase	+	+	+	+	+	+
O / F	+ / -	+ / -	+ / -	+ / -	+ / -	+ / -
S / I / M	+ / - / -	ضعیف+ / - /	- / - / +	+ / - / +	- / - / +	+ / - / -
Urease	ضعیف	-	-	ضعیف	ضعیف	+
Nitrate	-	-	-	+	ضعیف	+
Simmons' Citrate	+	+	+	+	-	+
TSI	اسید / اسید H_2S	اسید / آلکالن	اسید / اسید	اسید / اسید H_2S	اسید / آلکالن	اسید / آلکالن
Methyl Red	-	+	+	+	+	-
Voges–Proskauer	-	-	-	-	-	-
Gelatin	-	-	-	-	-	-
Aesculin	-	+	+	-	-	-
Lys	-	-	-	-	-	-
Orn	+	-	-	-	-	-
Arg	-	+	-	-	-	-

O/F: Oxidative/Fermentative (GLU); S/I/M: Sulfid/Indol/Motility; TSI: Triple Sugar Irone agar

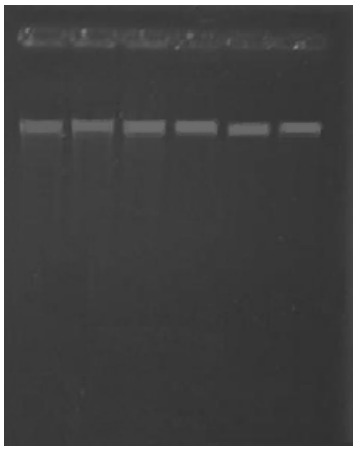
Lys: Lysine decarboxylase; Orn: Ornithine decarboxylase; Arg: Aarginine dihydrolase

نتایج مربوط به تست تحمل نمکی، بصورت "مثبت" برای رشد کلنی ها و "منفی" برای عدم رشد کلنی ها در جدول شماره (۴) گزارش شدند.

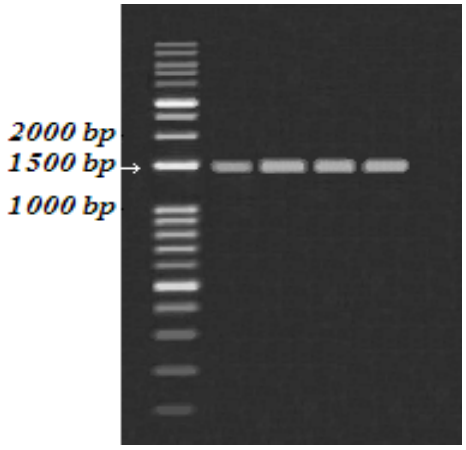
جدول ۴ - تست تحمل نمک سویه های جداسازی شده از دریاچه ارومیه در اردیبهشت ۱۳۹۰

درصد NaCl	سویه‌های جداسازی شده					
	URM ۱۰	URM ۱۶	URM ۲۰	URM C	URM E	URM F
۰	-	-	-	-	-	-
۳	+	+	-	+	-	+
۵	+	+	+	+	+	+
۱۰	+	+	+	+	+	+
۱۵	+	+	+	+	-	+
۲۰	-	-	+	-	-	-
۲۵	-	-	-	-	-	-

همچنین با استفاده از تکنیک الکتروفورز باندهای حاصل از ژنوم استخراجی و ژن‌های تکثیر شده توسط PCR بررسی و تایید شدند. در بررسی محصولات PCR، ژن ۱۶S rRNA پروکاریوتی که حدود ۱۵۰۰ bp می‌باشد مورد تایید قرار گرفت. Base Pair یا جفت باز اصطلاحا به یک زوج نوکلئوتید که بر روی دو زنجیره مقابل هم قرار گرفته و با یک پیوند هیدروژنی به هم متصل هستند، گفته می شود.

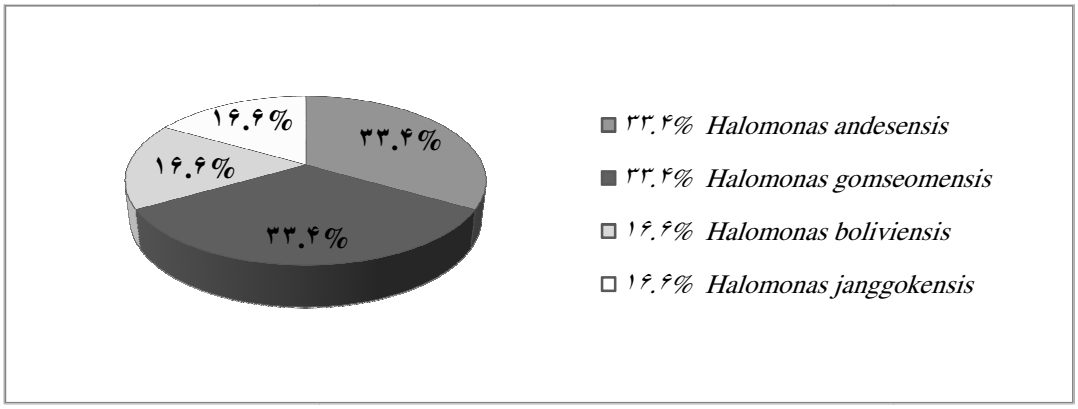


شکل ۲- عکس حاصل از الکتروفورز DNA ژنومی استخراجی



شکل ۳- عکس حاصل از الکتروفورز ژن های تکثیرشده

در مطالعات ژنوتیپی و بررسی های نتایج حاصل از تعیین توالی مشخص شد که سویه های منتخب از نظر فیلوژنتیکی به گونه های *Halomonas janggokensis* ، *Halomonas gomseomensis* ، *Halomonas boliviensis* ، *Halomonas andesensis* تعلق دارند. فراوانی سویه های جداسازی شده در شکل (۴) درج شده است.

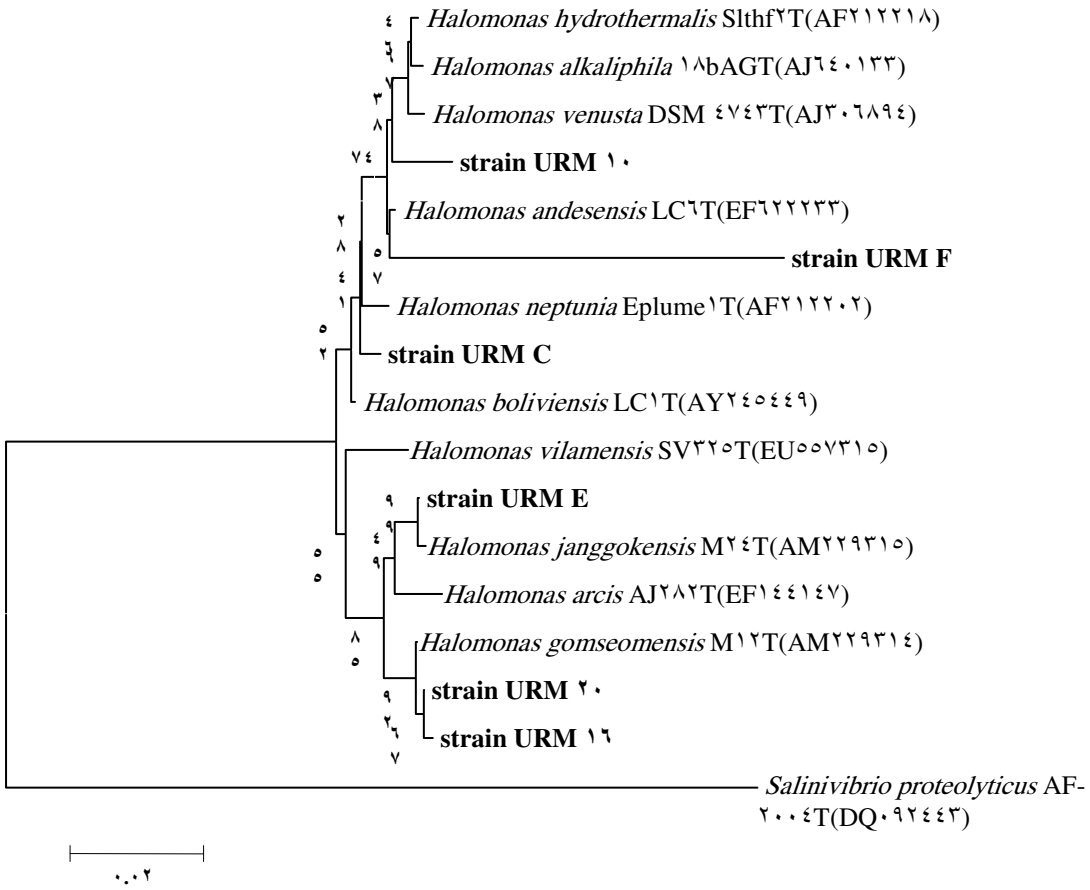


شکل ۴ - درصد فراوانی سویه های شناسایی شده از دریاچه ارومیه در اردیبهشت ۱۳۹۰

میزان تشابه برای سویه URM E با *Halomonas janggokensis* و سویه های URM ۲۰, URM ۱۶ با *Halomonas gomseomensis* بیش از ۹۹ درصد بود. اما برای سویه URM C با گونه *Halomonas boliviensis* و سویه URM ۱۰ با گونه *Halomonas andesensis* تشابه بین ۹۸/۹- ۹۷ درصد و نیز سویه URM F با گونه *Halomonas andesensis* تشابه ۹۴/۲ درصد نشان داده شد. برای شناسایی دقیق تر نیاز به انجام تکنیک های تکمیلی مانند هیبریداسیون DNA-DNA ، محتوای G+C و آنالیز اسیدهای چرب می باشد که

ممکن است این سویه ها در گونه ها و یا حتی جنس های جدید قرار گیرند و می توانند نمایندگانی از سویه های بومی دریاچه ارومیه باشند.

در نهایت درخت فیلوژنتیکی سویه های ترادف یابی شده توسط نرم افزار MEGA۵ و به روش neighbour-joining رسم شد.



شکل ۵ - درخت فیلوژنتیکی نشان دهنده قرابت سویه های منتخب با گونه *Halomonas sp.* بر اساس سکانس ۱۶S rRNA. سویه *Salinivibrio proteolyticus* AF-۲۰۰۴T(DQ۰۹۲۴۴۳) به عنوان outgroup انتخاب شده است.

بحث و نتیجه گیری

در مطالعه حاضر سویه های متعددی از جنس *Halomonas* تعین شدند. در پژوهش های مشابه نیز بیشتر باکتری های گرم منفی هتروتروفیک متعلق به جنس های *Halomonas* و *Chromohalobacter* و همچنین *Salinivibrio* توصیف شده اند (Kamekura, ۱۹۹۸; Ventosa *et al.*, ۱۹۹۸).

در مطالعه حاضر(strain LC۶^T) *Halomonas andesensis* جداسازی شد. پس از سانتریفیوژ نمونه های شوراب و استفاده از محیط غنی کننده NB و محیط‌های آگاردار NA و MacConkey با درصد نمکی ۵ درصد جداسازی شدند. این باکتری اولین بار توسط Guzma´n و همکاران از دریاچه نمک در بولیوی شناسایی گردید. با این تفاوت که در آن مطالعه از محیط HM (Halophilic Medium) با درصدهای نمکی ۵-۳ درصد و انکوباسیون ۳-۲ روز در دمای ۳۰ $^{\circ}C$ جهت جداسازی استفاده شده بود (Guzma´n *et al.*, ۲۰۱۰).

همچنین در پژوهش حاضر شاهد رشد سویه های نزدیک به *Halomonas janggokensis* و *Halomonas gomseomensis* بعد از غنی سازی در محیط مایع APW و کشت در محیط های جامد NA و MacConkey و گرماگذاری در دمای ۳۷ $^{\circ}C$ به مدت ۴۸ ساعت بودیم. در حالیکه سویه های مذکور شناسایی شده توسط Kim و همکاران از آب های شور و حوضچه های استخراج نمک خورشیدی منطقه Anmyeondo در کره، از محیط های مایع و جامد Marine Agar و Marine Broth با انکوباسیون در دمای ۲۸ $^{\circ}C$ به مدت ۴۸ ساعت جداسازی شدند. در هر دو پژوهش فوق، سویه های مربوطه از غلظت نمکی ۱۰ درصد جداسازی شدند (Kim *et al.*, ۲۰۰۷).

در این پژوهش باکتری *Halomonas boliviensis* از شوراب دریاچه ارومیه و محیط کشت های NB و MacConkey و با درصد نمک تلقیحی ۵ درصد و دمای ۳۷- ۳۵ $^{\circ}C$ جداسازی شد. این باکتری که توسط Quillaguama´nو همکاران در سال ۲۰۰۴ شناسایی شده است، به عنوان یک باکتری هالوفیل نسبی، سرمادوست و تحمل پذیر قلیایی معرفی گردید. Quillaguama´n و همکاران، این گونه باکتریایی را از خاک های اطراف یک دریاچه پرشور در بولیوی جداسازی کرده و کلنی ها را از محیط HM (Halophilic Medium) با رشد مطلوب در ۵ درصد نمک به دست آوردند(Quillaguama´n *et al.*, ۲۰۰۴).

شرایط محیطی محل نمونه گیری این باکتری یعنی ایستگاه شماره ۱۰ نیز با تحقیق انجام شده توسط Quillaguama´n و همکاران هماهنگی دارد. در تحقیق مذکور رشد کلنی های این میکروارگانیسم در شرایط ۱۱-۶ pH (بهینه رشد در ۸-۷.۵ pH) و دمای ۴۵-۰ $^{\circ}C$ (بهینه رشد در دمای ۳۰- ۲۵ $^{\circ}C$) صورت گرفته است (Quillaguama´n *et al.*, ۲۰۰۴).

همچنین در مطالعه حاضر، نتایج تست اکسیداز برای سویه های ۱۶ URM و ۲۰ URM (با بیشترین تشابه به *Halomonas gomseomensis*) و URM E (با بیشترین تشابه به *Halomonas janggokensis*) منفی بودند که با نتایج پژوهش Kim و همکاران (۲۰۰۷) مطابقت داشت.

اعضای خانواده *Halomonadaceae* از محیط های خاکی و آبی بسیار متنوع و عمدتا مکان های پرشور و یا قلیایی جداسازی شده اند. از نظر تاکسونومی، جنس *Halomonas* بسیار متنوع است و شامل بیش از ۶۰ گونه می شود (Franzmann *et al.*, ۱۹۸۸).

در مطالعه‌ای که بر روی دریاچه نمک آران و بیدگل انجام گرفت، ایزوله‌های گرم منفی گزارش شده، بیشتر متعلق به جنس های *Halomonas* و *Salicola* بودند (باباولیان و همکاران، ۱۳۸۸).

همچنین در بررسی تنوع زیستی باکتری های نمک دوست دریاچه حوض سلطان، بیشتر تولیدکنندگان آنزیم برون سلولی DNase متعلق به جنس *Halomonas* بودند. اما هیچ سویه ای از جنس *Chromohalobacter* یافت نشد (رهبان و آموزگار، ۱۳۸۸).

این پژوهش به گردآوری میکروارگانیسم های پروکاریوت با تاکید بر اعضای خانواده *Halomonadaceae* از دریاچه ارومیه و گسترش ذخایر ژنتیکی از این محیط پرشور پرداخته است. شناسایی سویه های بومی، علاوه بر شناسایی تنوع زیستی میکروارگانیسم های دریاچه ارومیه، افقی جدید برای علوم بیوتکنولوژی می باشد.

از این رو مطالعه انواع اکستریموفیل های ساکن محیط های اکستریم مانند دریاچه ها و تالاب های شور و یا قلیایی، چشمه های آبگرم و اسیدی و...، همچنین بررسی آنزیم های هیدرولیتیک تولید شده توسط این میکروارگانیسم ها و مطالعه کاربردهای بیوتکنولوژیکی آنها در مطالعات آتی سودمند خواهد بود.

منابع

باباولیان، ح.، آموزگار، م. ع. و پوربابائی، ا. ع.. ۱۳۸۸. شناسایی و تعیین خصوصیات باکتری های نمک دوست تولید کننده آنزیم های هیدرولیتیک جدا شده از دریاچه نمک آران و بیدگل. مجله زیست شناسی ایران، ۲۲(۱): ۲۴-۴۵.

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

جبارلوی شبستری، ب. ۱۳۸۰. درآمدی بر مطالعات آبشناسی دریاچه ارومیه. همایش دریاچه ارومیه. ایران.

رهبان، ر. و آموزگار، م. ع. ۱۳۸۸، بررسی تنوع زیستی باکتری های نمک دوست تولید کننده آنزیم های هیدرولیتیک ساکن در دریاچه حوض سلطان. علوم و تکنولوژی محیط زیست،۱۱: ۲۶۷-۲۵۱.

هلاکو، ا.، مظفری، ن. و فروهش تهرانی، ه. ۱۳۸۴. انتشار گونه های ویبریو در آبهای دریای خزر. مجله افق دانش، ۱۱(۳): ۲۰-۱۶.

Amoozegar, M.A., Schumann, P., Hajighasemi., M., Fatemi, A.Z., Karbalaei-Heidari, H.R. ۲۰۰۸. *Salinivibrio proteolyticus sp*. nov., a moderately halophilic and proteolytic species from a hypersaline lake in Iran. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, ۵۸: ۱۱۵۹–۱۱۶۳.

Arahal, D. R. & Ventosa, A. ۲۰۰۶. The family *Halomonadaceae*. In: The Prokaryotes. Dworkin, M. (Editor in-Chief), Falkow, S.; Rosenberg, E.; Schleifer, K-H.; & Stackebrandt, E.; (editors). Springer Science+Business Media, New York.

DasSarma, S. & Arora, P. ۲۰۰۱. A General review on Halophiles. In Encyclopedia of life sciences. Nature Publishing group. Available in: www.els.net.

Franzmann, P. D., Wehmeyer, U. & Stackebrandt, E. ۱۹۸۸ .*Halomonadaceae* fam. nov., a new family of the class proteobacteria to accommodate the genera *Halomonas* and *Deleya*. Systematic and Applied Microbiology, ۱۱: ۱۶-۱۹.

Govender, L., Naidoo, L. & Setati, M. E. ۲۰۰۹. Isolation of hydrolase producing bacteria from Sua pan solar salterns and the production of endo-۱, ۴-β-xylanase from a newly isolated haloalkaliphilic *Nesterenkonia* sp. African Journal of Biotechnology. ۸: ۵۴۵۸-۵۴۶۶.

Grant, W. D., Gemmell, R. T. & McGenity, T. J.; ۱۹۹۸. Halophiles, p ۹۲-۱۳۲. In: Extremophiles. Horikoshi, K and Grant W. J. (editors). Microbial life in extreme environments. Wiley-Liss, Inc. New York, USA.

Guzma´n, D., Quillaguaman, J., Mun˜oz, M. & Hatti-Kau, R. ۲۰۱۰. *Halomonas andesensis* sp. nov., a moderate halophile isolated from the saline lake Laguna Colorada in Bolivia. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, ۶۰: ۷۴۹-۷۵۳.

Kamekura, M. ۱۹۹۸. Diversity of extremely halophilic bacteria. Extermophils, ۲:۲۸۹-۲۹۵.

Kaye, J.Z., Ma´ rquez, M.C., Ventosa, A. & Baross, J.A. ۲۰۰۴. *Halomonas neptunia sp*. nov., *Halomonas sulfidaeris sp*. nov., *Halomonas axialensis sp*. nov. and *Halomonas hydrothermalis sp*. nov.: halophilic bacteria isolated from deep-sea hydrothermal-vent environments. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, ۵۴: ۴۹۹–۵۱۱.

Kim, K. K., Jin, L., Yang, H. CH. & Lee, S-T. ۲۰۰۷.*Halomonas gomseomensis* sp. nov., *Halomonas janggokensis* sp. nov., *Halomonas salaria* sp. nov. and *Halomonas denitrificans* sp. nov., moderately halophilic bacteria isolated from saline water.International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, ۵۷:۶۷۵–۶۸۱.

Klebahn, H. ۱۹۱۹. Die Schdlinge des Klippfisches. Mitteilungen aus dem Institut für Allgemeine Botanik in Hamburg, ۴: ۱۱-۶۹.

MacElroy, R. D. ۱۹۷۴. Some comments on the evolution of extremophiles. Biosystems.۶: ۷۴–۷۵.

Oren, A. ۲۰۰۲a. Diversity of halophilic microorganisms: Environments, phylogeny, physiology, andapplications. Industrial Microbiol and Biotechnology. ۲۸: ۵۶-۶۳.

Oren, A. ۲۰۰۲b. Halophilic Microorganisms and their Environments, Section ۱: An Historical Survey.۶۷; ۱-۱۶.

Quillaguama´n, J., Hatti-Kaul, R., Mattiasson, B., Alvarez, M. T. & Delgado, O. ۲۰۰۴.*Halomonas boliviensis* sp. nov., an alkalitolerant, moderate halophile isolated from

soil around a Bolivian hypersaline lake.International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology,۵۴:۷۲۱–۷۲۵.

Rohban, R., Amoozegar, M. A. & Ventosa, A. ۲۰۰۹. Screening and isolation of halophilic bacteria producing extracellular hydrolyses from Howz Soltan Lake, Iran. Industrial Microbiology and Biotechnol. ۳۶: ۳۳۳-۳۴۰.

Sanchez-Porro, C., Martin, S., Mellado, E. & Ventosa, A. ۲۰۰۳. Diversity of moderately halophilic bacteria producing extracellular hydrolytic enzymes. Applied Microbiology. ۹۴: ۲۹۵-۳۰۰.

Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. & Kumar, S. ۲۰۱۱. MEGA۵: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. Molecular Biology and Evolution, ۲۸(۱۰):۲۷۳۱–۲۷۳۹.

Ventosa, A. ۱۹۸۸. Taxonomy of moderately halophilic heterotrophic eubacteria, pp. ۷۱-۸۴ In: Rodriguez Valera, F. (editors). Halophilic bacteria, Vol. I. CRC Press, Boca Raton.

Ventosa, A. ۱۹۹۴. Taxonomy and phylogeny of moderately halophilic bacteria, pp. ۲۳۱-۲۴۲ In: Priest, F. G. (editors). Bacterial diversity and systematics. Plenum Press, New York.

Ventosa, A., Nieto, J.J. & Oren, A. ۱۹۹۸. Biology of moderately halophilic aerobic bacteria. Microbial Molecular Biology Review, ۶۲, ۵۰۴- ۵۴۴.

Ventosa, A., Mellado, E., Sanchez-Porro, C. & Marquez, M. C. ۲۰۰۸. Microbiology of extreme soils. Soil Biology ۱۳. Dion, P. & Nautiyal, C. S. (editors). Springer-Verlag. Berlin, Heidelberg