Research Article

Nova Biologica Reperta 9(4): 279-288 (2023)

Print ISSN: 2423-6330/Online ISSN: 2476-7115

https://nbr.khu.ac.ir; Kharazmi University Press; DOI: 10.29252/nbr.9.4.279

مقاله پژوهشی

یافته‌های نوین در علوم زیستی

جلد ۹، شماره ۴، صفحات ۲۷۹ الی ۲۸۸ (۱۴۰۱)

انتشارات دانشگاه خوارزمی

جداسازی برخی از باکتری‌های میکروبیوم شور دریاچه ارومیه

مهری فرزندی[۱]، رضا خاک ور[۱]، سید ابوالقاسم محمدی[۲] و توماس راتای[۳]

[۱]گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران؛ [۲]گروه بهنژادی و بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران؛ [۳]گروه میکروبیولوژی و علوم اکوسیستم، دانشکده علوم‌زیستی، دانشگاه وین، وین، اتریش

مسئول مکاتبات: رضا خاک‌ور، khakvar@tabrizu.ac.ir

چکیده. دریاچه ارومیه بزرگ‌ترین دریاچه داخلی ایران و دومین دریاچه شور دنیا است. برای شناسایی باکتری‌های کاملاً شور پسند دریاچه از طریق غربال با مارکرهای مولکولی، طی فصول مختلف سال‌های ۱۳۹۷ و ۱۳۹۸ از آب، لجن و خاک مناطق مختلف دریاچه نمونه‌هایی جمع‌آوری و به آزمایشگاه منتقل گردید. با استفاده از محیط‌های کشت عمومی‌جدایه‌های باکتریایی از نمونه‌ها جداسازی و برای بررسی تنوع گونه‌ای از نشانگر مولکولی ERIC استفاده گردید. پس از خوشه‌بندی ژنتیکی گونه‌ها، از هر خوشه یک باکتری بعنوان نماینده انتخاب و با رمزینه‌گذاری ناحیه 16srDNA مورد شناسایی قرار گرفتند. تست‌های بیوشیمیایی برای تایید نتایج مولکولی انجام گردید. در مجموع، ۱۰۲ جدایه باکتری از نمونه‌ها جداسازی شد که فقط ۲۹ جدایه بسیار شورپسند بودند. نشانگر مولکولی ERIC نشان داد که جدایه‌ها می‌توانند به پنج گروه منتسب شوند. پنج جدایه منتخب از هر خوشه، با آغازگرهای ناحیه 16SrDNA تکثیر و توالی‌یابی شدند که نتایج نشان داد که پنج جدایه منتخب با اطمینان ۹۹ درصد متعلق به گونه‌های *Microbulbifer halophilus*، *Halomonas salina*، *Bacillus sonorensis*، *Salinivibrio costicola* و *Bacillus aquimaris* هستند. نتایج شناسایی مولکولی با نتایج آزمون‌های بیوشیمیایی مطابقت داشت.

واژه‌های کلیدی. اریک پی‌سی‌آر، دریاچه ارومیه، میکروبیوم، شورپسند

Isolation of some bacteria for halophilic microbiome of Urmia Lake

Mehri Farzandi[1], Reza Khakvar[1], Seyed Abolghasem Muhammadi[2], Thomas Rattai[3]

[1]Plant Protection Department, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran; [2]Plant Biotechnology and Breeding, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran;[3]Department of Microbiology and Ecosystem Science, Faculty of Life Sciences, University of Vienna, Vienna, Austria

Correspondent author: Reza Khakvar, khakvar@tabrizu.ac.ir

Abstract. Urmia Lake is the largest lake in the Iranian plateau and the second largest Salt Lake in the world. This study was conducted to identify hypersaline bacteria in the lake through the screening with molecular markers. For the molecular study of the bacterial microbiome of the lake, samples were collected from water, sludge and soil of the different parts of the lake during different seasons of 2018 and 2019, and then transferred to the laboratory under standard conditions. Bacterial isolates were purified from the samples using universal culture media. ERIC molecular marker was used to study the species diversity. After clustering analysis of the species on the basis of their genetic markers, one bacterium from each cluster was selected as the representative of each cluster and then identified by DNA barcoding method using the 16srDNA. Biochemical tests were performed to confirm the molecular results. In total, 102 bacterial isolates were isolated and purified from the samples, of which only 29 isolates were extremely-halophilic. The molecular diversity of isolates, based on ERIC molecular marker, showed that isolates can be assigned to five different clusters. Five isolates selected from each cluster were selected and their 16SrDNA region were amplified and sequenced with 16SrDNA-specific primers. The results showed that the five selected isolates with 99% similarity belonged to the species *Microbulbifer halophilus*, *Halomonas salina*, *Bacillus sonorensis*, *Salinivibrio costicola* and *Bacillus aquimaris.* The results of molecular identification were consistent with the results of biochemical tests.

Key words. ERIC-PCR, halotolerant, microbiome, Urmia Lake

Received 03.01.2022/ Revised 18.08.2022/ Accepted 02.11.2022/ Published 20.03.2023

دریافت: ۱۴۰۰/۱۰/۱۳/ اصلاح: ۱۴۰۱/۰۵/۲۷/ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۸/۱۱/ انتشار: ۱۴۰۱/۱۲/۲۸

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.24236330.1401.9.4.4.6]

مقدمه

دریاچه ارومیه یکی از بزرگ‌ترین دریاچه‌های آب شور جهان است که با مساحت ۵۲۰۰ کیلومتر مربع، ۱۲۷۸ متر از سطح دریا، بین استان‌های آذربایجان شرقی و غربی قرار گرفته است. دریاچه دارای محیط بسیار سخت از نظر زندگی برای موجودات است، بنابراین موجودات داخل آن با موجودات اکوسیستم‌های دیگر بسیار متفاوت هستند. گونه‌های موجود در داخل دریاچه صرفا به دلیل متفاوت بودن اهمیت ندارند، بلکه ژن‌های موجود در آن‌ها می‌تواند منبع خوبی برای انتقال به سایر موجودات و اصلاح آن‌ها برای شرایط سخت یا ناخواسته باشد. سیستم‌های متعددی در حال حاضر برای حفاظت از دریاچه فعال شده‌اند. تاکنون تحقیقات متعددی روی موجودات داخل یا اطراف دریاچه ارومیه انجام شده است ولی بیشتر این تحقیقات روی پرندگان، خزندگان، سخت پوستان، پستانداران و حشرات انجام شده است (Imani et al., 2020) و اطلاع بسیار اندکی در مورد موجودات میکروسکوپی دریاچه در دسترس است. در بین موجودات میکروسکوپی، بیشتر مطالعات روی گونه‌های محدودی از جلبک‌ها، پروتوزاها و باکتری‌های متحمل به شوری متمرکز بوده و تحقیق روی باکتری‌های بسیار شورپسند به علت سختی کار بسیار انگشت شمار است. همچنین اکثریت قریب به اتفاق تحقیقات گذشته با استفاده از روش‌های بیوشیمایی یا ارزیابی-های فنوتیپی بوده و از روش‌های مولکولی به ندرت استفاده شده است. یکی از دلایل ممکن است مشکل استخراج DNA از موجودات رشد یافته در محیط‌های بسیار شور باشد که مطالعات مولکولی روی آن‌ها را محدود ساخته است (Amini Hajiabadi et al., 2020; Fallahi et al., 2022). تحقیق حاضر به منظور جداسازی و شناسایی جدایه‌های باکتریایی شورپسند از نمونه آب، لجن و خاک اطراف و داخل دریاچه طراحی و اجرا گردید. به منظور جلوگیری از شناسایی تصادفی سویه‌های مشابه از یک گونه باکتری و برای بدست آوردن تنوع بیشتری از باکتری‌ها، قبل از اقدام به شناسایی، غربالگری اولیه توسط مارکر ERIC انجام گردید.

مواد و روش‌ها

نمونه‌گیری

برای انجام این تحقیق، در فصول مختلف سال‌های ۱۳۹۸-۱۳۹۷ از مناطق مختلف اطراف دریاچه، از آب و لجن نمونه‌برداری صورت گرفت. تصویر ماهواره‌ای دریاچه و نقاط مختلف نمونه‌برداری در شکل ۱ نشان داده شده است.

نمونه‌ها داخل فالکون‌ها و ظروف پلاستیکی دردار، در شرایط استریل و خنک به آزمایشگاه باکتری‌شناسی دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز انتقال یافتند. نمونه‌ها جهت انجام کارهای بعدی و کشت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در یخچال نگه‌داری شدند.

خالص سازی و جداسازی سویه‌ها

برای جداسازی باکتری‌های موجود در آب و لجن، از روش مستقیم کشت (رقیق سازی) استفاده گردید (Schaad et al., 2001). نمونه‌های آب و لجن بعد از رقیق‌سازی تا 10^8 برابر در محیط کشت آماده نوترینت آگار، R2A Agar ، King B Agar، Macconkey Agar و دو محیط کشت دست ساز MHکه شامل ترکیبات (گرم بر لیتر): NaCl، ۱۰۱؛ $MgCl_2.6H_2O$، ۷؛ $MgSO_4.7H_2O$، ۹.۶؛ $CaCl_2.2H_2O$ ، ۰.۰۳۶؛ KCl، ۲؛ $NaHCO_3$، ۰.۰۶؛ NaBr، ۰.۰۲۶؛ Yeast extract، ۱۰؛ Glucose، ۱؛ Pepton، ۵؛ Agar، ۱۵) و محیطSWN که شامل ترکیبات (گرم بر لیتر): NaCl، ۲۰؛ $MgCl_2.6H_2O$، ۳؛ $MgSO_4.7H_2O$، ۵؛ $CaCl_2.2H_2O$، ۰.۰۵؛ KCl، ۰.۵؛ Yeast extract، ۱؛ Glucose، ۲؛ Pepton، ۵؛ Agar، ۱۵) (Mehrshad et al., 2012) حاوی ۱۰، ۱۵، ۲۰ و ۳۰ درصد نمک دریاچه کشت داده شدند و به منظور رشد در گرمخانه ۳۷-۱۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند.

بعد از ۵-۴ روز (باکتری‌ها کند رشد بودند)، جهت خالص سازی جدایه‌ها از میان کلنی‌های باکتریایی که در داخل پتری‌ها رشد کرده بودند کلون‌هایی انتخاب و روی محیط کشت نوترینت آگار و R2A Agarحاوی ۱۰ و ۱۵ درصد به صورت خطی کشت داده شدند. پس از رشد، تک کلون‌هایی تکی مجددا به محیط کشت جدید حاوی همان مقدار نمک منتقل شدند و به منظور رشد در انکوباتور در دمای ۲۷-۲۶ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند.

شناسایی مولکولی و بیوشیمایی جدایه‌های منتخب

استخراج DNA ژنومی‌باکتری‌ها به روش لیز حرارتی با کمی‌تغییرات صورت گرفت (Schaad et al., 2001). در این روش، جدایه‌های باکتریایی ابتدا در محیط کشت‌های NA و R2A آگار همراه نمک کشت داده شدند. پس از رشد کامل باکتری‌ها، یک لوپ پر از هر کدام از جدایه‌های باکتریایی برداشته و به میکروتیوب‌های استریل حاوی ۰/۵ میلی‌لیتر بافر TBE با غلظت ۰/۵X اضافه شد. به منظور لیز شدن سلول‌های باکتری و آزاد شدن بهتر DNA باکتری، محلول پتاسیم هیدروکسید (KOH) ۱۰ درصد به مقدار ۵ میکرولیتر در داخل هر میکروتیوب ریخته شد. سپس میکروتیوب‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در آب در حال جوشیدن قرار داده شدند تا عمل لیز شدن و آزاد شدن DNA باکتری به خوبی صورت گیرد. سپس میکروتیوپ‌ها به مدت ۴ دقیقه در ۱۲۰۰۰ دور بر دقیقه

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1401.9.4.4.6]

سانتریفیوژ و بعد از سانتریفیوژ مایع رویی حاوی DNA باکتریایی به داخل میکروتیوب‌های دیگر منتقل شدند و در فریزر۲۰- درجه سانتی‌گراد برای انجام واکنش زنجیره‌ای پلی-مراز نگه‌داری شدند. کمیت و کیفیت DNA استخراج شده با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر ارزیابی شد. جهت بررسی تنوع گونه‌ها و غربال اولیه جدایه‌ها از جفت نشانگر اختصاصی ERIC-PCR1 و ERIC-PCR2 که جایگاه هدف آن‌ها توالی-های تکراری محفوظ شده در ژنوم باکتریایی است استفاده گردید (Freezer & Vostaff, 2004) (جدول ۱). برای شناسایی جدایه‌های باکتریایی منتخب از هر گروه از آغازگرهای عمومی8F و 1492R استفاده شد که جایگاه هدف آن‌ها ناحیه 16SrDNA است (Schaad et al., 2001) جدول ۱ لیست آغازگرهای مورد استفاده را نشان می‌دهد. برای تکثیر قطعه DNA مورد نظر از دستگاه ترموسایکلر ساخت شرکت پیشگام استفاده گردید. مطابق برنامه داده شده به دستگاه، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از آغازگرهای عمومی 8F & 1492R (Rocas & Siqueira, 2008) و نشانگرهای اختصاصی ERIC-PCR1& ERIC-PCR2 (Khosravi et al., 2016) با برنامه حرارتی جدول ۲ صورت گرفت.

تفکیک قطعات تکثیری با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز ۱ درصد انجام شد. پس از بارگذاری نمونه‌ها، دستگاه الکتروفورز به منبع تامین برق با ولتاژ ۸۵ ولت و آمپر ۳۰ متصل و الکتروفورز به مدت ۶۰-۴۵ دقیقه انجام گرفت. قطعه تکثیری ۱۴۰۰ جفت بازی حاصل از جفت آغازگرهای 8F & 1492R جهت شناسایی و توالی‌یابی به شرکت دانش بنیان توپاز ژن کاوش فرستاده شد. نتایج حاصل از توالی یابی در وب سایت NCBI-Blast Search بارگذاری شد و با داده‌های توالی نوکلئوتیدی موجود در بانک ژن مقایسه شدند. با کمک نرم افزارMega-X درختچه فیلوژنتیک ترسیم شد و موقعیت فیلوژنتیک هر یک از گونه‌ها تعیین و هویت آن‌ها از طریق مقایسه با توالی جدایه‌های مرجع تایید گردید. توالی‌های نهایی هر یک از جدایه‌ها در بانک ژن (NCBI) ثبت و کد دسترسی برای هر یک اخذ گردید.

پس از مشخص شدن نتایج شناسایی مولکولی به منظور تایید نتایج مولکولی و اطمینان از تعیین گونه‌ها، برخی تست‌های بیوشیمیایی مرتبط با سرده و گونه‌های بدست امده به شرح جدول ۳ انجام گردید

شکل ۱- تصویر ماهواره‌ای از دریاچه ارومیه. نقاط مختلف نمونه‌برداری با ستاره قرمز مشخص شده است.

Figure 1- Satellite image of Lake Urmia. Different sampling sites were marked with red stars .

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.24236330.1401.9.4.4.6]

جدول۱- لیست آغازگرها، توالی و جایگاه هدف آن‌ها.

Table 1. Universal primers used for 16srDNA region and ERIC-PCR.

آغازگر	توالی	جایگاه هدف
8F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	16s rDNA
1492R	GGTTACCTTGTTACGACTT	16s rDNA
ERIC-PCR1	CACTTAGGGGTCCTCGAATGTA	توالی‌های تکراری محفوظ شده در ژنوم باکتریایی
ERIC-PCR2	AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG	توالی‌های تکراری محفوظ شده در ژنوم باکتریایی

جدول ۲- برنامه حرارتی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای جفت آغازگرها و نشانگرهای ERIC-PCR1& ERIC-PCR2 و 8F & 1492R

Table 2. Thermal cycling conditions used for 16rDNA region ERIC-PCR

آغازگر	مرحله	دما	زمان	تعداد چرخه
8F & 1492R	واسرشت سازی اولیه	۹۵ درجه سانتی‌گراد	۱ دقیقه	
	واسرشت سازی	۹۴ درجه سانتی‌گراد	۴۵ ثانیه	۲۶چرخه
	اتصال آغازگر	۵۰ درجه سانتی‌گراد	۴۵ ثانیه	
	بسط	۷۲ درجه سانتی‌گراد	۱/۵ دقیقه	
	بسط نهایی	۷۲ درجه سانتی‌گراد	۱۵ دقیقه	
ERIC-PCR1& ERIC-PCR2	واسرشت سازی اولیه	۹۴ درجه سانتی‌گراد	۳ دقیقه	
	واسرشت سازی	۹۴ درجه سانتی‌گراد	۱ دقیقه	۳۵ چرخه
	اتصال آغازگر	۵۵ درجه سانتی‌گراد	۷ دقیقه	
	بسط	۷۲درجه سانتی‌گراد	۲ دقیقه	
	بسط نهایی	۷۲درجه سانتی‌گراد	۵ دقیقه	

جدول ۳- تست‌های بیوشیمیایی انجام شده روی باکتری‌های شورپسند جداشده از دریاچه ارومیه.

Table 3. The results of biochemical assays on halophilic bacterial strains isolated from Urmia Lake.

تستهای بیوشیمیایی	نام جدایه‌های باکتریایی				
	MF8 *Bacillus sonorensis*	**MF20** *Salinivibrio costicola*	**MF26** *Bacillus aquimaris*	**MF28** *Halomonas salina*	**MF29** *Microbulbifer halophilus*
تست گرم	+	-	+	-	+
تست اکسیداز	+	+	+	+	+
تست کاتالاز	+	+	+	W	+
تست OF	Facultative anaerobe	Facultative anaerobe	Aerobic	aerobic	aerobic
تست احیا نشاسته	+	+	+	–	+
احیای نیترات	-	–	–	–	+
تست اوره	+	+	+	–	–
ذوب ژلاتین	+	+	+	–	–
مصرف گلوکز	+	+	+	+	+
مصرف سوکروز	+	+	–	–	–
مصرف سوربیتول	-	–	–	–	+
مصرف فروکتوز	-	+	–	+	+
مصرف لاکتوز	–	+	–	+	–
مصرف توئین ۸۰	–	–	+	+	–
رشد در pH=5	+	+	+	+	–

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.24236330.1401.9.4.4.6]

نتایج

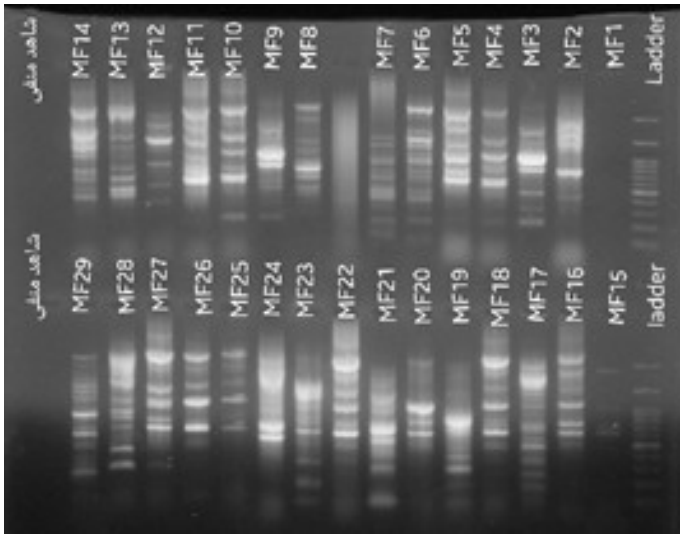
جداسازی و شناسایی

بر اساس نتایج بدست آمده در هیچ یک از محیط کشت‌های Macconkey Agar، King B Agar، MH و SWN در هیچ درصدی از نمک باکتری رشد نکرد و فقط در دو محیط کشت NA Agar وR2A Agar باکتری‌هایی در حضور نمک رشد کردند که رشد آن‌ها فقط در درصدهای نمک ۱۰ و ۱۵ درصد بود و در غلظت‌های بالاتر رشدی مشاهده نشد. بنابراین، از این دو محیط کشت در درصدهای مختلف نمک، حدود ۱۰۲ جدایه جداسازی شد. رنگ کلنی جدایه‌ها از قرمز و نارنجی تا سفید بود که بیشتر آن‌ها کرمی‌رنگ بودند. در مجموع از ۲۹ جدایه، پنج جدایه MF16تا MF21 در محیط کشت R2A Agar ۱۰ و ۱۵ درصد رشد کردند چهارده جدایه در NA Agar ۱۰و ۱۵ درصد رشد کردند و سه جدایه MF27 MF26,و MF28 فقط در NA Agar ۱۰درصد رشد کردند بنابراین همه ۲۲ جدایه فوق باکتری‌هالوفیل محسوب میشدند، چون فقط در حضور نمک ۱۰ و ۱۵ درصد رشد کردند. فقط هفت جدایه هم در محیط NA Agar بدون نمک و دارای نمک رشد کردند و باکتری‌هالوتولرنت محسوب می‌شدند (Larsen, 1986).

بررسی فیلوژنی

کلیه ۲۹ جدایه با استفاده از جفت نشانگرهای اختصاصی ERIC-PCR1 و ERIC-PCR2 که جایگاه هدف آن‌ها توالی‌های تکراری حفاظت شده در ژنوم باکتریایی است، PCR و الکتروفورز گردیدند و نتایج حاصل طبق شکل ۲ بود. گروه‌بندی جدایه‌ها با استفاده از داده‌های نشانگرهای اریک (ERIC-PCR) با نرم افزار PyElph 1.4 براساس الگوریتم تجزیه خوشه‌ای الحاق همسایگان (Neighbor Joining)، آن‌ها به پنج گروه منتسب کرد. این گروه‌بندی نشان داد که جدایه‌ها از گونه‌ها و گروه‌های مختلف باکتریایی هستند (شکل ۳).

برای توالی‌یابی ناحیه 16s rDNA پنج جدایه MF20،MF8، MF26، MF28 ، MF29 که باند غیراختصاصی نداشتند (شکل ۴) و در خوشه بندی ERIC-PCR در کلاسترهای متفاوتی قرار گرفته بودند، ارسال شد. همردیفی توالی‌های حاصل با داده‌های بانک اطلاعاتی NCBI نشان داد که با اطمینان ۹۹ درصد به ترتیب جدایه MF8 به گونه *Bacillus sonorensis*، جدایه MF20 به گونه *Salinivibrio costicola* ، جدایه MF26به گونه *Bacillus aquimaris*، جدایه MF28 به گونه *Halomonas salina* و جدایه MF29 به گونه *Microbulbifer halophilus* تعلق داشتند. توالی‌های بدست آمده پس از اصلاح در بانک ژن به شرح جدول ۴ ثبت شده و کد دسترسی (Accession number) دریافت گردید.

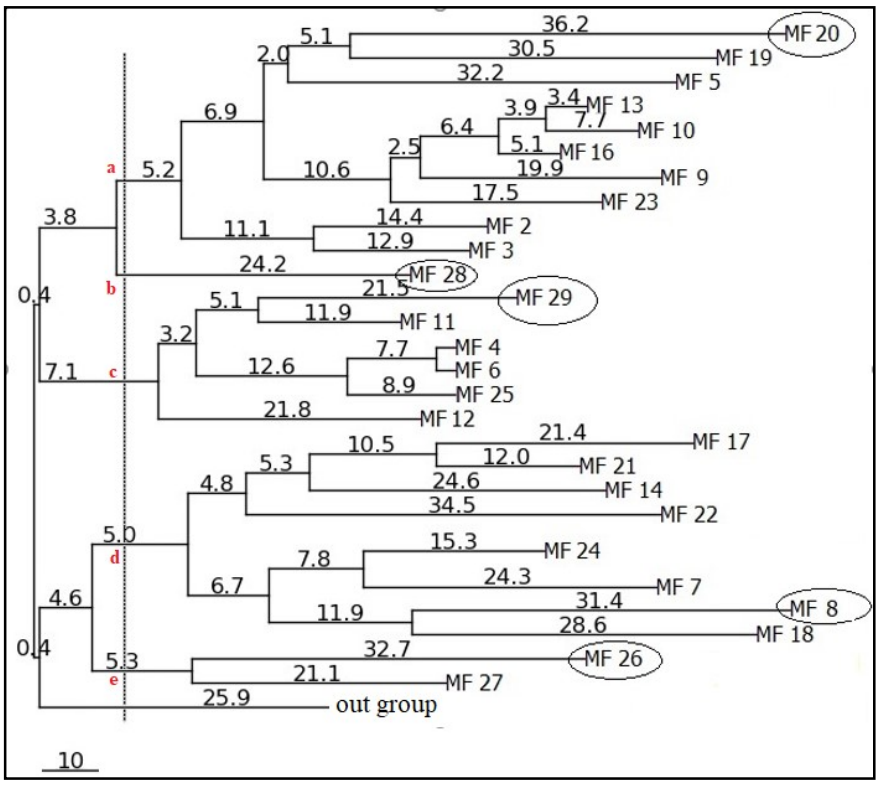


شکل۲- نتایج باندهای بدست آمده از مارکر مولکولیERIC-PCR انجام یافته بر روی جدایه‌های باکتریایی جدا شده از دریاچه ارومیه.

Fig 2. Constructed molecular patterns of halophilic bacterial strains isolated from Urmia Lake using ERIC-PCR.

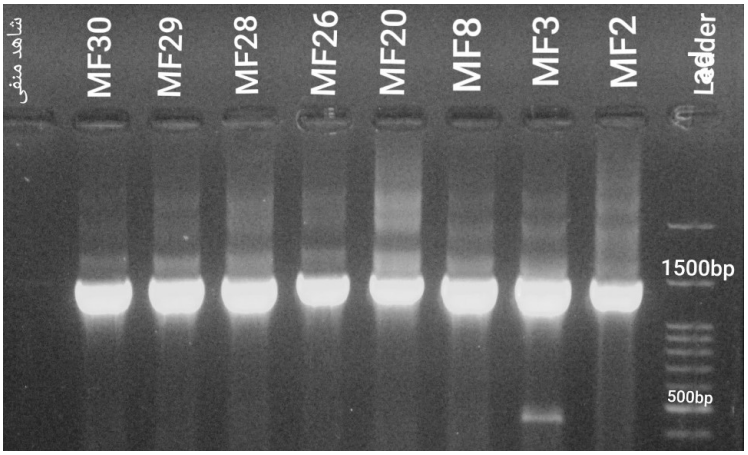
[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.24236330.1401.9.4.4.6]



شکل ۳- گروه‌بندی جدایه‌های باکتریایی شورپسند دریاچه ارومیه با استفاده از داده‌های نشانگرهای اریک (ERIC-PCR) براساس الگوریتم تجزیه خوشه‌ای الحاق همسایگان.

Figure 3. Constructed phylogenetic tree of halophilic bacterial strains isolated from Urmia Lake using ERIC-PCR marker based on Neighbor-joining method.



شکل ۴- قطعه ۱۴۰۰ جفت بازی تکثیر یافته برای جدایه‌های منتخب باکتریای توسط آغازگرهای F8 & 1492R.

Fig 4. 1400bp PCR products of selected bacterial isolates using F8&1492R primers.

جدول ۴- کد دسترسی (Accession number) توالی 16srDNA پنج جدایه شناسایی شده در این تحقیق که در بانک ژن (NCBI) ثبت شده است

Table 4: Accession numbers of five submitted 16rDNA sequences of bacterial strains of the present study in NCBI

کد جدایه	نام جدایه شناسایی شده	NCBI Accession number
MF8	*Bacillus sonorensis*	MN826058.1
MF20	*Salinivibrio costicola*	MH160186.1
MF26	*Bacillus aquimaris*	MN826060.1
MF28	*Halomonas salina*	MH159225.1
MF29	*Microbulbifer halophilus*	MH159167.1

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.24236330.1401.9.4.4.6]

بحث و نتیجه گیری

در چندین سال اخیر، توجه زیادی روی باکتری‌های شورپسند (هالوفیل) مخصوصا شورپسند متوسط شده است. چندین مطالعه روی جداسازی، اکولوژی و رده بندی این باکتری‌ها از محیط‌های مختلف و کاربرد آن‌ها در بیوتکنولوژی و تولید ترکیبات فعال از جمله آنتی‌بیوتیک صورت گرفته است (Ventosa et al., 1998; Vreeland, 1992; Dutta & Bandopadhyay, 2022; Yadav et al., 2021). این گروه از باکتری‌ها چون منبع غنی از ژنوم‌های مقاومت به شرایط سخت هستند، شناسایی و مطالعه آنها جزو برنامه‌های اصلی موسسات تحقیقاتی معتبر دنیا است (Orhan & Gulluce, 2015). دریاچه ارومیه یکی از دریاچه‌های دایمی‌حاوی باکتری‌های شورپسند در دنیا است که در شمال غرب ایران بین استان‌های آذربایجان شرقی و غربی واقع شده است (Heidari et al., 2010). در تحقیق حاضر پس از غربال اولیه با مارکر ERIC، بر اساس توالی‌یابی ناحیه 16SrDNA با احتمال ۹۹ درصد، پنج گونه شدیداً شورپسند باکتریایی جداسازی و شناسایی گردید که شامل گونه‌های *Halomonas salina*، *Microbulbifer halophilus*، *Bacillus aquimaris*، *Bacillus sonorensis* و *Salinivibrio costicola* هستند که سویه اولی و آخری از لجن دریاچه، سه سویه دیگراز آب دریاچه جداسازی شدند.

سرده *Microbulbifer* از رده Gammaproteobacteria برای اولین بار توسط برخی محققین گزارش شد تا به حال استرین‌هایی از این سرده از رسوبات دریایی، باطلاق‌های نمکی، ماسه سنگ‌های قرمز و از محیط‌های نمکی سخت جداسازی شده‌اند (et al., 1997; Tanaka et al., 2003; Yoon et al., 2003; Yoon et al., 2004; Yoon et al., 2007 Gonzalez). اخیرا گونه‌هایی از این سرده از جمله *M. variabilis, M. epialgicus* از جلبک و گیاهان دریایی محیط سخت جداسازی شدند (Nishijima et al., 2009). گونه شناسایی شده در این پژوهش (*Microbulbifer halophilus*)، برای اولین بار توسط محققین گزارش شده است (Yoon et al., 2003, 2004, 2007) و همچنین این گونه توسط دیگر محققین (Tang et al., 2008) از ناحیه Xinjiang در شمال غربی چین از خاک شور در محیط کشت ISP حاوی ۱۰ درصد نمک (NaCl) جداسازی شده است، و از گیاه دریایی *Zygophyllum qatarence* در عربستان نیز گزارش شده است (Bibi et al., 2017). برخی گونه‌های این سرده کاربردهای صنعتی داشته و از نظر اقتصادی بسیار با ارزش محسوب می‌شوند (Park et al., 2022).

گونه *Halomonas salina* اولین بار با نام *Deleya salina* توسط محققین از آب شور گزارش شده است ولی بعدا به سرده *Halomonas* منتقل گردید (Valderrama et al., 1991). همچنین این گونه بعنوان همزیست جلبک قهوه‌ای *Fucus evanescens* جداسازی شده است (Ivanova et al., 2002). اعضای این سرده در مطالعات بیوتکنولوژی کاربردهای متعددی پیدا کرده‌اند (Ye & Chen, 2021). گونه *Bacillus aquimaris* از محیط‌های شور جداسازی شده است (Ventosa et al., 1998; Waino et al., 1999; Yoon et al., 2001). همچنین این گونه از آب‌های زمین‌های آبگیر دریای زرد (Yellow sea) جداسازی شده است (Jeong et al., 2013). از این سرده تاکنون چند گونه برای میکروبیوم ایران گزارش شده است و این گزارشی دیگر از وجود این باکتری در آب شور دریاچه ارومیه است.

گونه *Bacillus sonorensis*، تحمل دمایی خیلی بالایی دارد (۸۰-۱۰۰ درجه سانتی‌گراد) که اصطلاحا Hypertherophilic می‌گویند و در محیط‌های نمکی داغ پیدا می‌شود و به همین دلیل بیشتر از مناطق بیابانی جداسازی شده است. از جمله بیابان نمکی سونوران (Sonoran) در شمال آمریکا که نام این گونه نیز از این بیابان گرفته شده است ضمنا برای اولین بار تولید آنزیم Hyperthermoalkalophilic lipase توسط این گونه گزارش گردید (Palmisano et al., 2001). این باکتری از خاک بیابان Rajasthan در هند (Bhosale et al., 2016) نیز جداسازی شده است. شباهت غیرعادی ظاهر این گونه به *B. subtilis* قبلا متعدد گزارش شده است و در کنار آن، شباهت زیادی هم به گونه *B. licheaiformis* دارد اما از گونه *B. licheaiformis* شورپسندتر است (Sankaralingam et al., 2017). تا کنون گزارش متعددی از ایران در مورد وجود این باکتری در بافت گیاهی (Saffari et al, 2017) و یا خاک‌های شور (Rabani et al., 2020) منتشر شده است و این رکوردی جدید از وجود این باکتری در آب دریاچه ارومیه با این درجه از شورپسندی است.

گونه *Salinivibrio costicola*، به طور معمولی ساکن محیط‌های شور است و اولین بار توسط برخی محققین گزارش شده است (Garcia et al., 1987; Marquez et al., 1987; Ventosa et al., 1982; Ashengroph, 2017). ارگانیسم غالب در آب‌های اشباع از نمک (۱۵-۱۰ درصد) است اگرچه به مقدار کم از خاک‌های شور هم جداسازی شده است (Quesada et al., 1983; Rodriguez-Valera et al., 1985). تا بحال گونه‌های کمی‌از باکتری‌های شورپسند (هالوفیل) گزارش شده است؛ بنابراین این گونه به عنوان گونه مدل برای مشخصات

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.24236330.1401.9.4.4.6]

فیزیولوژیکی باکتری‌های شورپسند کاربرد دارد (Kushner, 1978; Kushner & Kamekura, 1988).

استرین‌هایی از سه سرده *Halomonas*، *Salinivibrio* و *Idiomarina* در محیط‌های کشت نوترینت براث، آب آلکالین فسفات و Macconkey Agar حاوی ۵ درصد نمک دریاچه و توالی‌یابی ناحیه 16SrDNA با پرایمرهای 27F ,1492R از آب دریاچه ارومیه جداسازی شده است که شامل گونه‌های *H. andesensis*، *H. gomoseomensis*، *H. hydrothermalis*، *H. boliviensis*، *S. costicola* subsp. *Alcoliplilus*، *S. sharmensis* و *I. loihiensis* بود (Irannejad et al., 2015). در این تحقیق سویه *S. costicola* subsp. *alcoliplilus* بر اساس توالی یابی ناحیه 16SrDNA با ۹۵ درصد شباهت متعلق به این گونه شناسایی شده است در حالی که در تحقیق حاضر میزان شباهت ۹۹ درصد بود. همین زیر گونه در سال ۲۰۰۸ از آب دریاچه گزارش و توصیف گردیده است (Amoozegar et al., 2008).

با کشت نمونه‌های آبی دریاچه ارومیه در شش محیط کشت مختلف از جمله MH، Halomonas، Marin Agar، MGM و Luria Bertani حاوی ۷/۵ و ۱۰ درصد نمک و توالی یابی ناحیه 16SrDNA هفت سرده *Salicola*، *Pseudomona*، *Marinobacter* و *Halomonas* از رده Gammaproteobacteria و از سرده *Halomonas* گونه‌های *H. saccharitans*، *H. fontilapidosi* و *H. taenensis* و دو سرده از شاخه Firmicutes شامل *Bacillus* و *Halobacillus* گزارش گردید (Vahed et al., 2011)، که *Bacillus* شامل گونه‌های *B. altitudinis*، *B.pumilus* و *B. safensis* بود.

از خاک شور ریزوسفر گیاهان در ارزوروم (Erzurum) ترکیه یک ایزوله از *Halomonas* جداسازی گردیده است که جداسازی در حد شناسایی سرده و در محیط کشت MH حاوی۱۰ درصد نمک بوده است و همچنین ۱۹ ایزوله از *Bacillus* جداسازی گردیده که شامل گونه‌های شناسایی شده در تحقیق حاضر نیستند (Orhan & Gulluce, 2015). جمعی از محققین در سال‌های مختلف از منطقه Tunisia کره جنوبی ۲۰ استرین از *Halomonas* جداسازی کردند (Essghaier et al., 2014; Kadyan et al., 2013; Qurashi & Sabri, 2013; Shrivastava & Kumar, 2013) اما این گونه جدید تحقیق حاضر در بین آن‌ها نبود. این استرین‌ها به طیف وسیعی از عوامل یا استرس‌های غیرزنده مقاومت نشان می‌دهند و همچنین رشد گیاه را از طریق فعال‌سازی سه تا اسید استیک (IAA) افزایش می‌دهند و تثبیت نیتروژن را هم افزایش می‌دهند.

گونه *Bacillus aquimaris* قبلا در ایران از دریاچه شور حوض سلطان قم (Mahmodnia et al., 2013) و دریاچه مهارلوی شیراز (Ebrahiminezhad et al., 2011; Ghasemi et al., 2011) و اندوفیت گیاه برنج (Mirzajani et al., 2013) گزارش شده بود لیکن گزارشی از وجود آن در دریاچه ارومیه دردسترس نبوده و این گزارش جدیدی از وجود این باکتری در این دریاچه است.

در مطالعه حاضر جدایه‌های جدا شده به دلیل رشد در غلظت‌های اشباع نمک و تحمل شرایط تنش محیطی احتمالا جزء باکتری‌های تحمل‌کننده شوری بود و پتانسیل استفاده در زمینه‌های مختلف بیوتکنولوژی از جمله تولید آنزیم‌های صنعتی و کودهای بیولوژیکی برای اصلاح خاک‌های شور را دارند.

سپاسگزاری

نویسندگان مقاله از تمامی‌کارشناسان آزمایشگاههای باکتری شناسی گیاهی، قارچ شناسی و بیماری شناسی گیاهی دانشگاه تبریز کمال تشکر و قدردانی را دارند

REFERENCES

Amini Hajiabadi, A., Mosleh Arani, A., Ghasemi, S., Hadi Rad, M., Shabazi Manshadi, Sh. & Etesami, H. 2020. The effect of plant growth promoting potentials of rhizosphere bacteria isolated from several halophytic species on vegetative growth and ionic content of wheat. Nova Biologica Reperta 8: 104-117. (In Persian).

Amoozegar, M.A., Schumann, P., Hajighasemi, M., Fatemi, A.Z. & Karbalaei-Heidari, H.R. 2008. *Salinivibrio proteolyticus* sp. nov., a moderately halophilic and proteolytic species from a hypersaline lake in Iran. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 58: 1159-1163.

Ashengroph, M. 2017. *Salinivibrio costicola* GL6, a novel isolated strain for biotransformation of caffeine to theobromine under hypersaline conditions. Current Microbiology 74: 34-41.

Bibi, F., Ullah, I., Alvi, S.A., Bakhsh, S.A., Yasir, M., Al-Ghamdi, A.A.K. & Azhar, E.I. 2017. Isolation, diversity, and biotechnological potential of rhizo-and endophytic bacteria associated with mangrove plants from Saudi Arabia. Genetics and Molecular Research 16: 1-12.

Dutta, B. & Bandopadhyay, R. 2022. Biotechnological potentials of halophilic microorganisms and their impact on mankind. Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences 11: 1-16.

Ebrahiminezhad, A., Rasoul-Amini, S. & Ghasemi, Y. 2011. L-Asparaginase production by moderate halophilic bacteria isolated from Maharloo Salt Lake. Indian Journal of Microbiology 51: 307-311.

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.24236330.1401.9.4.4.6]

Essghaier, B., Dhieb, C., Rebib, H., Ayari, S., Boudabous, A., Rezgui, A. & Sadfi-Zouaoui, N. 2014. Antimicrobial behavior of intracellular proteins from two moderately halophilic bacteria: strain J31 of *Terribacillus halophilus* and strain M3-23 of *Virgibacillus marismortui.* Journal of Plant Pathology & Microbiology 5: 1-7

Fallahi, A., Khakvar, R. & Bandehagh, A. 2022. Isolation and identification of halophilic bacteria from saline soils and their effect on salinity tolerance at wheat seedling stage. Journal of Agricultural Science and Sustainable Production 32:175-185. (In Persian).

Freezer, V. & Vostaff, D. 2004. Food microbiology. Trans: Ghasemia Safaei H. Isfahan, Iran: Isfahan University of Medical Sciences 505-506. (In Persian).

Ghasemi, Y., Rasoul-Amini, S., Kazemi, A., Zarrini, G., Morowvat, M.H. & Kargar, M. 2011. Isolation and characterization of some moderately halophilic bacteria with lipase activity. Microbiology 80: 483-487.

Garcia, M.T., Ventosa, A., Ruiz-Berraquero, F. & Kocur, M. 1987. Taxonomic study and amended description of *Vibrio costicola.* International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 37: 251-256.

Gonzalez, J. M., Mayer, F., Moran, M. A., Hodson, R. E. & Whitman, W. B. 1997. *Microbulbifer hydrolyticus* gen. nov., sp. nov., and *Marinobacterium georgiense* gen. nov., sp. nov., two marine bacteria from a lignin-rich pulp mill waste enrichment community. International Journal of Systematic Bacteriology 47: 369-376.

Heidari, N., Roudgar, M. & Ebrahimpour, N. 2010. Thermodynamic quantities and Urmia Sea water evaporation. Saline Systems 6: 1-6

Imani, A., Valizadeh, S., & Atashbar Kangarloei, B. 2020. Investigating the effect of environmental factors on the biodiversity of crustaceans in spring ponds in Rashkan region of Urmia. Journal of Fisheries 73: 241-254.

Irannejad, S., Akhavan Sepahi, A., Amoozegar, M., Tukmechi, A. & Motallebi Moghanjoghi, A. 2015. Isolation and identification of halophilic bacteria from Urmia Lake in Iran. Iranian Journal of Fisheries Sciences, 14: 45-59.

Ivanova, E.P., Bakunina, I.Y. & Sawabe, T. 2002. Two species of culture-able bacteria associated with degradation of brown algae; *Fucus evanescens*. Microbiol Ecology 43: 242-249.

Jeong, S.H., Yang, S.H., Jin, H.M., Kim, J.M., Kwon, K.K., & Jeon, C.O. 2013. *Microbulbifer gwangyangensis* sp. nov. and *Microbulbifer pacificus* sp. nov., isolated from marine environments. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 63: 1335-1341.

Kadyan, S., Panghal, M., Kumar, S., Singh, Kh., Yadav, J. P. 2013. Assessment of functional and genetic diversity of aerobic endospore forming Bacilli from rhizospheric soil of *Phyllanthus amarus* L. World Journal of Microbiology and Biotechnology 29: 1597-1610.

Khosravi, A.D., Hoveizavi, H., Mohammadian, A., Farahani, A. & Jenabi, A. 2016. Genotyping of multidrug-resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn and wound infections by ERIC-PCR. Acta Cirurgica Brasileira 31: 206-211.

Kushner, D.J. 1978. Life in high salt and solute concentrations: halophilic bacteria. Microbial life in extreme environments. 317-368.

Kushner, D.J. & Kamekura, M. 1988. Physiology of halophilic eubacteria, in "Halophilic bacteria" (F. Rodriguez-Valera, ed) 109-140.

Larsen, H. 1986. Halophilic and halotolerant microorganisms -an overview and historical perspective. FEMS Microbiology Reviews 39: 3-7.

Mahmodnia, F., Bahador, N., & Basarisaleh, M. 2013. Isolation, characterization and identification of amylase producing halothermophilic isolates from Howz Soltan Lake, Iran. African Journal of Microbiology Research 7: 4483-4490.

Marquez, M.C., Ventosa, A & Ruiz-Berraquero F. 1987. A taxonomic study of heterotrophic halophilic and non-halophilic bacteria from a solar saltern. Microbiology 133: 45-56.

Mehrshad, M., Amoozegar, M.A., Yakhchali, B. & Shahzedeh Fazeli, A. 2012. Biodiversity of moderately halophilic and halotolerant bacteria in the western coastal line of Urmia Lake. Biological Journal of Microorganisms, 1: 49-70.

Mirzajani, F., Askari, H., Hamzelou, S., Farzaneh, M. & Ghassempour, A. 2013. Effect of silver nanoparticles on Oryza sativa L. and its rhizosphere bacteria. Ecotoxicology and Environmental Safety 88: 48-54.

Nishijima, M., Takadera, T. & Imamura, N. 2009. *Microbulbifer variabilis* sp. nov. and *Microbulbifer epialgicus* sp. nov., isolated from Pacific marine algae, possess a rod–coccus cell cycle in association with the growth phase. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 59: 1696-1707.

Orhan, F. & Gulluce, M. 2015. Isolation and characterization of salt-tolerant bacterial strains in salt-affected soils of Erzurum, Turkey. Geomicrobiology Journal 32: 521-529.

Park, S.L., Cho, J.Y., Kim, S.H., Lee, H.J., Kim, S.H., Suh, M.J., Ham, S., Bhatia, S.K., Gurav, R., Park, S.H., Park, K., Kim, Y.G. & Yang, Y.H. 2022. Novel Polyhydroxybutyrate-Degrading Activity of the *Microbulbifer* Genus as Confirmed by *Microbulbifer* sp. SOL03 from the Marine Environment, Journal of Microbiology and Biotechnology 32: 27-36.

Quesada, E., Ventosa, A., Rodriguez-Valera, F., Megias, L. & Ramos- Cormenzana, A. 1983. Numerical taxonomy of moderately halophilic Gram-negative bacteria from hypersaline soils. Journal of General Microbiology 129: 2649-2657.

Qurashi, A.W. & Sabri, A.N. 2013. Osmolyte accumulation in moderately halophilic bacteria improves salt tolerance of chickpea. Pakistan Journal

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.24236330.1401.9.4.4.6]

of Botany 45: 1011-1016.

Rabani, M.S., Sharma, R., Singh, R. & Gupta, M.K. 2020. Characterization and Identification of naphthalene degrading bacteria isolated from petroleum contaminated Sites and their possible use in bioremediation. Polycyclic Aromatic Compounds 1: 1-12.

Palmisano, M.M., Nakamura, L.K., Duncan, K.E., Istock, C.A. & Cohan, F. M. 2001. *Bacillus sonorensis* sp. nov., a close relative of *Bacillus licheniformis*, isolated from soil in the Sonoran Desert, Arizona. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 51: 1671-1679.

Rodriguez-Valera, F., Ventosa, A., Juez, G. & Imhoff, J.F. 1985. Variation of environmental features and microbial populations with salt concentrations. Journal of General Microbiology 133: 45-56.

Sankaralingam, S., Harinathan, B., Palpperumal, S., Kathiresan, D., Rajendran, S., Shankar, T. & Sivakumar, N. 2017. Optimization of culture conditions for the production of halophilic protease by newly isolated *Bacillus sonorensis*. American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences 17: 293-299.

Schaad, N.W., Jones, J.B. & Chun, W. 2001. Laboratory guide for the identification of plant pathogenic bacteria (No. Ed. 3). American Phytopathological Society (APS Press).

Saffari, H., Pourbabaee, A.A., Asgharzadeh, A. & Besharati, H. 2017. Isolation and identification of effective cellulolytic bacteria in composting process from different sources. Archives of Agronomy and Soil Science 63: 297-307.

Shrivastava, U.P. & Kumar, A. 2013. Characterization and optimization of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase (ACCD) activity in different rhizospheric PGPR along with Microbacterium sp. strain ECI-12A. International journal of applied Sciences and Biotechnology 1: 11-15.

Tanaka, T., Yan, L. & Burgess, J. G. 2003. *Microbulbifer arenaceous* sp. nov., a novel endolithic bacterium isolated from the inside of red sand stone. Current Microbiology 47: 412-416

Tang, S. K., Wang, Y., Cai, M., Lou, K., Mao, P. H., Jin, X. & Li, W. J. 2008. *Microbulbifer halophilus* sp. nov., a moderately halophilic bacterium from north-west China. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 58: 2036-2040.

Vahed, S.Z., Forouhandeh, H., Hassanzadeh, S., Klenk, H.P., Hejazi, M.A. & Hejazi, M.S. 2011. Isolation and characterization of halophilic bacteria from Urmia Lake in Iran. Microbiology 80: 834-841.

Valderrama, M.J., Quesada, E., Bejar, V., Ventosa, A., Gutierrez, M.C., Ruiz-berraquero, F.Y. & Ramos-Cormenzana, A. 1991. *Deleya salina* sp. nov., a moderately halophilic gramnegative bacterium. International journal of systematic bacteriology 41: 377-384.

Ventosa, A., Quesada, E., Rodriguez-Valera, F., Ruiz-Berraquero, F. & Ramos-Cormenzana, A. 1982. Numerical taxonomy of moderately halophilic Gram-negative rods. Microbiology 128: 1959-1968

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

Vreeland, R.H. 1992. The family Halomonadaceae. The prokaryotes, A Handbook on the Biology of Bacteria; New York. Springer, 3181-3188.

Yadav, A.N., Kaur, T., Devi, R., Kour, D. & Yadav, N. 2021. Biodiversity and biotechnological applications of extremophilic microbiomes: current research and future challenges. Microbiomes of Extreme Environments 11: 278-290.

Ye, J.W. & Chen, G.Q. 2021. Halomonas as a chassis. Essays in Biochemistry 65: 393-403.

Yoon, J.H., Jung, S.Y., Kang, S.J. & Oh, T.K. 2007. *Microbulbifer celer* sp. nov., isolated from a marine solar saltern of the Yellow Sea in Korea. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 57: 2365-2369.

Yoon, J.H., Kim, I.G., Kang, K.H., Oh, T.K. & Park, Y.H. 2003. *Bacillus marisflavi* sp. nov. and *Bacillus aquimaris* sp. nov., isolated from sea water of a tidal flat of the Yellow Sea in Korea. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 53: 1297-1303.

Yoon, J.H., Kang, S.S., Lee, K.C., Kho, Y.H., Choi, S.H., Kang, K.H. & Park, Y.H. 2001. *Bacillus jeotgali* sp. nov., isolated from jeotgal, Korean traditional fermented seafood. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 51: 1087-1092.

Yoon, J.H., Kim, I.G., Oh, T.K. & Park, Y.H. 2004. *Microbulbifer maritimus* sp. nov., isolated from an intertidal sediment from the Yellow Sea, Korea. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 54: 1111-1116.

*****

How to cite this article:

Farzandi, M., Khakvar, R., Muhammadi, S.A. & Rattai, T. 2023. Isolation of some bacteria for halophilic microbiome of Urmia Lake. Nova Biologica Reperta 9: 279-288. (In Persian).

فرزندی، م.، خاک ور، ر.، محمدی، س.ا. و راتای، ت. ۱۴۰۱. جداسازی برخی از باکتری‌های میکروبیوم شور دریاچه ارومیه. یافته‌های نوین در علوم زیستی ۹: ۲۸۸-۲۷۹.

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.24236330.1401.9.4.4.6]