



Investigation of Halophilic Bacterial Diversity in Lake Urmia Using PCR-DGGE Technique

Manaffar R.^{1*}; Geravandi F.

1- Urmia University, Faculty of Natural Resources, Department of Fisheries, Urmia, Iran

2- Islamic Azad University, Urmia Branch, Faculty of Science, Department of Biology, Urmia, Iran

Abstract:

Human life is intricately intertwined with microorganisms, many of which offer significant benefits to humanity. Halophilic bacteria are capable of producing enzymes that remain active under extreme conditions such as high salinity, elevated temperatures, and abnormal pH levels. These enzymes have valuable applications in the food, pharmaceutical, textile, detergent, and biotechnology industries. Therefore, identifying microorganisms that thrive in hypersaline environments like Lake Urmia—one of the saltiest lakes in the world—can facilitate the design of bioreactors operating under similar conditions. In this study, the diversity of halophilic bacteria in Lake Urmia was investigated using the PCR-DGGE technique. Water and salt samples were collected from six distinct regions of the lake. Bacteria present in the lake water were directly subjected to high-speed centrifugation for DNA extraction. The extracted DNA was then specifically amplified using a pair of universal primers in the PCR process. The resulting fragments were analyzed via DGGE electrophoresis. Bands obtained from the gel were extracted using a Roche kit, re-amplified by PCR, and subsequently sequenced. Nucleotide diversity was assessed using bioinformatics software, and comparison with gene bank databases enabled identification of bacterial genera and species. This study not only demonstrated the effectiveness of DGGE in assessing microbial diversity in extreme environments but also led to the identification of several novel halophilic bacterial taxa in Lake Urmia that had previously eluded conventional culturing methods. Notably, a new halophilic species, *Deefgea rivuli*, was identified in the lake—marking its first report in such a hypersaline ecosystem.

How To Cite This Article:

Manaffar, R., & Geravandi, F. (2025) Investigation of Halophilic Bacterial Diversity in Lake Urmia Using PCR-DGGE Technique, *Int. J. Biotech. Adv. Res.*, 1(1) 27-34

Review History:

Received: 8/3/2025

Revised: 8/29/2025

Accepted: 9/29/ 2025

Available Online: 10/1/2025

Keywords:

Urmia Lake

Halophilic bacteria

Deefgea rivuli

PCR-DGGE



*Corresponding author's email: r.manaffar@urmia.ac.ir



Copyrights for this article are retained by the author(s) with publishing rights granted to Green Wave Pub. The content of this article is subject to the terms and conditions of the Creative Commons Attribution 4.0 International (CC BY 4.0) License. For more information, please visit <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



بررسی تنوع باکتری‌های نمک دوست دریاچه ارومیه با استفاده از تکنیک PCR-DGGE

رامین منافف^{۱*}، فاطمه گراوندی^۲

۱- گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

۲- گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ارومیه، ارومیه، ایران

تاریخچه داوری:

دریافت: ۱۴۰۴ مداد ۱۴۰۴

بازنگری: ۷ شهریور ۱۴۰۴

پذیرش: ۷ مهر ۱۴۰۴

ارائه آنلاین: ۹ مهر ۱۴۰۴

کلمات کلیدی:

دریاچه ارومیه

باکتری‌های نمک دوست

Deefgea rivuli

PCR-DGGE

زندگی انسان و میکروارگانیسم‌ها به هم گره خورده است و بسیاری از این میکروارگانیسم‌ها برای انسان سودمند می‌باشند. باکتری‌های نمک دوست (هالوفیل) قادر به تولید آنزیم‌هایی هستند که در شرایط پرشور، دمای بالا یا PH غیرعادی فعل باقی می‌مانند. این آنزیم‌ها در صنایع غذایی، دارویی، نساجی، شوینده‌ها و زیست‌فناوری کاربرد دارند. لذا شناسایی میکروارگانیسم‌هایی که در محیط‌های پرشوری مانند دریاچه ارومیه با شوری بسیار بالا زنده می‌مانند، امکان طراحی بیورآکتورهایی با شرایط مشابه را فراهم می‌کند. در این مطالعه بررسی تنوع باکتری‌های نمک دوست دریاچه ارومیه با استفاده از تکنیک PCR-DGGE انجام شد. به همین منظور نمونه آب و نمک دریاچه از شش ناحیه مختلف دریاچه ارومیه برداشت شد. باکتری‌های موجود در آب دریاچه مستقیماً پس از تخلیص توسط سانتریفیوژ با دور بالا جهت استخراج DNA بکار رفته. حاصل سپس در تکنیک PCR با استفاده از یک جفت پرایمر یونیورسال به صورت اختصاصی تکثیر شد. قطعات حاصل سپس در تکنیک DGGE مورد بررسی قرار گرفته. باندهای حاصل سپس توسط کیت Roche از درون ژل استخراج شدند، مجدداً توسط PCR تکثیر شدند و محصول PCR حاصل توالی یابی شدند. بررسی تنوع نوکلئوتیدی توسط نرم‌افزار انجام شد و مقایسه آن‌ها در بانک ژنی توانتست گونه و جنس این باکتری‌ها را شناسایی نماید. این بررسی ضمن اثبات قابلیت و توانایی تکنیک DGGE برای بررسی تنوع باکتری‌های یک محیط توانتست چند گونه و جنس جدید باکتری نمک دوست جدید در داخل دریاچه ارومیه شناسایی نماید که قبلاً توسط تکنیک‌های مرسوم کشته غیرقابل شناسایی بودند. در این تحقیق گونه جدیدی از باکتری‌های نمک دوست با عنوان *Deefgea rivuli* در دریاچه ارومیه شناسایی شد که پیش‌از این در چنین محیط فوق اشباعی گزارش نشده بود.

برای ارجاع به این مقاله از عبارت زیر استفاده کنید:

Manaffar, R., & Geravandi, F. (2025) Investigation of Halophilic Bacterial Diversity in Lake Urmia Using PCR-DGGE Technique, *Int. J. Biotech. Adv. Res.*, 1(1) 27-34 (In Persian)



تنوع زیستی، میکروب‌ها هستند و حیات تمامی موجودات بستگی به فعالیت میکروارگانیسم‌ها دارد. میکروارگانیسم‌ها، گسترده‌ی بسیار وسیعی از موجودات زنده را دارند. برای استفاده و به کارگیری بهتر از میکروارگانیسم‌ها همانند باکتری‌ها، داشتن اطلاعات در رابطه با مکان زیستی و کاربردهای آن‌ها می‌تواند سودمند باشد (۵). در جوامع میکروبی، برخی از میکروب‌ها در مقابل شرایط محیطی بسیار نامطلوب تاب می‌آورند که بررسی و شناسایی این دسته از میکروب‌ها ضروری است. از جمله‌ی این شرایط

* نویسنده عهدار مکاتبات: r.manaffar@urmia.ac.ir

مقدمه

تنوع زیستی، شاخص کلیدی برای سلامت یک اکوسیستم است و می‌تواند توسط تغییرات اقلیمی و شرایط محیط زیستی تحت تأثیر قرار گیرد. تنوع زیستی به عنوان تنوع موجودات زنده تعریف می‌شود که در سه سطح گونه، اکوسیستم و ژنتیک مطرح می‌شود (۱۰). ژن‌ها با خشی از گونه‌ها هستند و هر اکوسیستم از چندین گونه تشکیل شده است. تنوع ژنتیکی ساده‌ترین حالتی است که در تنوع زیستی مطرح می‌شود (۴). بزرگ‌ترین مخزن ناشناخته از



می‌آید که از این نظر به دریاچه نمک بزرگ ایالات متحده شباهت زیادی دارد. چون آب این دریاچه بسیار شور است، بنابراین میکروارگانیسم‌های آن، اینمی بیشتر و سمیت زایی بسیار پایینی دارند و برای کارهای بالینی می‌توانند مناسب باشند (۹). مطالعات قبلی تنوع زیستی برخی باکتری‌های مقاوم به شوری و نمک دوست را از این دریاچه گزارش کرده‌اند (۹، ۱۰، ۲۱).

با توجه به این که این دریاچه دارای تنوع زیستی میکروبی هست که این میکروب‌ها می‌توانند برای استفاده‌های بالینی و صنعتی مورد استفاده قرار گیرند، این مطالعه انجام شد تا تنوع باکتری‌های نمک دوست دریاچه‌ی ارومیه را با استفاده از روش PCR-DGGE بررسی کند. در مطالعات صورت گرفته در دریاچه‌ی ارومیه، تاکنون از این روش برای شناسایی تنوع گونه‌ها از این روش استفاده نشده است. بنابراین این مطالعه برای اولین بار به بررسی تنوع باکتری‌های نمک دوست دریاچه ارومیه با استفاده از تکنیک PCR-DGGE می‌پردازد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری از آب و نمک دریاچه ارومیه از شش ناحیه مختلف آن در بهار و تابستان سال ۱۳۹۲ انجام گرفت (شکل ۱). به دلیل بحران خشک‌سالی دریاچه ارومیه این کار تنها از دو طرف پل میان‌گذر دریاچه ارومیه و ناحیه شمال دریاچه ارومیه (ایستگاه باری) که پس‌روی آب دریاچه ارومیه کمتر هست امکان‌پذیر شد. شوری آب دریاچه در فصل بهار و تابستان ۱۳۹۲ در تمامی محل‌های نمونه‌برداری بیش از ۳۴۰ گرم در لیتر بود.



شکل ۱- عکس ماهواره‌ای و محل‌های نمونه‌برداری از دریاچه ارومیه. عکس مربوط به بهار سال ۱۳۹۲ هست.

برای تخلیص باکتری‌ها از روش مطالعات قبلی استفاده شد (۱). بصورت خلاصه پس از ور تکس‌کردن، محتوی لوله‌ها به داخل فالکن تیوب‌ها ریخته شد و با دور ۳۰۰۰ به

دمای بسیار بالا، بسیار پایین، شرایط شوری و ... است. محیط‌های شور که شوری آن‌ها بیشتر از آب دریا است، تنوع میکروبی به علت غلظت‌های زیادی نمک محدود می‌شود (۶). میکروارگانیسم‌های نمک دوست، بهترین رشد را در محیط‌هایی با غلظت نمک $0.20\text{--}0.50$ مولار دارند، در حالی که میکروارگانیسم‌هایی که مقاوم به شوری، قادر به رشد در غلظت‌های زیاد نمک هستند (۱۶). سازوکارهای حفظ محیط داخلی و برخی از ویژگی‌های غشای پلاسمایی باکتری‌های مقاوم به شوری، به آن‌ها برای سازش در محیط‌های نمکی همانند دریاچه‌ها کمک می‌کند (۱۷). دو واکنش عمده در میکروارگانیسم‌ها هنگام تعامل با غلظت زیاد نمک رخ می‌دهد که شامل تغییر دادن ویژگی‌های ریخت‌شناسی همانند متورم شدن و یا منقبض شدن است (۱۰). مطالعات نشان داده‌اند که مطالعات روی دریاچه‌های نمکی می‌تواند به کشف میکروارگانیسم‌های جدیدی کمک کند که بتوان از فرآورده‌های آن‌ها استفاده نمود (۲۱). در مجموع، زندگی انسان و میکروارگانیسم‌ها برای گره‌خوردگی است و بسیاری از این میکروارگانیسم‌ها برای انسان سودمند می‌باشند. شناسایی گونه‌های جدید مخصوصاً در دریاچه‌های نمکی محتمل است.

روش‌های مختلفی برای جداسازی و شناسایی میکروارگانیسم‌ها صورت می‌گیرد. برای مثال، روش‌های مستقل از کشت، به شناسایی گونه‌های غیرقابل کشت کمک کرده است و امکان فراهم آوردن جزئیات بیشتری را برای میکروارگانیسم‌ها را فراهم آورده است. روش‌های مولکولی نسبت به روش‌های سنتی دقیق‌تر هستند و امکان شناسایی گونه‌های بیشتری را فراهم می‌کنند. یکی از روش‌های مولکولی نوین که در زمینه‌های مختلف و همچنین PCR-DGGE (Polymerase chain reaction Denaturing gradient gel electrophoresis) است که محصولات PCR تولید شده در DNA را تفکیک می‌کند (۸). در واقع این تکنیک از تحرک متفاوت DNA های دو رشته‌ای و به طور جزئی دناتوره شده در بستر پلی آکریل آمید استفاده می‌کند (۱۴).

در این مطالعه، دریاچه‌ی ارومیه، به عنوان یکی از دریاچه‌های شور با تنوع میکروبی موربد بررسی قرار گرفت. دریاچه ارومیه بزرگ‌ترین و شورترین دریاچه دائمی ایران و یکی از دریاچه‌های فوق اشباع از نمک در دنیا به حساب

میکرو تیوب ۲۰ میکرو لیتری برداشته و وزن هر میکرو تیوب اندازه‌گیری شد. هر باند تکی در ژل توسط تیغ استریلی از ژل برش داده شد و داخل میکرو تیوب انداخته شد. درنهایت وزن خالص ژل برش داده شده داخل هر میکرو تیوب اندازه‌گیری شد. برای استخراج DNA از باندهای برش داده شده از ژل توسط کیت شرکت Roche استفاده شد. برای انجام فن DGGE از پرایمر اختصاصی استفاده شد. در این پرایمرها برای جلوگیری از دناتوره شدن کامل قطعات دو رشته‌ای DNA، یک ناحیه حاوی بالاترین دمای ذوب مصنوعی به نام GC-clamp وجود دارد و تضمین می‌کند که قطعات DNA از دناتوراسیون کامل در اثر مواد دناטורه کننده (اوره و فرمامید) محافظت شوند.

بعد از آماده شدن ژل، جهت تزریق نمونه‌ها، شانه‌ها برداشته شد، سپس ژل و شیشه‌های روی کاست برداشته و به صورت کج داخل تانکر شده قرار داده شد. چاهک‌های ایجادشده به وسیله سرنگ و بافر به خوبی شست و شو داده شد، سپس مقدار ۶ میکرو لیتر از نمونه‌ها با ۲۴ میکرو لیتر Loading dye مخلوط و در داخل چاهک‌ها تزریق شد. به خاطر تزریق نمونه‌ها دستگاه بر روی ولتاژ پایین قرار داده شد. با توجه به اینکه هنگام Run کردن نمونه‌ها باید تمامی چاهک‌ها پر باشند، چاهک‌های خالی با Loading dye پر شدند. سپس درب بافر تانک گذاشته و دستگاه روی ولتاژ بالا گذاشته شد. عمل Running با ولتاژ ۱۲۰ به مدت ۱۶ ساعت انجام شد (۱۹). بعد از اتمام الکتروفوروز ۱۶ ساعته، ژل از بین صفحات شیشه‌ای برداشته و به وسیله ۶ میکرو لیتر اتیدیوم بروماید در ۲۰ میلی لیتر بافر TAE به طریق شناورسازی رنگ آمیزی شد، سپس به دستگاه عکس‌برداری از ژل منتقل و در زیر اشعه UV باندهای به دست آمده بررسی شد. باندهای حاصل در ژل الکتروفوروز DGGE ابتدا توسط کیت ویژه مجدد استخراج شدند. عمل re-PCR موجب شد محصول PCR با کیفیت بالاتر و همچنین به صورت اختصاصی مربوط به یک باکتری خاص تولید شود. محصول PCR حاصل شده نهایتاً در مقدار و مشخصات لازم به شرکت سینا کلون ارسال و از طریق این شرکت در کشور انگلستان توالی یابی شد.

نتایج

انجام عمل PCR و متعاقب آن اجرای تکنیک rePCR موجب شد که باندهای شفاف و بدون اسمیری از نمونه‌های

مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. محلول رویی دور ریخته شد و رسوبات ته نمونه نگهداشته شد این عمل تا جایی تکرار شد که محلول رویی بعد از سانتریفیوژ کردن بی‌رنگ شود. برای کردن باکتری‌ها از سایر مواد داخل آب از فیلتر باکتریایی ۰/۲۲ میکرون استفاده شد.

برای استخراج DNA ۴۰۰ میلی‌لیتر از نمونه برای مدت زمان پنج دقیقه در دمای ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد حرارت داده شد و سپس برای مدت پنج دقیقه در يخ قرار داده شد تا سلول‌های باکتریایی لیز شوند. کمیت و کیفیت DNA با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر بررسی شد.

پرایمرهای مورد استفاده برای انجام PCR در این آزمایش (۱۶S) از روش مطالعات قبلی و همان پرایمرها استفاده شد (۳). آغازگرهای مورد استفاده در این مطالعه Forward: 338f (5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3') و Reverse: 518r (5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3') بودند. تمام شرایط دمایی و پروتکل‌ها مطابق مطالعات قبلی انجام شد (۳). برای واکنش زنجیره‌ی پلیمراز، آب، MgCl₂، بافر Taq dNTPase پلی‌مراز و پرایمرها در نسبت‌های بهینه مورد استفاده قرار گرفتند و به دستگاه ترموسایکلر منتقل شدند مطابق یک برنامه خاص اجازه داده شد که دستگاه PCR از قطعات مورد نظر کپی برداری نماید. جهت بررسی تولید یا عدم تولید محصول PCR در هر نمونه، همچنین تعیین طول قطعه تکثیر شده از الکتروفوروز بر روی ژل آگاراز استفاده شد. طی الکتروفوروز DNA‌ها بر اساس وزن مولکولی داخل ژل حرکت کرده و ایجاد باند کردند. ژل در داخل تانک دستگاه الکتروفوروز که حاوی بافر ۰/۵۰ درصد TBE بود قرار داده شد. سپس توسط سمپلر، مقدار ۱۰ میکرو لیتر از محصول PCR به مدت ۲ میکرو لیتر لودینگ بافر و ۱ میکرو لیتر ماده رنگ کننده ژل در درون هر چاهک (آگاراز ۱/۵ درصد)، ریخته شد. در یکی از چاهک‌ها هم ۱ میکرو لیتر ۱۵۰۰ bp DNA مارکر مخلوط شد و با ۱ میکرو لیتر ماده رنگی ریخته شد؛ تا طول محصولات PCR قبل بررسی باشد. با مقایسه و بررسی وزن مولکولی هر باند با باندهای DNA Ladder می‌توان وزن مولکولی هر باند را به دست آورد.

برش ژل زیر نور UV و در تاریکی و با استفاده از ماسک محافظت انجام شد. قبل از برش ژل به تعداد باندهای تکی،

گونه *Deefgea rivuli* از باکتری‌های *Betaprobacterium* را شناسایی نماید که پیش‌ازین از محیط‌های بسیار شوری همانند دریاچه ارومیه گزارش نشده بودند.

بررسی انجام شده توسط نرم‌افزار نشان داد که فاصله ژنتیکی و درصد تشابهات در بین نمونه‌های مورد بررسی *Deefgea rivuli* خیلی کمتر از فاصله ژنتیکی دو نمونه دیگر باهم هست.

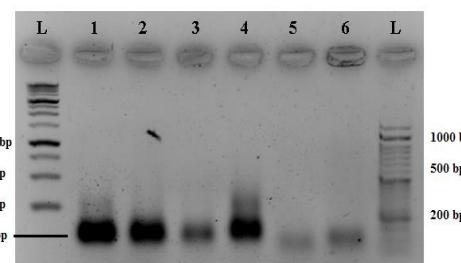
Uncultured bacterium	0.00304
Uncultured actinobacterium	0.02577
<i>Deefgea rivuli</i>	0.28673

شکل ۶- فیلوگرام سویه‌های مختلف باکتری‌های تحت مطالعه یافت شده در نمونه‌های تحت مطالعه's Nei

بحث

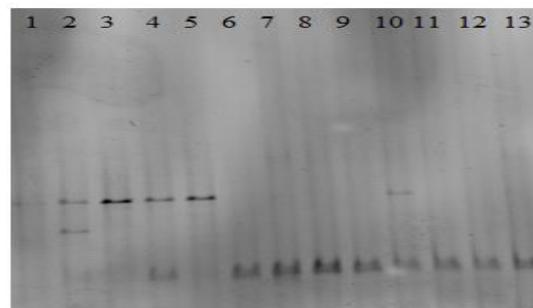
این تحقیق توانست برای اولین بار تنوع باکتری‌های دریاچه ارومیه را با روشنی غیر از کشت باکتریایی مشخص نماید. به دلیل بحران خشک‌سالی و بالا بودن شوری دریاچه تنوع مشاهده شده کمتر از میزان پیش‌بینی شده بود، لیکن این تحقیق توانست تعدادی سویه و گونه جدید باکتری را برای اولین بار از این محیط شناسایی کند. بررسی‌های به عمل آمده بر روی اقلیم‌های بسیار شور و دریاچه‌های نمکی پیش‌ازین توانسته بود انواعی از باکتری‌های نمک دوست را شناسایی نماید (۱۳، ۱۰، ۹، ۶). در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۱ بر روی جداسازی میکروارگانیسم‌ها از دریاچه ارومیه انجام شده است، نیز میکروارگانیسم‌هایی در دوشاخه *Firmicutes* و γ -*Proteobacteria* گزارش شدند که بیشترین میزان شباهت را به جنس‌های *Pseudomonas*, *Salicola*, *Halomonas*, *Bacillus*, *Marinobacter*, *Idiomarina* و *Halobacillus* نشان دادند (۲۲). اختلاف بین این مطالعه و مطالعات قبلی مربوط به روش مورد استفاده برای شناسایی باکتری‌ها باشد. پیش از روش‌های کشت و کلونینگ-توالی یاپی، برای بررسی تنوع زیستی باکتری‌های دریاچه ارومیه به کاربرده شدند. نتایج به دست آمده از هر کدام از این روش‌ها با توجه به ویژگی‌های ذاتی روش و شیوه‌های اجرایی دارای محدودیت و جهت‌گیری‌های خاص است. در روش کشت علاوه بر محدودیت اصلی (دسترسی به تنها حدود یک درصد از میکروارگانیسم‌های موجود)، محیط‌ها و روش‌های

موردمطالعه حاصل شود. باندهای حدود ۱۵۰ جفت بازی در شکل ۲ ارائه شده است.



شکل ۲- ژل الکتروفورز باکتری‌های دریاچه ارومیه از شش ایستگاه موردمطالعه. نمونه L مارکر DNA و نمونه‌های یک الی شش مربوط به ایستگاه‌های تحت مطالعه می‌باشند.

ادامه بررسی به منظور جداسازی و شناسایی باکتری‌های تحت مطالعه توسط الکتروفورز PCR-DGGE انجام شد. نتایج بررسی در شکل ۳ ارائه شده است. این آنالیز در غلظت ۵۰-۱۰ درصد ژل دناتوره کننده و ژل پلی آکریل آمید نه درصد انجام شد. این بررسی نشان داد که در هر یک از ایستگاه‌های تحت مطالعه حداقل یک جمعیت باکتری به صورت غالب وجود دارد اما در ایستگاه‌های شمال دریاچه این تنوع متفاوت از ناحیه میان‌گذر دریاچه ارومیه هست.



شکل ۳- ژل الکتروفورز DGGE باکتری‌های دریاچه ارومیه از شش ایستگاه موردمطالعه. نمونه L مارکر DNA و نمونه‌های یک الی پنج مربوط به ناحیه شمال دریاچه ارومیه و بقیه مربوط به نواحی میان‌گذر دریاچه ارومیه می‌باشند.

نتایج تعیین توالی در شکل‌های ۴ تا ۶ آورده شده است. این بررسی در مقایسه نرم‌افزاری در بانک ژنی توسط Basic Local Alignment Search Tool (Blast) توانست ۳ گونه جدید باکتری را شامل یک گونه تاکنون کشت نیافته از باکتری‌ها، یک گونه از باکتری‌های غیر کشت یافته *Actinobacterium* و یک

Uncultured bacterium clone ncd1651d05c
AGCAANCANNACCCANATANGCAGTGNNTGAAGAAGGCCTTTGGTTAAAGCACTTT
AGCGAGGAGGAGGAGGCTTTGATTAATACTCTATGGTAGTGGACGTTACTCGAAAATAAGCCC
CGGCTAACTCTGTGCCAGCGCGGT

Uncultured actinobacterium clone K-285-12-47
CACCANATANGCAGTGNNTGAAGAAGGCCTTTGGTTAAAGCACTTTAGCGAGGAGG
AGGCTCTTGATTAATACTCTACGTAGTGGACGTTACTCGAAAATAAGCCCCGGCTAACTCTG
TGCCAGCAGC

Deefgea rivuli strain S_T_TSA_63
CCTAGATCCANCACTGCCGCGTGAAGAAGGCCTCGGGTCCAAAGCTTTGCG
GGGAGGAAATCTTATTGGTTAATAANCCTGGAAAGGACAGTCCCCGGCAATAACGACCGGCT
TACTACGTGCCAGCGCGGTAAATAA

شکل ۴- توالی نمونه‌های شناسایی شده از باکتری‌های یافت شده در نمونه‌های تحت مطالعه

1	Uncultured bacterium	AGCAANCANNACCCANATANGCAGTGNNTGAAGAAGGCCTTTGGTTAAAGCACTTT	60
2	Uncultured actinobacterium	-----CACCANATANGCAGTGNNTGAAGAAGGCCTTTGGTTAAAGCACTTT	50
3	Deefgea rivuli	--CCTAGATCCANCACTGCCGCGTGAAGAAGGCCTCGGGTCCAAAGCTTTGCG	57
		*** *** * *** ***** * * *** * *** * ***	*****
1	Uncultured bacterium	AGCGAGGAGGAGGCTCTTGATTAATACTCTATGGTAGTGGACGTTACTCGAAAATAA	120
2	Uncultured actinobacterium	AGCGAGGAGGAGGCTCTTGATTAATACTCTACG-TAGTGGACGTTACTCGAAAATAA	109
3	Deefgea rivuli	TGCGGGGAGGAAATCTTATTGGTTAATAANCCTGGAA-GGACAGTCCCCGGCAATAAA	116
		*** ***** * *** ***** * * * *** * * ***	*****
1	Uncultured bacterium	GCCCCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCGCGGT-----	153
2	Uncultured actinobacterium	GCCCCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGC-----	135
3	Deefgea rivuli	CGACCGGGCTTACTACGTGCCAGCAGCGCGGTAAATAA	153
		***** *** *****	*****

شکل ۵- توالی مرتب شده توسط نرم‌افزار در نمونه‌های شناسایی شده از باکتری‌ها

مختلف دید درست‌تری در مورد تنوع زیستی میکروارگانیسم‌های منطقه به دست می‌دهد (۱۳). نتایج مشابهی در بررسی‌های قبلی بر روی دریاچه آران و بیدگل نیز به دست آمده است (۶، ۲). جدایه‌های گرم منفی و جدایه‌های دارای شکل میکروسکوپی کوکوس از فراوانی کمتری در بین جدایه‌ها برخوردار بودند. در مطالعه‌ای دیگر، محققین ۹۹ شکل میله‌ای بهشدت تحمل‌کننده نمک گرم مثبت و مولد هاگ را از خاک و رسوبات زیستگاه‌های پرشور واقع در نقاط مختلف اسپانیا جدا کردند که قادر به رشد در غلظت‌های نمک ۲۰ تا ۲۵ درصد بودند و بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناسی و محتوی G+C، در گونه‌های مختلف جنس Bacillus قرار گرفتند (۷). برخلاف نتایج حاصل از پژوهش حاضر، که اشکال میله‌ای گرم مثبت در بین جدایه‌ها دارای بیشترین میزان فراوانی هستند و ۵۹/۹ درصد جدایه‌ها را به خود اختصاص می‌دهند.

نتایج این بررسی نشان داد که بخش اصلی توالی‌ها در Bacteroidetes کتابخانه ژنی باکتری‌ها، توالی‌های به گروه متعلق بود. در این گروه، توالی‌های مرتبط با گونه Salinibacter ruber بیشترین فراوانی را داشت به طوری که ۶۶ درصد از توالی‌های به دست آمده در روش مستقل از کشت، اعضای این جنس بودند. این مشاهده در دیگر دریاچه‌های نمک نیز گزارش شده است (۱۲، ۱۵).

در این روش محدودیت‌هایی ایجاد می‌کند و نتایج به دست آمده از این روش بیانگر واقعیت کامل جامعه نیست. در روش مولکولی سد کشت برداشته شده و دسترسی به میکروارگانیسم‌های محیط بدون نیاز به رشد آن‌ها در شرایط مصنوعی آزمایشگاه میسر است. با این وجود، دسترسی به ماده ژنتیکی و توانایی تکثیر ژن موردنظر در این روش محدودیت‌هایی ایجاد می‌کند. تمامی میکروارگانیسم‌های منطقه در برابر روش استخراج DNA بکار برده شده پاسخ یکسانی ندارند. در این دسته از پژوهش‌های مولکولی، هیچ‌گونه همپوشانی در بین نتایج حاصل از روش‌های وابسته به کشت و غیر وابسته به کشت مشاهده نشد که این امر را می‌توان به تعداد بسیار کم جدایه‌های تعیین توالی شده با استفاده از روش کلونینگ و تعیین توالی نسبت داد. 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 قبول تری به دست می‌آید. بر اساس نتایج به دست آمده، به کارگیری روش‌های پلی فاز یک شامل استفاده همزمان از روش‌های سنتی وابسته به کشت و روش‌های مولکولی بهترین نتیجه در معرفی تنوع زیستی منطقه را ارائه می‌دهد. علاوه بر آن، استفاده از ابزارهای

- Incorporation and accumulation of docosahexaenoic acid from the medium by *Pichia methanolica* HA-32. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 66(12):2632-8.
2. Bagheri. M. 2009. Diversity of aerobic heterotrophic moderately halophilic bacteria from Aran-Bidgol Lake. A dissertation in University of Tehran. [In Persian]
 3. Boon N., Windt W., Verstraete W., Top E.M. 2002. Evaluation of nested PCR-DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis) with group-specific 16S rRNA primers for the analysis of bacterial communities from different waste-water treatment plants. *FEMS Microbiology and Ecology* 39(1):101-112.
 4. Bonnaud E.M., Troupin C., Dacheux L. 2019. Comparison of intra and inter-host genetic diversity in rabies virus during experimental cross-species transmission. *PLoS Pathogen.* 15(6):1007799.
 5. Davies Z.G., Dallimer M., Fisher J.C., Fuller R.A. 2019. Biodiversity and health: implications for conservation biodiversity and health in the face of climate change. Springer pp. 283-94.
 6. Didari M., Bagheri M., Amoozegar M.A., Bouzari S., Babavalian H., Tebyanian H., Hassanshahian M., Ventosa A. 2020. Diversity of halophilic and halotolerant bacteria in the largest seasonal hypersaline lake (Aran-Bidgol-Iran). *Journal of Environmental Health Science and Engineering* 11(1): 1-11.
 7. Garabito M.J., Marquez M.C., Ventosa A. 1998. Halotolerant *Bacillus* diversity in hypersaline environments. *Canadian Journal of Microbiology* 44:95-102.
 8. Green S.J., Leigh M.B., Neufeld J.D. 2009. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) for microbial community analysis, Germany. Springer, pp. 4137-58.
 9. Jookar Kashi F., Owlia P., Amoozegar M.A., Yakhchali B. 2014. Culturable prokaryotic diversity of Urmia salt lake. *Modern Genetics Journal.* 9(3):313-28. [In Persian]
 10. Kazemi E., Tarhriz V., Hejazi M.S., Amoozegar M.A. 2020. Isolation and characterization of halophilic and halotolerant bacteria from Urmia lake after

میان اعضای بانک ژنی تهیه شده از دریاچه ارومیه در ۴۲ درصد از جدایه های تعیین توالی شده شباهت کمتر از ۹۷ درصد با گونه های استاندارد ثبت شده مشاهده شد. سه جنس متفاوت *Adhaeribacter Salinibacter Cesiribacter* در بین جدایه های تعیین توالی شده مشاهده شدند که هر سه به رده Bacteroidetes متعلق هستند.

از جمله نتایج این تحقیق می توان به شناسایی گونه جدیدی به نام *D. rivuli* نام برد. این گونه ای از باکتری های Proteobacteria هستند. این شاخه گروه بزرگی از باکتری ها است. آن ها شامل طیف گسترده ای از عوامل بیماریزا مانند باکتری، سالمونلا، ویبریو، هلیکوباکتر، یرسینیا، و بسیاری دیگر از جنس های قابل توجه و بالهمیت است. آن ها بسیار گوناگون هستند و زندگی آزاد (غیر انگل)، و شامل بسیاری از باکتری های مسئول تثبیت نیتروژن می باشند (۱۸).

بر اساس شناسایی اولیه حاصل شده توسط نرم افزار و تحقیق در بانک ژنی و با توجه به اینکه نمونه دوم سویه ای از جنس *Actinobacterium* شد لذا احتمال سویه اول نیز از همین خانواده می رود. اکتنیو باکتری ها گروهی از باکتری های گرم مثبت هستند که در خود گوانین و سیتوزین بالای دارند. آن ها شامل تعداد زیادی از باکتری های بیماریزا و غیربیماریزا موجود در آب، خاک و طبیعت مانند اکتنیومایست ها، استرپتومیس و نوکاردیاها هستند. برخی از این باکتری ها مانند اکتنیومایست ها شباهت زیادی به قارچ ها دارند ولی عدم وجود هسته و مشاهده ترکیبات پیتیدوگلیکان، پروکاریوت بودن آن ها را تائید می کند. گونه جدید *Proteobacteria* نیز از باکتری های *Deefgea rivuli* هستند. این شاخه گروه بزرگی از باکتری ها است که تعداد زیادی از آن ها در محیط های رشد به رنگ غالب صورتی کلی ایجاد می کنند.

در مجموع، نتایج این مطالعه نه تنها نشان داد که استفاده از تکنیک برای شناسایی باکتری ها در آب های شور سودمند است، ولی گونه های جدیدی را شناسایی کرد که می توانند برای استفاده ای انسان سودمند باشند.

منابع

1. Aoki H., Miyamoto N., Furuya Y., Mankura M., Endo Y., Fujimoto K. 2002.

20. Vahed S.Z., Forouhandeh H., Tarhriz V. 2018. Halomonas tabrizica sp. nov., a novel moderately halophilic bacterium isolated from Urmia Lake in Iran. *Antonie van Leeuwenhoek* 111 (7): 1139-48.
21. Van den Burg B. 2013. Extremophiles as a source for novel enzymes. *Ecology Industry and Microbial* 6(1): 213–218.
22. Zununi Vahed S., Forouhandeh H., Hassanzadeh S., Klenk H., Hejazi M.A., Hejazi M. S. 2011. Isolation and characterization of halophilic bacteria from Urmia Lake in Iran. *Microbiology* 80(6): 834–841.
- the recent drought disaster in 2015. *Current Biotechnology* 9(1): 1-10.
11. Khan S.A., Zununi Vahed S., Forouhandeh H. Halomonas urmiana sp. nov., a moderately halophilic bacterium isolated from Urmia Lake in Iran. *International Journal of System Evolution Microbiology* 70(4): 2254-60.
12. Maturrano L., Santos F., Rossello-Mora R., Anton J. 2006. Microbial diversity in Maras salterns, a hypersaline environment in the Peruvian Andes. *Applied and environmental microbiology* 72(6): 3887-3895.
13. 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. *Microorganisms Biology* 1(1): 49-70. [In Persian]
14. Mohammadi P., Tavakoli A., Asgarani E., Ghazanfari T., Soroush M.R. 2015. Identification of dominant bacteria in sputum of chemical injured patients by using PCR-DGGE technique and culture-dependent method. *IJIDTM* 68(1): 7-14. [In Persian]
15. Mutlu M.B., Martínez-García M., Santos F., Pen A., Guven, K., Antón, J. 2008. Prokaryotic diversity in Tuz Lake, a hypersaline environment in Inland Turkey. *FEMS Microbiology Ecology* 63: 1-10.
16. Oren A. 2006. Life at high salt concentrations. In: Stanley Falkow ER, editor. Karl-Heinz Schleifer, Erko Stackebrandt, Martin Dworkin, editor. *The Prokaryotes: Ecophysiology and biochemistry*. Springer, pp. 263–82.
17. Rahman S.S., Siddique R. Tabassum N. 2017. Isolation and identification of halotolerant soil bacteria from coastal Patenga area. *BMC Research Notes* 10(1): 531-536.
18. Stackebrandt E., Lang E., Cousin S., Päuker O., Brambilla E., Kroppenstedt R., Lünsdorf H. 2007. Deefgea rivuli gen. nov., sp. nov., a member of the class Betaproteobacteria. *International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology* 57(3):639-645.
19. Taylor, G.R., Day, I.N., Taylor, G.R. eds. 2005. Guide to mutation detection. John Wiley & Sons Incorporated.