International Journal of Biotechnology and Advanced Research

Int. J. Biotech. Adv. Res., 1(1) (2025) 27-34

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.

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

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

*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/

[Downloaded from injbr.com on 2026-02-04]

نشریه بین‌المللی بیوتکنولوژی و پژوهش‌های پیشرفته

نشریه بین‌المللی بیوتکنولوژی و پژوهش‌های پیشرفته، دوره ۱، شماره ۱، سال ۱۴۰۴، صفحات ۲۷-۳۴

INJBR
INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY AND ADVANCED RESEARCH

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

رامین مناففر[*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

چکیده:

زندگی انسان و میکروارگانیسم‌ها به هم گره‌خورده است و بسیاری از این میکروارگانیسم‌ها برای انسان سودمند می‌باشند. باکتری‌های نمک‌دوست (هالوفیل) قادر به تولید آنزیم‌هایی هستند که در شرایط پرشور، دمای بالا یا PH غیرعادی فعال 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 رفتند. DNA حاصل سپس در تکنیک PCR با استفاده از یک جفت پرایمر یونیورسال به‌صورت اختصاصی تکثیر شد. قطعات حاصل سپس در تکنیک الکتروفورز DGGE موردبررسی قرار گرفتند. 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 توانست گونه و جنس این باکتری‌ها را شناسایی نماید. این بررسی ضمن اثبات قابلیت و توانایی تکنیک DGGE برای بررسی تنوع باکتری‌های یک محیط توانست چند گونه و جنس جدید باکتری نمک دوست جدید در داخل دریاچه ارومیه شناسایی نماید که قبلاً توسط تکنیک‌های مرسوم کشت غیرقابل‌شناسایی بودند. در این تحقیق گونه جدیدی از باکتری‌های نمک دوست با عنوان *Deefgea rivuli* در دریاچه ارومیه شناسایی شد که پیش‌ازاین در چنین محیط فوق اشباعی گزارش نشده بود.

تاریخچه داوری:

دریافت: ۱۲ مرداد 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

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)

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 به‌عنوان تنوع موجودات زنده تعریف می‌شود که در سه سطح گونه، اکوسیستم و ژنتیک مطرح می‌شود (۱۰). ژن‌ها بخشی از گونه‌ها هستند و هر اکوسیستم از چندین گونه تشکیل‌شده است. تنوع ژنتیکی ساده‌ترین حالتی است که در تنوع زیستی مطرح می‌شود (۴). بزرگ‌ترین مخزن ناشناخته از تنوع زیستی، میکروب‌ها هستند و حیات تمامی موجودات بستگی به فعالیت میکروارگانیسم‌ها دارد. میکروارگانیسم‌ها، گستره‌ی بسیار وسیعی از موجودات زنده را دارند. برای استفاده و به‌کارگیری 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. ازجمله‌ی این شرایط

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

حقوق مولفین به نویسندگان و حقوق ناشر به انتشارات موج سبز داده شده است. این مقاله تحت لیسانس آفرینندگی مردمی(Dreative Commons License)در دسترس شما قرار گرفته است. برای جزئیات این لیسانس، از آدرس https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/ دیدن فرمائید.

[Downloaded from injbr.com on 2026-02-04]

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 می-شود (۶). میکروارگانیسم‌های نمک دوست، بهترین رشد را در محیط‌هایی با غلظت نمک ۰/۲۰ تا ۵/۲۰ مولار دارند، درحالی‌که 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). درمجموع، زندگی انسان و میکروارگانیسم‌ها به هم گره‌خورده است و بسیاری از این میکروارگانیسم‌ها برای انسان سودمند می‌باشند. شناسایی گونه‌های جدید مخصوصاً در دریاچه‌های نمکی محتمل است.

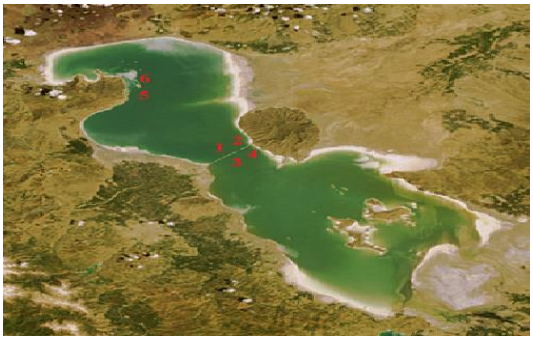
روش‌های مختلفی برای جداسازی و شناسایی میکروارگانیسم‌ها صورت می‌گیرد. برای مثال، روش‌های مستقل از کشت، به شناسایی گونه‌های غیرقابل کشت کمک کرده است و امکان فراهم آوردن جزئیات بیشتری را برای میکروارگانیسم‌ها را فراهم آورده است. روش‌های مولکولی نسبت به روش‌های سنتی دقیق‌تر هستند و امکان شناسایی گونه‌های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

در این مطالعه، دریاچه‌ی ارومیه، به‌عنوان یکی از دریاچه‌های شور با تنوع میکروبی موردبررسی قرار گرفت. دریاچه ارومیه بزرگ‌ترین و شورترین دریاچه دائمی ایران و یکی از دریاچه‌های فوق اشباع از نمک در دنیا به‌حساب می‌آید که از این نظر به دریاچه نمک بزرگ ایالات‌متحده شباهت زیادی دارد. چون آب این دریاچه بسیار شور است، بنابراین میکروارگانیسم‌های آن، ایمنی 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 (۲۱، ۱۰، ۹).

با توجه به این‌که این دریاچه دارای تنوع زیستی میکروبی هست که این میکروب‌ها می‌توانند برای استفاده-های بالینی و صنعتی مورداستفاده 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 استفاده‌نشده 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 ورتکس‌کردن، محتوی لوله-ها به داخل فالکن تیوپ‌ها ریخته شد و با دور ۳۰۰۰ به

[Downloaded from injbr.com on 2026-02-04]

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 جدا کردن باکتری‌ها از سایر مواد داخل آب از فیلتر باکتریایی ۰/۲۲ میکرون استفاده شد.

برای استخراج DNA، ۴۰۰ میلی‌لیتر از نمونه برای مدت‌زمان پنج دقیقه در دمای ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد حرارت داده شد و سپس برای مدت پنج دقیقه در یخ 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 شامل 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، $MgCl_2$، بافر PCR، TaqdNTpaseپلی مراز و پرایمرها در نسبت‌های بهینه مورد استفاده قرار گرفتند و به دستگاه ترموسایکلر منتقل شدند مطابق یک برنامه خاص اجازه داده شد که دستگاه PCRاز قطعات مورد نظر کپی برداری نماید. جهت بررسی تولید یا عدم تولید محصول PCRدر هر نمونه، همچنین تعیین طول قطعه تکثیر شده از الکتروفورز بر روی ژل آگارز استفاده شد. طی الکتروفورزDNA ها بر اساس وزن مولکولی داخل ژل حرکت کرده و ایجاد باند کردند. ژل درداخل تانک دستگاه الکتروفورزکه حاوی بافر ۰/۵۰ درصد TBE بود قرار داده شد. سپس توسط سمپلر، مقدار۱۰ میکرولیتر از محصول PCR به‌همراه ۲ میکرولیتر لودینگ بافر و ۱ میکرولیتر ماده رنگ‌کننده ژل در درون هر چاهک (آگارز ۱/۵ درصد)، ریخته شد. در یکی از چاهک‌ها هم ۱ میکرولیتر DNA 1500 bp مارکر مخلوط شد و با ۱ میکرولیتر ماده رنگی ریخته شد؛ تا طول محصولات PCRقابل بررسی باشد. با مقایسه و بررسی وزن مولکولی هر باند با باندهای DNA Ladder می توان وزن مولکولی هر باند را به دست‌آورد.

برش ژل زیر نور UV و در تاریکی و با استفاده از ماسک محافظ انجام شد. قبل از برش ژل به تعداد باندهای تکی، میکرو تیوپ ۲۰ میکرو لیتری برداشته و وزن هر میکرو تیوپ اندازه‌گیری شد. هر باند تکی در ژل توسط تیغ استریلی از ژل برش داده شد و داخل میکرو تیوپ انداخته شد. درنهایت وزن خالص ژل برش داده‌شده داخل هر میکرو تیوپ اندازه‌گیری شد. برای استخراج DNA از باندهای برش داده‌شده از ژل توسط کیت شرکت Roche استفاده شد. برای انجام فن DGGEاز 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 نامGC-clamp وجود دارد و تضمین می-کند که قطعاتDNA از دناتوراسیون کامل در اثر مواد دناتوره کننده (اوره و فرمامید) محافظت شوند.

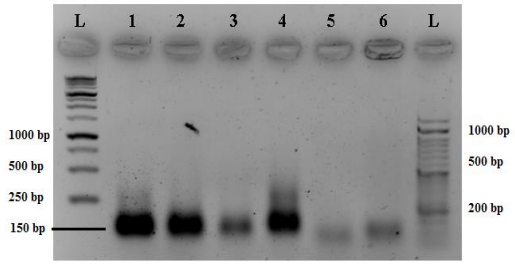
بعد از آماده شدن ژل، جهت تزریق نمونه‌ها، شانه‌ها برداشته شد، سپس ژل و شیشه‌های روی کاست برداشته و به‌صورت کج داخل تانکر شده قرار داده شد. چاهک‌های ایجادشده به‌وسیله سرنگ و بافر به‌خوبی شست‌وشو داده شد، سپس مقدار ۶ میکرو لیتر از نمونه‌ها با ۲۴ میکرو لیتر Loading dye مخلوط و در داخل چاهک‌ها تزریق شد. به 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 dyeپر شدند. سپس درب بافر تانک گذاشته و دستگاه روی ولتاژ بالا گذاشته شد. عمل Runningبا ولتاژ۱۲۰ به مدت۱۶ ساعت انجام شد (۱۹). بعد از اتمام الکتروفورز ۱۶ ساعته، ژل از بین صفحات شیشه‌ای برداشته و به‌وسیله ۶ میکرو لیتر اتیدیوم بروماید در۲۰ میلی‌لیتر بافرTAE به طریقه شناورسازی رنگ‌آمیزی شد، سپس به دستگاه عکس‌برداری از ژل منتقل و در زیر اشعه UV باندهای به‌دست‌آمده بررسی شد. باندهای حاصل در ژل الکتروفورز DGGEابتدا توسط کیت ویژه مجدداً استخراج شدند. عمل re-PCR موجب شد محصول PCR با کیفیت بالاتر و همچنین به‌صورت اختصاصی مربوط به یک باکتری خاص تولید شود. محصول PCR حاصل‌شده 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

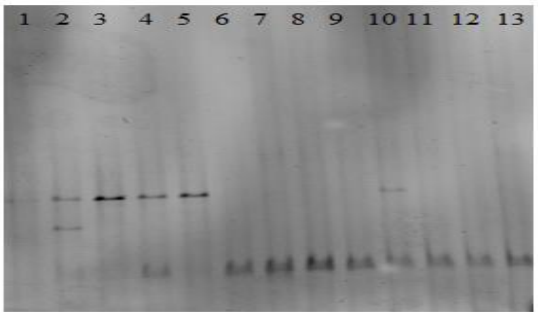
[Downloaded from injbr.com on 2026-02-04]

موردمطالعه حاصل شود. باندهای حدود ۱۵۰ جفت بازی در شکل ۲ ارائه‌شده 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.

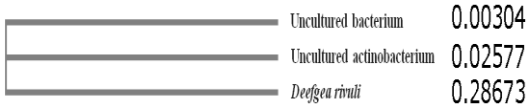
ادامه بررسی به‌منظور جداسازی و شناسایی باکتری‌های تحت مطالعه توسط الکتروفورز PCR-DGGE انجام شد. نتایج بررسی در شکل ۳ ارائه‌شده است. این آنالیز در غلظت ۱۰-۵۰ درصد ژل دناتوره کننده و ژل پلی آکریل آمید نه درصد انجام شد. این بررسی نشان داد که در هر یک از ایستگاه‌های تحت مطالعه حداقل یک جمعیت باکتری به‌صورت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



شـکل ۳- ژل الکتروفورز DGGE باکتری‌های دریاچه ارومیه از شـــش ایســـتگاه 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 نرم‌افزار تحت شبکه Basic Local Alignment Search Tool (Blast) توانست ۳ گونه جدید باکتری را شامل یک‌گونه تاکنون کشت نیافته از باکتری‌ها، یک‌گونه از باکتری‌های غیر کشت یافته *Actinobacterium* و یک گونه *Deefgea rivuli* از باکتری-های *Betaprobacterium* را شناسایی نماید که پیش‌ازاین از محیط‌های بسیار شوری همانند دریاچه ارومیه گزارش نشده بودند.

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



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

بحث

این تحقیق توانست برای اولین بار تنوع باکتری‌های دریاچه ارومیه را با روشی غیر از کشت باکتریایی مشخص نماید. به دلیل بحران خشک‌سالی و بالا بودن شوری دریاچه تنوع مشاهده‌شده کمتر از میزان پیش‌بینی‌شده بود، لیکن این تحقیق توانست تعدادی سویه و گونه جدید باکتری را برای اولین بار از این محیط شناسایی کند. بررسی‌های به‌عمل‌آمده بر روی اقلیم‌های بسیار شور و دریاچه‌های نمکی پیش‌ازاین 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 انجام‌شده است، نیز میکروارگانیسم‌هایی در دوشاخه *γ-Proteobacteria* و *Firmicutes* گزارش شدند که بیشترین میزان شباهت را به جنس‌های Halomonas، *Pseudomonas*، *Salicola*، *Idiomarina*، *Marinobacter* و *Bacillus* و *Halobacillus* نشان دادند (۲۲). اختلاف بین این مطالعه و مطالعات قبلی مربوط به روش مورداستفاده برای شناسایی باکتری‌ها باشد. پیش از روش‌های کشت و کلونینگ-توالی یابی، برای بررسی تنوع زیستی باکتری‌های دریاچه ارومیه به‌کاربرده شدند. نتایج به‌دست‌آمده از هرکدام 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

[Downloaded from injbr.com on 2026-02-04]

Uncultured bacterium clone ncd1651d05c
AGCAANCANNCACCANATANGCAGTGNGTGAAGAAGGCCTTTTGGTTGTAAAGCACTTTT
AGCGAGGAGGAGGCTCCTTTGATTAATACTCTATGGTAGTGGACGTTACTCGCAAAATAAGCCC
CGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGGTA

Uncultured actinobacterium clone K-285-12-47
CACCANATANGCAGTGNGTGAAGAAGCCGTTTTGGTTGTAAAGCACTTTTAGCGAGGAGG
AGGCTCCTTTGATTAATACTCTACGTAGTGGACGTTACTCGCAAAATAAGCCCCGGCTAACTCTG
TGCCAGCAGC

***Deefgea rivuli* strain S_T_TSA_63**
CCTAGATCCANCACTGCCGCGTGCGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTCCCAAGCTCTTTTTGCG
GGGAGGAAATCTTATTGGTTAATAANCGCTGGGAAGGACAGTCCCCGGCCAATAACGACCGGCT
TACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATAA

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

```
1  Uncultured bacterium          AGCAANCANNCACCANATANGCAGTGNGTGAAGAAGGCCTTTTGGTTGTAAAGCACTTTT 60
2  Uncultured actinobacterium    ----------CACCANATANGCAGTGNGTGAAGAAGCCGTTTTGGTTGTAAAGCACTTTT 50
3  Deefgea rivuli                --CCTAGATCCANCACTGCCGC-GTGCGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTCCCAAGCTCTTTT 57
                                       ** **     ** *** ********* * **  ****   **** *****

1  Uncultured bacterium          AGCGAGGAGGAGGCTCCTTTGATTAATACTCTATGGTAGTGGACGTTACTCGCAAAATAA 120
2  Uncultured actinobacterium    AGCGAGGAGGAGGCTCCTTTGATTAATACTCTACG-TAGTGGACGTTACTCGCAAAATAA 109
3  Deefgea rivuli                TGCGGGGAGGAAATCTTATTGGTTAATAANCGCTGGGAA-GGACAGTCCCCGGCCAATAA 116
                                  *** ******       *** ******  *   *  *  ****  * * **   *****

1  Uncultured bacterium          GCCCCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGGTA---- 153
2  Uncultured actinobacterium    GCCCCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGC---------- 135
3  Deefgea rivuli                CGACCGGCTTACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATAA 153
                                    ****** ***  ***********
```

شکل۵- توالی مرتب‌شده توسط نرم‌افزار در نمونه‌های شناسایی‌شده از باکتری‌ها

کشت استفاده‌شده، تنها امکان رشد گروه خاصی از میکروارگانیسم‌ها را فراهم می‌کند و نتایج به‌دست‌آمده از این روش بیانگر واقعیت کامل جامعه نیست. در روش مولکولی سد کشت برداشته‌شده 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 به‌اندازه افزایش تعداد نمونه در جوامع گیاهی و جانوری مؤثر و قابل‌تعمیم به واقعیت نیست. اما با افزایش تعداد نمونه‌ها نتایج قابل‌قبول‌تری به دست می‌آید. بر اساس نتایج به‌دست‌آمده، به‌کارگیری 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 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 به‌دست‌آمده است (۶، ۲). جدایه‌های گرم منفی و جدایه های دارای شکل میکروسکوپی کوکوس از فراوانی کمتری در بین جدایه ها 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 جدایه ها دارای بیشترین میزان فراوانی هستند و ۵۹/۹ درصد جدایه ها را به خود اختصاص می‌دهند.

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

[Downloaded from injbr.com on 2026-02-04]

میان اعضای بانک ژنی تهیه‌شده از دریاچه ارومیه در ۴۲ درصد از جدایه‌های تعیین توالی شده شباهت کمتر از ۹۷ درصد با گونه‌های استاندارد ثبت‌شده مشاهده شد. سه جنس متفاوت *Salinibacter*، *Adhaeribacter* و *Cesiribacter* در بین جدایه‌های تعیین توالی شده مشاهده شدند که هر سه به رده Bacteroidetes متعلق هستند.

ازجمله نتایج این تحقیق می‌توان به شناسایی گونه جدیدی به نام *D. rivuli* نام برد. این‌گونه ای از باکتری‌های Proteobacteria هستند. این شاخه گروه بزرگی از باکتری‌ها است. آن‌ها شامل طیف گسترده‌ای از عوامل بیماری‌زا مانند باکتری، سالمونلا، ویبریو، هلیکوباکتر، یرسینیا، و بسیاری دیگر از جنس‌های قابل‌توجه و بااهمیت است. آن‌ها بسیار گوناگون هستند و زندگی آزاد (غیر انگل)، و شامل بسیاری از باکتری‌های مسئول تثبیت نیتروژن می‌باشند (۱۸).

بر اساس شناسایی اولیه حاصل‌شده توسط نرم‌افزار و تحقیق در بانک ژنی و با توجه به اینکه نمونه دوم سویه‌ای از جنس *Actinobacterium*شناسایی شد لذا احتمال سویه اول نیز از همین خانواده می‌رود. اکتینو باکتری‌ها گروهی از باکتری‌های گرم مثبت هستند که در DNAخود گوانین و سیتوزین بالایی دارند. آن‌ها شامل تعداد زیادی از باکتری‌های بیماری‌زا و غیربیماریزایی موجود در آب، خاک و طبیعت مانند اکتینومایست‌ها، استرپتومیسس و نوکاردیاها هستند. برخی از این باکتری‌ها مانند اکتینومایست‌ها شباهت زیادی به قارچ‌ها دارند ولی عدم وجود هسته و مشاهده ترکیبات پپتیدوگلیکان، پروکاریوت بودن آن‌ها را تائید می‌کند. گونه جدید *Deefgea rivuli* نیز از باکتری‌های *Proteobacteria* هستند. این شاخه گروه بزرگی از باکتری‌ها است که تعداد زیادی از آن‌ها در محیط‌های رشد به رنگ غالب صورتی کلنی ایجاد می‌کنند.

درمجموع، نتایج این مطالعه نه‌تنها نشان داد که استفاده از تکنیک برای شناسایی باکتری‌ها در آب‌های شور سودمند است، ولی گونه‌های جدیدی را شناسایی کرد که می‌توانند برای استفاده‌ی انسان سودمند باشند.

منابع

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

[Downloaded from injbr.com on 2026-02-04]

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-Garcıa 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.
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.

[Downloaded from injbr.com on 2026-02-04]