مجله دنیای میکروب‌ها
سال یازدهم شماره اول (پیاپی ۳۴) بهار ۱۳۹۷
صفحات ۷۲-۶۱

Original Article

# تنوع مولکولی باکتری ها و آرکی های هتروتروف غار نمکدان قشم

**محبوبه دارابی[۱]، محمد علی آموزگار*[۲]، ملیحه مهرشاد[۳]، نینا زمانی[۱]، سید ابوالحسن شاهزاده فاضلی[۴]، محمود شوندی[۵]**

[۱] کارشناس ارشد، دانشگاه تهران، تهران، [۲] استاد، دانشگاه تهران، تهران، [۳] دکتری، دانشگاه تهران، تهران، [۴] دانشیار، مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران، تهران، [۵] استادیار، گروه میکروب شناسی و بیوتکنولوژی، پژوهشگاه صنعت نفت، تهران.

## چکیده

*سابقه و هدف:* با توجه به تنوع بالا، کاربردهای زیست فناوری و نقش موثر میکروارگانیسم ها در ایجاد و حفظ تعادل زیست بوم، کسب اطلاعات و توجه به تنوع زیستی میکروارگانیسم ها بسیار مورد نیاز است. در این میان، باکتری‌ها و آرکی های نمک‌دوست نیز به دلیل اهمیت اقتصادی و شرایط خاص اکولوژیکی زیست بوم شان مورد توجه می باشند. این مطالعه با هدف بررسی تنوع باکتری ها و آرکی های هتروتروف غار نمکدان قشم انجام شد.

*مواد و روش ها:* این پژوهش به صورت مقطعی با نمونه برداری از غار نمکدان قشم در آبان ماه سال ۱۳۹۲ انجام شد. تنوع میکروارگانیسم های هوازی هتروتروف ساکن غار با استفاده از روش کشت مورد بررسی قرار گرفت. باکتری ها و آرکی های هالوفیل و هالوتولرانت در شرایط هوازی به ترتیب در دو محیط کشت Marine Agar و MGM جدا سازی شدند. جدایه ها براساس تفاوت های ریخت شناسی و ویژگی های بیوشیمیایی اولیه تفکیک شدند. در نهایت ژن *16S rRNA* برای ۳۲ سویه توالی یابی شد.

*یافته ها:* بین ۱۷۲ سویه خالص ژن *16S rRNA* برای ۲۷ سویه ترادف یابی شد که از نظر فیلوژنتیک آرکی ها در شاخه *یوری آرکیوتا* و درجنس های *هالوباکتریوم، هالوآرکولا، هالوفراکس، هالوکوکوس* و باکتری ها در شاخه های *فرمی کیوتس* و *باکتریوئیدس* و در جنس های *آلیفودینی بیوس، باسیلوس، پارالیوباسیلوس،اکویی باسیلوس، پائنی باسیلوس* قرار گرفتند. از بین این سویه ها ۱۱ سویه شباهت کمتر از ۹۸/۷ درصد با نزدیک ترین سویه استاندارد داشتند که نقطه مرزی برای ارائه گونه جدید میکروبی محسوب می شود.

*نتیجه گیری:* قرار گرفتن جدایه های شناسایی شده در شاخه ها و جنس های مختلف نشان دهنده تنوع بالای اکوسیستم غار نمکدان قشم از نظر میکروبی است. ارایه میکروارگانیسم های بومی در گونه ها و جنس های جدید و از اکوسیستم های منحصر به فرد با معرفی محتوای ژنتیکی جدید امکان دست یابی به فرایند ها و ژن های جدید بومی را فراهم می کند.

*واژگان کلیدی:* باکتری های نمک دوست، آرکی های نمک دوست، تنوع زیستی، غار نمکدان قشم.

دریافت مقاله: فروردین ماه ۹۶ پذیرش برای چاپ: اردیبهشت ماه ۹۶

## مقدمه

میکروارگانیسم‌ها بخش جدایی ناپذیر از تاریخ و عملکرد حیات در کره زمین هستند. اکولوژی میکروبی؛ تنوع میکروارگانیسم‌ها و همچنین چگونگی برهم کنش آنها با یکدیگر و با محیط برای تولید و حفظ این تنوع را مورد بررسی قرار می دهد (۱). میکروارگانیسم‌ها نقش مهمی در تکامل بیولوژیکی، ژئولوژیکی، ژئوشیمیایی و اقلیمی زمین دارند. در نتیجه اکولوژیست‌های میکروبی به صورت سنتی بر دو زمینه مطالعاتی: تنوع میکروبی شامل جداسازی، شناسایی و کمیت پذیر کردن میکروارگانیسم‌ها در زیستگاه‌های متنوع و همچنین فعالیت میکروبی یعنی عملکرد میکروارگانیسم‌ها در

*) آدرس برای مکاتبه: تهران، خ انقلاب، دانشگاه تهران، گروه میکروب شناسی.
تلفن: ۰۲۱۶۱۱۱۳۵۵۹ پست الکترونیک: amoozegar@ut.ac.ir

زیستگاه خود و نقش شان به واسطه تعیین تنوع میکروبی و چرخه‌های ژئوشیمیایی تمرکز دارند (۱). تنوع زیستی مفهوم بسیار مهمی است که پایه و اساس حیات بر روی کره زمین را تشکیل می‌دهد (۲). تنوع میکروبی در محیط را می‌توان با شاخص‌های متنوعی مانند تنوع فیلوژنتیکی، تنوع گونه‌ای، تنوع ژنوتایپی و تنوع ژنی بررسی کرد (۱). مطالعه اکولوژی، تنوع و تکامل میکروبی بسیار به هم پیوسته هستند (۳). آنالیز مقایسه‌ای توالی‌های RNA ریبوزومی نشان می‌دهد که حیات سلولی متعلق به یکی از سه قلمرو باکتری، آرکی و یوکاریوت است (٤).

تعریف موجودات در این سه قلمرو اصلی نه تنها یک چارچوب فیلوژنتیکی اساسی ارائه داده است که پیش از آن اکولوژی میکروبی و میکروبیولوژی آن را نداشت، بلکه در نهایت منجر به ایجاد اصل مهم در اکولوژی میکروبی شده است. یعنی ناتوانی در کشت درصد زیادی از باکتری‌هایی که با روش‌های شمارش مستقیم قابل مشاهده هستند که به عنوان یک مانع در اکولوژی میکروبی مطرح است (۵).

غارها فضای خالی و طبیعی زیر زمینی هستند که هیچ گونه ابعاد خاص و مشخصی ندارد و عموماً دارای یک دهانه به سطح زمین هستند (٦ و۷). غارها را می‌توان به روش‌های متعددی دسته بندی کرد. از رایج ترین این روش‌ها دسته‌بندی بر اساس نوع صخره و چگونگی ایجاد غار است (۵). اغلب غارها از سنگ آهک یا دیگر صخره‌های آهکی ایجاد شده اند. انواع دیگر غار که البته به تعداد محدود وجود دارند از جنس گچ، گرانیت، تالوس، کوارتزیت، یخ و ماسه سنگ می‌باشند (۸).

برای سال‌ها غارها به عنوان اکوسیستم‌های فقیر به لحاظ زیست‌توده و تنوع زیستی در نظر گرفته می‌شدند (۹). چنین مفهومی از چند دلیل ناشی می‌شد: فقدان تولید کننده‌های اولیه در بیشتر قسمت‌ها، محدودیت فضا و این حقیقت که بیشتر مطالعات بر روی غارها در عرض‌های جغرافیایی معتدل انجام می‌گرفت که در آن غارها به لحاظ تنوع زیستی نسبت به همتایان گرمسیری خود نسبتاً فقیرند (۹). با وجود اینکه مطالعه باکتری‌ها و آرکی‌ها در غارها قدمت زیادی ندارد و نسبتاً محدود است اما تائیدی بر اهمیت این ارگانیسم‌ها در اکولوژی غار بوده است (۱۰).

از بسیاری جهات تنوع باکتری‌های موجود در غار بازتابی از محیط پیرامون است (١٤-١١). بنابراین همچنان فراوان‌ترین باکتری‌ها از اعضای شاخه پروتئوباکتر هستند و هر پنج زیرشاخه آن در این محیط یافت می‌شوند. اما به نظر می‌رسد که گروه اپسیلون غالب‌تر است (١٤-١١). سایر گروه‌هایی که در غار مشاهده می‌شوند شامل *اکتینوباکتریا* (*Actinobacteria*)، *باکتروئیدس/کلروبی* (*Bacteroidetes/Chlorobi*)، *فلیوباکتریا/باکتروئیدس* (*Flavobacteria/Bacteroides*)، *فرمی کیوتس* (*Firmicutes*)، *پلنکتومایستس* (*Planctomycetes*) و *نیتروسپیرا* هستند. این باکتری‌ها در انواع ژئولوژیکی غار از جمله: سنگ آهکی، گدازه‌ای و گرانیتی یافت می‌شوند. این تنوع فیلوژنتیکی با گروه‌های پیچیده وابسته به این میکروارگانیسم‌ها همراه می‌شوند. بع عنوان نمونه، پوشش میکروبی می‌تواند شامل باکتری‌های ارگانوتروف، اکسیدکننده‌های گوگرد و نیتروژن باشد که همگی به عنوان جمعیت میکروبی عمل می‌کنند (١٤-١١).

باکتری‌های هتروتروف موجود در غارها یا باکتری‌های محیطی معمولی هستند که به صورت تصادفی توسط جریان آب سطحی یا ورود و خروج حیوانات و انسان‌ها وارد غار شده‌اند (۱۵) یا باکتری‌هایی هستند که کل چرخه‌ی زندگی خود را در غار می‌گذرانند (١٦). اخیراً از دو نظر به میکروارگانیسم ها در غار ها توجه شده است: اول به دلیل این که تولید کنندگان اولیه هستند و دوم: به دلیل تغییر در شکل غار مورد توجه خاص قرار دارند (۹).

باکتری‌ها می‌توانند نقش اصلی را در شکل‌دهی فضای داخلی غار در فرآیندی به نام اسپلئوژنسیس بر عهده داشته باشند. مشخص شده است که باکتری‌ها و سایر میکروارگانیسم‌ها به محلول سازی دیواره های غار کمک می‌کنند (۸). این امر توسط فرآیندهایی مانند حمله فیزیکی، تولید اسید، تنش نمک و اگزوآنزیم‌ها امکان پذیر است (۱۷). در جهان غار های نمکی محدود واندکی وجود دارد. به عنوان نمونه می توان به غار های

کشورهای شیلی، رومانی و فلسطین اشاره نمود. اما طولانی‌ترین و بزرگترین غار نمکی جهان در ایران واقع شده است. غار نمکدان قشم در موقعیت جغرافیایی E553100 و N263704 در استان هرمزگان و جزیره قشم واقع شده است. این غار در فاصله ۲۳۷ متر از سطح دریا در انتهای جنوب غربی جزیره قرار گرفته است. طویل ترین غار گنبد نمکی قشم به نام غار نمکدان ۳ در قسمت جنوب غربی این گنبد با درازای ۶۵۸۰ متر به عنوان طویل ترین غار نمکی جهان شناخته می‌شود (۱۸). در این مطالعه با نمونه برداری از غار با استفاده از روش‌های قابل کشت برای جداسازی میکروارگانیسم‌های ساکن در غار و سپس شناسایی مولکولی با استفاده از ژن *16S rRNA* تنوع زیستی میکروارگانیسم‌های غار مورد بررسی قرار گرفت.

## مواد و روش‌ها

*الف) نمونه برداری:* در ابتدا از آب، رسوب و بلورهای نمک غار نمکی قشم در آبان ماه سال ۱۳۹۲ نمونه برداری انجام گرفت. نمونه ها در کوتاه ترین زمان ممکن و در شرایط سترون به آزمایشگاه منتقل شدند. میزان اسیدیته و دمای نمونه‌ها به ترتیب توسط pH متر و دماسنج قابل حمل در محل نمونه برداری اندازه گیری شد. میزان شوری نمونه‌ها نیز با استفاده از دستگاه مالتی‌متر شرکت متلر تولدو (Mettler Toledo) مدل مولتی سون (Multiseven) پس از انتقال نمونه‌ها به آزمایشگاه اندازه‌گیری شد. آنالیز شیمیایی ترکیبات نمونه‌ها برای سنجش عناصر موجود در نمونه‌ها در دانشکده زمین‌شناسی دانشگاه تهران با استفاده از روش نورسنجی شعله‌ای انجام شد. نمونه‌ها تا زمان استفاده در دمای ٤ درجه سلیسیوس نگه‌داری شدند.

*ب) کشت و جداسازی باکتری‌ها و آرکی‌ها:* محیط کشت‌های مورد استفاده با توجه به شرایط اقلیمی غار که دارای میزان نمک بالا است انتخاب شدند. به منظور جداسازی طیف گسترده‌تری از باکتری‌ها و آرکی‌ها محیط‌های MGM 23%, Marine agar 10% و marine agar 3% استفاده شدند که ترکیبات آنها در جدول ۱ آورده شده است. تلقیح نمونه آب به دو صورت مستقیم و سانتریفیوژ شده و نمونه‌های رسوب و نمک با تهیه سریال رقت تا رقت $10^{-7}$ بر روی محیط‌های آماده شده انجام گرفت. در نهایت محیط‌های تلقیح شده در دمای ۳۰ °C برای باکتری‌ها و ٤۰ °C برای آرکی‌ها نگه داری شدند. کلنی‌های رشد کرده بر روی پلیت‌ها از نظر تفاوت در ویژگی های ریخت‌شناختی (شکل، اندازه، رنگ، قوام، حاشیه و برآمدگی سطحی) جداسازی شدند. همچنین برای جداسازی انواع کند رشد پلیت های اولیه به مدت یک ماه با تامین رطوبت گرماگذاری شدند. در نهایت با استفاده از پارافیلم دور پلیت به مدت شش ماه نگهداری و در بازه های زمانی دو هفته‌ای برای جداسازی کلنی‌های جدید بررسی شدند. کلنی‌هایی که پس از پنج بار کشت متوالی در رنگ آمیزی گرم و خصوصیات ریخت شناختی رفتار ثابتی از خود نشان دادند، به عنوان کشت خالص در نظر گرفته شدند. در محیط MGM از محلول SL10 به عنوان ریز مغذی (Trace element) استفاده شد که ترکیبات آن در زیر آورده شده است:

25% HCl (۱۰ میلی لیتر)، $FeCL_2.4H_2O$ (۱/۵ گرم)، $CoCl_2.6H_2O$ (۱۹۰ میلی گرم)، $MnCl_2.4H_2O$ (۱۰۰ میلی

جدول ۱: مشخصات محیط کشت های مورد استفاده به منظور جداسازی باکتری ها و آرکی ها (۱۹).

| ردیف | ترکیب | مقدار در محیط (g/l) | | |
|---|---|---|---|---|
| | | MGM 23% | Marine Agar 10% | Marine Agar 3% |
| ۱ | NaCl | ۱۸۳/۰ | ۸۰ | ۱۹/٤٥ |
| ۲ | $MgCl_2$ | ۲۲/۹ | ۸/۸ | ۸/۸ |
| ۳ | $MgSO_4$ | ۲٦/۸ | - | - |
| ۴ | Peptone | ۱۰ | ۵ | ۵ |
| ۵ | Yeast extract | ۲ | ۱ | ۱ |
| ۶ | $Na_2SO_3$ | - | ۳/۲٤ | ۳/۲٤ |
| ۷ | $CaCl_2$ | ۳ | ۱/۸ | ۱/۸ |
| ۸ | KCl | ۵/۳٦ | ۲ | ۰/۵۵ |
| ۹ | $NaHCO_3$ | - | ۰/۱٦ | ۰/۱٦ |
| ۱۰ | Ferric citrate | - | ۰/۱ | ۰/۱ |
| ۱۱ | KBr | - | ۰/۰۸ | ۰/۰۸ |
| ۱۲ | $SrCl_2$ | - | ۰/۰۳ | ۰/۰۳ |
| ۱۳ | $Na_2SiO_3$ | - | ۰/۰۰٤ | ۰/۰۰٤ |
| ۱۴ | NaF | - | ۰/۰۰۲٤ | ۰/۰۰۲٤ |
| ۱۵ | $NH_4NO_3$ | - | ۰/۰۰۱٦ | ۰/۰۰۱٦ |
| ۱۶ | $H_3BO_3$ | - | ۰/۰۲ | ۰/۰۲ |
| ۱۷ | $Na_2HPO_4$ | - | ۰/۰۰۸ | ۰/۰۰۸ |
| ۱۸ | Agar | - | ۱۵ | ۱۵ |

*سترون سازی محیط ها ی کشت در دمای ۱۲۱ °C و فشار ۱۵ پوند بر اینچ مربع (psi) انجام گرفت. pH محیط ها بین ۷ تا ۷/۵ تنظیم شد.

گرم)، $ZnCl_2$ (۷۰ میلی گرم)، $H_3BO_3$ (٦ میلی گرم)، $Na_2MoO_4$ (۳٦ میلی گرم)، $NiCl_2.6H_2O$ (۲٤ میلی گرم)، $CuCl_2.2H_2O$ (۲ میلی گرم) و آب مقطر (۱/۰۱ میلی لیتر). مقدار ۲۵ میلی‌لیتر از این محلول اتوکلاو شده و برای هر یک لیتر از محیط MGM، ۵۰۰ میکرولیتر از این استوک استفاده شد (۱۹).

ج) *توصیف اولیه سویه‌ها:* بررسی صفات اولیه ماکروسکوپی، میکروسکوپی و فیزیولوژیک سویه ها انجام گرفت. ویژگی‌های ماکروسکوپی سویه‌ها شامل شکل، ارتفاع، حاشیه، سطح و رنگ کلنی هریک از جدایه‌ها در محیط جامد با ترکیب گفته شده در جدول ۱ مشخص شد. از تست‌های KOH، کاتالاز و اکسیداز و روش لام مرطوب استفاده شد (۲۰).

د) *تعیین محدوده تحمل نمک:* برای تفکیک سویه‌ها از نظر تعلق به گروه های نمک دوست افراطی، نسبی یا تحمل کننده نمک از محیط با کمترین میزان ماده آلی استفاده شد که تامین کننده رشد سویه ها باشد. محیط کشت پایه مورد استفاده شامل ۵ g/l yeast extract و ۱۵ g/l agar بوده که با درصدهای نمک صفر، ٤، ٦، ۱۰، ۱۲/۵، ۱۵، ۱۷/۵، ۲۰، ۲۳/۵، ۲۵، ۲۷/۵ و ۳۰ تهیه شد و هریک از جدایه‌های منتخب بر روی تمامی این محیط‌ها کشت داده شد و در دمای ۳۰ °C برای باکتری‌ها و ٤۰ °C برای آرکی‌ها گرماگذاری شدند. گرماگذاری تا ۱۰ روز ادامه یافت. درصدی از نمک که نخستین رشد ادامه دار در آن مشاهده شد به عنوان درصد بهینه نمک برای رشد آنها در نظر گرفته شد. سویه های با رشد بهینه در محدوده ۳ تا ۱۵٪ نمک به عنوان نمک دوست نسبی و سویه های با توانایی رشد در میزان نمک بالای ۱۵٪ به عنوان نمک دوست واقعی در نظر گرفته شدند (۲۰).

جدول ۲: مشخصات پرایمرهای مورد استفاده در واکنش زنجیره ای پلی مراز (۲۰).

| نام پرایمر | توالی پرایمر(5' ⟶ 3') | دمای اتصال (°C) |
|---|---|---|
| 27F (باکتری) | AGAGTTTGATCMTGGCTCAG | ٥٦/۳ |
| 1492R (باکتری و آرکی ها) | GGTTACCTTGTTACGACTT | ٥٤ |
| 21F (آرکی ها) | TCCGGTTGATCCTGCCG | ٥۳/۷ |

جدول ۳: برنامه واکنش زنجیره ای پلیمراز مورد استفاده به منظور تکثیر ژن *16SrRNA* (۲۰).

| نام مرحله | دما (درجه سلیسیوس) | زمان (ثانیه) مخصوص باکتری | زمان (ثانیه) مخصوص آرکی | تعداد چرخه |
|---|---|---|---|---|
| واسرشت شدن اولیه | ۹۵ | ۳۰۰ | ۱۸۰ | ۱ |
| واسرشت شدن | ۹٤ | ٦۰ | ۱۵ | |
| اتصال | ۵۷ (باکتری) ۵۱ (آرکی) | ٦۰ | ۳۰ | ۳۰ |
| گسترش | ۷۲ | ٦۰-۵۰ | ۵۲ | |
| گسترش نهایی | ۷۲ | ٤۲۰ | ٤۲۰ | ۱ |

ز) *شناسایی مولکولی و آنالیز فیلوژنتیک:* در ابتدا DNA سویه‌ها با روش مارمور (Marmur) استخراج شد. به منظور تکثیر ژن *16SrRNA* باکتریایی و آرکیایی از توالی های یاد شده در جدول ۲ استفاده شد (۲۱). برای انجام واکنش زنجیره‌ای پلی مراز از محیط بافری با غلظت 1X در ترکیب نهایی، ۱/۵ میکرولیتر از $MgCl_2$ (۵ mM)، ۱ میکرولیتر از dNTPs (۱۰ mM)، ۲ میکرولیتر از آنزیم Taq DNA پلی مراز، ۲ میکرولیتر از هر کدام از پرایمرها (۱۰ µM) و DNA الگو به میزان مناسب استفاده گردید. برای کنترل منفی به جای DNA از آب مقطر دوبار تقطیر استفاده شد (۲۰). چرخه دمایی برای انجام واکنش PCR در جدول ۳ نشان داده شده است. ژن *16SrRNA* به طول ۱٤۰۰ جفت باز پس از تکثیر در دستگاه ترموسایکلر بیومترا (Biometra) ساخت کشور آلمان، بر روی ژل آگاروز ۰/۷ درصد الکتروفورز گردید. در نهایت محصول PCR برای توالی یابی به شرکت ماکروژن در کره جنوبی ارسال شد.

ح) *آنالیز آماری:* ترادف دریافت شده توسط نرم افزار کروماس پرو (ChromasPro) بازخوانی و ویرایش شد. سپس با استفاده از ابزار بلاست (BLAST) نوکلئوتید با توالی های ثبت شده در پایگاه های داده اطلاعات ژنومی NCBI (GenBank) و Eztaxon مقایسه گردید و میزان شباهت آن با سویه های مختلف ثبت شده، تعیین گردید (۲۲).

## یافته ها

مشخصات فیزیکوشیمیایی نمونه شاخص و ترکیب یون‌های موجود در غار به ترتیب در جداول ٤ و ۵ آورده شده است. از مجموع ۱۷۲ سویه، تعداد ۳۸ سویه مربوط به محیط کشت

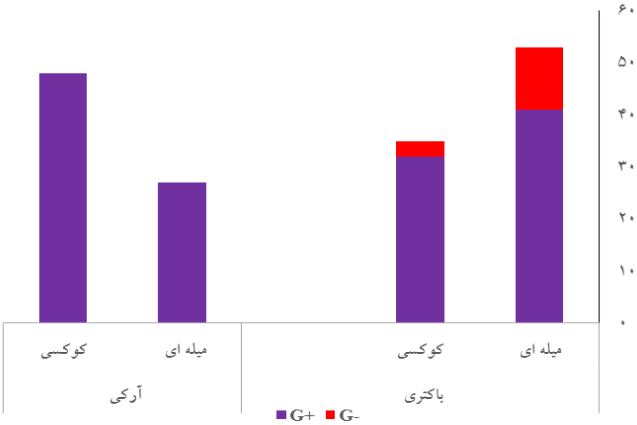
جدول ٤: مشخصات فیزیکوشیمیایی نمونه شاخص.

| ویژگی | نمونه شاخص |
|---|---|
| دما | ۲۷/۵ |
| pH | ۷/۲ |
| TDS | ۲۲/۳ |
| salinity | ۲۸/۹ |

جدول ۵: ترکیب و نوع یون ها.

| نام یون | مقدار (g/l) |
|---|---|
| $Na^{+}$ | ۱۲۸٤ |
| $K^{+}$ | ۱۱/٦٥ |
| $Mg^{++}$ | ۰/۱ |
| $Ca^{++}$ | ۳/۲٦ |
| $Fe^{++}$ | ۰/۱۱٦ (mg/l) |

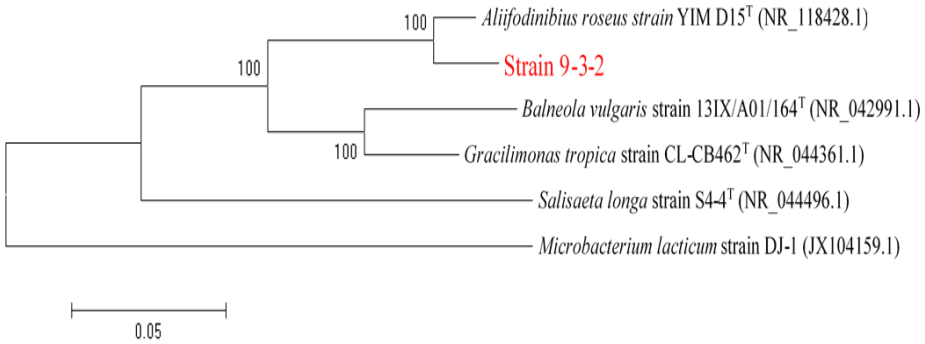
Marine Agar 3%، تعداد ۵۹ سویه مربوط به محیط کشت Marine Agar 10% و ۷۵ سویه مربوط به محیط کشت MGM 23% بودند. تعداد جدایه‌های اولیه بر اساس شکل میکروسکوپی در نمودار ۱ آمده است. از بین جدایه های خالص شده به صورت تصادفی ۲۷ سویه شامل ۲۲ سویه نمک دوست واقعی و ۵ سویه نمک دوست نسبی برای آنالیز ژن *16SrRNA* انتخاب شدند. نتایج حاصل از مقایسه‌ی توالی ژن سویه‌های منتخب با سویه‌های استاندارد ثبت شده در EZtaxon در جدول ٦ آورده شده است. درخت فیلوژنتیکی توالی ژنی *16SrRNA*به دست آمده از جدایه های مورد بررسی به روش Neighbor-joining و با ضریب Bootstrap صد و با استفاده از نرم‌افزار MEGA6 رسم شد. درخت فیلوژنتیک به تفکیک برای جدایه‌های به شاخه *باکتریوئیدس*، *فرمی کیوتس* و *یوری آرکئوتا* در شکل های ۱ تا ۳ نمایش داده شده است.




نمودار ۱: میزان جدایه‌های اولیه به تفکیک نوع میکروارگانیسم، شکل میکروسکوپی و رنگ‌آمیزی گرم.

## بحث

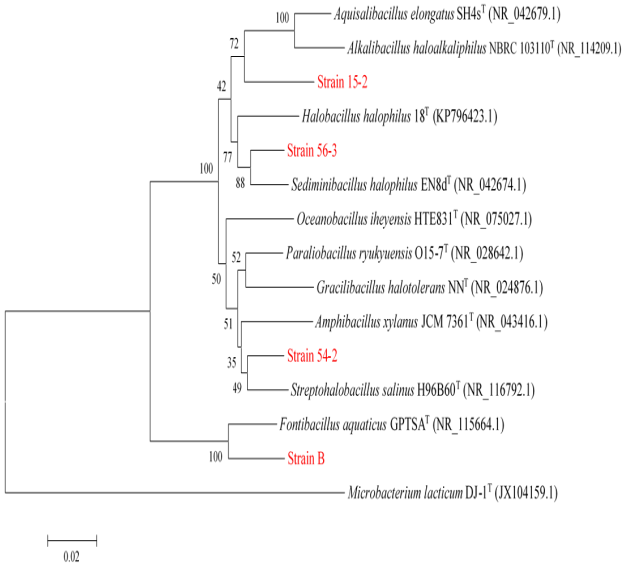
غارها محیط‌های تاریک و با محدودیت مواد غذایی هستند (۸). به همین دلیل تنوع موجودات زنده موجود در این مناطق نسبت به محیط پیرامون کمتر است. میکروارگانیسم‌ها به دلیل دارا بودن سبک خاص زندگی و توانایی تحمل شرایط سخت در حفظ و پایداری این اکوسیستم‌ها نقش بسزایی دارند. در مورد غار نمکدان قشم علاوه بر دو شرط یاد شده شوری بالای ۳۰٪ را نیز باید در نظر گرفت. این غار علاوه بر شرایط اکولوژیکی منحصر به فرد، با قرار گرفتن در لیست ژئوپارک های جهانی ثبت شده توسط سازمان یونسکو




شکل ۱: درخت فیلوژنتیک مربوط به جدایه‌های شاخه *باکتریوئیدس* با استفاده از روش Neighbor-joining و ضریب Boot Strap صد.

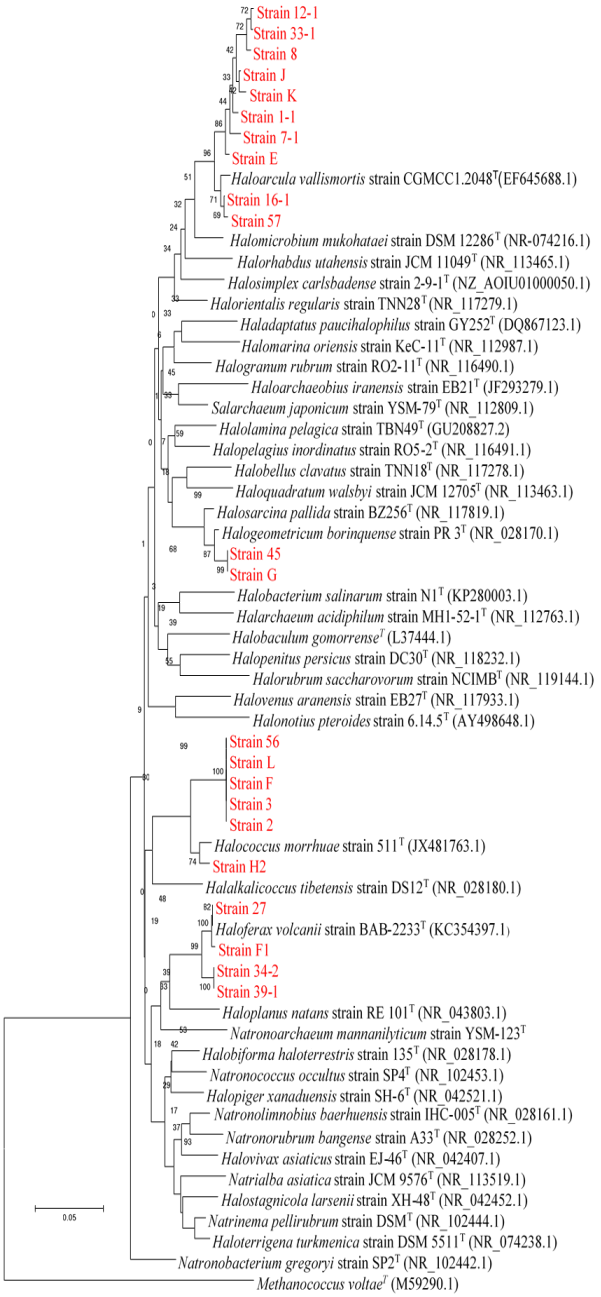
جدول ٦: مقایسه میزان شباهت ژن *16S rRNA* سویه های منتخب با سویه های استاندارد.

| ردیف | نام سویه ی منتخب | سویه ی استاندارد با بیشترین میزان شباهت | درصد شباهت | نوع میکروارگانیسم |
|---|---|---|---|---|
| ۱ | J | *Haloarcula salaria* HST01-2R(T) | ۹۷/۱ | آرکی |
| ۲ | K | *Haloarcula salaria* HST01-2R(T) | ۹۷/٤ | آرکی |
| ۳ | L | *Halococcus saccharolyticus* ATCC49257(T) | ۹۸/۸ | آرکی |
| ۴ | H | *Haloferax alexandrius* TM(T) | ۹۹/۸ | آرکی |
| ۵ | G | *Halogeometricum borinquense* DSM11551(T) | ۹۹/۱ | آرکی |
| ۶ | F | *Halococcus saccharolyticus* ATCC49257(T) | ۹۸/۸ | آرکی |
| ۷ | E | *Haloarcula marismortui* ATCC43049(T) | ۹۷/۳ | آرکی |
| ۸ | H2 | *Halococcus morrhuae* ATCC17082(T) | ۹۸/۵ | آرکی |
| ۹ | F1 | *Haloferax alexandrius* TM(T) | ۹۹/۹ | آرکی |
| ۱۰ | 57 | *Haloarcula japonica* JCM 7785(T) | ۹۸/۷ | آرکی |
| ۱۱ | 45 | *Halogeometricum borinquense* DSM11551(T) | ۹۹ | آرکی |
| ۱۲ | 39-1 | *Haloferax mediterranei* CGMCC1.2087(T) | ۹۹/٤ | آرکی |
| ۱۳ | 34-2 | *Haloferax mediterranei* CGMCC1.2087(T) | ۹۹/۳ | آرکی |
| ۱۴ | 16-1 | *Haloarcula japonica* JCM 7785(T) | ۹۹/۳ | آرکی |
| ۱۵ | 8 | *Haloarcula salaria* HST01-2R(T) | ۹۸ | آرکی |
| ۱۶ | 3 | *Halococcus saccharolyticus* ATCC49257(T) | ۹۸/۸ | آرکی |
| ۱۷ | 2 | *Halococcus saccharolyticus* ATCC49257(T) | ۹۸/٦ | آرکی |
| ۱۸ | 1-1 | *Haloarcula hispanica* ATCC33960*(T)* | ۹۷/۸ | آرکی |
| ۱۹ | 7-1 | *Haloarcula salaria* HST01-2R(T) | ۹۷/٤ | آرکی |
| ۲۰ | 12-1 | *Haloarcula hispanica* ATCC33960*(T)* | ۹۹/٦ | آرکی |
| ۲۱ | 27 | *Haloferax prahovense* TL6(T) | ۱۰۰ | آرکی |
| ۲۲ | 33-1 | *Haloarcula hispanica* ATCC33960*(T)* | ۹۹/۷ | آرکی |
| ۲۳ | B | *Paenibacillus lautus* NRRL NRS-666(T) | ۹۹/۷ | باکتری |
| ۲۴ | 56-3 | *Aquibacillus albus* YIM 93624(T) | ۹۸/۷ | باکتری |
| ۲۵ | 54-2 | *Paraliobacillus quinghaiensis* YIM-C158(T) | ۹۹/۸ | باکتری |
| ۲۶ | 15-2 | *Bacillus oceanisediminis* H2(T) | ۹۹/۵ | باکتری |
| ۲۷ | 9-3-2 | *Aliifodinibius roseus* YIM D15(T) | ۹٦/۵ | باکتری |




شکل ۲: درخت فیلوژنتیک مربوط به جدایه‌های شاخه ی *فرمی کیوتس* با استفاده از روش Neighbor-joining و ضریب Boot Strap صد.

(UNESCO) و همچنین به عنوان اولین ژئوپارک ملی از اهمیت راهبردی خاصی نیز برخوردار است. در این پژوهش با توجه به داده های موجود در مطالعات پیشین در زمینه تنوع زیستی غارها در زمینه تنوع کم میکروارگانیسم‌ها در محیط‌های غاری، با شبیه سازی هرچه بیشتر شرایط کشت به محیط اولیه سعی بر جداسازی هرچه بیشتر میکروارگانیسم‌های موجود در غار نمکی قشم شده است. در این راستا محیط‌های کشت دارای انواع نمک‌های موجود در محیط‌های تالازوهالین انتخاب شدند. از بین سه نوع محیط کشت استفاده شده با درصدهای متفاوت نمک، بیشترین تعداد جدایه‌ها مربوط به محیط MGM با ۲۳٪ شوری بودند که از جمله دلایل آن می توان به شباهت در میزان نمک محیط غار با درصد نمک استفاده شده در این محیط جداسازی و سازگاری محیط غار برای حیات میکروارگانیسم های نمک دوست افراطی اشاره کرد. بیشتر جدایه‌های به دست آمده در قلمرو باکتری ها دارای شکل




شکل ۳: درخت فیلوژنتیک مربوط به جدایه‌های شاخه *یوری آرکیوتا* با استفاده از روش Neighbor-joining و ضریب Boot Strap صد.

میله ای بوده و از نظر رنگ آمیزی گرم در گروه گرم مثبت ها قرار می گیرند. با توجه به این نکته که این شاخه از میکروارگانیسم‌ها قادر به تشکیل اسپور و قرارگیری در حالت خفتگی هستند، مشاهده آنها در شرایط سخت غار که دارای میزان کم مواد غذایی و تاریکی و نمک بالا است مورد انتظار است. بر اساس نتایج مطالعات پیشین در زمینه حیات میکروبی در محیط های تاریک غارها اینگونه نتیجه گیری شده است که بیشترین گروه های میکروبی موجود در غارها متعلق به شاخه‌های اپسیلون پروتئوباکتریا، *اکتینوباکتریا*، *باکتروئیدس/کلروبی*، *فلاووباکتریا/باکتروئیدس*، *فرمی کیوس*، *پلانکتومایستس* و *نیتروسپیرا* هستند (۹).

بیشتر مطالعاتی که در زمینه بررسی تنوع زیستی میکروارگانیسم ها در محیط های غاری صورت گرفته بر روی غارهای غیر شور بوده است و گستره وسیعی از جمعیت های میکروبی را در محیط های غاری گزارش کرده اند.

در سال ۲۰۱۲ از غارهای بزرگ کارچنر (Kartchner) در ایالت آریزونا اعضای شاخه‌های *گاما پروتئوباکتریا*، *بتاپروتئوباکتریا*، *پلنکتومایستس*، *آلفاپروتئوباکتریا*، *دلتاپروتئوباکتریا*، *کلروفلکسی*، *اسیدوباکتریا* و *فرمی کیوتس* به ترتیب بیشترین جدایه‌ها را به خود اختصاص دادند (۲۳).

در بررسی تنوع میکروبی غارهای لیمستون (Limestone) در کره جنوبی در سال ۲۰۱۰ میکروارگانیسم های جدا شده عمدتاً باکتری های متعلق به شاخه های *گاما پروتئوباکتریا*، *بتاپروتئوباکتریا*، *پلنکتومایستس*، *آلفاپروتئوباکتریا*، *اسیدوباکتریا* و *فرمی کیوتس* بوده‌اند (۲٤). پژوهش انجام شده در غار Altamira در سال ۲۰۰۸ در اسپانیا موجب جداسازی اعضای شاخه های باکتریایی *گاما پروتئوباکتریا*، *بتاپروتئوباکتریا*، *پلنکتومایستس*، *آلفاپروتئوباکتریا*، *دلتاپروتئوباکتریا*، *کلروفلکسی*، *اسیدوباکتریا*، *فرمی کیوتس* و *باکتروئیدس* شد (۲۵).

در پژوهش دیگری در غار Frassasi واقع در ایتالیا اعضای خانواده های *اپسیلون پروتئوباکتریا*، *دلتاپروتئوباکتریا*، *تیوتریکس* (*Thiothrix*)، *بژیاتوئا* (*Beggiatoa*) بیشترین سویه‌ها را به خود اختصاص دادند (۲٦). همچنین در سال ۲۰۰٤ از غار Lower Kane در ایالت وایومینگ در آمریکا بیشترین جدایه‌ها مربوط به شاخه‌های *گاماپروتئوباکتریا*، *بتاپروتئوباکتریا* و *باکتروئیدس* بودند (۲۷). بیشترین میکروارگانیسم‌های جدا شده از غار Fairy در ایالت کلورادو در آمریکا مربوط به شاخه‌های *گاماپروتئوباکتریا*، *بتاپروتئوباکتریا*، *پلنکتومایستس*، *آلفا پروتئوباکتریا*، *فرمی کیوتس*، *باکتروئیدس* و *سایتوفاگالس*

(*Cytophagales*) بودند (۲۸).

در سال ۲۰۰۳ از غارهای لچوگیا (Lechuguilla) و اسپایدر (Spider) در نیومکزیکو باکتری‌های متعلق به شاخه‌های گاما *پروتئوباکتریا*، *بتاپروتئوباکتریا*، *پلنکتومایست*، *آلفاپروتئوباکتریا*، *دلتاپروتئوباکتریا*، *اپسیلون پروتئوباکتریا*، *نیتروسپیرا*، *اسیدوباکتریا*، *یوری‌آرکیوتا* و *کرنوآرکیوتا* (*Crenarchaeota*) بودند (۲۹).

در سال ۲۰۰٤ از غار یونین ( Llonin) و گارما (Garma) در اسپانیا باکتری‌های متعلق به شاخه‌های *گاماپروتئوباکتریا*، *بتاپروتئوباکتریا*، *پلنکتومایستس*، *دلتاپروتئوباکتریا*، *اپسیلون پروتئوباکتریا*، *نیتروسپیرا*، *اسیدوباکتریا*، *اکتینومایستس*، شاخه *CFB* ، *فرمی کیوتس* و *باکتری‌های غیر گوگردی سبز* جدا شدند (۳۰). همان‌طور که مشخص است شاخه‌های جدا شده از این غارها با وجود منحصر به فرد بودن محیط کشت شان از یک الگوی مشخص پیروی می‌کند و از شباهت تقریبی برخوردار هستند. گروه های جدا شده از غار نمکدان قشم نیز تنوعی مشابه با این گروه‌ها داشت. مطالعات گسترده تر و با استفاده از روش‌های غیر قابل کشت اطلاعات مناسبی در زمینه تنوع زیستی محیط های غاری در اختیار قرار داده است. در عین حال مطالعات بسیار محدودی در زمینه تنوع زیستی میکروبی غارهای نمکی انجام شده است که می‌تواند ناشی از تعداد کم این محیط‌های منحصر به فرد در سطح کره زمین باشد.

به عنوان یک محیط مشابه در پژوهشی که در سال ۲۰۱۲ در معدن نمکی در آناتولی مرکزی در ترکیه انجام گرفت، با استفاده از روش وابسته به کشت جدایه‌های حاصل اعضای جنس‌های *هالوکوکوس* (*Halococcus*)، *هالوآرکیولا* (*Haloarcula*) و *هالوروبروم* (*Halorubrum*) متعلق به قلمرو آرکی ها و در شاخه *هالوآرکیا* (*Haloarchaea*) بودند (۳۱).

در زمینه این معدن نمکی که تا حدودی مشابه محیط غارهای نمکی است، مطالعه دیگری در زمینه غارهای نمکی و یا محیط های مشابه گزارش نشده است. علاوه بر اینکه باید به این نکته اشاره شود که یکی از تفاوت های عمده بین معادن نمکی و غارهای نمکی، بکر بودن محیط های غار نمکی در مقایسه با معادن و کمتر بودن دستورزی انسان در این محیط ها است.

در مطالعه انجام شده بر دریاچه‌ی ارومیه که ایران نژاد (Irannejad) و همکاران در سال ۲۰۱۵ انجام دادند بیشتر جدایه‌ها از اعضای جنس *هالوموناس*، *سالینی‌ویبریو* (*Salinivibrio*) و *ایدیومارینا* (*Idiomarina*) بودند (۳۲). این سویه‌ها نمک‌دوست نسبی و از اجزای شاخه *گاماپروتئوباکتریا* هستند. اما در جدایه‌های حاصل از غار نمکدان اجزای این جنس دیده نشدند. اما در مطالعه دیگری بر روی دریاچه ارومیه که در سال ۲۰۱٤ توسط جوکار (Jokar) و همکاران انجام شد، همانند غار نمکدان بیشتر جدایه‌ها از گرم مثبت های شاخه *فرمی کیوتس* بودند. این شباهت می‌تواند به دلیل مشابهت در میزان نمک هر دو محیط و شرایط فقر ماده غذایی باشد (۳۳).

در بررسی تنوع میکروبی قابل کشت غار نمکی قشم، اعضایی از قلمرو باکتری ها و آرکی ها جداسازی شدند. از بین جدایه های تعیین توالی شده، انواع آرکیایی در شاخه *یوری آرکیوتا* و جدایه های باکتریایی در شاخه های *فرمی کیوتس* و *باکتروئیدس* قرار گرفتند که گروه‌های باکتریایی مطابق با شاخه‌های مورد انتظار در محیط غار بودند که از غارهای دیگر در سراسر جهان نیز جداسازی شده بودند.

با توجه به شرایط شوری افراطی محیط غار جدا شدن این گروه‌ها دور از انتظار نبود. چرا که این باکتری‌ها قادر به تشکیل ساختارهای مقاوم اسپور و همچنین باسیل‌های بلند و کشیده برای دست یابی بهتر به مواد غذایی اندک موجود در غار هستند. جدایه‌های حاصل از غار نمکدان به دلیل محیط پرشور غار بیشتر از نوع آرکی‌های متعلق به شاخه یوری آرکیوتا و در جنس‌های *هالوکوکوس*، *هالوآرکیولا*، *هالوفراکس* (*Haloferax*) و *هالوژئومتریکوم* (*Halogeometricum*) بودند. این جنس ها در خانواده *هالوباکتریاسه* قرار می گیرند که دارای اعضای نمک دوست افراطی است. بنابراین، جدا سازی این گروه از آرکی های نمک دوست افراطی از محیط غار که دارای شوری حدود ۳۰ درصد است دور از انتظار نیست. جداسازی اعضای جنس‌های *آلیفودینی بیوس* (*Aliifodinibius*)، *باسیلوس*

(*Bacillus*)، *پارالیوباسیلوس* (*Paraliobacillus*)، *پائنی باسیلوس* (*Paenibacillus*) و *آکوئی باسیلوس* (*Aquibacillus*) از محیط غار نیز نشان دهنده تنوع باکتریایی محیط در بین اعضای شاخه های مختلف است.

به علاوه تعداد جدایه های توالی یابی شده از میان کل جدایه های خالص شده تنها درصدی از جامعه میکروبی را نشان می دهد. بر اساس تفاوت در ساختار کلنی انواع سویه های خالص سازی شده می توان اینگونه تخمین زد که تنوع گونه ای میکروارگانیسم ها در محیط غار نمکی نیز مشابه سایر غارها دارای تنوع مناسبی از انواع باکتری ها و آرکی ها است. در مورد غارهای غیر نمکی گزارش از پژوهش هایی که بر روی آرکی های ساکن در مناطق غاری تمرکز کرده باشند کمتر مشاهده شده است. به همین دلیل داده مناسبی در زمینه انواع آرکیایی ساکن محیط های غاری غیر نمکی وجود ندارد. در همین راستا در مطالعات پیشین از غارهای غیر نمکی جدایه‌ها اغلب از قلمرو باکتری‌ها بودند. همان طور که اشاره شد دلیل این امر می‌تواند عدم تمرکز بر جداسازی این گروه از میکروارگانیسم ها و یا نقش پررنگ تر باکتری ها به عنوان تولید کننده اولیه در محیط های غاری باشد.

در این مطالعه با توجه به شرایط فوق اشباع نمک در غار و این حقیقت که اکثر قریب به اتفاق میکروارگانیسم‌های نمک‌دوست افراطی متعلق به قلمرو آرکی‌ها هستند، تعداد قابل توجه جدایه‌های قابل کشت متعلق به خانواده *هالوباکتریاسه* بودند. بررسی دقیق نقشه پروکاریوتی غار نمکدان قشم نیازمند استفاده از انواع روش‌های غیر قابل کشت و نمونه برداری در فصول مختلف است که تصور درست و قابل اعتباری را از جامعه میکروبی غار در اختیار قرار دهد. این پژوهش اولین گام در راستای شناسایی تنوع میکروبی این اکوسیستم و همچنین غارهای نمکی است. با توجه به شرایط بسیار ویژه و منحصر به فرد این اکوسیستم در سراسر جهان، شناسایی میکروارگانیسم های بومی این منطقه که در خلال زمان برای حیات در این سیستم سازگار شده اند از نظر دست یابی به محتوای ژنتیکی جدید بسیار حائز اهمیت است.

## نتیجه گیری

در این مطالعه جدایه های شناسایی شده از غار نمکدان با استفاده از روش‌های مرسوم وابسته به کشت جداسازی شدند و با استفاده از آنالیز فیلوژنی مبتنی بر توالی‌یابی ژن *16S rRNA* بررسی شدند. نتایج نشان داد که جدایه‌های حاصل همانند تنوع میکروبی به دست آمده از سایر غارها در شاخه ها و جنس های مختلف قرار داشتند. این امر نشان دهنده تنوع بالای اکوسیستم غار از نظر میکروبی است. این مطالعه با ارایه میکروارگانیسم‌های بومی در گونه‌ها و جنس‌های جدید و از یک اکوسیستم منحصر به فرد با معرفی محتوای ژنتیکی جدید امکان دست یابی به فرایندها و ژن های جدید بومی را فراهم می‌کند.

## تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از بخش میکروبیولوژی دانشگاه تهران و مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران و سازمان ژئوپارک قشم به دلیل همکاری صمیمانه در اجرای این پژوهش کمال امتنان را دارند.

## References

**1.** Joy S. Ecology in the age of DNA barcoding: the resource, the promise, and the challenges ahead. Mol Ecol. 2014; 14(2): 221-232.

**2.** Adams A, Tarmo A, Raadik, Christopher P, Burridge, Georges A. Global biodiversity assessment and hypercriptic species complexes: more than one species of elephant in the room?. Syst Biol. 2014; 63(4): 518-533.

**3.** Buttigieg PL, Alban Ramette A. Guide to statistical analysis in microbial ecology: a community

focused, living review of multyvariate data analyses. FEMS Microbial Ecol. 2014; 90(3): 543-550.

**4.** Stone M. Genetically enhanced Archaean challenges three-domain evolutionary tree. Bio Sci. 2015; 65(11): 1108.

**5.** Wolfe BE, Button JE, Santarelli M, Dutton RJ. Cheese rind communities provide tractable systems for in situe and in vitro studies of microbial diversity. Cell. 2014; 158(2): 422-433.

**6.** Gillieson D. Caves: Processes. Development, Management. 2nd edition. Massachusetts, USA. Blackwell; 2009.

**7.** Veni G, Hauwert N. Historical review and forward view of cave and karst research in Texas. Geological Soc America. 2015; 516: 263-283.

**8.** Riquelme C, Marshall Hathaway JJ, Dapkevicius E, Miller AZ, Kooser A, Northup DE, Jurado V, Fernandez O, Saiz-Jimenez C, Cheeptham N. Actinobacterial diversity in volcanic caves and associated geomicrobiological interactions. Frontiers Microbiol. 2015; 1342(6): 467-483.

**9.** Romero A. Cave biology: life in darkness. First edition. Cambridge,UK. Cambridge University Press. 2009.

**10.** Saiz-Jimene C. Microbiological and environmental issues in show caves. World J Microbiol Biotechnol. 2012; 28(7): 2453-2464.

**11.** De Gruyter W. Microbial life of cave systems. First edition. Boston. Walter de Gruyter GmbH & Co KG. 2015.

**12.** Desai MS, Assig K, Dattagupta S. Nitrogen fixation in distinct microbial niches within a chemoautotrophy-driven cave ecosystem. ISME J. 2013; 7(12): 2411-2423.

**13.** Gray CJ, Engel AS. Microbial diversity and impact on carbonate geochemistry across a changing geochemical gradient in a karst aquifer. ISME J. 2013; 7(2): 325-337.

**14.** Banerjee S, Joshi SR. Insights into cave architecture and the role of bacterial biofilm. Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sci. 2013; 83(3): 277-290.

**15.** Ortiz M, Neilson JW, Nelson WM, Legatzki A, Byrne A, Yu Y, Wing RA, Soderlund CA, Pryor BM, Pierson III LS. Profiling bacterial diversity and taxonomic composition on speleothem surfaces in Kartchner Caverns, AZ. Microbiol Ecol. 2013; 65(2): 371-383.

**16.** Venarsky MP, Huntsman BM, Huryn AD, Benstead JP, Kuhajda BR. Quantitative food web analysis supports the energy-limitation hypothesis in cave stream ecosystems. Oecologia. 2014; 176(3): 859-869.

**17.** Waltham T. Salt terrains of Iran. Geol Today. 2008; 24(5): 188-194.

**18.** Dyall-Smith M. The Halohandbook: Protocols for halobacterial genetics. Available at: http://www.haloarchaea.com/resources/halohandbook. 2009.

**19.** Winn W, Allen S, Janda W, Konemen E, Procop G, Schreckenberger P, Woods G. Color atlas and diagnostic microbiology. 6th edition. Baltimore. Lippincott Williams & Wilkins. 2006.

**20.** Rasooli M, Amoozegar MA, Akhavan Sepahy A, Babavalian H, Tebyanian H. Isolation,

identification and extracellular enzymatic activity of culturable extremely halophilic archaea and bacteria of Inche Boroun wetland. Int Letter Natural Sci. 2016; 56: 40-51.

**21.** Murray R, Doetsch RN, Robinow C. Determinative and cytological light microscopy. Method General Mol Bacteriol. 1994; 1: 22-41.

**22.** Chun J, Lee JH, Jung Y, Kim M, Kim S, Kim BK, Lim YW. EzTaxon: a web-based tool for the identification of prokaryotes based on 16S ribosomal RNA gene sequences. Int J Syst Evol Microbiol. 2007; 57(10): 2259-2261.

**23.** Ortiz M, Neilson JW, Nelson WM, Legatzki A, Byrne A, Yu Y, Pierson III LS. Profiling bacterial diversity and taxonomic composition on speleothem surfaces in Kartchner Caverns, AZ. Microbial Ecol. 2013; 65(2): 371-383.

**24.** Chang SJ, Blake RE, Stout LM, Kim SJ. Oxygen isotope, micro-textural and molecular evidence for the role of microorganisms in formation of hydroxylapatite in limestone caves, South Korea. Chem Geol. 2010; 276(3): 209-224.

**25.** Portillo MC, Saiz-Jimenez C, Gonzalez JM. Molecular characterization of total and metabolically active bacterial communities of “white colonizations” in the Altamira Cave, Spain. Res Microbiol. 2009; 160(1): 41-47.

**26.** Macalady JL, Lyon EH, Koffman B, Albertson L.K, Meyer K, Galdenzi S, Mariani S. Dominant microbial populations in limestone-corroding stream biofilms, Frasassi cave system, Italy. App Environ Microbiol. 2006; 72(8): 5596-5609.

**27.** Engel AS, Porter ML, Stern LA, Quinlan S, Bennett PC. Bacterial diversity and ecosystem function of filamentous microbial mats from aphotic (cave) sulfidic springs dominated by chemolithoautotrophic “Epsilonproteobacteria”. FEMS Microbiol Ecol. 2004; 51(1): 31-53.

**28.** Barton HA, Taylor MR, Pace NR. Molecular phylogenetic analysis of a bacterial community in an oligotrophic cave environment. Geomicrobiol J. 2004; 21(1): 11-20.

**29.** Northup DE, Barns SM, Yu LE, Spilde MN, Schelble RT, Dano KE, Natvig DO. Diverse microbial communities inhabiting ferromanganese deposits in Lechuguilla and Spider Caves. Environ Microbiol. 2003; 5(11): 1071-1086.

**30.** Irannejad S, Akhavan-Sepahi A, Amoozegar MA, Tukmechi A, Motallabi Moghanjoghi AA. Isolation and identification of halophilic bacteria from Urmia lake in Iran. Iran J Fisheries Sci. 2015; 14(1): 45-59.

**31.** Jookar Kashi F, Owlia P, Amoozegar MA, Yakhchali B, Kazemi B. Diversity of cultivable microorganisms in the eastern part of Urmia salt lake, Iran. J Microbiol Biotechnol Food Sci. 2014; 4(1): 36-43.

**32.** Schabereiter-Gurtner C, Saiz-Jimenez C, Piñar G, Lubitz W, Rölleke S. Phylogenetic diversity of bacteria associated with Paleolithic paintings and surrounding rock walls in two Spanish caves (Llonin and La Garma). FEMS Microbiol Ecol. 2004; 47(2): 235-247.

**33.** Yildiz E, Ozcan B, Caliskan M. Isolation, characterization and phylogenetic analysis of halophilic Archaea from a salt mine in central Anatolia (Turkey). Polish J Microbiol. 2012; 61: 111-117.

Journal of Microbial World
Volume 11, No. 1, April 2018

Original Article

# Molecular diversity of heterotrophic bacteria and archaea of Namakdan Cave in Qeshm

**Mahboobeh Darabi[1], Mohammad Ali Amoozegar[2], Maliheh Mehrshad[3], Nina Zamani[1], Seyed Abolhasan Shahzadeh Fazeli[4], Mahmood Shavandi[5]**

[1]M.Sc., University of Tehran, Tehran, Iran. [2]Professor, University of Tehran, Tehran, Iran. [3]Ph.D., University of Tehran, Tehran, Iran. [4]Associate Professor, Iranian Biological Resource Centre (IBRC), ACECR Tehran, Iran. [5]Assistant Professor, Microbiology and Biotechnology Group, Research Institute of Petroleum Industry (RIPI), Tehran, Iran.

## Abstract

*Background & Objectives:* Given the high diversity, biotechnological applications and the effective role of bacteria in making and maintaining the ecosystem balance; biodiversity research are very important. Meanwhile, the halophilic bacteria and archaea have been considered because of their biotechnological importance and specific ecological condition. In this study, we investigated the diversity of heterotrophic bacteria and archaea of Namakdan cave in Qeshm Island.

*Materials & Methods:* This cross-sectional study was carried out by sampling from Qeshm Namakdan cave in November 2013. The diversity of the cave heterotrophic aerobic bacteria was analyzed using the culture method. Halophilic and halotolerant bacteria and Archaea under aerobic conditions were isolated by MGM and Marine agar media, respectively. Isolates were separated according to morphological differences, and primary biochemical features. Finally, *16s rRNA* sequencing was performed for 32 isolates.

*Results:* Among 172 isolates *16S rRNA* sequencing was carried out for 27 strains. Phylogenetic analysis placed archaea in the euryarchaeota division and *Halococcus*, *Haloferax*, *Haloarcula*, *Halogeometricum* genus branches and bacteria in *Firmicutes* and *Bacteroides* divisions and in *Aliifodinibius*, *Paenibacillus*, *Aquibacillus*, *Paraliobacillus*, and *Bacillus* genus branches. Among the sequenced isolates, 11 isolates showed less than 89.7% similarity to the standard species, which is considered as a borderline point to present new microbial species.

*Conclusion:* Placing the identified isolates in different phylogenetic divisions and genus branches demonstrates the wide microbial diversity of Qeshm Namakdan cave ecosystem. Presenting native microorganisms in new species and genera from unique ecosystems by introducing new genetic content provides access to new native genes and pathways.

*Keywords:* Halophilic bacteria, Halophilic archaea, Biodiversity, Namakdan cave of Qeshm.

**Correspondence to**: Mohammad Ali Amoozegar

Tel: +98 2161113559

E-mail: amoozegar@ut.ac.ir

Journal of Microbial World 2018, 11(1): 61-72.