تنوع فیلوژنتیکی باکتریهای قابل کشت دریاچه بزنگان و نقش اکولوژی آنها

بهار شهنواز[۱،۲]* و فرشته قاسم زاده[۱،۲]

[۱] **مشهد، دانشگاه فردوسی مشهد، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی**

[۲] **مشهد، دانشگاه فردوسی مشهد، مرکز پژوهشی جانورشناسی کاربردی، گروه نوآوری‌های زیستی جانوری**

تاریخ دریافت: ۹۳/۲/۸ تاریخ پذیرش: ۹۴/۴/۱۹

چکیده

باکتریها فراوان ترین و غنی ترین گروه از موجودات زنده اند که در بسیاری از فرآیندهای مهم اکوسیستم نقش دارند. با وجود اهمیت اکولوژیکی آنها اطلاعات در مورد تنوع زیستی به ویژه در محیطهای آبی ناچیز می باشد. ایران دارای دریاچه های متنوعی در نقاط مختلف می باشد که هر کدام به دلیل اقلیم ویژه ای که در آن قرار دارند، از نظر اکولوژی دارای ویژگیهای منحصر به فردی می باشد. دریاچه بزنگان تنها دریاچه مهم و طبیعی استان خراسان رضوی است که جزء آبهای کم شور محسوب می شود و تاکنون پژوهشی درباره میکروارگانیسم های آن انجام نشده است. پژوهش حاضر به بررسی تنوع فیلوژنتیکی باکتریهای قابل کشت موجود در دریاچه بزنگان پرداخته است. نمونه برداری در آبان ۱۳۹۱ صورت گرفت و غربالگری باکتریها منجر به جداسازی ۵۱ باکتری گرم منفی و ۱۵ باکتری گرم مثبت گردید. ۳۰ جدایه به منظور شناسایی مولکولی با استفاده از ژن ۱۶S rRNA، بررسی ویژگیهای مورفولوژی، بیوشیمیایی و آنزیمهای هیدرولازی انتخاب شدند. سویه های شناسایی شده متعلق به گروههای beta-Gamma-Proteobacteria و Bacteroidetes و Firmicutes می باشند. تنوع جنسهای متعلق به گرم منفی بیشتر بوده و شامل *Pseudomonas*، *Xanthomonas*، *Luteibacter*، *Varivorax*، *Collimonas* و *Flavobacterium* می باشند. در حالی که باکتریهای گرم مثبت از تنوع و تعداد کمتری برخوردار بوده و شامل جنسهای *Bacillus*، *Fictibacillus*، *Staphylococcus* و *Paenibacillus* می باشند. بیشترین فراوانی مربوط به جنس *Pseudomonas* می باشد. بررسی آنزیمهای هیدرولازی در بین سویه های گرم مثبت و گرم منفی تفاوت معنی داری را نشان نمی دهد.

واژه های کلیدی: تنوع زیستی، دریاچه بزنگان، باکتریهای قابل کشت، ژن ۱۶S rRNA

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۵۱-۳۸۸۰۵۵۰۶ ، پست الکترونیکی: shahnavaz@um.ac.ir

مقدمه

میکروارگانیسم ها و به ویژه باکتریها نقش مهمی را در چرخه های بیوژئوشیمیایی مانند کربن و نیتروژن برعهده دارند. از سویی دیگر اهمیت آنها در فرآیندهای تجزیه زیستی مواد پلیمری و آلاینده های نفتی، حشره کشها و سایر مواد سمی به خوبی شناخته شده است. با وجود این که میکروارگانیسم ها به دلیل ویژگیهای منحصر به فرد خود تقریباً در همه اکوسیستمها پراکنده می باشند، تنوع زیستی آنها به دلیل اندازه کوچکی که دارند، مغفول مانده است، در حالی که اثرات آنها در چرخه مواد غذایی کاملاً شناخته شده است (۱۰، ۱۱ و ۲۰). مطالعه تنوع این گروه موجب شناخت بهتر فلور طبیعی این زیستگاهها و افزایش ذخیره ژنتیکی و جداسازی گونه هایی می گردد که پتانسیل استفاده در بیوتکنولوژی را دارا می باشند، تا به عنوان گامی در جهت استفاده صنعتی از این دانش برداشته شود.

پژوهشگران روشهای متعدد بررسی تنوع جمعیت باکتریایی را مقایسه کرده اند (۵، ۸ و ۹). نتیجه این تحقیقات نشان می دهد که روشهای موجود کامل نمی باشد، و هر یک از

آنها دارای ویژگیهایی می باشند. برای بررسی تنوع زیستی میکروارگانیسم ها روشهای مختلفی شامل روشهای مستقل از کشت و یا وابسته به کشت بررسی شده است. در روشهای مستقل از کشت DNA کل از نمونه محیطی استخراج شده و ژنهای مورد نظر تکثیر و آنالیز می شوند. یکی از مهم ترین ویژگیهای این روشها درک ساختار و ترکیب جمعیت میکروبها، صرف نظر از فعالیتهای عملکردی آنها در محیط می باشد. البته هر یک از روشهای مذکور دارای ضعفهایی می باشند که نتیجه حاصل از آن تنوع جمعیت میکروبی را تحت تأثیر قرار می دهد. به عنوان مثال روش استخراج DNA (۱۸ و ۲۱)، انتخاب ژن و یا انتخاب آغازگرهای فرآیند تکثیر ژن که در نهایت ممکن است به حذف برخی گروههای میکروبی و یا تخمین بیش از اندازه گروهی دیگر منجر شود (۲۶). با استفاده از روشهای وابسته به کشت دستیابی به ژنوم کامل میکروارگانیسم ها، بررسی نقش اکولوژی و قابلیت تجزیه زیستی ترکیبات مضر در طبیعت امکان پذیر می باشد. باید در نظر داشت که در این روشها بخشی از میکروارگانیسم ها به دلیل غیرقابل کشت بودن در نظر گرفته نمی شود، و یا انتخاب روش کشت و شرایط فیزیکی و نوع محیط کشت انتخابی می تواند بر نتیجه نهایی تأثیر گذار باشد (۱۲).

کشور ایران دارای دریاچه های متنوعی در نقاط مختلف می باشد که هر کدام به دلیل وضعیت خاص آب و هوایی آن، می تواند از نظر اکولوژیکی دارای ویژگیهای منحصر به فردی باشد. بسیاری از این دریاچه ها مانند ارومیه، آران بیدگل،..... که جمعیت میکروارگانیسم های آن در سالهای اخیر مورد بررسی قرار گرفته است، دارای غلظت نمکی بالایی می باشند (۳، ۱۶ و ۲۲). دریاچه بزنگان تنها دریاچه مهم و طبیعی استان خراسان رضوی است که جزء آبهای کم شور محسوب می شود و تاکنون پژوهشی درباره میکروارگانیسم های آن انجام نشده است. هدف اصلی از انجام پژوهش حاضر بررسی تنوع فیلوژنتیکی باکتریهای قابل کشت موجود در دریاچه بزنگان و مقایسه آن با باکتریهای مشابه به دست آمده در سایر محیطهای طبیعی می باشد.

مواد و روشها

نمونه برداری و ویژگیهای محل نمونه برداری: دریاچه بزنگان در فاصله ۱۲۰ کیلومتری شرق شهرستان مشهد و ۹۴ کیلومتری جنوب‌غربی شهرستان سرخس در ۳۶ درجه و ۱۸ دقیقه و ۴۸ ثانیه شمالی و ۶۰ درجه و ۲۸ دقیقه و ۵۳ ثانیه شرقی واقع شده است. ارتفاع دریاچه از سطح دریا ۸۶۰ متر، متوسط ژرفای دریاچه ۸ متر و بیشینه آن در زمستان ۱۲ متر و مساحت دریاچه ۸۰-۷۰ هکتار برآورد گردیده است. آب دریاچه لب‌شور و دریاچه الیگوتروف است (۲). منابع تأمین آب دریاچه بزنگان آبهای فصلی و سطحی می‌باشد که شامل سیلابهای بهاره و مازاد آبهای کشاورزی است. علاوه بر آن تعدادی چشمه که در زیر آب قرار دارند، شامل ۴ چشمه دائمی (چشمه النگ- چشمه زیوکهر- چشمه شمال دریاچه- چشمه زیارتگاه) و دو چشمه فصلی (چشمه ضلع جنوبی و چشمه نی‌زار) از منابع تأمین آب دریاچه می‌باشند. به دلیل عمق بالا و املاح کلر و سدیم سطح دریاچه در طول سال یخ نمی‌بندد. دریاچه از دیدگاه اکولوژی dimictic (دارای دو چرخه آبی در فصول پاییز و بهار) می باشد (۱). رنگ آب دریاچه برحسب میزان مواد محلول، رنگ محیط اطراف، عمق، تراکم و نوع پلانکتونها و ذرات معلق در آب تغییر می‌کند. در بهار با ورود سیلابها به دریاچه رنگ آب مایل به زرد، در تابستان همزمان با شکوفایی پلانکتونها سبزرنگ و در زمستان مایل به آبی می باشد. ویژگیهای فیزیکی و شیمیایی آب در زمان نمونه برداری و در سالهای گذشته در جدول ۱ نشان داده شده است. درباره پوشش گیاهی اطراف دریاچه بزنگان و فون جانوران آن پژوهشهایی در سالهای اخیر صورت گرفته است (۲).

نمونه برداری در آبان ماه ۱۳۹۱ از سه ضلع مختلف دریاچه انجام پذیرفت. در هر ناحیه نمونه برداری در سه نقطه مختلف صورت گرفته، سپس نمونه ها با یکدیگر ادغام و در نهایت سه نمونه مورد بررسی قرار گرفت که شامل آب دریاچه و رسوبات آن بوده است. نمونه برداری در ظروف شیشه ای استریل با رعایت شرایط نمونه برداری انجام پذیرفت. نمونه ها تا زمان انجام آزمایش در دمای محیطی و شرایط تاریکی نگهداری شدند.

جدول ۱- ویژگیهای فیزیکی و شیمیایی آب دریاچه در سال ۱۳۹۱ و سالهای قبل

سال نمونه برداری	۱۳۹۰	۱۳۹۱ (فصل بهار)	۱۳۹۱ (فصل پاییز)
وضعیت آب و هوا در روز نمونه‌برداری	آفتابی و گرم	ابری و خنک	ابری و خنک
دمای آب (°C)	۱۷/۶	۱۸	۱۸
اسیدیته (pH)	۹/۵۴	۹/۸۹	۸/۶۷
هدایت الکتریکی (EC) (ms/cm)	۱/۹۸	۴۲/۲۲	۵۰/۳۳
مقدار کل ذرات جامد حل شده (TDS) (ppt)	۰/۸۷	۲۱/۲۶	۲۵/۲۳
درصد شوری	-	-	۳

جداسازی نمونه ها: به منظور حداکثر جداسازی باکتریهای هتروتروف محیط کشتهای Tryptic Soy Broth (TSB) و R2A به همراه ۳ درصد نمک انتخاب گردید. محیط کشتها با ۱۵ گرم/لیتر آگار جامد شده و pH: ۷ تنظیم گردید. از نمونه آب تا $۱۰^{-۶}$ سری رقت تهیه گردید و به محیطهای کشت جامد تلقیح گردید و در درجه حرارت ۲۰ و ۳۰ درجه سانتی گراد به مدت ۲ تا ۷ روز گرماگذاری شدند. آزمایش برای هر سری رقت و درجه حرارت با سه تکرار صورت پذیرفت.

بررسی فنوتیپی و ویژگیهای بیوشیمیایی: بررسی ویژگیهای جدایه های به دست آمده مانند فرم و اندازه کلنی، مورفولوژی سلول و تولید رنگدانه با کشت مجدد هر یک از آنها در محیط TSA انجام گرفت. جدایه های به دست آمده براساس ویژگیهای فنوتیپی به گروههای متفاوتی دسته بندی شده و به صورت تصادفی برای مطالعات بعدی انتخاب شدند. به منظور بررسی بیشتر جدایه های انتخاب شده، رنگ آمیزی گرم، تست حرکت و آزمونهای بیوشیمیایی مانند وجود آنزیمهای هیدرولازی سیتراتاز، ژلاتیناز، آمیلاز و پروتئاز صورت گرفت (جدول ۲).

تکثیر ژن 16S rRNA و توالی سکانس: حدود ۲۵۰ میلی گرم از هر سویه باکتری در ۵۰۰ µl آب دیونیزه سوسپانسیون شده و به مدت ۲۴ h در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد قرار گرفت. پس از ذوب شدن مجدد، ۱ µl از سوسپانسیون باکتری به عنوان الگوی DNA به منظور تکثیر ژن 16S rRNA با استفاده از پرایمرهای عمومی ۲۷F (۳'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-۵') (۱۷) و ۱۴۹۲R (۳'-GGTTACCTTGTTACGACTT-۵') (۱۳) استفاده شد. با این روش غالباً دیواره سلولی باکتریها در اثر شوک سرمایی آسیب دیده و می توان از سوسپانسیون حاصل به عنوان الگوی DNA استفاده کرد. در مواردی که دسترسی به DNA با این روش میسر نبود، استخراج با استفاده از کیت FastDNA® SPIN (MP Biomedicals, Qbiogene) Kit براساس روش توضیح داده شده انجام پذیرفت. PCR با استفاده از ۱/۵ میلی مولار $MgCl_2$، ۱/۵ میلی مولار KCl، ۱۰ میلی مولار Tris-HCl، ۰/۲ از هر dNTP، ۰/۵ میکرومولار از هر پرایمر و ۰/۶ واحد از Taq polymerase انجام پذیرفت. واکنش PCR با دمای واسرشت کننده اولیه ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۲ دقیقه و سپس ۳۰ سیکل با دمای واسرشت ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال پرایمرها در دمای ۵۷ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه، سنتز قطعه مورد نظر در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد

به مدت ۳۰ ثانیه و گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۷ دقیقه انجام شد. محصول PCR استفاده از روش رسوب دهی سدیم استات و الکل اتانول خالص گردید و به منظور تعیین توالی به شرکت MACROGEN کره جنوبی ارسال شد.

جدول ۲- ویژگیهای فنوتیپی، خصوصیات بیوشیمیایی سویه های جداسازی و شناسایی شده از دریاچه بزنگان

	نمونه	مورفولوژی و واکنش گرم	تولید رنگدانه	حرکت	پروتئاز	آمیلاز	ژلاتیناز	سیتراتاز	بیشترین باکتری مشابه در **Ez-Taxon**	درصد شباهت
۱	A6	میله ای گرم مثبت	سفید	مثبت	مثبت	مثبت	مثبت	منفی	*Bacillus thuringiensis*	۹۹/۶۴
۲	A33	میله ای گرم مثبت	سفید	منفی	منفی	منفی	منفی	منفی	*Bacillus oceanisediminis*	۹۹/۲۳
۳	A9	میله ای گرم مثبت	سفید	مثبت	مثبت	مثبت	منفی	مثبت	*Bacillus simplex*	۱۰۰
۴	A12	میله ای گرم مثبت	زرد	منفی	مثبت	مثبت	منفی	منفی	*Bacillus simplex*	۹۸/۶۵
۵	A20	میله ای گرم مثبت	سفید	منفی	مثبت	منفی	مثبت	منفی	*Bacillus thuringiensis*	۱۰۰
۶	B9	میله ای گرم مثبت	سفید	منفی	مثبت	منفی	منفی	مثبت	*Bacillus simplex*	۹۹/۴۳
۷	A29	میله ای گرم مثبت	سفید	مثبت	مثبت	منفی	منفی	منفی	*Bacillus muralis*	۹۹/۵۴
۸	B1	میله ای گرم مثبت	نارنجی	منفی	منفی	مثبت	منفی	منفی	*Fictibacillus barbaricus*	۹۹/۷۱
۹	A10	میله ای گرم مثبت	سفید	منفی	منفی	مثبت	منفی	منفی	*Fictibacillus barbaricus*	۹۹/۵
۱۰	B18	کوکسی گرم مثبت	سفید	مثبت	منفی	منفی	منفی	منفی	*Staphylococcus epidermidis*	۱۰۰
۱۱	B21	میله ای گرم مثبت	سفید	منفی	مثبت	مثبت	منفی	منفی	*Paenibacillus terrae*	۹۸/۸۲
۱۲	A24	میله ای گرم منفی	نارنجی	منفی	منفی	مثبت	منفی	منفی	*Pseudomonas chlororaphis*	99.45
۱۳	A23	میله ای گرم منفی	نارنجی	مثبت	منفی	منفی	منفی	منفی	*Pseudomonas thivervalensis*	98.86
۱۴	B3	میله ای گرم منفی	نارنجی	مثبت	مثبت	مثبت	منفی	منفی	*Pseudomonas prosekii*	99.54
۱۵	B29	میله ای گرم منفی	سفید	مثبت	منفی	منفی	منفی	منفی	*Pseudomonas prosekii*	99.38
۱۶	A14	میله ای گرم منفی	سفید	منفی	منفی	منفی	منفی	مثبت	*Pseudomonas trivialis*	98.9
۱۷	A15	میله ای گرم منفی	نارنجی	منفی	منفی	مثبت	منفی	منفی	*Pseudomonas rhodesiae*	۹۹/۱۵
۱۸	A7	میله ای گرم منفی	سفید	منفی	مثبت	منفی	مثبت	مثبت	*Pseudomonas simiae*	۹۸/۹۸
۱۹	A18	میله ای گرم منفی	سفید	منفی	منفی	منفی	منفی	منفی	*Pseudomonas asturiensis*	۹۸/۲۶
۲۰	B16	میله ای گرم منفی	سفید	منفی	منفی	مثبت	منفی	منفی	*Pseudomonas frederiksbergensis*	۹۹/۳
۲۱	B33	میله ای گرم منفی	نارنجی	مثبت	مثبت	منفی	منفی	منفی	*Xanthomonas hyacinthi*	۱۰۰
۲۲	B6	میله ای گرم منفی	نارنجی	مثبت	منفی	مثبت	منفی	منفی	*Luteibacter rhizovicinus*	۹۹/۳۲
۲۳	B8	میله ای گرم منفی	سفید	منفی	مثبت	منفی	منفی	مثبت	*Luteibacter rhizovicinus*	۹۹/۸۶
۲۴	B10	میله ای گرم منفی	سفید	منفی	مثبت	منفی	منفی	مثبت	*Luteibacter rhizovicinus*	۹۷/۱۹
۲۵	B11	میله ای گرم منفی	سفید	منفی	مثبت	منفی	منفی	مثبت	*Variovorax boronicumulans*	۹۸/۰۴
۲۶	B22	میله ای گرم منفی	سفید	مثبت	منفی	منفی	منفی	منفی	*Collimonas pratensis*	۹۹/۰۲
۲۷	B7	میله ای گرم منفی	نارنجی	مثبت	منفی	مثبت	منفی	منفی	*Flavobacterium frigiddimaris*	۹۸/۳۲
۲۸	B23	میله ای گرم منفی	نارنجی	مثبت	منفی	مثبت	منفی	منفی	*Flavobacterium oncorhynchi*	۹۹/۰۳
۲۹	A31	میله ای گرم منفی	زرد	مثبت	مثبت	منفی	منفی	منفی	*Flavobacterium hydatis*	۹۸/۸
۳۰	B28	میله ای گرم منفی	سفید	منفی	منفی	مثبت	منفی	منفی	*Flavobacterium aquidurense*	۹۸/۷۲

آنالیز فیلوژنتیک: توالی های به دست آمده در بانک ژنی NCBI ثبت و شماره ژنی مربوط به هر کدام دریافت گردید که از شماره KT188790 تا KT188819 می باشند. قرابت فیلوژنتیکی جدایه های به دست آمده با یکدیگر و با سویه های موجود در پایگاههای اطلاعاتی NCBI و Ez-taxon مورد بررسی گرفت. توالیهای موجود با استفاده از نرم افزار ClustalW همراستاسازی شدند (۲۵). آنالیز داده های به دست آمده با استفاده از نرم افزار MEGA (Vrsion 6) و با استفاده از الگوی Maximum Likelihood انجام شد (۲۴). بررسی اعتبار شاخه های درخت با استفاده از نرم افزار bootstrap analysis با تکرار ۱۰۰۰ صورت گرفت.

بحث و نتیجه گیری

شمارش و ویژگیهای فنوتیپی جدایه ها: بخش عمده ای از کره زمین توسط میکروارگانیسم ها اشغال شده است. بررسی تنوع میکروبی اکوسیستمهای مختلف اجازه می دهد شناخت بهتری از فلور طبیعی این زیستگاهها در دسترس قرار گیرد. ایران دارای دریاچه های متنوعی در نقاط مختلف می باشد که هر کدام به دلیل وضعیت خاص آب و هوایی آن، می تواند دارای ویژگیهای منحصر به فردی باشد. از طرفی علی رغم تنوعی که این مناطق دارند، مطالعات محدودی درباره جمعیت میکروبی آنها صورت گرفته است. یکی از این مناطق دریاچه بزنگان می باشد که تنها دریاچه طبیعی در شمال شرقی ایران است که تاکنون گزارشی مبنی بر تنوع میکروارگانیسم های آن ارائه نشده است. ویژگیهای اکولوژی دریاچه مانند pH، Electrical conductivity: EC (ms/m) و Total dissolved solid: TDS (mg/l) اندازه گیری شد که به ترتیب ۸,۶۷±۰,۰۵، ۵۰,۳۳±۰,۵۸ و ۲۵,۲۳± ۰,۴۲ به دست آمدند (جدول ۱).

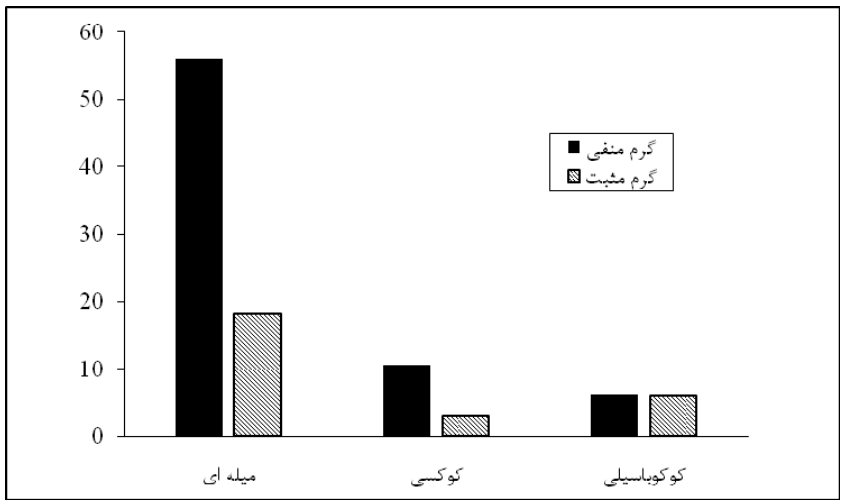
در پژوهش اخیر، نمونه برداری در فصل پاییز و در یک روز ابری صورت پذیرفته است، مقایسه داده های موجود با اطلاعات مربوط به سالهای گذشته کاهش حجم آب، افزایش درجه شوری و تغییرات pH آب را نشان می دهد که بیشتر می تواند به دلیل خشکسالیهای اخیر در منطقه باشد. بنابراین میزان یونهای محلول و هدایت الکتریکی، مقدار کل ذرات جامد معلق و کدورت آن و درصد شوری آب افزایش یافته است که می تواند روی جمعیت میکروبی تأثیرگذار باشد، هر چند در مورد جمعیت میکروبی در سالهای گذشته هیچ گونه اطلاعاتی در دسترس نمی باشد.

گرچه باکتریهای قابل کشت درصد ناچیزی از مجموعه باکتریهای موجود را تشکیل می دهند، جداسازی و شناسایی این باکتریها به جهت دستیابی به ژنوم کامل آنها و بررسی فعالیت فیزیولوژی آنها از اهمیت ویژه ای برخوردار می باشد. به منظور شمارش و جداسازی باکتریها از دو محیط کشت TSB و R2A استفاده گردید. در مجموع ۱۹۵ کلنی (۱۱۰ کلنی از رسوبات و ۸۵ کلنی از آب) در محیط R2A و ۲۰۱ کلنی (۱۱۵ کلنی از رسوبات و ۸۶ کلنی از آب) در محیط TSA جداسازی شد. نتایج شمارش باکتریها نشان می دهد که تعداد کلی باکتریها در دو محیط نامبرده تفاوت معنی داری با یکدیگر ندارند و به صورت میانگین CFU/ml $۲,۷۳ \times ۱۰^{۳}$ می باشد. تنوع مورفولوژی در کلنیهای به دست آمده از نمونه های آبی بیشتر از رسوبات می باشد.

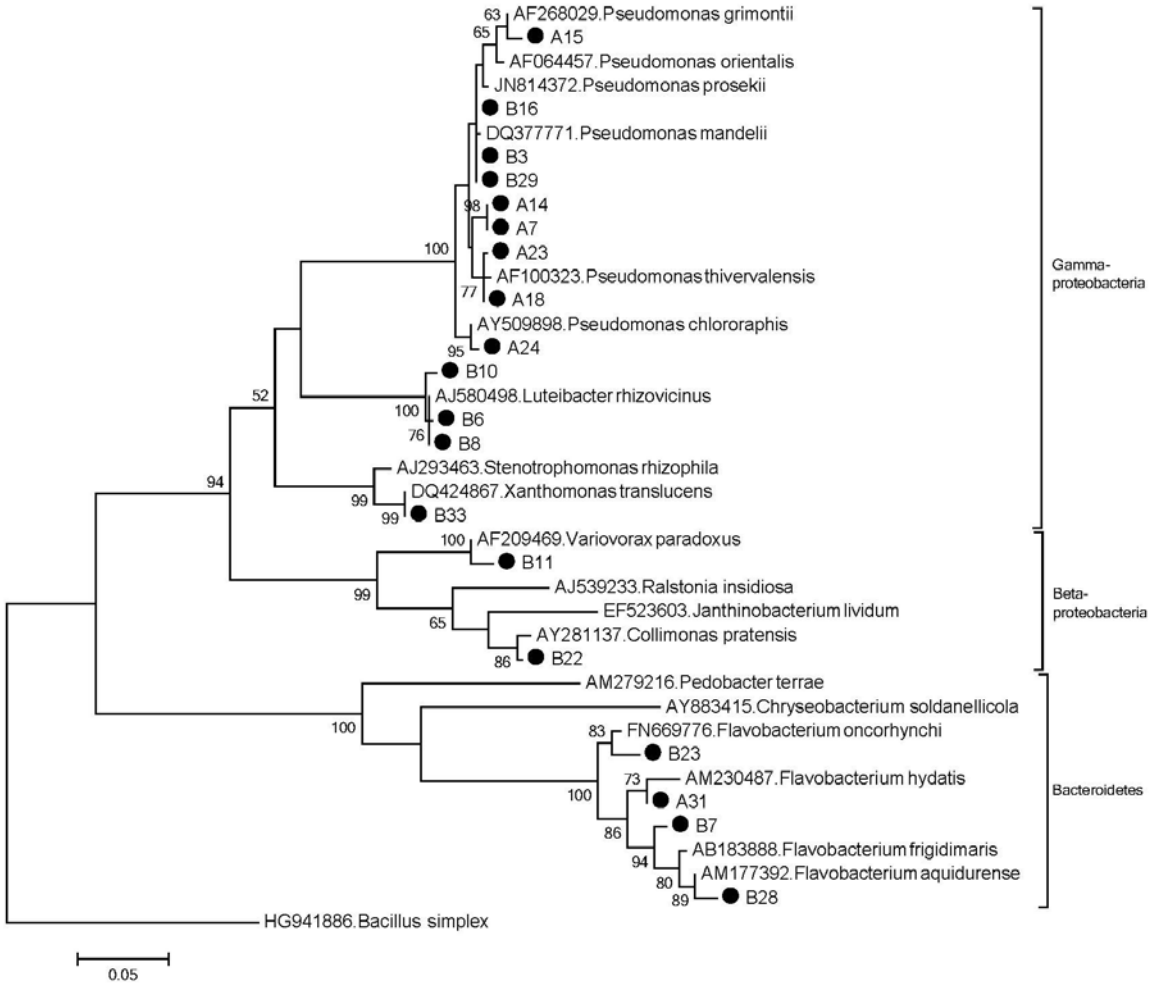
تنوع سویه های شناسایی شده: درک ساختار و عملکرد گروههای باکتریها به منظور درک بهتر اکوسیستمهای آبی ضروری می باشد. با وجود مطالعاتی که در سالهای اخیر صورت گرفته است، فهم اکولوژیکی آنها مغفول مانده است. از مجموع باکتریهای به دست آمده، ۶۶ جدایه براساس تفاوتهای فنوتیپی و مورفولوژی انتخاب شدند. از این تعداد ۵۶ درصد (۳۷) میله ای گرم منفی، ۱۰/۶ درصد (۷) کوکسی گرم منفی و ۶ درصد (۴) کوکوباسیلی گرم منفی می باشند. تعداد جدایه های گرم مثبت به صورت معنی داری کمتر می باشد و شامل ۱۸/۱۸ درصد (۱۲) میله ای گرم مثبت، ۳/۰۳ درصد (۷) کوکسی گرم مثبت و ۶/۰۶

درصد (۴) کوکوباسیلی گرم مثبت می باشند (شکل ۱). در نهایت ۳۰ سویه که تفاوت بیشتری را در مورفولوژی کلنی (سطح کلنی، اندازه و تولید پیگمان) و شکل و آرایش میکروسکوپی نشان می دادند، به منظور بررسی و تکثیر با ژن ۱۶SrRNA انتخاب شدند. ویژگیهای مورفولوژی، واکنش گرم و بررسی آنزیم های هیدرولازی سویه هایی که به روش مولکولی شناسایی شده اند، در جدول ۲ نشان داده شده است. باکتریهای گرم منفی به دست آمده، دارای تنوع بالاتری بوده و متعلق به سه شاخه باکتریایی beta-Gamma-Proteobacteria، Bacteroidetes می باشند. در حالی که تنوع در باکتریهای گرم مثبت کمتر و تمامی جنسهای به دست آمده مربوط به شاخه Firmicutes می باشند. در مجموع ۱۰ جنس مختلف به صورت مولکولی شناسایی شدند که جنسهای متعلق به باکتریهای گرم منفی شامل *Pseudomonas*، *Xanthomonas*، *Luteibacter*، *Varivorax*، *Collimonas* و *Flavobacterium* (شکل ۲) وگرم مثبت شامل *Bacillus*، *Fictibacillus*، *Staphylococcus* و *Paenibacillus* می باشند (شکل ۳). برخی سویه های شناسایی شده مانند A12 (*Bacillus* sp.)، A18 (*Pseudomonas* sp.)، B10 (*Luteibacter* sp.)، B11 (*Varivorax* sp.)، و B6 (*Flavobacterium* sp.) درصد مشابهت کمتر از ۹۸/۷ را در مقایسه با داده های موجود در پایگاههای اطلاعاتی نشان می دهند که ممکن است معرف گونه جدیدی باشند. برای رسیدن به این منظور شناسایی تکمیلی ویژگیهای فنوتیپی، بیوشیمیایی و مولکولی ضروری می باشد.

شاخه Gamma-Proteobacteria دارای بیشترین میزان فراوانی بوده و *Pseudomonas* به عنوان جنس غالب می باشد. در این شاخه جنسهای *Luteibacter* و *Xanthomonas* با فراوانی کمتری دیده می شوند. پروتئوباکتریها در بسیاری از چرخه های بیوشیمیایی چرخه های محیطهای آبی نقش دارند و غالب بودن آنها در اکوسیستمهای برخی محیطهای آبی گزارش شده است (۱۴ و ۲۳). *Pseudomonas* از تجزیه کنندگان مهم ترکیبات آلی به شمار می رود و نقش مؤثری در چرخه کربن دارد. جنسهای *Collimonas* و *Varivorax* در شاخه بتاپروتئوباکتریها دارای فراوانی کمتری می باشد. بررسی رسوبات دریاچه Dongping با روش T-RFLP و آنالیز ژن ۱۶S rRNA، شانزده شاخه باکتری به دست آمد که پروتئوباکتریها غالب بودند (۲۳). در شاخه Bacteroidetes تنها جنس *Flavobacterium* شناسایی شد. جنسهای *Pseudomonas* و *Flavobacterium* دارای گونه هایی هستند که ارتباط نزدیکی با چرخه نیتروژن دارند (۱۹).

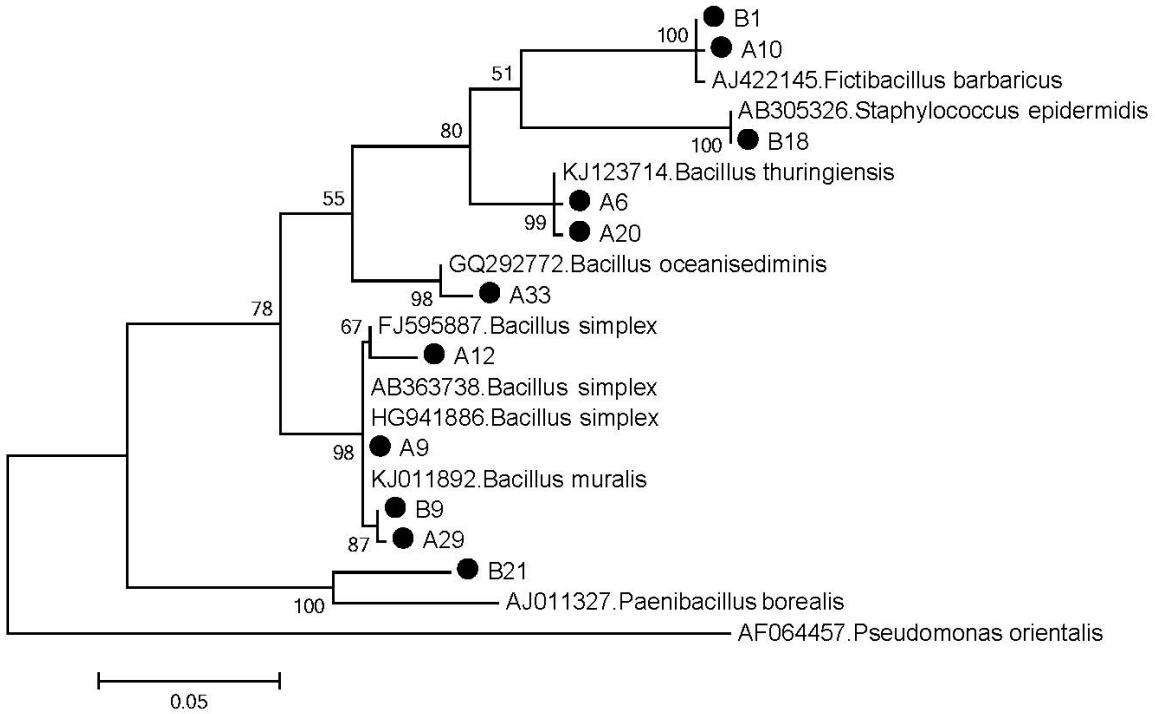


شکل ۱- فراوانی باکتریهای گرم منفی و گرم مثبت براساس مورفولوژی آنها



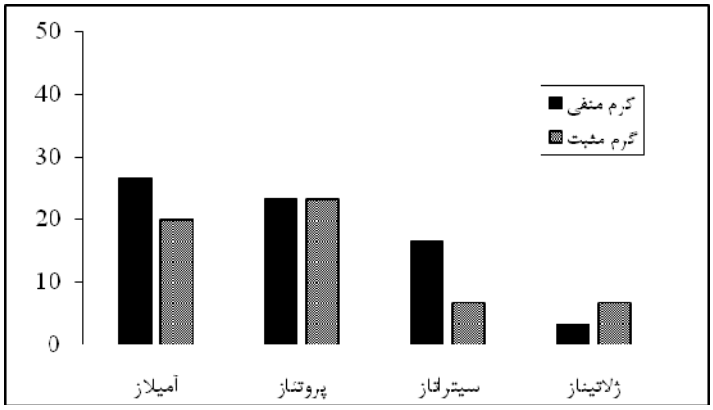
شکل ۲- درخت فیلوژنی باکتریهای گرم منفی با استفاده از الگوی Maximum Likelihood انجام شد. بررسی اعتبار شاخه های درخت با استفاده از آنالیز bootstrap با تکرار ۱۰۰۰ صورت گرفت. سویه های به دست آمده در این پژوهش با دایره های سیاه نشان داده شده اند. توالی باکتری *Bacillus simplex* به عنوان گروه بیرونی آورده شده است.

برخی مطالعات نشان داده اند که حضور برخی از گروهها با حالت تعادل دریاچه در ارتباط می باشد. در دریاچه های گل آلود بیشتر Cyanobacteria و در دریاچه های صاف Bacteroidetes غالب می باشند (۲۷). در این پژوهش، باکتریهای به دست آمده از نظر متابولیسمی هتروتروف می باشند و بسیاری از آنها مانند *Pseudomonas*، *Flavobacterium*، *Xanthomonas* و *Bacillus* از تجزیه کنندگان سوبستراهای مختلف در طبیعت به شمار می روند (۶). نتیجه حاصل می تواند به دلیل موقعیت مکانی و فصل نمونه برداری باشد. نمونه برداری در فصل پاییز در حاشیه دریاچه انجام پذیرفت. در این زمان گیاهان موجود در حاشیه به تدریج از بین می روند و سوبسترای حاصل از آنها منبع غذایی مناسبی به منظور تقویت باکتریهای تجزیه کننده مواد می باشد. ساختار جمعیت میکروارگانیسم ها می تواند با بسیاری از متغیرهای محیطی دیگر مانند شوری، میزان مواد آلی و معدنی یا مواد غذایی در دسترس در ارتباط باشد (۱۵).



شکل ۳- درخت فیلوژنی باکتریهای گرم مثبت با استفاده از الگوی Maximum Likelihood انجام شد. بررسی اعتبار شاخه های درخت با استفاده از آنالیز bootstrap با تکرار ۱۰۰۰ صورت گرفت.سویه های به دست آمده در این پژوهش با دایره های سیاه نشان داده شده اند. توالی باکتری *Pseudomonas orientalis* به عنوان گروه بیرونی آورده شده است.

از طرفی حاشیه اطراف دریاچه به تدریج و به دلیل کاهش بارندگی در سالهای اخیر عقب نشینی کرده و به نظر می رسد غلظت نمک موجود در آن رو به افزایش باشد. در دریاچه Bafa در غرب ترکیه پس از ساخت و سازهایی که در سال ۱۹۸۵ به منظور کنترل سیل صورت پذیرفت، شوری دریاچه افزایش یافت. جمعیت میکروارگانیسم ها در طول یک سال مورد بررسی قرار گرفتند که نشان می دهد این جمعیت تغییر یافته و ترکیبی از جمعیت آبهای شیرین و محیطهای شور می باشد (۷). بنابراین با اینکه جمعیت میکروبی دریاچه بزنگان کاملاً شناخته نشده است، به نظر می رسد به دلیل افزایش درجه شوری و تغییر در سایر عوامل اکولوژیکی این اکوسیستم با تغییر کلیماکس مواجه شده است که نیازمند بررسیهای بیشتر می باشد. بررسی آنزیمهای خارج سلولی در باکتریهای شناسایی شده نشان می دهد که در باکتریهای گرم منفی ۲۶/۶، ۲۳/۳، ۱۶/۷ و ۳/۳ درصد سویه ها به نسبت تعداد کل شناسایی شده به ترتیب دارای فعالیت آمیلازی، پروتئازی، سیتراتازی و ژلاتینازی می باشند. در حالی که در باکتریهای گرم مثبت ۲۰، ۲۳/۳، ۶/۷ و ۶/۷ درصد دارای فعالیت آنزیمهای نامبرده می باشند (شکل ۴). بنابراین، ۵۶/۷ درصد باکتریهای گرم مثبت و ۷۰ درصد باکتریهای گرم منفی قابلیت تولید آنزیمهای خارج سلولی را دارا می باشند. این نتیجه نشان می دهد که در تولید آنزیم های هیدرولازی تفاوت معناداری بین باکتریهای گرم مثبت و گرم منفی مشاهده نمی شود. بررسی تنوع زیستی میکروارگانیسم های حاضر در اکوسیستمهای مختلف می تواند نقش اکولوژی این سویه ها را در محیط زیست خود و اثر آنها را در سایر زنجیره های غذایی موجود آشکارتر سازد. این سویه ها دارای توانایی تولید آنزیمهای هیدرولازی می باشند، که می توانند در چشم انداز زیست فناوری در نظر گرفته شوند.



شکل ۴- درصد فراوانی آنزیم های خارج سلولی در سویه های شناسایی شده

تشکر و قدردانی: انجام این طرح تحقیقاتی با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه فردوسی مشهد در قالب طرح شماره ۲۲۲۲۰/۲ انجام شده است. از دست اندرکاران و پرسنل آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشگاه فردوسی مشهد و به ویژه سرکار خانم پردلی قدردانی می شود.

منابع

۱. بهروزی راد، ب.، ۱۳۸۷، تالابهای ایران، انتشارات سازمان جغرافیایی نیروهای مسلح

۲. غلامی، ع.، اجتهادی، ح.، قاسم زاده، ف.، قرشی الحسینی، ج.، ۱۳۸۵، تنوع زیستی گونه های گیاهی اطراف منطقه حفاظت شده دریاچه بزنگان، مجله زیست شناسی ایران، ۱۹(۴): ۴۰۷-۳۹۸.

۳. زرپرور، پ.، آموزگار، م.ع.، فلاحیان، م. ر.، بررسی تنوع زیستی باکتریهای نمک دوست و تحمل کننده نمک قابل کشت در تالاب پرشور اینچه برون، مجله پژوهشهای سلولی و مولکولی (مجله زیست شناسی ایران)، ۲۷ (۱): ۵۶ ـ ۴۴

4. Babavalian, H., Amoozegar, M.A., Zahraei, S.,Rohban, R., Shakeri, F., Moghaddam, M.M., 2014, Comparison of bacterial biodiversity and enzyme production in three hypersaline lakes; Urmia, Howz-Soltan and Aran-Bidgol, Indian Journal of Microbiology. 54: 444-9.

5. Chandler, D.P., Li, S.M., Spadoni, C.M., Drake, G.R., Balkwill, D.L., Fredrickson, J.K., Brockman, F.J., 1997, A molecular comparison of culturable aerobic heterotrophic bacteria and 16S rDNA clones derived from adeep subsurface sediment, FEMS Microbiology Ecology. 23:131-144.

6. Cottrell, M.T., Kirchman, D.L., 2000, Natural assemblages of marine proteobacteria and members of the Cytophaga-Flavobacter cluster consuming low- and high-molecular-weight dissolved organic matter, Applied and Environmental Microbiology. 66: 1692-1697.

7. Demir, N., 2007, Changes in the phytoplankton community of a coastal, hyposaline lake in western Anatolia, Turkey, Limnology. 8: 337–342.

8. Dunbar, J., Takala, S., Barns, S.M., Davis, J.A., and Kuske C.R., 1999, Levels of Bacterial Community Diversity in Four Arid Soils Compared by Cultivation and 16S rRNA Gene Cloning, Applied and Environmental Microbiology. 65: 1662–1669.

9. Ellis, R.J., Morgan, P., Weightman, A.J., Fry, J.C., 2003, Cultivation-Dependent and -Independent Approaches for DeterminingBacterial Diversity in Heavy-Metal-Contaminated Soil, Applied and Environmental Microbiology. 69: 3223–3230

10. Hayward, C.A., 2006, Microorganisms. In: Encyclopedia of Life Sciences (ELS). John Wiley & Sons, Ltd: Chichester.

11. Fenchel, T., 2007, Bacterial Ecology. In: Encyclopedia of Life Sciences (ELS). John Wiley & Sons, Ltd: Chichester.

12. Kirk, J.L., Beaudette L.A., Hart, M., Moutoglis, P., Klironomos, J.N., Lee, H., Trevors, J.T., 2004, Methods of studying soil microbial diversity. Journal of Microbiological Methods. 58:169–188

13. Lane, D.J., 1991, 16S/23S rRNA sequencing. In: Stackebrandt E, Goodfellow M, editors. Nucleic acid techniques in bacterial systematics. Chichester, United Kingdom: John Wiley and Sons. 115–175.

14. Liu, L., Peng, Y., Zheng, X., Xiaoa, L., Yang, L., 2010, Vertical Structure of Bacterial and Archaeal Communities within the Sediment of a Eutrophic Lake as Revealed by Culture-Independent Methods. Journal of Freshwater Ecology. 25: 565-573.

15. Liu, Y., Zhang, J., Zhao, L., Zhang, X., Xie, S.,2014, Spatial distribution of bacterial communities in high-altitude freshwater wetland sediment. Limnology. 15:249–256

16. Makhdoumi-Kakhki, A., Amoozegar, M.A., Kazemi, B., Pašić, L., Ventosa, A., 2012, Prokaryotic diversity in Aran-Bidgol salt lake, the largest hypersaline playa in Iran. Microbes and Environments. 27: 87-93.

17. Marchesi, J.R., Sato, T., Weightman, A.J., Martin, T.A., Fry, J.C., Hiom, S.J., Wade, W.G., 1998, Design and Evaluation of Useful Bacterium-Specific PCR Primers That Amplify Genes Coding for Bacterial 16S rRNA. Applied and Environmental Microbiology. 64: 795–799

18. Martin-Laurent, F., Philippot, L., Hallet, S., Chaussod, R., Germon, J. C., Soulas, G., and Catroux, G., 2001, DNA extraction from soils: Old bias for new microbial diversity analysis methods, AppliedandEnvironmental Microbiology. 67: 2354-2359.

19. Pearce, D.A., Gast, C.J., Lawley, B., Ellis-Evans, J.C., 2003, Bacterioplankton community diversity in a maritime Antarctic lake, determined by culture-dependent and culture-independent techniques, FEMS Microbiology Ecology. 45: 59-70.

20. Philp, J.C., Atlas, R., and Cunningham, C.J., 2009, Bioremediation. In: Encyclopedia of Life Sciences (ELS). John Wiley &Sons, Ltd: Chichester.

21. Prosser, J. I., 2002, Molecular and functional diversity in soil micro-organisms, Plant and Soil, 244: 9-17.

22. Rohban, R., Amoozegar, M.A., Ventosa, A., 2009, Screening and isolation of halophilic bacteria producing extracellular hydrolyses from Howz Soltan Lake, Iran, Journal of industrial microbiology & biotechnology. 36: 333-340.

23. Song, H., Li1, Z., Du1, B., Wang, G., Ding, Y., 2011, Bacterial communities in sediments of the shallow Lake Dongping in China. Journal of Applied Microbiology.112: 79–89.

24. Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., and Kumar, S., 2011, MEGA 5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods, Molecular Biology and Evolution. 28: 2162-2169.

25. Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson T.J., 1994, Clustal-W - Improving The Sensitivity Of Progressive Multiple Sequence Alignment Through Sequence Weighting, Position-Specific Gap Penalties And Weight Matrix Choice, Nucleic Acids Research. 22: 4673-4680.

26. Ulrich, A., Klimke, G., Wirth, S., 2008, Diversity and activity of cellulose-decomposing bacteria, isolated from a sandy and a loamy soil after long-term manure application, Microbial Ecology, 55: 512-522.

27. Van der Gucht, K., Vandekerckhove, T., Vloemans, N., Cousin, S., Muylaert, K., Sabbe, K., Gillis, M., Declerk, S., De Meester, L., Vyverman, W., 2005, Characterization of bacterial communities in four freshwater lakes differing in nutrient load and food web structure, FEMS Microbiology Ecology. 53: 205-20.

Phylogenetic diversity of cultivable bacteria in Lake Bazangan and their ecological role

Shahnavaz B.[1,2] and Ghassemzadeh F.[1,2]

[1] **Biology Dept., Faculty of Science, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, I.R. of Iran**

[2] **Zoological Innovations Research Dept., Institute of Applied Zoology, Faculty of Sciences, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, I.R. of Iran**

Abstract

Bacteria are the most abundant and richest groups of organisms that are involved in many important ecosystem processes. Despite their ecological importance, there is little literature about biodiversity, especially in aqueous environments. Iran has a variety of lakes in different locations, each of which have a special climate, with unique ecological features. Bazangan Lake, only natural lake with little salty is located in Khorasan Razavi and so far, there has not been researched on its microorganisms. The present study examined the phylogenetic diversity of cultivable bacteria in the Bazangan Lake. Sampling was conducted in November 2010. The bacterial screening led to isolation of 51 gram-positive and 15 gram-negative. 30 isolates were selected to molecular identification using 16S rRNA, studying Morphology, biochemistry and hydrolase enzymes. Identified strains belonged to beta, Gamma-Proteobacteria, Bacteroidetes and Firmicutes. Variety of Gram-ngative genus was more including *Luteibacter*, *Xanthomonas*, *Varivorax*, *Collimonas* and *Flavobacterium*. While Gram-positive bacteria is of less diversity including *Bacillus*, *Fictibacillus*, *Staphylococcus* and *Paenibacillus*. The maximum frequency is related to the genus *Pseudomonas*. The significant difference was not observed in gram-positive and gram-negative strains by checking hydrolase enzymes.

Key words: Biodiversity, Lake Bazangan, cultivable bacteria, 16S rRNA gene