

تنوع فیلوژنتیکی باکتریهای قابل کشت دریاچه بزنگان و نقش اکولوژی آنها

بهار شهنواز^{۱،۲*} و فرشته قاسم زاده^{۲،۱}

^۱ مشهد، دانشگاه فردوسی مشهد، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی

^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

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

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

قابل کشت موجود در دریاچه بزنگان و مقایسه آن با باکتریهای مشابه به دست آمده در سایر محیطهای طبیعی می‌باشد.

مواد و روشها

نمونه برداری و ویژگیهای محل نمونه برداری: دریاچه بزنگان در فاصله ۱۲۰ کیلومتری شرق شهرستان مشهد و ۹۴ کیلومتری جنوب غربی 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) می‌باشد (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 می‌باشد. 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).

آنها دارای ویژگیهایی می‌باشند. برای بررسی تنوع زیستی میکروارگانیسم‌ها روشهای مختلفی شامل روشهای مستقل از کشت و یا وابسته به کشت بررسی شده است. روشهای مستقل از کشت DNA کل از نمونه محیطی استخراج شده و ژنهای مورد نظر تکثیر و آنالیز می‌شوند. یکی از مهم‌ترین ویژگیهای این روشها درک ساختار و ترکیب جمعیت میکروبیها، صرف نظر از فعالیتهای عملکردی آنها در محیط می‌باشد. البته هر یک از روشهای مذکور دارای ضعفهایی می‌باشند که نتیجه حاصل از آن تنوع جمعیت میکروبی را تحت تأثیر قرار می‌دهد. 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 میکروارگانیسم‌ها، بررسی نقش اکولوژی و قابلیت تجزیه زیستی ترکیبات مضر در طبیعت امکان پذیر می‌باشد. باید در نظر داشت که در این روشها بخشی از میکروارگانیسم‌ها به دلیل غیرقابل کشت بودن در نظر گرفته نمی‌شود، و یا انتخاب روش کشت و شرایط فیزیکی و نوع محیط کشت انتخابی می‌تواند بر نتیجه نهایی تأثیر گذار باشد (۱۲).

کشور ایران دارای دریاچه‌های متنوعی در نقاط مختلف می‌باشد که هر کدام به دلیل وضعیت خاص آب و هوایی آن، می‌تواند از نظر اکولوژیکی دارای ویژگیهای منحصر به فردی باشد. بسیاری از این دریاچه‌ها مانند ارومیه، آران بیدگل،..... که جمعیت میکروارگانیسم‌های آن در سالهای اخیر مورد بررسی قرار گرفته است، دارای غلظت نمکی بالایی می‌باشند (۳، ۱۶ و ۲۲). دریاچه بزنگان تنها دریاچه مهم و طبیعی استان خراسان رضوی است که جزء آبهای کم شور محسوب می‌شود و تاکنون پژوهشی درباره میکروارگانیسم‌های آن انجام نشده است. هدف اصلی از انجام پژوهش حاضر بررسی تنوع فیلوژنتیکی باکتریهای

شامل آب دریاچه و رسوبات آن بوده است. نمونه برداری در ظروف شیشه‌ای استریل با رعایت شرایط نمونه برداری انجام پذیرفت. نمونه‌ها تا زمان انجام آزمایش در دمای محیطی و شرایط تاریکی نگهداری شدند.

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 نمونه‌ها با یکدیگر ادغام و در نهایت سه نمونه مورد بررسی قرار گرفت که

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 نمونه برداری	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 نمونه‌ها: 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 10^{-6} 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 جدایه‌های 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. جدایه‌های 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 جدایه‌های انتخاب شده، رنگ آمیزی گرم، تست حرکت و آزمونهای بیوشیمیایی مانند وجود آنزیمهای هیدرولازی سیتراز، ژلاتیناز، آمیلاز و پروتئاز صورت گرفت (جدول ۲).

تکثیر ژن rRNA ۱۶S و توالی سکانس: حدود ۲۵۰ میلی گرم از هر سویه باکتری در $500 \mu\text{l}$ آب دیونیزه سوسپانسیون شده و به مدت ۲۴ h در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد قرار گرفت. پس از ذوب شدن مجدد، $1 \mu\text{l}$ از سوسپانسیون باکتری به عنوان الگوی DNA به منظور تکثیر ژن rRNA 16S با استفاده از پرایمرهای عمومی ۲۷F (۳'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG (۵'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG (۱۷) و ۱۴۹۲R (۳'-GGTTACCTTGTTACGACTT (۵'-GGTTACCTTGTTACGACTT (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 $1/5$ میلی مولار MgCl_2 ، $1/5$ میلی مولار KCl، 10 میلی مولار Tris-HCl، $0/2$ از هر dNTP، $0/5$ میکرومولار از هر پرایمر و $0/6$ 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

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

افزایش درجه شوری و تغییرات pH آب را نشان می‌دهد که بیشتر می‌تواند 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 می‌تواند روی جمعیت میکروبی تأثیرگذار باشد، هر چند در مورد جمعیت میکروبی در سالهای گذشته هیچ گونه اطلاعاتی در دسترس نمی‌باشد.

گرچه باکتریهای قابل کشت درصد ناچیزی از مجموعه باکتریهای موجود را تشکیل می‌دهند، جداسازی و شناسایی این باکتریها به جهت دستیابی به ژنوم کامل آنها و بررسی فعالیت فیزیولوژی آنها از اهمیت ویژه ای برخوردار می‌باشد. 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 می‌دهد که تعداد کلی باکتریها در دو محیط نامبرده تفاوت معنی داری با یکدیگر ندارند و به صورت میانگین $2,73 \times 10^3$ CFU/ml می‌باشد. تنوع مورفولوژی در کلنیهای به دست آمده از نمونه های آبی بیشتر از رسوبات می‌باشد.

تنوع سویه های شناسایی شده: درک ساختار و عملکرد گروههای باکتریها به منظور درک بهتر اکوسیستمهای آبی ضروری می‌باشد. 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 می‌باشند. تعداد جدایه های گرم مثبت به صورت معنی داری کمتر می‌باشد و شامل ۱۸/۱۸ درصد (۱۲) میله ای گرم مثبت، ۳/۰۳ درصد (۷) کوکسی گرم مثبت و ۶/۰۶

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 می‌باشند. 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

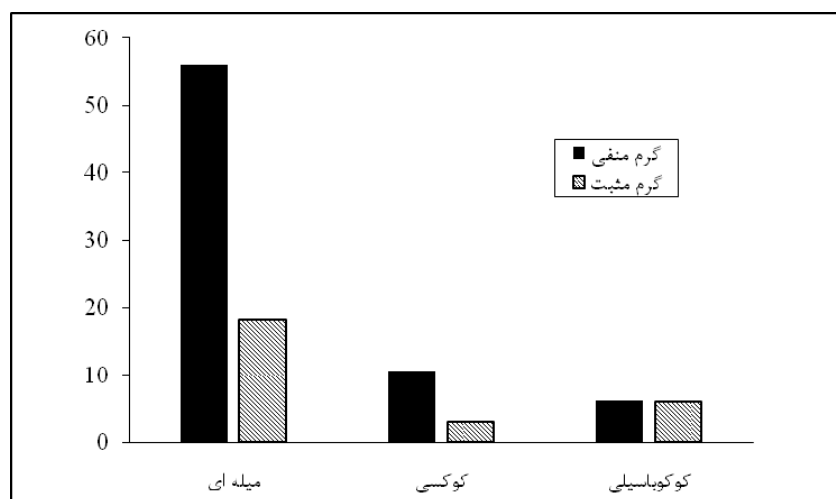
شمارش و ویژگیهای فنوتیپی جدایه ها: بخش عمده ای از کره زمین توسط میکروارگانیسم ها اشغال شده است. بررسی تنوع میکروبی اکوسیستمهای مختلف اجازه می‌دهد شناخت بهتری از فلور طبیعی این زیستگاهها در دسترس قرار گیرد. ایران دارای دریاچه های متنوعی در نقاط مختلف می‌باشد که هر کدام به دلیل وضعیت خاص آب و هوایی آن، می‌تواند دارای ویژگیهای منحصر به فردی باشد. از طرفی علی‌رغم تنوعی که این مناطق دارند، مطالعات محدودی درباره جمعیت میکروبی آنها صورت گرفته است. یکی از این مناطق دریاچه بزنگان می‌باشد 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 $8,67 \pm 0,05$ و $50,33 \pm 0,58$ و $25,23 \pm 0,42$ 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،

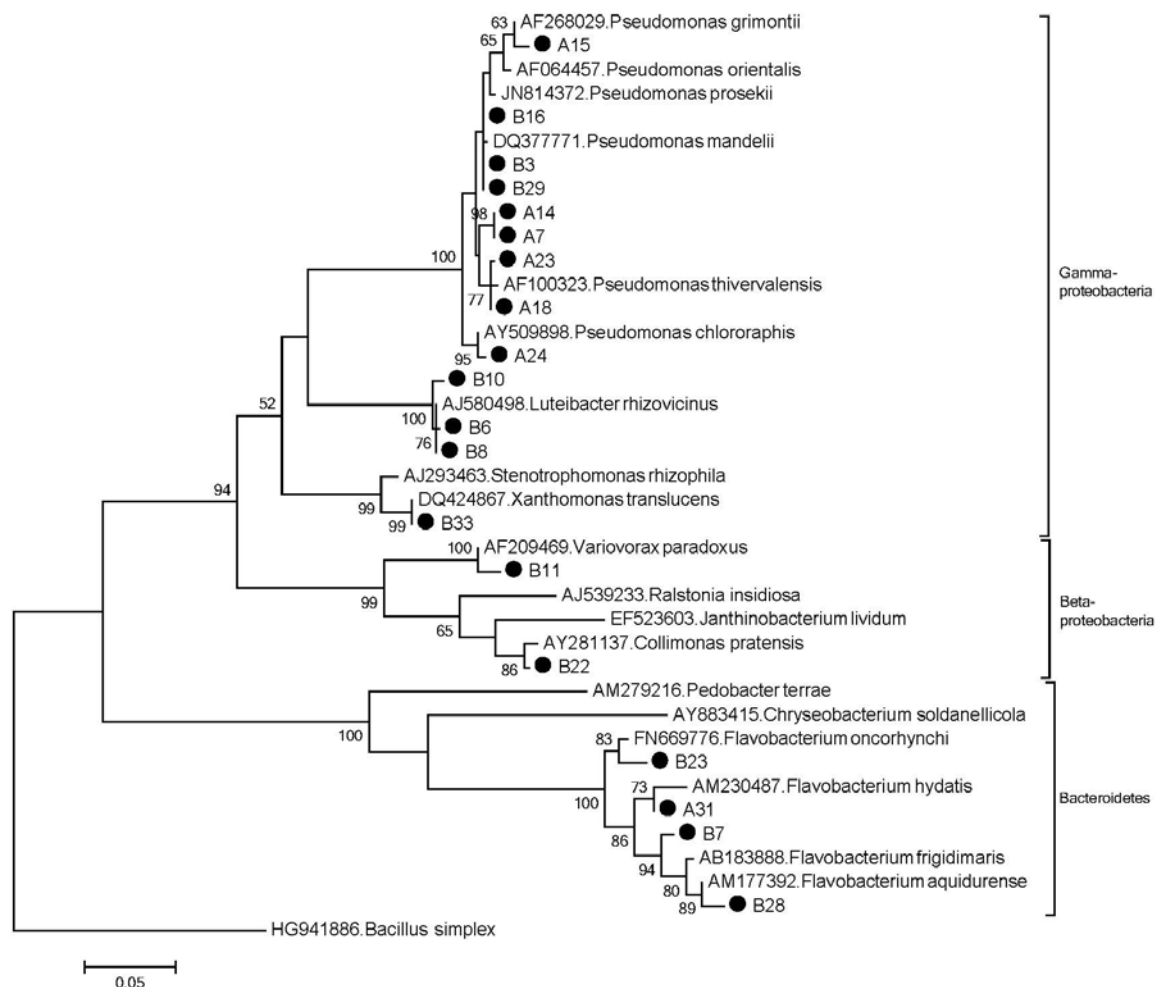
پایگاه‌های اطلاعاتی نشان می‌دهند که ممکن است معرف گونه جدیدی باشند. برای رسیدن به این منظور شناسایی تکمیلی ویژگی‌های فنوتیپی، بیوشیمیایی و مولکولی ضروری می‌باشد.

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

درصد (۴) کوکوباسیلی گرم مثبت می‌باشند (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 می‌دادند، به منظور بررسی و تکثیر با ژن *SrRNA* ۱۶ انتخاب شدند. ویژگی‌های مورفولوژی، واکنش گرم و بررسی آنزیم‌های هیدرولازی سویه‌هایی که به روش مولکولی شناسایی شده‌اند، 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* می‌باشند. در حالی که تنوع در باکتری‌های گرم مثبت کمتر و تمامی جنس‌های به دست آمده مربوط به شاخه *Firmicutes* می‌باشند. در مجموع ۱۰ جنس مختلف به صورت مولکولی شناسایی شدند که جنس‌های متعلق به باکتری‌های گرم منفی شامل *Luteibacter*، *Xanthomonas*، *Pseudomonas*، *Varivorax*، *Collimonas* و *Flavobacterium* (شکل ۲) و گرم مثبت شامل *Bacillus*، *Fictibacillus*، *Staphylococcus* و *Paenibacillus* می‌باشند (شکل ۳). برخی سویه‌های شناسایی شده مانند A12 (*Bacillus* sp.)، B11 (*Pseudomonas* sp.)، B10 (*Luteibacter* sp.)، B6 (*Flavobacterium* sp.) و (*Varivorax* sp.) درصد مشابهت کمتر از ۹۸/۷ را در مقایسه با داده‌های موجود در



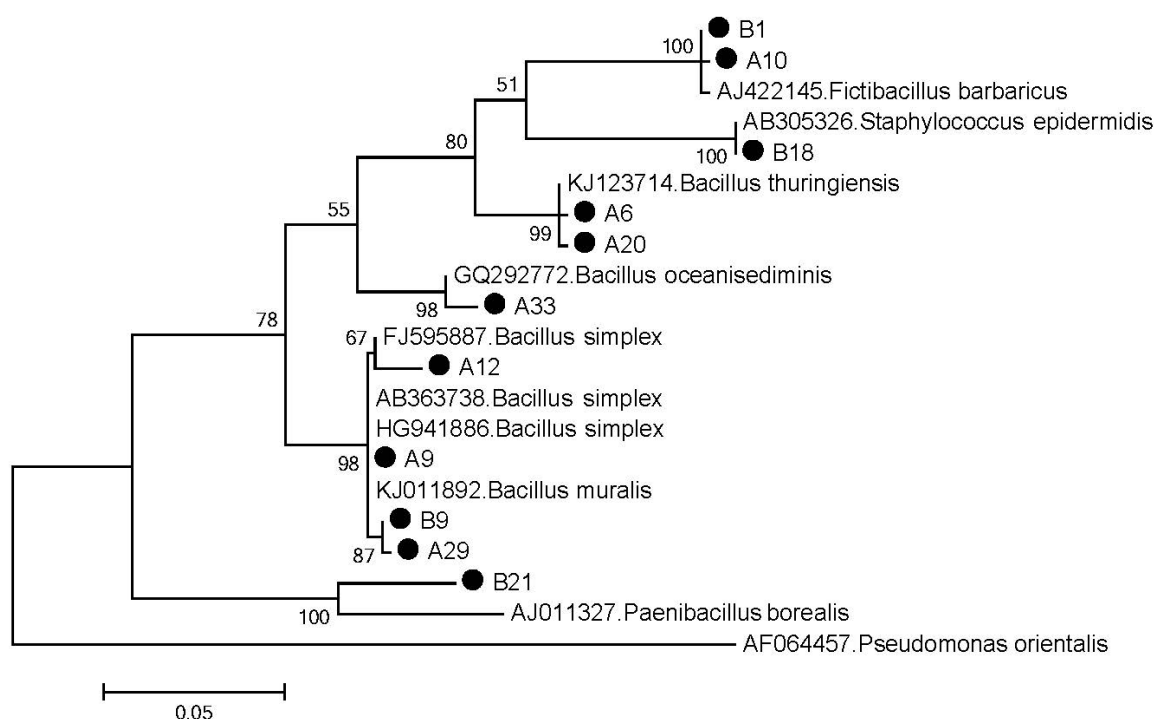
شکل ۱- فراوانی باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت براساس مورفولوژی آنها



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.

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).

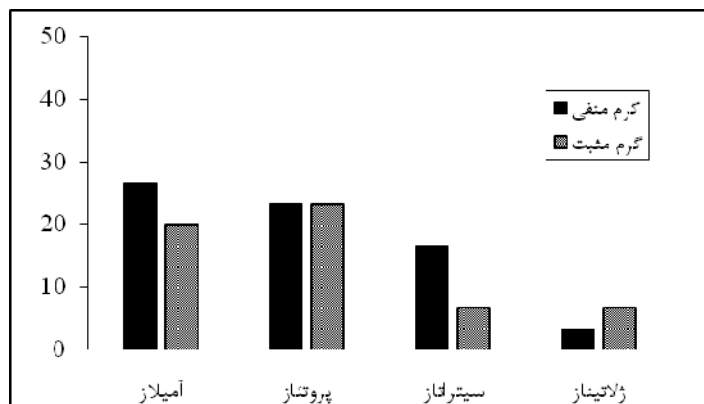
برخی مطالعات نشان داده اند که حضور برخی از گروهها با حالت تعادل دریاچه در ارتباط می باشد. در دریاچه های گل آلود بیشتر Cyanobacteria و در دریاچه های صاف Bacteroidetes غالب می باشند (۲۷). در این پژوهش، باکتریهای به دست آمده از نظر متابولیسمی هتروتروف می باشند و بسیاری از آنها مانند *Pseudomonas*، *Flavobacterium*، *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



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.

شده به ترتیب دارای فعالیت آمیلازی، پروتئازی، سیترازی 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 میکروارگانسیم 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.

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 میکروارگانسیم 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



شکل ۴- درصد فراوانی آنزیم‌های خارج سلولی در سویه‌های شناسایی شده

و پرسنل آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشگاه فردوسی مشهد و به ویژه سرکار خانم پردلی قدردانی می‌شود.

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

منابع

- بهریزی راد، ب.، ۱۳۸۷، تالیب‌های ایران، انتشارات سازمان جغرافیایی نیروهای مسلح
- غلامی، ع.، اجتهادی، ح.، قاسم زاده، ف.، قرشی‌الحسینی، ج.، ۱۳۸۵، تنوع زیستی گونه‌های گیاهی اطراف منطقه حفاظت شده دریاچه بزنگان، مجله زیست‌شناسی ایران، ۱۹(۴): ۳۹۸-۴۰۷.
- زرپور، پ.، آموزگار، م.ع.، فلاحیان، م. ر.، بررسی تنوع زیستی باکتریهای نمک دوست و تحمل‌کننده نمک قابل کشت در تالاب پرشور اینچه برون، مجله پژوهش‌های سلولی و مولکولی (مجله زیست‌شناسی ایران)، ۲۷(۱): ۵۶-۴۴
- 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.
- 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 a deep subsurface sediment, FEMS Microbiology Ecology. 23:131-144.
- 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.
- Demir, N., 2007, Changes in the phytoplankton community of a coastal, hyposaline lake in western Anatolia, Turkey, Limnology. 8: 337-342.
- 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.
- Ellis, R.J., Morgan, P., Weightman, A.J., Fry, J.C., 2003, Cultivation-Dependent and -Independent Approaches for Determining Bacterial Diversity in Heavy-Metal-Contaminated Soil, Applied and Environmental Microbiology. 69: 3223-3230
- Hayward, C.A., 2006, Microorganisms. In: Encyclopedia of Life Sciences (ELS). John Wiley & Sons, Ltd: Chichester.
- Fenchel, T., 2007, Bacterial Ecology. In: Encyclopedia of Life Sciences (ELS). John Wiley & Sons, Ltd: Chichester.
- Kirk, J.L., Beaudette L.A., Hart, M., Moutoglisis, 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, *Applied and Environmental 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., Li, Z., Du, 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-negative 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