Identification of some Cyanobacterial Isolates of Khabr National Park of Kerman using Classic and Molecular Methods

Zahra Hojjati Bonab *
Ph.D Student of Microbiology, Alzahra University, Tehran, Iran 2Instructor of Microbiology, Islamic Azad University, Bonab, Iran, hojjati_zahra90@yahoo.com
Parisa Mohammadi
Associate Professor of Microbiology,Alzahra University,Tehran,Iran, p.mohammadi@alzahra.ac.ir
Ezat Asgarani
Associate Professor of Genetics, Alzahra University, Tehran, Iran, asgarani@gmail.com

Abstract

Introduction: Khabr national park is one of the invaluable natural sources in our country and its microbial variety has not been investigated. Cyanobacteria are of those organisms that are present in all terrestrial and water ecosystems and some minerals are limiting factors in their growth. The goal of this study is to investigate the present cyanobacteria in the soils of the grazed and non-grazed plots in two cold and hot steppes of Khabr Park in the autumn season by means of classic and molecular methods.

Materials and Methods: 32 different regions of Khabr Park were sampled in autumn and were cultured in BG11 medium. Isolation of cyanobacteria was conducted by various sub-cultures. Then the pure colonies were morphologically studied by valid taxonomic keys. Molecular identification of mentioned isolates was performed by amplification and sequencing of *16srRNA gene*. The features of mentioned soils were analyzed physically and chemically.

Results: The results showed that for the soil texture of sandy loam, the average electrical conductivity was 99.12 µSiemens/cm and the average acidity of soil was 8.29. The isolates of Cyanobacteria belonged to *Chroococcidiopsis*, *Leptolyngbya*, *Synechococcus*, *Nodularia*. The results of DNA sequencing were compared to NCBI and its results were subjected to BLAST alignment.

Discussion and conclusion: The present work revealed that the variety and the number of the Cyanobacteria in this desert area are dependent on different parameters such as weather, humidity, source of nutrients, the amount of light absorbed by the surface and the temperature. The results of molecular identification validated the results of morphological tests.

Key words: Khabr National Park, Cyanobacteria, *16srRNA gene*.

* Corresponding author
Received: February 13, 2018 / **Accepted:** April 16, 2018

فصلنامه علمی- پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها
سال هفتم، شماره ۲۷، پاییز ۱۳۹۷، صفحه ۳۵- ۲۵
تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱۱/۲۴ – تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۱/۲۷

شناسایی برخی جدایه‌های سیانوباکتریایی پارک ملی خبر کرمان با روش‌های کلاسیک و مولکولی

زهرا حجتی بناب: دانشجوی دکتری گروه میکروبیولوژی، دانشگاه الزهرا(س)، تهران، ایران و مربی گروه میکروبیولوژی، دانشکدهٔ علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد بناب، ایران، hojjati_zahra90@yahoo.com
پریسا محمدی *: دانشیار گروه میکروبیولوژی، دانشگاه الزهرا(س)، تهران، ایران، p.mohammadi@alzahra.ac.ir
عزت عسگرانی: دانشیار گروه ژنتیک، دانشگاه الزهرا(س)، تهران، ایران، asgarani@gmail.com

چکیده

مقدمه: پارک ملی خبر یکی از ذخیره‌گاه‌های طبیعی بسیار باارزش کشور است که تاکنون تنوع میکروبی آن بررسی نشده است. سیانوباکتری‌ها ازجمله موجودات زنده‌ای هستند که در بیشتر اکوسیستم‌های خاکی و آبی وجود دارند و برخی مواد معدنی عامل محدودکنندهٔ رشد این موجودات هستند. هدف پژوهش حاضر، بررسی حضور و شناسایی سیانوباکتری‌های موجود در خاک‌های مناطق دست‌خورده و دست‌نخورده در دو منطقهٔ استپ سرد و گرم پارک خبر با استفاده از روش‌های کلاسیک و مولکولی است.

مواد و روش‌ها: از ۳۲ نمونهٔ مختلف خاک پارک خبر که در فصل پاییز نمونه‌برداری شده بودند در محیط BG11کشت داده شد و جداسازی سیانوباکتری‌ها با استفاده از واکشت‌های متعدد انجام شد؛ سپس کلنی‌های خالص ازنظر ریخت‌شناسی با استفاده از کلیدهای شناسایی معتبر بررسی شدند. شناسایی مولکولی جدایه‌های یادشده با استفاده از تکثیر و تعیین توالی ژنوم ناحیهٔgene *16S rRNA* انجام شد. ویژگی‌های خاک مناطق یادشده ازنظر فیزیکی و شیمیایی تجزیه‌وتحلیل شدند.

نتایج: نتایج بررسی نشان دادند نوع بافت خاک لوم- شنی، میانگین میزان هدایت الکتریکی ۹۹/۱۲ میکروزیمنس بر سانتی‌متر و میانگین اسیدیتهٔ خاک ۸/۲۹ است. جدایه‌های سیانوباکتری‌ها متعلق به جنس‌های *Chroococcidiopsis* sp.، *Leptolyngbya* sp.، *Nodularia* sp. و *Synechococcus* sp. بودند. نتایج تعیین توالی DNA با بانک‌های اطلاعاتی NCBI مقایسه و نتایج آن هم‌تراز (Blast) شد.

بحث و نتیجه‌گیری: پژوهش حاضر نشان داد تنوع و تعداد سیانوباکتری‌های موجود در مناطق بیابانی به عوامل مختلفی ازجمله شرایط آب‌وهوایی، میزان رطوبت، مقدار تابش نور جذب‌شده بر سطح و دمای منطقه بستگی دارد. نتایج شناسایی مولکولی نتایج ریخت‌شناسی را تأیید کردند.

واژه‌های کلیدی: پارک ملی خبر، سیانوباکتری، *16S rRNA* gene

* نویسندهٔ مسئول مکاتبات

Copyright©2018, University of Isfahan. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/BY-NC-ND/4.0/), which permits others to download this work and share it with others as long as they credit it, but they cannot change it in any way or use it commercially.

مقدمه.

بیابان‌ها بیش از یک‌پنجم خشکی‌های زمین را پوشانده‌اند و ازنظر اقلیمی بسیار گرم‌وخشک و یا بسیار سردوخشک هستند. وسعت بیابان‌ها در ایران حدود ۳۴۰ هزار کیلومترمربع و کمتر از یک‌پنجم کل مساحت آن است. پارک ملی خبر در جنوب شهر بافت استان کرمان و در N28°25′ تا N28°59′ عرض شمالی و E56°02′ تا E56°39′ طول شرقی واقع شده است. مساحت این منطقه حدود ۱۴۹۹۳۴ هکتار است و در سال ۱۳۷۹ با عنوان پارک ملی ثبت شده است (۱).

پژوهش‌های اخیر نشان می‌دهند اکوسیستم‌های بیابانی نسبتاً پیچیده و ازنظر زیستی غنی هستند (۲). بیابان‌ها به‌طور شگفت‌آوری حیات گیاهان و جانوران متنوع را حمایت می‌کنند و حتی برخی تاکسون‌های نیازمند به رطوبت مانند جلبک‌ها، خزه‌ها، سرخس‌ها، جانوران سخت‌پوست و تعدادی گونهٔ سمندر و دوزیست در بیابان‌ها گزارش شده‌اند. پوشش گیاهی و اجتماعات گیاهی در سرزمین‌های بیابانی و خشک حساس هستند و معمولاً اصلاح آنها به دلایلی مشکل است؛ برای نمونه، خاک‌های این مناطق اغلب هوموس کمی دارند، میزان مواد مغذی به‌ویژه فسفر این مناطق کم است و تغییرات و نوسانات دمای فصلی و سالانه زیاد است. پوسته‌های زیستی خاک در مناطق بیابانی و خشک اهمیت ویژه‌ای دارند؛ پوسته‌های زیستی متشکل از جلبک‌ها، سیانوباکتری‌ها، سرخس‌ها، جگرواش‌ها، قارچ‌ها و گل‌سنگ‌ها هستند که چند میلی‌متر بالایی سطح خاک را در اکوسیستم‌های خشک و نیمه‌خشک سراسر دنیا می‌پوشانند و یکی از مهم‌ترین اجزای زندهٔ این نواحی هستند (۳). این موجودات اجتماع زندهٔ ویژه‌ای تشکیل می‌دهند که آثار شدیدی ازجمله فرسایش خاک، زهکشی، پالایش، تنفس خاک، تثبیت نیتروژن و عملکرد گیاهان آوندی بر فرایندهای کلیدی اکوسیستم‌های یادشده دارد (۴ و ۵). سیانوباکتری‌ها موجودات بسیار کوچکی هستند که اندازهٔ آنها از چند میکرون بیشتر نمی‌شود، تولیدمثل آنها به روش غیرجنسی و تقسیم دوتایی است و در برخی موارد با تولید هورموگونیوم تکثیر می‌شوند و دارای کلروفیل a و فتواتوتروف هستند. سیانوباکتری‌ها ازنظر تولید اکسیژن در آب‌های شیرین و شور و ازنظر تثبیت نیتروژن به‌ویژه در آب‌های کم‌نیتروژن اهمیت بسیاری دارند و نیتروژن حاصل از فعالیت آنها نقش مهمی در چرخهٔ پروتئین‌سازی چنین اکوسیستم‌هایی ایفا می‌کند. سیانوباکتری‌ها بیشتر در محیط‌های خنثی یا قلیایی رشد می‌کنند و رشد آنها در محیط‌های اسیدی محدود می‌شود. چهار جنس *Stichococcus*، *Nostoc*، *Anabaena* و *Oscillatoria* از مهم‌ترین سیانوباکتری‌ها در طبیعت محسوب می‌شوند (۶-۹)؛ ازاین‌رو در گام نخست برای شناخت تنوع ریزموجودات پارک ملی خبر کرمان، جدایه‌های سیانوباکتریایی که یکی از مؤثرترین گروه‌های میکروبی این مناطق هستند با روش‌های کلاسیک و مولکولی شناسایی شدند.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری خاک از دو منطقهٔ استپی سرد و گرم و دست‌خورده و دست‌نخورده و از عمق صفر تا ۱۵ سانتی‌متری سطح خاک در فصل پاییز انجام شد. سه ویژگی بافت خاک، اسیدیته و هدایت الکتریکی خاک که دارای اهمیت ویژه است در نمونه‌های خاک بررسی شدند.

سنجش برخی ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک

اسیدیتهٔ خاک: ابتدا میزان ۲۰ گرم خاک گذرانده‌شده از الک ۲ میلی‌متری وزن شد و ۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر به آن اضافه شد و به مدت ۲ ساعت روی شیکر با سرعت g× ۲۰۰ تکان داده شد؛ سپس اسیدیتهٔ نمونه‌های خاک با استفاده از pHمتر اندازه‌گیری شد.

بافت خاک: ۵۰ گرم خاک الک‌شده به ۲۰ میلی‌لیتر پلی‌فسفات‌سدیم ۱۰ درصد و ۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر افزوده شد و پس‌از هم‌زدن، محلول به‌مدت یک شبانه‌روز در دمای اتاق نگهداری شد. در مرحلهٔ بعد، پس‌از افزودن ۳۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر و ۵ دقیقه مخلوط کردن با همزن برقی، محلول به استوانهٔ مدرج یک لیتری منتقل و با آب مقطر به حجم ۱ لیتر رسانده شد. چگالی پس‌از گذشت زمان‌های ۴۰ ثانیه و ۲ ساعت با چگالی‌سنج خوانده شد. درصد خاک رس و خاک لوم از دو رابطهٔ زیر محاسبه شد:

درصد رس=(۲×چگالی ۴۰ ثانیه)+۰/۲×(۶۸-دمای ۴۰ ثانیه)

درصد لوم=(۲×چگالی ۲ ساعت)+۰/۲×(۶۸-دمای ۲ ساعت)

مجموع دو عدد حاصل از عدد ۱۰۰ کم شد تا درصد شن معلوم شود:

درصد شن=(رس+لوم)-۱۰۰

درنهایت، بافت خاک با استفاده از مثلث خاک مشخص شد.

هدایت الکتریکی خاک: ابتدا از خاک، گل اشباع و سپس عصاره از گل اشباع تهیه شد. میزان هدایت الکتریکی محلول با کمک الکترود هدایت‌سنج خوانده و تعیین شد.

روش کشت سیانوباکتری‌های خاک: پس‌از تهیهٔ رقت‌های متوالی از خاک، نمونه‌ها در شرایط استریل روی محیط کشت جامد BG-11 حاوی ۱/۵گرم $NaNO_3$، ۱/۷ گرم $NaHCO_3$، ۳۱ میلی گرم K_2HPO_4، ۷۵ میلی گرم $MgSO_4.7H20$، ۳۶ میلی گرم $CaCl_2.H_20$، ۲۰ میلی گرم Na_2CO_3، ۶ میلی گرم Citric Acid، ۶ میلی گرم Ferric Ammonium Citrate، ۱ میلی گرم EDTA، ۲/۸۶ میلی گرم H_3BO_3، ۱/۸۱ میلی گرم $Mn_2Cl_2.4H_20$، ۲۲۰ میکروگرم $ZnS0_4.H_20$، ۳۹۰ گرم $Na_2MoO_4.2H_20$، ۸۰ میکروگرم $CuSO_4.H_20$ و ۴۰ $CoCl_2.6H_20$ کشت داده شدند (۱۰) و در دمای ۲۵ درجهٔ سانتی‌گراد و روشنایی ۲۵۰۰ لوکس در دوره‌های ۱۶ ساعت روشنایی/۸ ساعت تاریکی نگهداری شدند. دو هفته گرماگذاری برای جداسازی جدایه‌ها انجام شد و کلنی‌های قابل‌مشاهده واکشت شدند. برای جلوگیری از رشد قارچ‌ها رقت ۰/۱ گرم بر لیتر آنتی‌بیوتیک‌های نیستاتین و سیکلوهگزامید به محیط‌های کشت اضافه شد. ویژگی‌های ریخت‌شناسی جدایه‌ها مانند کوکوئیدی یا رشته‌ای‌بودن، وجود انشعابات، نوع انشعابات، توانایی تشکیل هتروسیست و تولید هورموگونیوم با استفاده از کلیدهای شناسایی تعیین شدند (۱۱-۱۳).

روش مولکولی: شناسایی مولکولی با تکثیر و تعیین توالی ژنوم ناحیهٔ *16S rRNA* و به کمک پرایمرهای اختصاصی سیانوباکتری‌ها انجام شد. پرایمر آغازگر رو به جلو CYA359F 5'(GGG GAA TYT TCC GCA ATG GG)3' و پرایمر معکوس CYA781R مخلوط هم‌مولار توالی‌های زیر بودند (۱۴-۱۶).

CYA781R (a) 5'(GAC TAC TGG GGT ATC TAA TCC CAT T)3'

CYA781R (b) 5'(GAC TAC AGG GGT ATC TAA TCC CTT T) 3'

روش استخراج DNA: استخراج DNA به‌طور دستی انجام شد؛ به این منظور، تودهٔ سلولی با انجام سانتریفیوژ از محیط‌کشت مایع جمع‌آوری شد و سپس به میکروتیوب حاوی این توده، ۴۰۰ میکرولیتر محلول بافر استخراج ۱۰۰ میلی‌مولار Tris/HCl، ۲۰ میلی‌مولار EDTA، ۲/۵ درصد (وزنی/حجمی) CTAB، ۱/۴ مولار NaCl، ۰/۲ درصد (حجمی/حجمی) مرکاپتواتانول با اسیدیتهٔ ۸ افزوده و نمونه به‌مدت ۱۵ دقیقه در فریزر منفی ۷۰ درجهٔ سانتی‌گراد قرار داده شد. سوسپانسیون حاصل به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۶۰ درجهٔ سانتی‌گراد قرار داده شد و سپس، استخراج DNA با افزودن حجم برابری از کلروفرم انجام شد. پس‌از افزودن کلروفرم، نمونه به‌آرامی مخلوط و به‌مدت ۶ دقیقه در g× ۵۰۰۰ سانتریفیوژ شد. فاز آبی به میکروتیوب جدید منتقل و هم‌حجم آن ایزوپروپانول اضافه شد. توده با سانتریفیوژ به‌مدت ۵ دقیقه در g× ۱۰۰۰۰ جمع‌آوری و به تودهٔ حاصل ۴۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل افزوده شد؛ سپس به سوسپانسیون حاصل به‌ترتیب ۰/۱ برابر حجم استات‌سدیم ۳ مولار و ۲ برابر حجم اتانول اضافه شد. رسوب DNA با سانتریفیوژ به‌مدت ۵ دقیقه در دور g× ۱۰۰۰۰ جمع‌آوری و سپس زیر هود خشک شد؛ DNA استخراج‌شده به ۲۰ میکرولیتر آب دوبار تقطیر استریل وارد و در فریزر منفی ۲۰ نگهداری شد.

سنجش غلظت DNA: ابتدا دستگاه نانودراپ با آب مقطر استریل کالیبره شد. سپس جذب ۱ میکرولیتر DNA استخراج‌شده در طول موج ۲۶۰ نانومتر خوانده و غلظت آن بر حسب نانوگرم بر میکرولیتر محاسبه شد.

شناسایی مولکولی جدایه‌ها با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR): واکنش PCR در حجم ۵۰ میکرولیتر شامل ۵ میکرولیتر بافر PCR (۱۰x)، ۱/۵ میکرولیتر $MgCl_2$ (۵۰ میلی‌مولار)، ۱ میکرولیتر از هریک از پرایمرها، ۰/۵ میکرولیتر آنزیم Taqپلیمراز، ۰/۵ میکرولیتر dNTP (۵۰ میلی‌مولار)، ۴ میکرولیتر DNA الگو و ۳۶/۵ میکرولیتر آب مقطر استریل انجام شد.

برنامه زمانی PCR: مراحل واسرشتی اولیه در ۹۴ درجهٔ سانتی‌گراد به‌مدت ۴ دقیقه، ۳۵ چرخه شامل واسرشتی در ۹۴ درجهٔ سانتی‌گراد به‌مدت ۱ دقیقه، اتصال در ۶۴ درجهٔ سانتی‌گراد به‌مدت ۱ دقیقه و طویل‌شدن در ۷۲ درجهٔ سانتی‌گراد به‌مدت ۱ دقیقه و مرحلهٔ طویل‌شدن نهایی در ۷۲ درجهٔ سانتی‌گراد به‌مدت ۱۰ دقیقه انجام شد.

روش الکتروفورز: ۱۰ میکرولیتر از هر محصول PCR همراه با ۲ میکرولیتر لودینگ‌بافر (۶x) به چاهک ژل آگارز ۱/۵ درصد حاوی رنگ سایبرگلد اضافه شد و الکتروفورز به‌مدت ۴۵ دقیقه با ولتاژ ۷۰ ولت انجام شد. تصویر ژل آگارز با دستگاه ژل‌داک (Ebox Vx5) مشاهده و تصویربرداری شد.

تعیین توالی DNA: محصولات PCR برای تعیین توالی به شرکت Sequetech (شرکت پیشگام) ارسال شدند. تعیین توالی با روش Exome Sequencing (Next Generation Sequencing- NGS)- Fragment Analysis-sanger انجام شد.

نتایج

ویژگی‌های اقلیمی منطقهٔ مطالعه‌شده: ویژگی‌های اقلیمی منطقهٔ پارک ملی خبر با استفاده از اطلاعات سامانهٔ ادارهٔ هواشناسی جمع‌آوری شدند (جدول ۱). ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی خاک مطابق بخش مواد و روش‌ها تعیین و نتایج در جدول ۲ ارائه شدند.

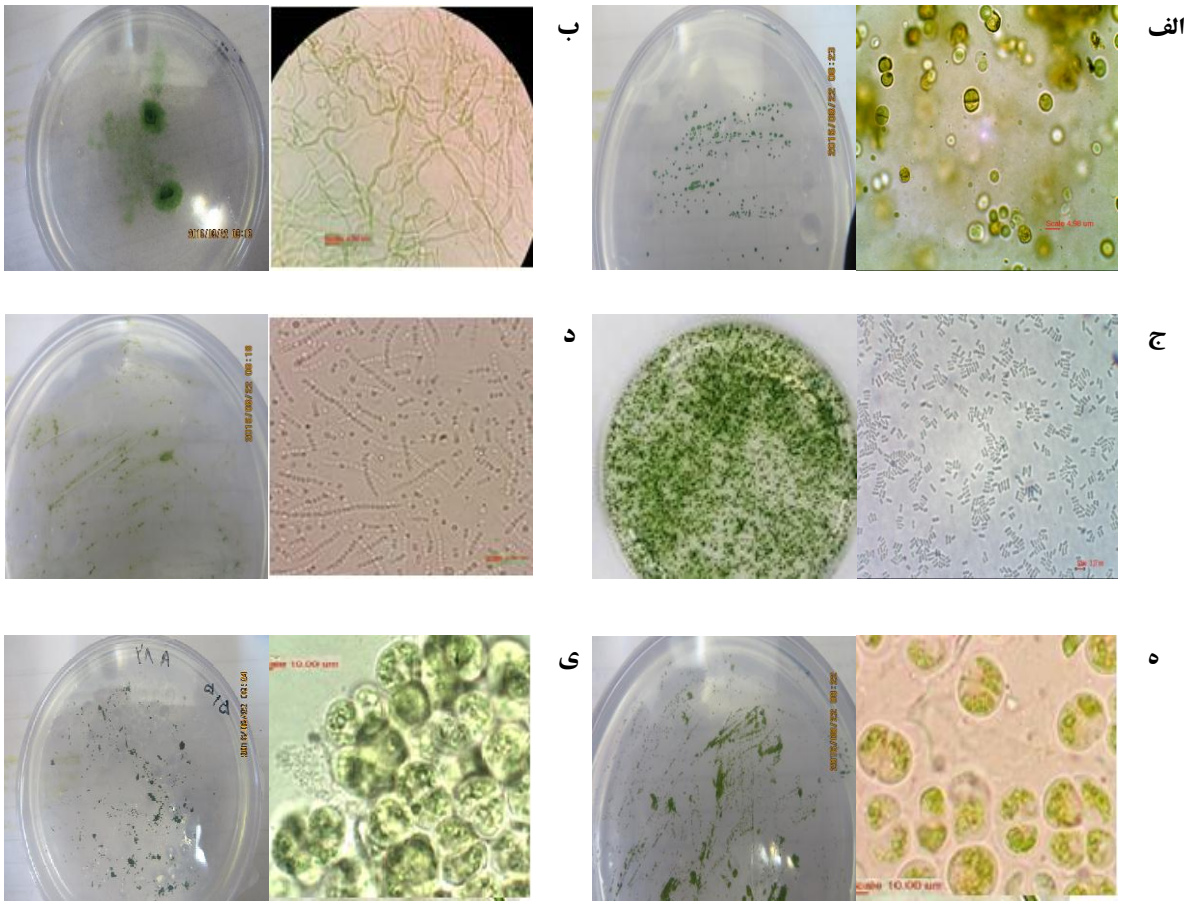
جدول ۱- ویژگی‌های اقلیمی منطقهٔ مطالعه‌شده

میانگین ماهانهٔ متوسط دمای روزانه بر حسب درجهٔ سانتی‌گراد	۱۵/۰۱
میانگین رطوبت نسبی بر حسب درصد	۳۹/۱۴
مجموع بارندگی ماهانه بر حسب میلی‌متر	۲۴۷/۴۳

جدول ۲- نتایج تعیین ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی خاک منطقهٔ استپی در فصل پاییز

منطقهٔ استپی	گرم دست‌خورده	گرم دست‌نخورده	سرد دست‌خورده	سرد دست‌نخورده
بافت خاک	لوم شنی	لوم شنی	لوم شنی	لوم شنی
هدایت الکتریکی خاک	۹۶/۶۱	۱۰۰/۲۶	۹۶/۶۳	۱۰۳/۵۱
اسیدیتهٔ خاک	۸/۳	۸/۳۱	۸/۲۸	۸/۲۷

نتایج شناسایی جدایه‌های سیانوباکتریایی: جدایه‌ها بر اساس مشاهده‌های میکروسکوپی (شکل ۱) و به کمک کلیدهای شناسایی (جدول ۳) بررسی و گونه‌های *Nodularia*، *Synechococcus*، *Leptolyngbya*، *Chroococcidiopsis* شناسایی شدند.



شکل ۱- تصاویر میکروسکوپی و ماکروسکوپی سیانوباکتری‌های شناسایی‌شده. الف. جدایهٔ ۲۲، *Chroococcidiopsis*؛ ب. جدایهٔ ۲۱، *Leptolyngbya*؛ ج. جدایهٔ ۲۳، *Synechococcus*؛ د. جدایهٔ ۲۹، *Nodularia*؛ ه. جدایهٔ ۲۶، *Chroococcidiopsis*؛ ی. جدایهٔ ۲۸، *Chroococcidiopsis*

جدول ۳- سیانوباکتری‌های استخراج‌شده از منطقهٔ استپی در فصل پاییز

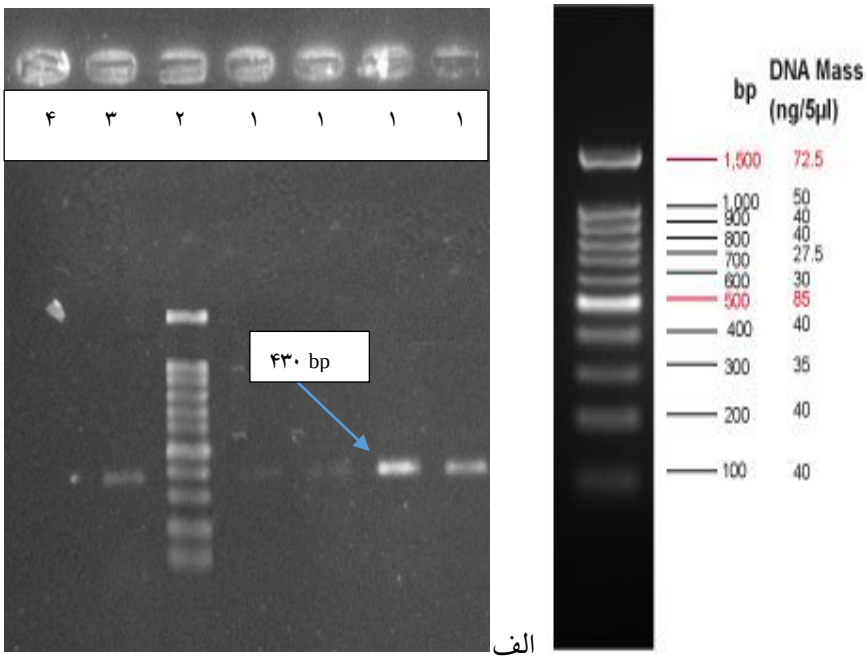
جنس سیانوباکتری	کد محل نمونه‌برداری	نوع استپی	نوع منطقه	ویژگی‌های ریخت‌شناسی
Leptolyngbya	۲۱	گرم	دست‌خورده	رشته‌ای، بدون انشعاب، غلاف‌دار، دارای هورموگونیوم، بدون هتروسیست، اندازهٔ سلول‌ها حدود ۰/۵ تا ۳ میکرومتر
Chroococcidiopsis	۲۲	گرم	دست‌نخورده	مشاهدهٔ سلول‌ها معمولاً به‌شکل دو، سه یا چهارتایی و محصورشده در یک غلاف، بیشتر سلول‌ها مشابه، کم‌وبیش دارای شکل کروی یکنواخت
Synechococcus	۲۳	گرم	دست‌خورده	سلول‌ها کروی‌شکل، تک‌سلولی، بدون هتروسیست، اندازهٔ سلول‌ها ۰/۸ تا ۱/۵ میکرومتر
Chroococcidiopsis	۲۶	گرم	دست‌نخورده	مشاهدهٔ سلول‌ها معمولاً به‌شکل دو، سه یا چهارتایی و محصورشده در یک غلاف، بیشتر سلول‌ها مشابه، کم‌وبیش دارای شکل کروی یکنواخت
Chroococcidiopsis	۲۸	گرم	دست‌نخورده	مشاهدهٔ سلول‌ها معمولاً به‌شکل دو، سه یا چهارتایی و محصورشده در یک غلاف، بیشتر سلول‌ها مشابه، کم‌وبیش دارای شکل کروی یکنواخت
Nodularia	۲۹	گرم	دست‌نخورده	تریکوم‌ها مستقیم، سلول‌ها بیضوی، کروی یا سیلندری‌شکل، مشاهدهٔ هتروسیست

.نتایج بررسی کمّی و کیفی DNA استخراج‌شده از سیانوباکتری‌ها: برای بررسی کمیت و کیفیت DNA استخراج‌شده از دستگاه نانودراپ استفاده شد و نتایج در جدول ۴ ارائه شدند.

جدول ۴- نتایج بررسی کمّی و کیفی DNA استخراج‌شده از سیانوباکتری‌ها

شمارهٔ نمونه	غلظت (نانوگرم‌برمیکرولیتر)	A260	A280	A260/280	A260/230
۲۶	۸۳۰	۲۳/۹۰	۱۳/۹	۱/۷۱	۰/۶
۲۹	۲۱۷/۸	۴/۳۵۶	۲/۱۳۴	۲/۰۴	۱/۳۴
۲۳	۳۰۶/۹	۶/۱۶۸	۲/۹۹	۲/۰۷	۱/۷۰
۲۸	۲۲۵/۹	۴/۵۱۸	۲/۲۹۰	۱/۹۷	۱/۰۵
۲۱	۳۰۷/۴	۶/۱۴۸	۳/۴۱۶	۱/۸۰	۰/۹۸
۲۲	۲۲۹/۳	۴/۵۸۵	۲/۵۵۶	۱/۷۹	۰/۸۰

نتایج مربوط به PCR: تصاویر ژل‌های ارائه‌شده در شکل ۲ طول توالی تکثیرشده توسط پرایمر آغازگر رو به جلو CYA359F و پرایمر معکوس CYA781R را نشان می‌دهند.



شکل ۲- الف. باندها محصولات PCR ژن *16S rRNA* سیانوباکتریایی را نشان می‌دهند که حدود ۴۳۰ جفت‌باز طول دارند و از راست به چپ به‌ترتیب عبارتند از: ۱. محصول PCR سیانوباکتریایی با غلظت‌های مختلف، ۲. نشانگر، ۳. شاهد مثبت، ۴. شاهد منفی. ب. تصویر شاخص وزن مولکولی استفاده‌شده

نتایج تعیین توالی DNA: نتایج تعیین توالی محصولات PCR پس‌از دریافت با نرم‌افزار BioEdit بررسی و بخش‌های نامنظم توالی به کمک کروماتوگرام حذف شدند؛ به‌این‌ترتیب، ویرایش توالی‌ها انجام شد. توالی‌ها از طریق سامانهٔ GenBank[1] و بانک اطلاعاتی NCBI مقایسه و هم‌تراز شدند (۱۷). از میان ۱۰۰ توالی مقایسه‌شده برای هر نمونه، توالی‌های ابتدایی بر اساس اولویت تشابه با نمونهٔ موجود مقایسه شدند. جدول ۵ نتایج شناسایی تعدادی از جدایه‌ها را باتوجه‌به نتایج مولکولی نشان می‌دهد.

جدول ۵- نتایج مولکولی برخی از جدایه‌های سیانوباکتری

کد سایت	پرایمر (F)	آغازگر (R)	ریخت‌شناسی	بهترین همخوانی بلاست	درصد هم‌پوشانی	درصد سایت مشابه	پیوست
۲۹	Cya359	CYA781 R(a), (b)	Cyanobacteria	*Nodularia*.sp	۱۰۰	۹۹	JQ927348
۲۶	Cya359	CYA781 R(a), (b)	Cyanobacteria	*Chroococcidiopsis* sp.	۹۹	۹۹	MF467540.1
۲۸	Cya359	CYA781 R(a), (b)	Cyanobacteria	*Chroococcidiopsis* sp.	۹۹	۹۹	MF467540.1
۲۱	Cya359	CYA781 R(a), (b)	Cyanobacteria	*Leptolyngbya*.sp	۱۰۰	۹۸	Q51767
۲۳	Cya359	CYA781 R(a), (b)	Cyanobacteria	*Synechococcus* sp.	۹۴	۹۹	AY274622

بحث و نتیجه‌گیری

پارک‌های ملی اهمیت بسیاری در حفظ ذخایر طبیعی حیات وحش، حفظ خاک و گیاهان، تنوع زیستی و حفاظت از تغییرات ژنتیکی دارند؛ در این حفاظت، مجموعهٔ پیچیده‌ای از فرایندهای بوم‌شناختی و ژنتیکی به‌طور دائم سبب تکامل جمعیت‌های سازگار با مناطق یادشده می‌شوند که نقش بسزایی در این اکوسیستم‌ها دارند. در بررسی حاضر همان‌گونه که انتظار می‌رفت تعداد سیانوباکتری کمتری از خاک‌های بیابانی در مقایسه با اکوسیستم‌های آبی جدا شد که ناشی از وضعیت خاص آب‌وهوای منطقه است. جنس‌های جداشده از خاک پارک خبر کرمان در فصل پاییز در منطقهٔ استپی گرم *Leptolyngbya*، *Synechococcus*، *Chroococcidiopsis* و *Nodularia* بودند. تنوع و تعداد سیانوباکتری‌های موجود در مناطق بیابانی به عوامل مختلفی مانند شرایط اقلیمی، میزان رطوبت، مقدار تابش نور جذب‌شده بر سطح، دمای منطقه، جنس مواد تشکیل‌دهندهٔ خاک بیابان مطالعه‌شده، میزان پذیرش سطحی مواد تشکیل‌دهندهٔ منطقه بستگی دارد. مطالعهٔ جوامع میکروبی و شناسایی ریزموجودات زیستگاه‌های مناطق بیابانی سرد و گرم باتوجه‌به محدودیت‌های رشد در آن مناطق بسیار مهم است (۱۸). پژوهشگران پی برده‌اند اغلب جنس *Chroococcidiopsis* در شرایط خشک و در زیستگاه میکروبی شور به‌شکل اندولیتیکی زندگی می‌کند. جعفری و همکاران برخی ویژگی‌های پوسته‌های خاکی و خاک‌های غیرپوسته‌ای را در منطقهٔ آلاگل در شمال استان گلستان مقایسه و گزارش کرده‌اند پوسته‌های زیستی نقش مهمی در حفاظت و شیمی خاک دارند (۱۹). همچنین سیانوباکتری *Chroococcidiopsis* sp. ازجمله سیانوباکتری‌های غالب بیابان‌هایی مانند دره‌های خشک در قطب جنوب، کویر آتاکاما در شیلی و کویر موجیو در کالیفرنیا گزارش شده است (۲۰). تأثیر تثبیت نیتروژن سیانوباکتریایی بر بازده حذف نیتروژن شناخته شده است (۲۱). این سیانوباکتری‌ها نسبت به خشک‌شدن، پرتوهای یونیزه‌کننده و تابش اشعهٔ ماورابنفش فوق‌العاده مقاوم هستند. در پژوهش حاضر، ۴۲/۸ درصد جدایه‌های سیانوباکتریایی به جنس *Chroococcidiopsis* تعلق داشتند. نتایج نشان می‌دهند منطقهٔ گرم دست‌نخورده در فصل پاییز بیشترین تعداد جدایه‌های سیانوباکتریایی را دارد و دمای کم فصل پاییز و سایر تنش‌ها دلیل جدانشدن سیانوباکتری‌ها از مناطق سرد دست‌نخورده هستند؛ برای نمونه آب منجمد ازنظر زیستی برای موجودات زنده در دسترس نیست. مطالعه‌های چندانی دربارهٔ دست‌خوردگی خاک مناطق بیابانی انجام نشده است (۲۲). پژوهش‌های انجام‌شده دربارهٔ خاک دست‌خوردهٔ مناطق جنگلی نشان می‌دهند دست‌خوردگی بافت خاک و پوشش گیاهی ممکن است به کاهش جمعیت میکروبی منجر شود. پژوهشگران نشان داده‌اند تنوع جمعیت گیاهی خاک با تغییر ترکیب جمعیت میکروبی تغییر می‌کند و تغییر جمعیت گیاهی ممکن است در اثر چرای دام نیز رخ دهد (۲۳)؛ علاوه‌براین، پژوهشگران نشان داده‌اند دما و رطوبت بر رشد جمعیت‌های میکروبی خاک تأثیر می‌گذارند و از عوامل غیرزندهٔ کنترل‌کنندهٔ تنفس خاک‌های بیابانی هستند (۲۴). همان‌طور که گزارش شده است درصد کمی از ریزموجودات اکوسیستم‌های خاکی کشت‌پذیر هستند و تعداد کم جدایه‌های حاصل از نمونه‌های خاک

تأییدی بر این ادعاست. برخی ریزموجودات توانایی رشد روی محیط‌های کشت مصنوعی را ندارند و متأسفانه همیشه تعدادی از جدایه‌ها طی فرایند کشت از دست می‌روند. از سوی دیگر، گاهی روش‌های کلاسیک امکان شناسایی سیانوباکتری‌ها را به‌خوبی امکان‌پذیر نمی‌کنند و بنابراین شناسایی برخی گونه‌ها به روش مولکولی انجام می‌شود. حیدری و همکاران جدایه‌های سیانوباکتری‌های چهار منطقهٔ گرم ایران را با تعیین توالی ژنوم ناحیهٔ *16S rRNA* به کمک روش PCR شناسایی کردند و نتایج شناسایی مولکولی آنها بر روش‌های کلاسیک ریخت‌شناختی منطبق بود و تعیین توالی ژنومی اطلاعات لازم برای جداسازی تاکسون‌های مطالعه‌شده بر اساس روش‌های ریخت‌شناسی را تأیید کرد (۲۵ و ۲۶). اساس تجزیه‌وتحلیل فیلوژنتیکی با استفاده از تعیین توالی ژن *16S rRNA* بر مشاهده‌های مورفولوژیکی مبتنی است (۲۷). در مطالعه‌ای دیگر مشخص شده است ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی خاک مانند هدایت الکتریکی، بافت و اسیدیته بر تنوع و فراوانی سیانوباکتری‌های خاک بیابان سرد لاداک در هند مؤثر هستند. همچنین پژوهشگران نشان داده‌اند سیانوباکتری‌های رشته‌ای به‌ویژه جنس‌های *Phormidium* و *Leptolyngbya* از بیشتر خاک زمین‌های شمال ویکتوریا جدا شده‌اند (۲۸ و ۲۹). در پژوهش حاضر نتیجه گرفته شد در بافت لوم- شنی خاک بیابان بیشتر جنس *Chroococcidiopsis* و به‌ندرت انواع رشته‌ای سیانوباکتری یافت می‌شوند؛ بنابراین، اغلب سیانوباکتری‌های جداشده از مناطق بیابانی به‌علت شرایط الیگوتروفی به‌شکل کروی با پوشش غشای ضخیم هستند تا با افزایش نسبت سطح به حجم باکتری‌ها، سطح تماس آنها با مواد آلی و معدنی محیط افزایش یابد. سیانوباکتری‌ها برای غلبه‌کردن بر محیط‌های الیگوتروف از راهکارهای متنوع فیزیولوژیکی، ریخت‌شناختی و اکولوژیکی برای دستیابی به ظرفیت بهینهٔ تثبیت نیتروژن، فتوسنتز، تجزیه و جداسازی عناصر غذایی مانند فسفر و آهن بهره می‌برند. حضور این ریزموجودات در محیط‌های سخت خشک و نیمه‌خشک سازگاری درخور توجه اکوفیزیولوژیکی و توانایی زیاد تطابق با عوامل محیطی تغییریافتهٔ اکوسیستم‌های بیابانی را نشان می‌دهد. از خاک منطقهٔ استپی گرم و سرد پارک حفاظت‌شدهٔ خبر که در فصل پاییز نمونه‌گیری شده بود تعدادی سیانوباکتری جدا شد که عبارتند از جنس‌های: *Chroococcidiopsis*، *Leptolyngbya*، *Synechococcus* و *Nodularia* و باتوجه‌به اینکه نمونه‌برداری از مناطق مختلف گرم و سرد انجام شد، سیانوباکتری‌ای از مناطق سرد دست‌خورده و دست‌نخورده جدا نشد. جنس *Chroococcidiopsis* از سه محل منطقهٔ گرم جدا شد.

پژوهش حاضر نشان داد تنوع و تعداد سیانوباکتری‌های موجود در مناطق بیابانی در منطقهٔ گرم و دست‌نخورده بیشتر از منطقهٔ گرم و دست‌خورده است و شرایط آب‌وهوایی، میزان رطوبت، مقدار تابش نور جذب‌شده بر سطح، دمای حضور مواد مغذی مختلف، مواد آلی، کربن آلی، نیتروژن، فسفر و پتاسیم و تغییرات جزیی اسیدیته در این امر دخیل هستند. نتایج مولکولی پژوهش حاضر نتایج شناسایی ریخت‌شناختی را تأیید کردند و باتوجه‌به نقش این دسته موجودات پیشنهاد می‌شود از آنها در تغییر و اصلاح بافت خاک و ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی آن استفاده شود.

سپاسگزاری

نویسندگان مقالهٔ حاضر از کارشناس محترم آزمایشگاه‌های میکروبیولوژی دکتر سپهر، سرکار خانم مریم یوسفی و خانم مریم تیموری دانشجوی دکتری میکروبیولوژی که زحمت نمونه‌برداری از خاک‌های منطقه خبر کرمان را بر عهده داشتند تشکر می‌کنند. پژوهش حاضر با حمایت معاونت محترم پژوهشی دانشگاه و پژوهانهٔ کد D96/3/125 در آزمایشگاه ملی میکروبیولوژی انجام شد.

References

(1) Bahrami M. Desert and desertification in Iran. *Geophysical Research Abstracts* 2009; 11: 1745.

(2) Polis GA. Complex trophic interactions in deserts: an empirical critique of food-web theory. *The American Naturalist journal* 1991; 123-155.

(3) Belnap J., Lange OL. Biological soil crusts: structure, function and management. *Ecological Studies* 2003; 471-479.

(4) Belknap J. The potential roles of biological soil crusts in dry land hydrologic cycles. *Hydrological processes* 2006; 20(15): 3159-3178.

(5) Alexander RW., Calvo A. The influence of lichens on slope processes in some Spanish badlands. *Geomorphology* 1990; 385-398.

(6) Sethi SK., Samad LK., Adhikary SP. Cyanobacteria and micro-algae in biological crusts on soil and sub-aerial habitats of eastern and north eastern region of India. *Journal of the Phycological Society* 2012; 42(1): 1-9.

(7) Koijam L., Devi SD., Singh OA., Tiwari ON., Singh MR. Modern characteristic features of cyanobacteria with special emphasis on reproduction and thallus structure. *The Journal of Plant Reproductive Biology* 2009; 1(1): 53-57.

(8) Luuc RM., Olav M., Skulberg O., and Hans U. Toxic Cyanobacteria in Water: A guide to their public health consequences, monitoring and management In: Ingrid C., Jamie B. editors. Cyanobacteria in the Environment. London and New York: Spon E and FN; 1999.

(9) Ortega Calvo JJ., Hernandez Marine M., Saiz Jimenez C. Biodeterioration of building materials by cyanobacteria and algae. *International Biodeterioration* 1991; 28(2): 165-185.

(10) Andersen RA. *Algal culturing techniques*. 1st ed. Amsterdam: Elsevier; 2005.

(11) Bellinger EG., Sigee DC. *Freshwater Algae Identification and Use as Bioindicators*. 1st ed. New York: John Wiley and Sons, Inc.; 2010.

(12) Wehr JD., Armonk YF. *Freshwater Algae of North America: Ecology and Classification*. 2nd ed. Academic Press: Cambridge, Massachusetts; 2015.

(13) Prescott GW. *Algae of the western great lakes area*. Dubuque and Iowa: Wm. C. Brown Company Publishers; 1970.

(14) Chand T., Pankaj D., Arora K. Evaluation of potential of molecular and physical techniques in studying biodeterioration. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology* 2012; 11: 71-104.

(15) Karen L., Vidalia HA. Surface analysis and materials characterization for the study of biodeterioration and weathering effects on cultural property. *International Biodeterioration and Biodegradation* 2009; 63(7): 813-822.

(16) Nubel U., Garcia-pichel F., Muyzer G. PCR Primers to Amplify *16S rRNA* Genes from Cyanobacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 2009; 63: 3327-3332.

(17) Zhang Z., Schwartz S., Wagner L., Miller W. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *Journal of Computational Biology* 2000; 7(1-2): 203-214.

(18) Wierzchos J., Ascaso C., McKay CP. Endolithic Cyanobacteria in halite rocks from the hyperarid core of the Atacama Desert. *Astrobiology Journal* 2006; 6: 1-8.

(19) Jafari MA., Tavili N., Zargham Gh.A., Heshmati M.A., Zare hahouki S., Shirzadian H. et al. Comparing some properties of crusted and uncrusted soils in alagol region of Iran. *Pakistan Journal Nutr*ition 2004; 3: 273-277.

(20) Daniela B., Mickael B., Heather DS., Christopher PM. Cyanobacteria from extreme deserts to space. *Advances in Microbiology* 2013; 3: 80-86.

(21) Xiaodong Z., Xin J., Liang Y., Jinzhi W., Xiaoming K., Lijuan C. Cyanobacterial nitrogen fixation influences the nitrogen removal efficiency in a constructed wetland. *Water Journal* 2017; 9: 865.

(22) Devi HR., Dkhar MS. Comparative study on soil fungal diversity of mawphlang sacred grove and disturbed forest north East India. *Indian Journal of Scientific Research and Technology* 2014; 2(5): 64-72.

(23) Carney KM., Matson PA. The influence of tropical plant diversity and composition on soil microbial communities. *Microbial Ecology* 2006; 52(2): 226-238.

(24) Nonzom S., Sumbali G. Fate of mitosporic soil fungi in cold deserts. *American International Journal of Research in Formal, Applied & Natural Sciences* 2015; 2328-3777.

(25) Heidari F., Riahi H., Yousefzadi M., Shariatmadari Z. Morphological and phylogenetic diversity of cyanobacteria in four hot springs of Iran. *The Iranian Journal of Botany* 2013; 19(2): 162-172.

(26) Rehakova K., Johansen J., Casamatta D., Xuesong L., Vincent J. Morphological and molecular characterization of selected desert soil cyanobacteria : three species new to science including Mojavia pulchra gen .et sp. Nov. *Phycologia* 2007; 46(5): 481-502.

(27) 27- Xuan H., Shinpei S., Shoichiro S. Unexpected high diversity of terrestrial Cyanobacteria from the campus of the university of the Ryukyus, Okinawa, Japan. *Microorganisms journal* 2017; 5: 69.

(28) Oinam G., Singh KO., Tiwari ON. An account of morphological and biochemical characterization of some heterocystous cyanobacteria (nostocalean) of NE region of India falling under Indo-Burma biodiversity hotspots. *Biosience Biotechnology Research Communication* 2010; 3(1): 26-32.

(29) Li Z., Brand J. Leptolyngbya nodulosa. sp. nov. (Oscillatoriaceae), a subtropical marine cyanobacterium that produces a unique multicellular structure. *Phycologia Journal* 2007; 46(4): 396-401.

[1]- http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi