



ارزیابی شاخص های غنای گونه ای باکتری ها در خاک منطقه سرچشمه

مهدی صادقی پور مروی^۱، احمد علی پوربابایی^۲، حسینعلی علیخانی^۲، احمد حیدری^۲، زهرا منافی^۳
^۱مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان تهران، ^۲گروه علوم و مهندسی خاک، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، ^۳شرکت ملی صنایع مس ایران، مجتمع مس سرچشمه

چکیده

با توجه به فراوانی ترکیبات گوگردی در محدوده منطقه مس سرچشمه در استان کرمان، این پژوهش به ارزیابی شاخص های غنای گونه ای باکتری ها در خاک این منطقه پرداخته است. استخراج DNA و PCR از نمونه های خاک به روش مرسوم انجام گردید. توالی های شناسایی شده با بانک ژن NCBI مورد مقایسه قرار گرفتند و BLASTn انجام و شاخص های غنای گونه ای با استفاده از نرم افزار PAST محاسبه شد. نتایج نشان داد شاخص های تاکسا و انحصاری، همبستگی معنی دار زیادی با هم نشان دادند و در دیگر دسته، شاخص های مارگالف و منهینیک نیز با همدیگر همبستگی معنی دار زیادی داشتند، اما شاخص شائو-۱ همبستگی کمتری با دیگر شاخص ها نشان داد. مقایسه مقادیر شاخص های غنای گونه ای نشان داد *Pseudomonas* sp. و *Bacillus* sp. بیشترین و *Streptomyces* sp. کمترین غنای گونه ای را داشتند.

واژه های کلیدی: تنوع زیستی، خاک، غنای گونه ای

مقدمه

گوگرد از عناصر مهم در چرخه حیات محسوب می شود و اکسایش و احیاء آن در تامین انرژی مورد نیاز برخی جانداران، نقش دارد. از کاربردهای باکتری های اکسیدکننده گوگرد در صنایع مختلف می توان به صنعت نفت، تصفیه خانه های فاضلاب شهری و کشاورزی (به عنوان کود زیستی) اشاره کرد.

تنوع زیستی نه تنها گوناگونی حیات را در بردارد بلکه ساختار اجتماعی - سیاسی^۱ و اکولوژیکی را نیز در بردارد. در تعریف جدید، تنوع زیستی بصورت سلسله مراتبی بر پایه تمایز میان سطوح ترکیب، ساختار و عملکرد مورد استفاده در مقیاس های مختلف، تعریف شده است. در سطح اول، ترکیب تنوع زیستی، مشخصاتی از قبیل تولید زیست توده^۲، فراوانی گونه ها، حضور گونه های در معرض تهدید انقراض یا تناسب زیستگاه را در بر دارد. در سطح دوم، ساختار تنوع زیستی، سازماندهی مولفه های تنوع زیستی و ارتباط میان آنها می باشد. این مولفه ها، اطلاعات ساختاری در مورد جمعیت (جنس، تراکم و غیره) و اراضی (اتصال، جدایی و اندازه زمین و غیره) می باشند. در سومین سطح، عملکرد تنوع زیستی، مجموعه ای از فرآیندهای اکولوژیکی خاص از قبیل فرآیندهای آمارگیری یا دینامیک جمعیت و ژنتیک جمعیت می باشد. گروه های عملکردی، روش عملیاتی دیگری است که تنوع زیستی را به فرآیندهای اکوسیستم پیوند می دهد. هر گروه عملکردی به یک فرآیند اکوسیستم (از قبیل تجزیه ماده آلی و معدنی شدن نیتروژن) مرتبط است (Clergue et al., 2005).

تنوع زیستی، شاخص مهمی برای تعیین کیفیت خاک زراعی محسوب می شود (Shi et al., 2011) و در واقع، تنوع زیستی میکروارگانیسم ها، منعکس کننده تنوع زیستگاه، ژنتیک و فیزیولوژی آنهاست (Rawlings and Johnson, 2002).

با توجه به اهمیت تنوع زیستی در خاک و همچنین اهمیت شاخص غنای گونه ای در ارزیابی تنوع زیستی در جمعیت میکروبی خاک، هدف این پژوهش، ارزیابی تنوع زیستی باکتری های اکسید کننده گوگردی در خاک منطقه مس سرچشمه (استان کرمان) با استفاده از شاخص های غنای گونه ای است تا به درک بهتری از تنوع زیستی در خاک منطقه مورد مطالعه منجر گردد.

¹Socio-political

²Biomass



مواد و روش‌ها

در این پژوهش، نمونه برداری در منطقه مس سرچشمه واقع در استان کرمان انجام شد. سپس نمونه‌ها برای انجام آنالیزهای مولکولی به آزمایشگاه بیوتکنولوژی گروه علوم و مهندسی خاک پردیس کشاورزی دانشگاه تهران منتقل شدند. استخراج DNA با استفاده از کیت (Bio 101 FP-120 FastPrep cell disruptor, KiaGenCompany) انجام شد. تکثیر ژن 16S rRNA بوسیله PCR مرسوم (Paisséet al., 2008) انجام گردید. آغازگر مورد استفاده 27f و 1492r (Kay et al., 2013) (و همچنین 357f و 717r (Auld, 2014)) - مختص اکسید کننده های گوگرد- بود. نمونه‌ها برای توالی‌یابی به شرکت ماکروژن کره جنوبی ارسال گردید. شناسایی سویه‌ها با استفاده از BLASTn در سایت NCBI انجام شد. محاسبه شاخص‌های تنوع زیستی باکتری‌ها به ویژه باکتری‌های اکسید کننده گوگرد با استفاده از نرم افزار PAST انجام شد. از نرم افزارهای مختلفی از قبیل (Diver (Ganis, 1992), Diver (Tóthmérész, 1993) و PAST (Rodrigues et al., 2014) برای آنالیز شاخص‌های تنوع زیستی استفاده می‌شود. در این پژوهش، با استفاده از نرم افزار PAST شاخص‌های غنای گونه‌ای محاسبه شدند. شاخص غنای گونه‌ای^۳، تعداد کل گونه‌های موجود در جمعیت را تخمین می‌زند (Hughes et al., 2001). (این شاخص، نشان‌دهنده حضور انواع گونه‌های مختلف در یک محیط است و در واقع، تعداد گونه‌های موجود در محیط را مشخص می‌کند (Kent and Coker, 1992). غنای گونه‌ای^۴ با استفاده از شاخص‌های مارگالف^۴ (Hill et al., 2003)، منهینیک^۵، شائو^۶ (Hill et al., 2003) و تاکسا^۷ و انحصاری^۸ محاسبه گردید. فرمول محاسباتی این شاخص‌ها در زیر ارائه شده است (Harper, 1999):

$$Taxa = S \quad (1)$$

$$individuals = n \quad (2)$$

$$Menhinick's\ richness\ index = \frac{S}{\sqrt{n}} \quad (3)$$

$$Margalef's\ richness\ index = \frac{(S-1)}{\ln(n)} \quad (4)$$

$$Chao1 = S + \frac{F_1(F_1-1)}{2(F_2+1)} \quad (5)$$

در این معادله، S تعداد Taxa، n تعداد کل افراد، F₁ تعداد گونه‌های singleton و F₂ تعداد گونه‌های doubleton می‌باشند. آزمون T برای مقایسه میانگین‌ها استفاده گردید. سپس، برای بررسی همبستگی میان مقادیر شاخص‌های تنوع زیستی، از آزمون آماری همبستگی پیرسون استفاده شد (Waite, 2000). تمامی محاسبات آماری با استفاده از نرم‌افزار SAS 8.1 انجام شد.

نتایج و بحث

جدول ۱ شاخص‌های غنای گونه‌ای را در سویه‌های شناسایی شده نشان می‌دهد. مطابق جدول ۱، مقایسه مقادیر شاخص‌های غنای گونه‌ای در میان باکتری‌های شناسایی شده نشان داد *Pseudomonas sp.* و *Bacillus sp.* بیشترین و *Streptomyces sp.* کمترین غنای گونه‌ای را داشتند. یعنی این سه باکتری به ترتیب کمترین و بیشترین تعداد گونه باکتری را در میان باکتری‌های شناسایی شده را داشتند.

³Species richness

⁴Margalef

⁵Menhinick

⁶Chao-1

⁷Taxa

⁸Individual

جدول ۱- مقادیر شاخص های غنای گونه ای در باکتری های شناسایی شده در این پژوهش

شاخص های غنای گونه ای					باکتری
منهینیک	مارگالف	شائو-۱	انحصاری	تاکسا	
۵	۷/۴۶	۳۲۵	۲۵	۲۵	<i>Pseudomonas syringae</i> 1.20
۴	۵/۴۱	۱۳۶	۱۶	۱۶	<i>Pseudomonas</i> sp.1.18
۴/۱۲	۵/۶۵	۱۵۳	۱۷	۱۷	<i>Bacillus subtilis</i> 2.10
۳/۳۲	۴/۱۷	۶۶	۱۱	۱۱	<i>Acidithiobacillus ferridurans</i> 1.6
۳	۳/۶۴	۴۵	۹	۹	<i>Acinetobacter johnsonii</i> 2.7
۳	۳/۶۴	۴۵	۹	۹	<i>Sphingobium myanoikuyae</i> 1.23
۲/۸۳	۳/۳۷	۳۶	۸	۸	<i>Propionibacterium</i> sp.2.2
۲/۸۳	۳/۳۷	۳۶	۸	۸	<i>At. ferrooxidans</i> 1.1
۲/۸۳	۳/۳۷	۳۶	۸	۸	<i>At. ferridurans</i> 184
۲/۸۳	۳/۳۷	۳۶	۸	۸	<i>At. caldus</i> 1.11
۲/۴۵	۲/۷۹	۲۱	۶	۶	<i>Halospirulina</i> sp. 1.13
۲/۲۴	۲/۴۹	۱۵	۵	۵	<i>Starkeya novella</i> 129, 1.3
۲/۲۴	۲/۴۹	۱۵	۵	۵	<i>Bacillus megaterium</i> 1.16
۱/۷۳	۱/۸۲	۶	۳	۳	<i>Solfubacillus acidophilus</i> 155
۱/۴۱	۱/۴۴	۳	۲	۲	<i>Sphingomonas</i> sp.3.14
۱/۴۱	۱/۴۴	۳	۲	۲	<i>At. thiooxidans</i> 148
۱/۴۱	۱/۴۴	۳	۲	۲	<i>Thiobacillus thiophilus</i> 158
۱/۴۱	۱/۴۴	۳	۲	۲	<i>T. thioparus</i> 190
۱/۴۱	۱/۴۴	۳	۲	۲	<i>T. aquaesulis</i> 156, 192
۱	۰	۱	۱	۱	<i>Streptomyces</i> sp.2.3

ضرایب همبستگی پیرسون میان شاخص های غنای گونه ای:

جدول ۲ ضرایب همبستگی پیرسون میان شاخص های غنای گونه ای در باکتری های شناسایی شده را نشان می دهد.

جدول ۲- ضرایب همبستگی پیرسون میان شاخص های غنای گونه ای

شاخص های غنای گونه ای						
	تاکسا	انحصاری	شائو-۱	مارگالف	منهینیک	
تاکسا	۱	۱ **	۰/۹۰۰۵ **	۰/۹۸۲۴ **	۰/۹۷۷۱ **	
انحصاری		۱	۰/۹۰۰۵ **	۰/۹۸۲۴ **	۰/۹۷۷۱ **	
شائو-۱			۱	۰/۶۶۸۳ **	۰/۲۰۸۰ **	
مارگالف				۱	۰/۹۹۲۲ **	
منهینیک					۱	

*, ** و ns به ترتیب، اختلاف معنی دار در سطح آماری ۱ و ۵٪ و عدم اختلاف معنی دار می باشد.

بر اساس جدول ۲، شاخص های غنای گونه ای مورد استفاده در این پژوهش، برای ارزیابی نوع زیستی در خاک، همبستگی معنی داری داشتند. مقایسه همبستگی میان شاخص های غنای گونه ای نشان داد شاخص های تاکسا و انحصاری



همبستگی زیادی نشان دادند و شاخص های مارگالف و منهینیک نیز با همدیگر همبستگی زیادی داشتند، اما شاخص شائو-۱ همبستگی کمتری با دیگر شاخص ها نشان داد.

نتیجه گیری

بر اساس نتایج این پژوهش، مشخص شد، شاخص های غنای گونه ای برای ارزیابی تنوع زیستی در خاک، همبستگی خوبی داشتند ولی شاخص شائو-۱ همبستگی کمتری با دیگر شاخص ها نشان داد. همچنین در میان باکتری های شناسایی شده، *Pseudomonas sp.* و *Bacillus sp.* بیشترین و *Streptomyces sp.* کمترین غنای گونه ای را داشتند.

منابع

- Auld R.R. 2014. Re-examining temporal and seasonal microbial acid mine: drainage community variation Laurentian university of Sudbury.96.
- Clergue B., Amiaud B., Pervanchon F., Lasserre-Joulin F., Plantureux S. 2005. Biodiversity: function and assessment in agricultural areas. A review. *Agronomy for sustainable development*. 25: 1-15.
- Ganis P. 1992. Diver: A program for diversity measures in ecology. University of Trieste. Distributed by scientia publishing, Budapest, Hungary.
- Kay C.M., Rowe O.F., Rocchetti L., Coupland K., Hallberg K.B., Johnson D.B. 2013. Evolution of microbial "streamer" growths in an acidic, metal-contaminated stream draining an abandoned underground copper mine. *Life*. 3: 189-210.
- Kent M., Coker P. 1992. Vegetation description and analysis. Baffins Lane. John Wiley and Sons. 363.
- Kondratyeva T.F., Muntyan L.N., Karavaiko G.I. 1995. Zinc-and arsenic-resistant strains of *Thiobacillus ferrooxidans* have increased copy numbers of chromosomal resistance genes. *Microbiology*. 141: 1157-1162.
- Hill T.C., Walsh K.A., Harris J.A., Moffett B.F. 2003. Using ecological diversity measures with bacterial communities. *FEMS microbiology ecology*. 43: 1-11.
- Hughes J.B., Hellmann J.J., Ricketts T.H., Bohannan B.J. 2001. Counting the uncountable: statistical approaches to estimating microbial diversity. *Applied and environmental microbiology*. 67: 4399-4406.
- Rawlings D.E., Johnson D.B. 2002. Ecology and biodiversity of extremely acidophilic Microorganisms'. Collection title: Extremophiles (Gerday, C., ed.) in encyclopedia of life support systems (EOLSS), developed under the auspices of the united nations educational, Scientific and cultural organization. 3: 1-7.
- Rodrigues V.D., Torres T.T., Ottoboni L.M. 2014. Bacterial diversity assessment in soil of an active Brazilian copper mine using high-throughput sequencing of 16S rDNA amplicons. *Antonie van Leeuwenhoek*. 106: 879-890.
- Shi J-Y., Lin H-R., Yuan X-F., Chen X-C., Shen C-F., Chen Y-X. 2011. Enhancement of copper availability and microbial community changes in rice rhizospheres affected by sulfur. *Molecules*. 16: 1409-1417.
- Tóthmérész B. 1993. NuCoSA 1.0: number cruncher for community studies and other ecological applications. *Abstract botanica*. 283-287.
- Waite S. 2000. Statistical ecology in practice: a guide to analysing environmental and ecological field data. Prentice Hall Harlow. New York. p.414.

Evaluation of Species Richness Indexes for Bacteria in Sarcheshmeh Area Soil

Abstract

In this study, for evaluation of species richness indexes for sulfur oxidizing bacteria, soil samples were gathered in Copper Sarcheshmeh area soil, Kerman, Iran. DNA extraction and PCR conventionally was done. So, after DNA sequencing, sequences compared to gen bank sequences in NCBI and BLASTn was done. Species richness indexes calculated based on PAST software. The results showed that species richness indexes had a significant correlation. Therefore Taxa and Individual indexes had high significant correlation together and on the other hand, Margalef, Menhinick indexes had high significant correlation together, too. But Chao-1 index had lower correlation to other indexes. Comparison of species richness index value showed that *Pseudomonas spp.* and *Bacillus spp.* had highest and *Streptomyces sp.* had lowest species richness indexes.

Keywords: Biodiversity, Soil, Species Richness