Journal of Microbial World
Volume 15, No. 4, March 2023

Original Article

The effect of altitude on the bacterial diversity and abundance of the soil samples of Kazem Khan Mountain of saline Lake Urmia

Fatemeh ghaffarnejad mogadam[1], Mahmoud Shavandi[2], Azam Haddadi[3], Mohammad Ali Amoozegar[4]

[1]Ph.D student, Department of Microbiology, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran. [2]Assisstant Professor, Department Ecology and Environmental Pollution Control Research Group, Research Institute of Petroleum Industry, Tehran, Iran. [3]Assisstant Professor, Department of Microbiology, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran. [4]Associate Professor, Department Department of Microbiology, College of Science, Pardis University of Tehran, Tehran, Iran.

Abstract

Background & Objectives: Considering the critical conditions of Lake Urmia, identifying bacteria with the ability to live in extreme environments is valuable in terms of microbial applications and tolerance of the existing biological conditions, and it helps us to better understand the surrounding environment. In this study, the most abundant microbial branch in the soil samples obtained from three different heights of 10, 150 and 250 meters of Qale Kazem Khan Mountain, which is located on the shore of a very salty lake in Urmia, has been investigated.

Materials & Methods: The soil samples were collected to identify and classify Proteobacteria subgroups using 16S rRNA sequencing using Next Generation Sequencing (NGS) as well as FLASH genetic software and UCHIME algorithm to identify the obtained sequences.

Results: Altitude change affects the abundance of Alphaproteobacteria and Betaproteobacteria. The abundance percentage of Alphaproteobacteria has a direct relationship with altitude, while the abundance percentage of Betaproteobacteria increased with the decrease in altitude.

Conclusion: in the overview the percentage of *Proteobacteria* abundance the samples has an inverse relationship with the increase in height, whereas in the separate examination of the microbial groups, a significant relationship between the increase and decrease in abundance and the height of sampling is observed. Also, two unknown and unclassified genera in the *Deltaproteobacteria* order were also identified which a very high frequency percentage (18-27%) among the data had related to the three samples.

Keywords: Altitude; Saline environment; Bacterial diversity; NGS.

Received: 1 September 2022 Revised: 6 November 2022 Accepted: 1 February 2023

Correspondence to: Mahmoud Shavandi
Tel: +98 2148255166
E-mail: shavandim@gmail.com
Journal of Microbial World 2023, 15(4): 271-281
DOI:10.30495/jmw.2022.1966410.2033

Copyright © 2019, This article is published in Journal of Microbial World as an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License. Non-commercial, unrestricted use, distribution, and reproduction of this article is permitted in any medium, provided the original work is properly cited.

مجله دنیای میکروب‌ها
سال پانزدهم شماره چهارم (پیاپی ۵۳) زمستان ۱۴۰۱
صفحات ۲۸۱-۲۷۱

Original Article

تاثیر ارتفاع بر روی تنوع و فروانی جمعیت باکتریایی نمونه‌های خاک کوه قلعه کاظم خان دریاچه ارومیه

فاطمه غفارنژاد مقدم[۱]، محمود شوندی[۲*]، اعظم حدادی[۳]، محمدعلی آموزگار[۴]

[۱]دانشجوی دکتری، گروه میکروبیولوژی، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران. [۲]استادیار، گروه میکروبیولوژی و بیوتکنولوژی، پژوهشگاه صنعت نفت، تهران، ایران.
[۳]استادیار، گروه میکروبیولوژی، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران. [۴]دانشیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم، دانشگاه تهران، تهران، ایران.

چکیده

سابقه و هدف: با توجه به شرایط بحرانی دریاچه ارومیه، شناسایی باکتری‌هایی که توانایی زیستن در محیط‌های افراطی را داشته باشند، به لحاظ کاربردهای میکروبی و تحمل‌پذیری شرایط زیستی موجود، جالب توجه بوده و به درک هر چه بهتر ما از محیط پیرامون کمک می‌نماید. در این مطالعه فراوان‌ترین شاخه باکتریایی موجود در نمونه‌های خاک از سه ارتفاع ۱۰، ۱۵۰ و ۲۵۰ متری کوه قلعه کاظم خان در ساحل دریاچه فوق‌شور ارومیه بررسی شده است.

مواد و روش‌ها: نمونه‌های خاک جمع‌آوری شده و برای شناسایی و طبقه‌بندی رده‌های زیرمجموعه Proteobacteria از توالی‌یابی S rRNA16 به روش توالی‌یابی نسل بعد (NGS) استفاده شد و با بکارگیری نرم‌افزار ژنتیکی FLASH و نیز الگوریتم UCHIME توالی‌های به‌دست آمده شناسایی شدند.

یافته‌ها: تغییر ارتفاع بر فراوانی و تنوع سویه‌های شناسایی شده در شاخه proteobacteria مشهود بود به شکلی که درصد فراوانی Alphaproteobacteria با ارتفاع رابطه مستقیم داشت و برعکس، درصد فراوانی Betaproteobacteria با کاهش ارتفاع افزایش یافت. این تغییر در تنوع سویه‌های مربوط به هر یک از رده‌ها نیز مشاهده می‌شود.

نتیجه‌گیری: در بررسی‌های اجمالی نمونه‌ها، درصد فراوانی Proteobacteria رابطه معکوسی با افزایش ارتفاع دارد ولی در بررسی مجزای رده‌های میکروبی، ارتباط معناداری بین افزایش و کاهش فراوانی و ارتفاع نمونه برداری، مشاهده می‌گردد. همچنین دو تیره ناشناخته و طبقه‌بندی نشده در رده Deltaproteobacteria نیز در نمونه‌ها شناسایی شدند که دارای درصد فراوانی بالایی (۱۸-۲۷ درصد) در بین داده‌های مربوط به سه نمونه بودند.

کلید واژه: ارتفاع جغرافیایی، محیط نمکی، تنوع باکتریایی، NGS.

دریافت مقاله: ۱۴۰۱/۶/۱۰ ویرایش مقاله: ۱۴۰۱/۸/۱۵ پذیرش مقاله: ۱۴۰۱/۱۱/۱۲

مقدمه

خاک در برگیرنده اجتماعی از میلیون‌ها جمعیت بسیار پیچیده و متنوع است. طبق داده‌های سال‌های اخیر، ۱ سانتی‌متر مکعب از خاک با بهره وری متوسط، شامل ۲۰ میلیارد میکروارگانیسم است. این مقدار تقریباً ۱٪ از وزن خاک را تشکیل می‌دهد. چنین جوامعی ثبات بالا و متمایزی دارند و به راحتی تحت تأثیر عوامل محیطی از بین نمی‌روند. خاک دارای برخی خصوصیات مشخص برای اجتماعات میکروبی است از جمله فشردگی و تراکم (در واحد سطح) سازگاری (توانایی استفاده از یک سوبسترای جدید)، سن و غیره (۱). خاک‌ها از نظر

*) آدرس برای مکاتبه: گروه میکروبیولوژی و بیوتکنولوژی، پژوهشگاه صنعت نفت، تهران، ایران.
تلفن: ۰۲۱۴۸۲۵۵۱۶۶ پست الکترونیک: shavandim@gmail.com

حقوق نویسندگان محفوظ است. این مقاله با دسترسی آزاد و تحت مجوز مالکیت خلاقانه (http://creativecommons.org/licenses/bync/4.0/) در فصلنامه دنیای میکروب‌ها منتشر شده است. هرگونه استفاده غیرتجاری فقط با استناد و ارجاع به اثر اصلی مجاز است.

ساختار بسیار ناهمگن (heterogeneous) هستند و به همین علت تعداد کل میکروارگانیسم‌ها و ترکیب برخی از گروه‌های سیستماتیک به ساختار خاک وابسته است. به‌عبارت دیگر ترکیب تنوع میکروبی خاک (Microbiota) به نوع آن خاک بستگی دارد (۲-٤). باکتری‌ها از جمله مهم‌ترین رده‌های میکروبی هستند که با ۳۲ شاخه متنوع در این گروه قرار می‌گیرند (۵). در طی یک دهه گذشته شاهد افزایش مطالعات انجام گرفته بر روی اکوسیستم‌های خاکی هستیم (٦). با توجه به چالش‌هایی که ما به دلیل بهره‌برداری بیش از حد از منابع کره زمین، تغییرات آب و هوایی، بیماری‌های همه گیر، افزایش تقاضا برای مواد غذایی، نیاز به انرژی‌های تجدید پذیر و منابع طبیعی (۷و۸). با آن مواجه هستیم، وجود اطلاعات کامل ژنومی درباره میکروب‌ها و تنوع آن‌ها در محیط‌های طبیعی می‌تواند به حل این مشکلات زیست محیطی کمک شایانی نماید.

تحقیق در مورد عملکرد تنوع زیستی هر اکوسیستم ذاتاً نیاز به بررسی رابطه بین جوامع گونه‌ای (Species communities) و فرآیندهای اکوسیستم دارد. تنوع بالا، تولید مثل سریع، سازگاری زیاد به دلیل بازآرایی ژنومی و توزیع فراگیر، از جمله عللی هستند که انجام مطالعات گسترده در رابطه با میکروارگانیسم‌ها را الزامی می‌کند. دهه‌های متمادی، نظریه توزیع میکروبی گونه‌ها از طریق مکان و زمان تحت سلطه فرضیه همه چیز همه جا هست، اما محیط انتخاب می‌کند (۹). بود که بر اساس آن، عدم محدودیت پراکندگی میکروارگانیسم‌ها توزیع جهانی آن‌ها را تضمین می‌کرد، اما در واقع این عوامل اکولوژیک هستند که فراوانی نسبی گونه‌های نهفته و شکوفا را تعیین می‌نمایند. با این حال، مطالعات زیادی وجود دارد که روابط بین گونه‌ها، جغرافیای زیستی و الگوهای متفاوت را در مقیاس‌های مختلف برای میکروب‌ها نشان می‌دهد (۱۰-۱۲) و اخیراً این بررسی‌ها، با استفاده از یک رویکرد مبتنی بر ژنوم صورت می‌گیرد (۸و۱۳).

یکی از مهمترین، متنوع‌ترین و فراوان‌ترین شاخه‌های میکروبی که اغلب در همه جا یافت می‌شوند، Proteobacteria هستند که اغلب بیش از ۳۹٪ از کل جوامع میکروبی را به خود اختصاص می‌دهد (۵). Proteobacteria از اعضای بسیار مهم در چرخه‌های مربوط به کربن و سولفور در خاک هستند و دارای شش زیر شاخه آلفا، بتا، گاما، دلتا، زتا و اپسیلون (١٤) می‌باشد. سودومونادوتا (Pseudomonadota) (مترادف پروتئوباکتریا) شاخه‌ای متشکل از باکتری‌های گرم منفی است. تغییر نام این شاخه میکروبی در سال ۲۰۲۱ در میان میکروبیولوژیست‌ها بحث برانگیز بوده و بسیاری از آن‌ها همچنان از نام قدیمی این شاخه، یعنی Proteobacteria استفاده می‌کنند. نکته‌ای که در مورد شاخه Pseudomonadota وجود دارد این است که در حداقل ۳۰ گونه از باکتری‌های طبقه‌بندی شده در کلاس‌های آلفا، بتا و گاما پدیده دگرگونی (Transformation)، گزارش شده است. دگرگونی فرآیندی است که در آن مواد ژنتیکی از یک باکتری به باکتری دیگر منتقل می‌شود (۱۵).

دریاچه ارومیه به علت دارا بودن شوری بالا و آب و هوای کوهستانی یکی از مناطق دارای ویژگی‌های خاص به شمار می‌آید و به همین علت مورد توجه محققان و پژوهشگران شاخه‌های مختلف علوم زیست شناسی قرار دارد. این دریاچه یکی از محیط‌های تالاسوهالین (Thalassohaline) بوده و به دلیل محتوای بالای نمک و املاح معدنی، برای زیست انواعی از موجودات از جمله بسیاری از باکتری‌ها، نامساعد است. محیط‌های تالاسوهالین محیط‌هایی با pH خنثی یا کمی قلیایی همراه با یون‌های سدیم و کلر هستند. در این تحقیق به بررسی تنوع میکروبی موجود در این اکوسیستم که دارای شرایط اکستریمی و منحصر به فردی می‌باشد، پرداخته شده است. کوه قلعه کاظم خان یکی از چندین کوه-تپه تقریبا مرتفع در نزدیکی ساحل دریاچه ارومیه بوده و ارتفاع آن از سطح دریا به ۳۰۰ متر می‌رسد.

مواد و روش‌ها

چندین جزیره و کوه-تپه تقریبا مرتفع در درون و یا در نزدیکی سواحل دریاچه ارومیه وجود دارد که کوه قلعه کاظم خان یکی از این بلندی‌های مرتفع با ارتفاع ۳۰۰ متر و مختصات

جغرافیایی N380322, E451159 می‌باشد. این کوه قلعه ساختاری صخره‌ای داشته و عمق خاک آن در بهترین شرایط به ۱۰ سانتی‌متر می‌رسد. با توجه به شرایط اقلیمی و ضخامت خاک منطقه مورد نظر، نمونه‌برداری به شرح زیر انجام گرفت:

الف) نمونه‌برداری: از آب دریاچه ارومیه به تعداد دو نمونه از هر یک از عمق های ۱۰ و ۲۰ سانتی‌متری و نیز دو نمونه از هر یک از سه ارتفاع مختلف ۱۰، ۱۵۰ و ۲۵۰ متری کوه قلعه کاظم خان در آذر ماه ۹۷ انجام گرفت. نمونه های خاک جمع‌آوری شده سطحی، تا عمق ۵ سانتی‌متری و مساحت ۲ متر مربعی، با توجه به امکان بهره‌برداری از خاک (به علت صخره‌ای بودن کوه قلعه) جمع‌آوری شدند. هر دو نوع نمونه پس از قرارگیری در ظروف استریل و ثبت مشخصات منطقه به آزمایشگاه رفرنس ژنتیک دانشگاه آزاد اسلامی ارومیه انتقال یافتند. بررسی‌های ابتدایی هر سه نمونه از نظر خواص فیزیکی، شیمیایی و برخی ترکیبات تشکیل دهنده خاک، صورت گرفت.

ب) استخراج DNA ژنومی: جداسازی ژنوم مربوط به میکروارگانیسم‌های احتمالی موجود درنمونه‌ها، با استفاده از کیت NucleoSpin (Macherey-Nagel, Germany) و انجام تمامی مراحل تعیین شده توسط شرکت تولید کننده، انجام شد. این کیت برای جداسازی DNA ژنومی با وزن مولکولی بالا مربوط به میکروارگانیسم‌های گرم منفی، گرم مثبت، آرکی‌ها، قارچ‌ها، و جلبک‌های موجود در خاک، لجن و نمونه‌های رسوبی طراحی شده است.

ترکیبات موجود در نمونه در بافر لیز کننده SL1 یا SL2 مخلوط شده، سپس محلول SX اضافه شد و ژنوم با استفاده از بیدهای سرامیکی بصورت مکانیکی، جداسازی شد. پروتین‌ها و مهارکنندگان PCR با استفاده از بافر لیز کننده SL3 ته‌نشین شده و متعاقبا در نتیجه سانتریوفوژ شدن، به همراه سایر ترکیبات غیر قابل حل، در انتهای بید ته‌نشین می‌گردند. مایع رویی دور ریخته شده و با عبور آن از ستون بردارنده مهار کننده‌های NucleoSpin تخلیص می‌شود. در مرحله بعدی اتصالات DNA از طریق اضافه نمودن بافر SB تثبیت شده و و ترکیبات حاصل از تجزیه سلولی در درون ستون NucleoSpin قرار می‌گیرد. بقایای زیرواحدهای هیومیک، بخصوص اسیدها و سایر مهارکنندگان PCR از طریق شستشوی موثر نمونه با بافر اتصالی SB و بافر شستشوی SW1/SW2، پس از یک مرحله خشک نمودن، انجام می‌گیرد، DNA قابل استفاده سپس می‌تواند در بافر شوینده SE (حاوی ۵ میلی‌لیتر تریس/ HCL، pH ۸/۵) آماده می‌شوند.

DNA کل میکروارگانیسم‌های موجود در نمونه‌ها با استفاده از روش CTAB/SDS استخراج شد. غلظت و خلوص DNA بر روی ژل‌های آگارز ۱٪ کنترل شد. در مرحله بعدی پس از بررسی کیفیت ژنوم جداسازی شده با استفاده از دستگاه نانودراپ، نمونه‌ها برای شناسایی تنوع میکروبی به شرکت Green Gene Korea ارسال شدند.

ج) توالی‌یابی: بخش‌های متمایز V3-V4 از ژن ۱۶S rRNA با استفاده از پرایمرهای اختصاصی 341-F و 806-R توالی‌یابی شدند. در تمامی واکنش‌ها از Phusion® High-Fidelity PCR Master Mix استفاده شد. نمونه‌هایی با نوار اصلی روشن بین ۴۵۰ –۴۰۰ جفت باز برای بررسی‌های بیشتر انتخاب شدند (۱۱و ۱۶).

د) تهیه کتابخانه ژنومی و توالی‌یابی: کتابخانه‌های تعیین‌توالی با استفاده از کیت NEBNext Ultra DNA Library برای Illumina تولید می‌گردند. همچنین کیفیت کتابخانه‌ها در سیستم Qubit @ 2.0 Fluorometer (Thermo Scientific) و Agilent Bioanalyzer 2100 ارزیابی شدند. در نهایت، کتابخانه بر روی پلت فرم توالی‌یابی ایلومینا (Illumina sequencing platform) تهیه شده و ۲۵۰ جفت، بصورت دوتایی بازخوانی شدند. سپس خوانش‌های مربوط به جفت‌های انتهایی نمونه با استفاده از توالی بارکد و پرایمر منحصر به فرد، اختصاصی شده و از طریق حذف بارکد و توالی پرایمری، کوتاه‌تر و مختصرتر شدند. خوانش‌های جفت‌های انتهایی با استفاده از FLASH ادغام شدند (۱۷). به داده‌های حاصل از این فرایند داده‌های خام می‌گویند. برای دستیابی به داده‌های پاک (CLEAR DATA) و با کیفیت بالا از داده‌های خام، فیلتراسیون، تحت شرایط خاص و بر اساس

فرایندهای کنترلی QIIME (Bokulich et al. 2013) انجام شد (۱۸). داده‌ها با پایگاه داده مرجع Gold database و با استفاده از الگوریتم UCHIME برای شناسایی توالی‌های واهی (chimeric) مورد بررسی قرار گرفتند (۱۹)؛ توالی‌های واهی از توالی‌های مورد نظر جدا شده (۲۰) و در نهایت توالی‌های تاثیر گذار (Effective Tags) به‌دست آمده‌اند.

ه) تفسیر خوشه‌های OUT(Operational Taxonomic Units) و گونه‌ها: آنالیز توالی‌ها با استفاده از نرم‌افزار UPARSE (Uparse v7.0.1001) (۲۱) انجام شد. توالی‌هایی که دارای بیش از ۹۷٪ مشابهت بودند در یک OTU قرار گرفتند. تفسیر گونه‌ای نیز برای هر توالی به‌دست آمده بر اساس پایگاه داده‌ای Green Gene (http://greengenes.lbl.gov/cgi-bin/nph-index.cgi) (۲۲) با استفاده از الگوریتم طبقه‌بندی RDP (Version 2.2,) (۲۳) برای تفسیر اطلاعات تاکسونومیکی، به‌کار گرفته شد.

و) ساختار روابط فیلوژنتیکی: برای مطالعه روابط فیلوژنتیک مربوط به هر OUT و بررسی تفاوت‌های گونه‌های غالب در هر یک از سه نمونه، هم‌ترازی توالی‌های متعدد با استفاده از نرم افزار MUSCLE (Multiple Sequence Alignment -Version 3.8.31) انجام شد. در مرحله بعد، ابتدا غالب‌ترین شاخه باکتریایی (Proteobacteria) شناسایی شده و سپس فیلوتایپ‌های مختلف آن از طریق بسط توالی ژن ۱۶ S rRNA مشخص شد. سپس انواع فیلوتایپ‌های غالب (OUTهایی با بیش از ۹۷٪ شباهت توالی در منطقه ژن ۱۶ SrRNA) که دارای فراوانی بیشتری بودند در انواع نمودارهای مربوط به رده، راسته و تیره طبقه‌بندی نموده و رابطه بین ارتفاع محل نمونه‌برداری و فراوانی دسته‌های مختلف و مقایسه آن‌ها با سایر پژوهش‌ها بررسی شد.

یافته‌ها

بررسی‌های ابتدایی نمونه‌ها از نظر خواص فیزیکی، شیمیایی و برخی ترکیبات تشکیل دهنده خاک، در همان ساعات اولیه صورت گرفت که در جدول ۱ آمده است.

جدول ۱: آنالیز شیمیایی و بیوشیمیایی نمونه‌ها.

نمونه / عوامل	KUL-10	KUL-150	KUL-250	آب دریاچه
Ec (Ds/m)	1/54	1/62	1/32	*201
pH	7/45	7/59	7/75	7/38
رطوبت (%)	23	21	20	-
TOC (%)	1/24	1/88	1/84	-
N (%)	0/13	0/2	0/19	-
Av. P (ppm)	10/90	24/80	17/29	-
Av. K (ppm)	338	534	431	-
HCO_3^- (meq/l)	3/2	31/4	2/9	40
Cl^- (meq/l)	7/2	8/1	7/8	5400
SO_4^{2-} (meq/l)	5/68	6/34	3/63	126
Ca^{2+}(meq/l)	11/2	11/6	8/4	60
Mg^{2+}(meq/l)	2/0	3/6	2/8	1190
Na^+ (meq/l)	3/08	2/84	3/33	4318

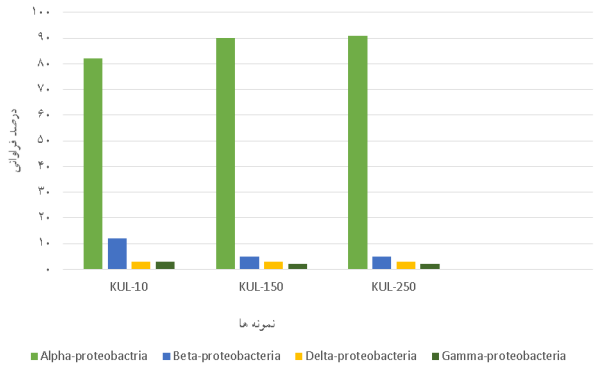
* ECبرای آب دریاچه بر اساس ms/cm محاسبه شده است.

مقدار هدایت الکتریکی (EC) با رفرکتومتر محاسبه شده و برای نمونه‌های KUL در مقایسه با EC محاسبه شده برای آب دریاچه (201 ms/cm) بسیار پایین بوده و در حد مقدار تعیین شده برای خاک‌های مناطق کشاورزی و حاصل‌خیز می‌باشد. همچنین مقدار pH محاسبه شده برای هر سه نمونه خاک و نمونه آب دریاچه بین ۷/۷۵–۷/۳۸ بود. درصد نیتروژن، کربنات و سولفات موجود در نمونه‌ها نیز برای بررسی فرایندهای زیستی و چرخه‌های مواد معدنی مورد سنجش و بررسی قرار گرفتند.

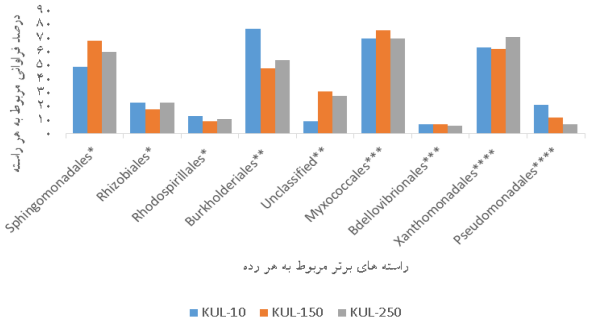
همانگونه که در شکل ۱ مشاهده می‌شود، نتایج حاصل از توالی‌یابی و آنالیزهای ژنتیکی نمونه‌ها نشان داد که فراوان‌ترین و غالب‌ترین شاخه باکتریایی موجود در بین نمونه‌ها شاخه Proteobacteria می‌باشد. این شاخه باکتریایی ۵۱٪ از کل ژنوم باکتریایی موجود در نمونه‌های KUL- ۱۰، ۴۹٪ از KUL- ۱۵۰ و ۴۱٪ از KUL- ۲۵۰ را تشکیل می‌دهد. در بررسی فراوانی رده‌های مربوط به Proteobacteria همانگونه که در شکل ۲ مشاهده می‌شود، در هر سه نمونه مذکور، رده Alphaproteobacteria فراوان‌ترین رده در بین سه رده دیگر بوده و بیشترین اعضای شناخته شده، در این رده قرار می‌گیرند. البته درصد فراوانی ژنوم مربوط به اعضای این رده در دو نمونه KUL- ۱۵۰ و KUL- ۲۵۰ در مقایسه با نمونه KUL- ۱۰ بیشتر و به ترتیب معادل ۹۱ و ۹۰ درصد می‌باشد. به‌عبارت دیگر با

افزایش ارتفاع، درصد ژنوم شناسایی شده مربوط به رده Alphaproteobacteria نیز افزایش می‌یابد. همچنین درصد فراوانی رده Betaproteobacteria در نمونه KUL- ۱۰ در مقایسه با دو نمونه دیگر بیشتر بوده و معادل ۱۲٪ از کل ژنوم شناسایی شده Proteobacteria در این نمونه می‌باشد. بر خلاف رده Alphaproteobacteria، این رده در ارتفاع پایین‌تر فراوان بوده و با افزایش ارتفاع از فراوانی آن کاسته می‌شود.

شکل ۱: فراوانی ۱۰ شاخه (phylum) برتر در سه نمونه.



شکل ۲: فراوانی رده‌های مختلف از *Proteobacteria*.



شکل ۳: بررسی راسته‌های برتر از هر رده *Proteobacteria*.، به جز رده آلفا از سایر رده‌ها دو راسته مورد بررسی قرار گرفته است؛ *: رده *Proteobacteria Alpha*، **: *Proteobacteria Beta*، ***: *Proteobacteria Gamma*، ****: *Proteobacteria Delta*.

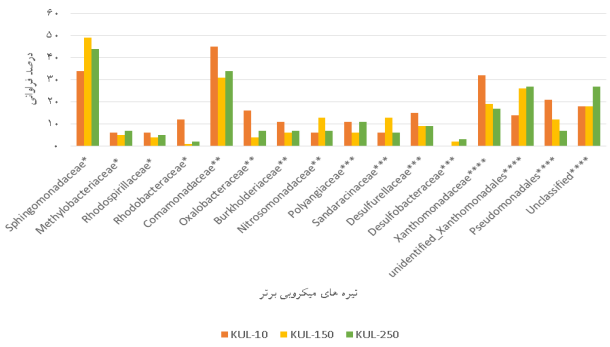
در نمودار شکل ٤ مشاهده می‌شود که تیره Rhodobacteraceae در نمونه KUL-۱۰، در مقایسه با دو نمونه دیگر، افزایشی ناگهانی و بسیار زیاد معادل ۱۲٪ دارد.

در شکل ۳، راسته‌های بسیار فراوان و مهم مربوط به هر رده از Proteobacteria نشان داده شده است. در این نمودار از رده Proteobacteria Alpha سه راسته Sphingomonadales, Rhizobiales و Rhodospirillales مورد توجه قرار گرفته‌اند. با توجه به ستون‌های شکل ۳، مشاهده می‌شود که Sphingomonadales با بالاترین درصد فراوانی در بین تمامی راسته‌های برتر انتخابی در تمام رده‌ها، رتبه اول فراوانی را به خود اختصاص داده است. درصد فراوانی این راسته در نمونه KUL- ۱۰ معادل ٤۹٪، در نمونه KUL-۱۵۰ معادل ٦۸٪ و در نمونه KUL-۲۵۰ معادل ٦۰ درصد از کل تنوع مربوط به Proteobacteria Alpha می‌باشد.

در ارتباط با رده Betaproteobacteria، راسته Burkholderiales و یک راسته ناشناخته و طبقه بندی نشده، دارای بیشترین فراوانی در هر سه نمونه بودند. همانگونه که در شکل ۳ مشاهده می‌شود، درصد فراوانی این دو راسته در نمونه‌های KUL-۱۰، KUL-۱۵۰ و KUL-۲۵۰ به ترتیب ۷۷، ٤۸ و ٥٤ درصد برای راسته Burkholderiales و ۹، ۳۱ و ۲۸ درصد برای راسته ناشناخته می‌باشد. از سوی دیگر شناسایی ژنومی راسته طبقه‌بندی نشده در این رده از Proteobacteria با این حد از فراوانی نشان دهنده وجود نوع خاصی از باکتری‌ها در رده Betaproteobacteria می‌باشد.

در رده Delthaproteobacteria دو راسته برتر و فراوان‌تر در بین سایرین Myxococcales و Bdellovibrionales می باشند درصد فراوانی Myxococcales در مقایسه با Bdellovibrionales در بین سه نمونه مورد بحث بسیار بالاتر بوده ودر نمونه‌های KUL- ۱۰، KUL- ۱۵۰ و KUL- ۲۵۰ به ترتیب دارای ۷۰، ۷٦ و ۷۰ درصد فراوانی می‌باشد. نکته جالب توجه در مورد این راسته افزایش ناگهانی فراوانی Myxococcales در ارتفاع ۱۵۰ متری نسبت به دو ارتفاع ۱۰ و ۲۵۰ متری می‌باشد.

و در دسته آخر بررسی رده‌های زیر مجموعه Proteobacteria، Gammaproteobacteria قرار دارد که در آن نیز Xanthomonadales و pseudomonadales قرار دارند با این تفاوت که درصد فراوانی Xanthomonadales بسیار بالاتر و بیشتر از pseudomonadales بوده و معادل ۶۳، ۶۲ و ۱۷ درصد در نمونه‌های حاصل از ارتفاعات ۱۰، ۱۵۰ و ۲۵۰ متری می‌باشد.



نمودار شکل ٤ چهار تیره فراوانتر از هر راسته میکروبی مربوط به رده‌های مختلف:* *Proteobacteria*رده *Proteobacteria Alpha*، **: *Proteobacteria Beta*، ***: *Proteobacteria Gamma*، **** *Proteobacteria Delta*

بحث

هدف از انجام این مطالعه و بررسی زیر مجموعه‌های مربوط به شاخه *Proteobacteria* بررسی دقیق حضور میکروارگانیسم‌های مختلف و متفاوتی بود که تا به امروز از هیچ یک از نمونه‌های به دست آمده در پژوهش‌ها و مطالعات قبلی صورت گرفته از بخش‌های مختلف دریاچه بسیار شور ارومیه شامل ماسه نواحی ساحلی، لجن، رسوبات، آب و حتی خاک، شناسایی و مشاهده نشده بودند. با اینکه این ناحیه از اقلیم ایران دارای شرایط افراطی و خاصی است که مشابه آن فقط در یک نقطه دیگر از زمین در ایالات متحده grate salt lake مشاهده شده است (۲٤)، ولی نتایج حاصل از بررسی‌های فیزیکوشیمیایی نمونه‌های خاک استخراج شده از کوه قلعه کاظم خان نشان داد که خاک‌های یک منطقه اکستریم به علت ماهیت ناهمگن (heterogeneous)، می‌توانند میکروارگانیسم‌هایی کاملا متفاوت از آنچه که در محیط‌های همگن (homogeneous) وجود دارند، را در خود جای داده و جوامعی کاملا پویا، مستقل و سازگار با محیط ایجاد نمایند. در تحقیق حاضر به بررسی اعضای برتر و با درصد فراوانی بیشتر از هر چهار رده زیرمجموعه *Proteobacteria* پرداخته و داده‌ها حاکی از وجود برخی روابط بین تیره و یا راسته میکروبی جداسازی و شناسایی شده با ارتفاع نمونه‌برداری شده می‌باشد. همانگونه که در جدول ۱ مشاهده می‌شود، در صد نیتروژن موجود در نمونه‌های خاک بسیار پایین و بین ۰/۱۳ تا ۰/۲ می‌باشد که نشان دهنده ضعیف بودن چرخه مربوط به نیتروژن است و به همین دلیل احتمال جداسازی و شناسایی میکروارگانیسم‌های تثبیت کننده ازت کاهش می‌یابد. نکته قابل توجه در رابطه با ترکیبات ذکر شده مربوط به نمونه KUL-۱۵۰ می‌باشد، با توجه به اعداد و ارقام ثبت شده در جدول ۱، میزان کربنات و سولفات موجود در این نمونه در مقایسه با دو نمونه دیگر بسیار بالا بوده و به ترتیب ۳۱/٤ و ٦/۳٤ میلی‌اکی‌والان بر لیتر است.

در بررسی شکل ۱مشاهده می‌شود که، شاخه باکتریایی *Proteobacteria* بصورت میانگین، حدود ٤٦/٦٦ درصد از تنوع باکتریایی موجود سه نمونه را تشکیل می دهد. با توجه به درصدهای بیان شده برای هر نمونه، با افزایش ارتفاع، فراوانی این شاخه باکتریایی نیز کاهش می‌یابد. به عبارت بهتر KUL- ۲۵۰ با ٤۱٪ کمترین میزان فراوانی و KUL- ۱۰ با ۵۱٪ بیشترین میزان فراوانی ژنومی مربوط به این شاخه را، نشان می‌دهند. در تحقیقات صورت گرفته توسط Chengjie Ren و همکاران (2017) که بر روی کوهی در چین انجام شد نیز شاخه *Proteobacteria* با ۲۹/۷۸ ٪ فراوان‌ترین شاخه باکتریایی جداسازی شده از نمونه‌ها بود که با افزایش ارتفاع فراوانی آن نیز افزایش می‌یافت (۲۵). این برخلاف نتایج به‌دست آمده در مطالعه حاضر است. علاوه بر این یافته‌های Chengjie Ren و همکاران نشان می‌دهند که فراوانی اعضای رده *Alphaproteobacteria* و *Betaproteobacteria* نیز با افزایش ارتفاع رابطه مستقیم دارند. این مورد در یافته‌های مربوط به مطالعه حاضر نیز مشاهده شد، در نمونه‌های مربوط به این تحقیق نیز رده *Alphaproteobacteria* فراوان‌ترین رده

نسبت به سه رده دیگر بوده و با افزایش ارتفاع، درصد شناسایی شده مربوط به آن افزایش می‌یابد. همچنین بیشترین اعضای باکتریایی شناخته شده هم در این رده قرار می‌گیرند.

یافته‌های مطالعه حاضر حاکی از این است که درصد فراوانی مربوط به دو رده *Gammaproteobacteria* و *Deltaproteobacteria* در هر سه نمونه تقریبا برابر بوده و ارتباط چندانی با افزایش و یا کاهش ارتفاع ندارند. ولی در مطالعه صورت گرفته توسط Chengjie Ren و همکاران بر روی کوه Taibai در شرق چین، دو رده *Gammaproteobacteria* و *Deltaproteobacteria* در ارتفاع متوسط فراوان‌تر و در ارتفاعات بالاتر و پایین تر با کاهش فراوانی مواجه بودند (۲۵).

با بررسی داده‌های شکل‌های ۱ و ۳ مشاهده می‌شود که رابطه آمار معنی داری بین درصد نیتروژن موجود در نمونه‌های خاک (۰/۲، ۰/۱۳ و ۰/۱۹ در صد به ترتیب در نمونه‌های ۱۰- KUL، ۱۵۰- KUL و KUL-250) و فراوانی مربوط به *Rhizobiales* وجود دارد؛ *Rhizobiales* از جمله راسته‌های تثبیت‌کننده نیتروژن می‌باشند که در چرخه‌های مربوط به تثبیت این عنصر مهم و فراوان موجود در طبیعت نقش عمده و اساسی را ایفا می‌کنند. در نتیجه مشاهده می‌شود که درصد نیتروژن موجود در نمونه‌های خاک نیز با درصد فراوانی این راسته رابطه مستقیم داشته و مقادیر نیتروژن موجود در نمونه‌های ۱۰ -KUL و ۲۵۰ -KUL تقریبا برابر می‌باشد.

در مطالعه‌ای مشابه با این مقاله، Lipson به این نتیجه رسید که با افزایش ارتفاع، فراوانی *Rhizobiales* به طور قابل توجهی افزایش یافته و در مقابل فراوانی *Rhodospirillales* به طور قابل توجهی کاهش می‌یابد (۲۶). این درحالی است که داده‌های مربوط به پژوهش حاضر نشان دهنده برابری تقریبی درصدهای فراوانی اعضای راسته *Alphaproteobacteria* در دو ارتفاع ۱۰ و ۲۵۰ متری بوده و بیشترین تفاوت در نمونه مربوط به ارتفاع ۱۵۰ متری مشاهده می‌شود. همچنین مهم‌ترین و متفاوت‌ترین تغییرات در فراوانی‌ها مربوط به رده *Gammaproteobacteria* می‌باشد. چهار عضو انتخابی از این رده همگی دارای بالاترین و متفاوت‌ترین درصد های فراوانی می‌باشند. در بررسی مطالعات داخلی صورت گرفته بر روی دریاچه ارومیه، تنها مورد مشابه، مربوط به زنوزی و همکاران (۲۰۱۱) می‌باشد که میکروارگانیسم‌هایی در رده *Gammaproteobacteria* با بیشترین میزان شباهت به جنس‌های *Pseudomonas* و *Idiomarina* را گزارش نموده‌اند (۲۷) که البته در این پژوهش فقط جنس *Pseudomonas* مشاهده شده است. در این رده میکروبی نیز جداسازی و شناسایی دو تیره *unidentified_Xanthomonadales* و *Unclassified* با فراوانی‌های قابل توجه در هر سه نمونه قابل تامل می‌باشد.

در بررسی مطالعات بین المللی صورت گرفته در زمینه میکروبیولوژی محیطی، Yongxing Cuiدر سال ۲۰۱۹ با نمونه برداری از کوه Gongga در حوضه آبریز Hailuogou و Yu-Te Lin(۲۰۱۵) با نمونه‌برداری از یک منطقه کوهستانی نیمه گرمسیری در شهرستان نانتو، مرکز تایوان، نشان دادند که *Rhodoplanes* و *Bradyrhizobium* فراوان‌ترین جنس‌های باکتریایی رده *Alphaproteobacteria* می‌باشند (۲۸و۲۹)، حال آنکه هیچ یک از این دو جنس میکروبی در نمونه‌های مورد بحث در این پژوهش مشاهده نشدند. در مطالعات Lipson و Chengjie Ren نیز رده‌های *Xanthomonadales* و *Myxococcales*، از دو زیر شاخه *Gammaproteobacteria* و *Deltaproteobacteria*، در ارتفاع متوسط به طور قابل توجهی فراوان‌تر بودند (۲۵و۲۶). این نکته در بین داده‌های حاصل از مطالعه حاضر نیز مشاهده شده و درصد فراوانی این دو راسته در نمونه ۱۵۰ -Kul در مقایسه با دو نمونه دیگر بیشتر بوده است.

نتیجه‌گیری

با توجه به داده‌های ژنومی و نیز آمار موجود در این مطالعه، هیچکدام از باکتری‌های شناسایی شده در گروه میکروارگانیسم‌های نمک دوست قرار نگرفته و همگی از جمله باکتری‌های دارای توانایی زیستن در شرایط نرمال (و نه شرایط اکستریمی) می‌باشند. به عبارت بهتر شرایط اکولوژیکی مربوط به کوه قلعه کاظم خان علی رغم قرار گرفتن در داخل دریاچه

بسیار شور ارومیه احتمالا تحت تاثیر بارش تعدیل شده و امکان حیات سایر میکروارگانیسم‌های غیرنمک دوست نیز فراهم شده است. علاوه بر این‌ها، مشاهده راسته‌ای تحت عنوان Unclassified در رده *Betaproteobacteria* و *unidentified_Xanthomonadales* و *Unclassified* در رده *Gammaproteobacteria* که دارای بیشترین فراوانی در هر سه نمونه باشند جالب توجه است. شناسایی ژنومی چنین راسته‌هایی از *Proteobacteria* با این حد از فراوانی که در هیچکدام از منابع رسمی طبقه‌بندی نشده‌اند، نشان دهنده وجود نوع خاصی از باکتری‌ها در این اکوسیستم خاص بوده و احتمالا بایستی دارای ویژگی‌های منحصر به فردی برای سازگاری با شرایط خاص محیطی و آب و هوای سرد و کوهستانی منطقه باشند. این امر نشان می‌دهد که این منطقه نیازمند بررسی‌های بیشتر و با ابزار و روش‌های دقیق‌تر برای شناسایی گونه‌های خاص و احتمالا ناشناخته میکروبی می‌باشد.

ملاحظات اخلاقی

نویسندگان تمامی نکات اخلاقی شامل عدم سرقت ادبی، انتشار دوگانه، تحریف داده‌ها و داده‌سازی را در این مقاله رعایت کرده‌اند.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مطالعه از همکاری‌های مطالعاتی و آزمایشگاهی دانشگاه آزاد اسلامی ارومیه و همچنین مرکز مطالعاتی دریاچه ارومیه کمال تشکر را داشته و همچنین از جناب آقای دکتر محمدرضا اصغرزاده برای در اختیار قرار دادن اطلاعات علمی و همکاری در نگارش این متن سپاسگزارند.

تعارض منافع

وجود ندارد.

References

1. Nino A. Gagelidze , et al., Bacterial composition of different types of soils of Georgia. Annals of Agrarian Science, 2018. 16: p. 17-21.
2. J.F. Chau, A.C. Bagtzoglou, and M.R. Willig, 'The effect of soil texture on richness and diversity of bacterial communities. Environ. Forensics, 2011. 12: p. 333-41.
3. O. Mikanova, et al., Soil biological characteristics and microbial community structure in a field experiment. Open Life Sci., 2015. 10: p. 249-59.
4. G. Kvesitadze, T.U.E., Field Soil Science. Georgian National Academy Press,Tbilisi,, 2016.
5. Janssen, P., Identifying the dominant soil bacterial taxa in libraries of 16S rRNA and 16S rRNA genes. Appl Environ Microbiol 2006. 72: p. 1719-28.
6. Putten, R.D. Bardgett, and W.H.v. der., Belowground biodiversity and ecosystem functioning. Nature 2014. 515: p. 505-11.
7. Verstraete, W., et al., Microbial resource management: the road to go for environmental biotechnology. Eng. Life Sci, 2007. 7: p. 117-26.
8. Bodelier, P.L.E., Toward understanding, managing, and protecting microbial ecosystems. Frontiers in Microbiology, 2011.

9. Wit, R.D. and T. Bouvier, ‘Everything is everywhere, but, the environment selects’; what did Baas Becking and Beijerinck really say? Environtal Microbiology, 2006. 8(4): p. 755-758.
10. Horner-Devine, M.C., et al., A taxa-area relationship for bacteria. Nature 2004. 432: p. 750-53.
11. Caporaso, J.G., et al., Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. Proceedings of the national academy of sciences, 2011. 108 (supplement_1): p. 4516-4522.
12. Reich, P.B., et al., Impacts of biodiversity loss escalate through time as redundancy fades. Science, 2012. 336(6081): p. 589-592.
13. Zhou, J.Z., et al., Spatial scaling of functional gene diversity across various microbial taxa. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A, 2008. 105: p. 7768-73.
14. Spain, A., Krumholz, L. & Elshahed, M. , Abundance, composition, diversity and novelty of soil Proteobacteria. . ISME J 2009. 3: p. 992-1000.
15. Oren, A., Valid publication of the names of forty-two phyla of prokaryotes. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. , 2021. 71:005056.
16. Hess, M., et al., Metagenomic discovery of biomass-degrading genes and genomes from cow rumen. Science, 2011. 331(6016): p. 463-467.
17. Magoč T, S.S.L., FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies. Bioinformatics 2011. 27(21): p. 2957-2963.
18. Caporaso, J. Gregory, and e. al., QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. Nature methods, 2010. 7.
19. Edgar, Robert C., and e. al., UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. Bioinformatics,, 2011. 27: p. 2194-200.
20. Haas, B.J., et al. , Chimeric 16S rRNA sequence formation and detection in Sanger and 454-pyrosequenced PCR amplicons. Genome research, 2011. 21(3): p. 494-504.
21. Edgar and R. C., UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads. Nature methods, 2013. 10: p. 996-98.
22. DeSantis, Todd Z., and e. al., Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. . Applied and environmental microbiology, 2006. 72: p. 5069-72.
23. Wang, Qiong, and e. al., Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. Applied and environmental microbiology, 2007. 73: p. 5261-67.
24. Eimanifar, A., and Mohebbi, F., Urmia Lake (Northwest Iran): a Brief Review. Saline Syst., 2007. 3(5): p. 1-8.

25. Chengjie Ren, et al., Differential responses of soil microbial biomass, diversity, and compositions to altitudinal gradients depend on plant and soil characteristics in Science of the Total Environment. 2017.
26. Lipson, D.A., 'Relationships between temperature responses and bacterial community structure along seasonal and altitudinal gradients. FEMS Microbiol. Ecol, 2006. 59: p. 418-27.
27. Zununi Vahed, et al., Isolation and characterization of halophilic bacteria from Urmia Lake in Iran. . Microbiology, 2011. 80(6): p. 834-41.
28. Lin, Y.T., et al., Changes of soil bacterial communities in bamboo plantations at different elevations. FEMS Microbiol. Ecol, 2015. 91.
29. Yongxing Cuia, Haijian Bing, Linchuan Fanga, Yanhong Wu, Jialuo Yu, Guoting Shen, and X.W. Mao Jiang, Xingchang Zhang, Diversity patterns of the rhizosphere and bulk soil microbial communities along an altitudinal gradient in an alpine ecosystem of the eastern TibetanPlateau. Geoderma, 2018.