The 1st International Conference of IALE-Iran
30-31 October 2013, Isfahan University of Technology, Iran
نخستین کنفرانس بین المللی
اکولوژی سیمای سرزمین
۸ و ۹ آبان ۱۳۹۱، دانشگاه صنعتی اصفهان، ایران
Web: www.Iale.Iran.iut.ac.ir/conference, Email:Iale.Iran@of.iut.ac.ir

جداسازی و شناسایی باکتری های غالب محیط کشت های زئوپلانکتونی

رامین شرفی[*1]، امیدوار فرهادیان[2]، محسن سلیمانی[3]

چکیده

باکتری ها و زئوپلانکتون ها از مهمترین اجزاء زنجیره غذایی پلاژیک و بزرگترین عامل تنوع زیستی پلاژیک و فرآیندهای زیست شیمیایی هستند. باکتری ها و زئوپلانکتون ها در وقایع و عملکردهای اکولوژیکی ارتباط های تنگاتنگی دارند. در این تحقیق جدا سازی و شناسایی بیوشیمیایی این باکتری ها و شمارش آنها (روش رقیق سازی) از محیط کشت زئوپلانکتونی انجام شد. زئوپلانکتون ها (پاروپایان و آنتن منشعب ها) با جلبک سبز *Scenedesmus quadricauda* مورد تغذیه قرار گرفت. باکتری جداسازی و شناسایی شده در محیط کشت پاروپا باکتری Alcaligenes و در محیط کشت آنتن منشعب باکتری Aeromonas بود. تعداد باکتری ها در محیط کشت آنتن منشعب نسبت به محیط کشت پاروپا 10 برابر بیشتر بود. بررسی های بیشتر برای شناسایی و تنوع باکتریها پیشنهاد میشود.

واژگان کلیدی: زئوپلانکتون، باکتری، شناسایی بیوشیمیایی، جلبک سبز *Scenedesmus quadricauda*

مقدمه

باکتری ها و زئوپلانکتون ها از مهمترین اجزاء زنجیره غذایی پلاژیک و بزرگترین عامل تنوع زیستی پلاژیک و فرآیندهای زیست شیمیایی هستند. اگرچه باکتریها و پلانکتونها دارای محیط زیست مشابهی هستند و دارای روابط غیر مستقیم درچرخه غذایی و سطوح تروفی هستند اما آن ها اغلب در واحدهای عملکردی جداگانه ای طبقه بندی می شوند (Azam & Malfatti, 2007). نبود ساختارهای فیزیکی در ستون آب اثراتی بر باکتری ها دارد، به صورتی که باعث می شود که آن ها در محیطی تقریبا یکنواخت زیست کنند و فقط به شکارچیان، حملات ویروسی و تغییرات فیزیکی- شیمیایی محتوای آب واکنش دهند.

باکتری ها و زئوپلانکتون ها در وقایع و عملکردهای اکولوژیکی ارتباط های تنگاتنگی دارند برای مثال می توان ساختار بیرونی و پوششی احشاء پاروپایان را نام برد که سطوح مناسبی برای اتصال باکتری ها فراهم می آورد(Nagasawa & Nemoto, 1988; Pruzzo et al., 1996, Carman & Dobbs, 1997). این اتصال باکتریایی فقط به سخت پوستان زئوپلانکتونی محدود نمی شود و باکتری های همزیست در زئوپلانکتون هایی همچون روتیفرها (Selmi, 2001)، ژله فیش ها (Schuett & Doepke, 2009) نیز مشاهده گردیده است.

[1]دانشجوی کارشناسی ارشد تکثیر و پرورش آبزیان، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه صنعتی اصفهان Emai: Raminsharafi11@yahoo.com
[2]استادیار دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه صنعتی اصفهان
[3]ستادیار دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه صنعتی اصفهان

زئوپلانکتون ها جانوران چراکننده میکروسکوپی یا گاهی اوقات بزرگتر، در محیط های آبی هستند که در انتقال مواد و انرژی به سطوح غذایی بالای زنجیره غذایی نقش اساسی دارند. این موجودات از فیتوپلانکتون‌ها تغذیه کرده و دومین حلقه مهم شبکه های غذایی را تشکیل می‌دهند آنها با عمل چراکردن مقادیر قابل توجهی از مواد آلی را از سطح آب‌ها به لایه‌های عمیق‌تر انتقال می دهند (Dumant et al., 1975; Boxshall & Daniell, 2008). کشت این زئوپلانکتون ها، با استفاده از موادآلی گیاهی و جانوری از قبیل ضایعات کنجاله سویا، کنجاله پنبه دانه، یونجه (Barkoh et al., 1996)، گندم،برنج(Barkoh et al., 2005) ، کودهای مختلف جانوری از جمله کودهای گاوی، مرغی (Srivastava et al, 2006) و همچنین جلبک هایی مانند کلرلا (Savas & Erdoghan, 2008) ، سندسموس (Ranta et al,. 1993) و مخمرهای مختلف مانند مخمر نان(Lashkarbolouki & Jafaryan , 2011) *Saccharomyces cerevisia* امکان پذیر است. زئوپلانکتون ها از گروه های مختلف باکتریایی، مخمر، ریزجلبک (جلبک های تک سلولی و جلبک های دارای کلونی)، مواد پوسیده و مواد آلی غیر محلول تغذیه می کنند (Monakov, 1972). سلول های باکتریایی و قارچی ارزش غذایی زیادی دارند و جمعیت دافنی با حضور مقادیر کافی سلول های باکتریای، مخمر و هم چنین ریزجلبک ها به سرعت رشد می کند (Dewey & Parker, 1964).

هدف از انجام این تحقیق جداسازی و شناسایی باکتریهای غالب از محیط کشت های زئوپلانکتونی بعنوان بخشی از تنوع زیستی است که می تواند بر عملکرد یک اکوسیستم آبی تاثیر گذار باشد.

مواد و روش‌ها

نمونه زئوپلانکتونی موجود از آبگیرهای حومه شهرستان زرین شهر در 35 کیلومتری شهر اصفهان با مختصات جغرافیایی 51 درجه و 22 دقیقه طول شرقی از نصف النهار گرینویچ و 32 درجه و 24 دقیقه عرض شمالی از خط استوا با استفاده از تور پلانکتون گیری با چشمه 140 میکرون با تورکشی عمودی جمع آوری و به آزمایشگاه هیدروبیولوژی دانشکده منابع طبیعی دانشگاه صنعتی اصفهان منتقل گردید. نمونه ها پس از چند ساعت ته نشینی با کمک لوپ آزمایشگاهی (Olympus, SZ6045, Japan) و میکروسکوپ اینورت (CETI, Belgium) مورد بررسی و شناسایی قرار گرفت. یک نوع پاروپا و یک نوع آنتن منشعب مورد جداسازی قرار گرفت بطوریکه ماده های بالغ این زئوپلانکتون ها از مقیاس کوچک تا بزرگ کشت داده شد تا علاوه بر مهیا سازی تعداد کافی برای شروع کار آزمایشگاهی، گونه های مورد نظر نیز به شرایط موجود در آزمایشگاه سازگار گردند.

برای تهیه غذای زئوپلانکتون ها از جلبک سبز *Scenedesmus quadricauda* استفاده گردید. کشت این جلبک در ارلن مایرهای2 لیتری با استفاده از محیط کشت BBM (Bold's Basal Medium) بر طبق ترکیبات بیان‌شده توسط Nichols و Bold در سال 1965 انجام شد. شرایط پرورش این گونه شامل آب شیرین فیلتر و اتوکلاو شده، دمای 1±23 درجه سانتی گراد، دوره نوری 12:12 ساعت تاریکی: روشنایی، شدت نور 60 میکرومول فوتون بر مترمربع در ثانیه، pH آغازین 6/9 و اکسیژن محلول بالای 5 میلی‌گرم در لیتر بود. جلبک‌ها در فاز رشد سریع از طریق سانتریفیوژ کردن (سانتریفوژ مدلCenturion Scientific Ltd) با سرعت 3000 دور در دقیقه برای مدت 5 دقیقه مورد برداشت قرار گرفت.

محاسبه تعداد میکروارگانیسم های محیط با استفاده از روش رقیق سازی مرحله ای (Dilution Serial) انجام گرفت. در این روش 1 میلی لیتر از نمونه در غلظت های 10^{-1} تا 10^{-6} رقیق گردید و سپس بر روی محیط کشت جامد نوترینت آگار (NA) تعداد کلنی های تشکیل شده شمارش شد.

به منظور تهیه کشت خالص از باکتریها ، با استفاده از روش خطی کلونی های تک جداسازی گردید. سپس از هر کلونی بر روی محیط کشت NA ، کشت صورت گرفت و نمونه ها به مدت 24 تا 48 ساعت در انکوباتور با دمای 28 درجه سانتی گراد نگهداری شد.

جهت شناسایی باکتری به روش بیوشیمیایی با بررسی مشخصات ماکروسکوپی کلنیها، مشخص کردن مرفولوژی و واکنش گرم باکتری، انجام تست های بیوشیمیایی به کمک کشت تازه باکتری خالص از جمله تست های کاتالاز، اکسیداز، کوآگولاز، احیاء نیترات، حساسیت به نووبیوسین، اوره، رشد در محیط فنل رد مانیتول سالت آگار، و تخمیر قند مانیتول انجام شد. و در انتها برای شناسایی باکتریایی با استفاده از کتاب سیستماتیک برگی (Holt et al., 1994) شناسایی صورت گرفت.

یافته‌ها و بحث

باکتری جداسازی و شناسایی شده در محیط کشت پاروپای تغذیه شده با جلبک سبز سندسموس باکتری Alcaligenes بود. در محیط کشت آنتن منشعب نیز باکتری شناسایی شده از دسته باکتری های گرم منفی، Aeromonas شناسایی گردید که مشخصات شناسایی هر دو باکتری در جدول شماره 1 آورده شده است. نتایج حاصل از شمارش تعداد میکروارگانیسم به روش رقیق سازی نشان داد تعدادباکتریهای برای محیط کشت آنتن منشعب 5×10^4 CFU ودر محیط کشت پاروپا 5×10^3 CFU در هر میلی لیتر بود.

هانسن و بچ در سال 1996 در محیط کشت *Acartia tonsa* تعداد 2×10^5 CFU در هر میلی لیتر باکتری گزارش کرد. اولسن و همکاران در سال 2000 در محیط کشت *Artemia franciscana* $1/7\times10^4$ CFU در هر میلی لیتر باکتری محاسبه کرد. تانگ در سال 2005شمارش تعداد باکتری را در محیط کشت زئوپلانکتون *A. tonsa* $4/5\times10^5$ تا 2×10^3 CFU در هر میلی لیتر بدست آورد. همچنین تانگ و همکاران در سال 2009 تعداد باکتریها را در محیط کشت های *Daphnia cucullata*، *Eudiaptomus gracilis* و *Diaphanosoma brachyurum* به ترتیب $3/9\times10^5$ تا 1×10^5، $4/3\times10^5$ تا $1/7\times10^5$ و $3/3\times10^5$ CFU در هر میلی لیتر گزارش کردند.

جدول شماره 1: تست های شناسایی باکتری در محیط کشت پاروپا و آنتن منشعب

تست های شناسایی	محیط کشت پاروپا	محیط کشت آنتن منشعب
تست گرم	-	-
شکل	Rod	Rod
هوازی	+	+
بی هوازی	-	+
اسپور	-	-
حرکت	+	+
کاتالاز	+	+
بنزیدین	+	+
اکسیداز	+	+
گلوکز	-	+
O/F	-	F
باکتری شناسایی شده	*Alcaligenes*	*Aeromonas*

نتیجه‌گیری

باکتریهای غالب در محیط کشت زئوپلانکتونهای پاروپا و آنتن منشعب تغذیه شده با جلبک سندسموس کوادریکودا از نوع گرم منفی و به ترتیب از جنسهای *Alcaligenes* و *Aeromonas* بودند. شناسایی باکتری ها در محیط کشت زئوپلانکتونی و

بررسی اکولوژیکی آن ها باعث شناخت هر چه بهتر تنوع زیستی و عملکرد اکوسیستم می گردد. پیشنهاد می گردد کل ساختار جمعیت باکتریایی و روند تغییرات آنها با گذشت زمان و تاثیر آن بر خصوصیات کیفی آب نیز بررسی گردد.

قدردانی

بدینوسیله نویسندگان از معاونت پژوهشی دانشکده منابع طبیعی و معاونت پژوهشی و تحصیلات تکمیلی دانشگاه صنعتی اصفهان که موجبات انجام این تحقیق را فراهم نمودند کمال سپاسگزاری را دارند.

منابع

1) Azam, F. Malfatti, F. 2007. Microbial structuring of marine ecosystems. Natural Reviwe Microbiology 5:782–791.
2) Barkoh, A. 1996. Effect of three fertilization treatments on water quality, zooplankton, and striped bass fingerling production in plastic lined ponds, Progressive Fish Culturist, 58:237-247.
3) Barokh, A. Hamby, S. Kurten, G. Warren Schlechte, J. 2005. Effects of rice bran, cottonseed meal, and alfalfa meal on pH and zooplankton. North American Journal of Aquaculture, 67:237-243.
4) Boxshall, GA. Daniell, D. 2008. Globall diversity of copepods (Crustacea: Copepoda) in freshwater, Hydrobiologia, 595:195-207.
5) Carman, KR. Dobbs, FC. 1997. Epibiotic microorganisms on copepods and other marine crustaceans. Microscopic Research Technology 37:116–135.
6) Dewey, IE. Parker, BL. 1964. Mass rearing of Daphnia magna for insecticide bioassay. Journal of Economic Entomology, 6:57.
7) Dumont, HJ. Van de Velde, I. Dumont, S. 1975. The dry weight estimate of biomass in a selection of Cladocera, copepod and rotifer from the plankton, periphyton and benthos of continental waters. Oecology. (Berlin), 19:75-97.
8) Hansen, B. Bech, G. 1996. Bacteria associated with a marine planktonic copepod in culture. I. Bacterial genera in seawater, body surface, intestines and fecal pellets and succession during fecal pellet degradation. Journal Plankton Research 18:257–273.
9) Holt, JG. Krieg, NR. Sneath, PHA., Staley, JT., & Williams, ST. 1994. Bergeys Manual of Determinative Bacteriology. Maryland USA: Wijjiams Wilkins.
10) Lashkarbolouki, M. Jafaryan, H. 2011. Evaluation of resistance in Acipenser percicus larvae fed with bioencapsulated Daphnia magna Via Saccharomyce scerevisiae product (Amax) against challenge test. World Journal of Fish and Marine Sciences, 3(4): 340-345.
11) Monakov, AV. 1972. Review of studies on feeding of aquatic invertebrates conducted at the Institute of Biology of Inland Waters, Academy of Science, V. S. S. R. Journal Fisheries Research Board of Canada, 29: 363-383.
12) Nagasawa, S. Nemoto, T. 1988. Presence of bacteria in guts of marine crustaceans and on their fecal pellets. Journal Plankton Research 10:559–564.
13) Nichols, H W. Bold, HC. 1965. Trichorsarcina polymorpha gen. et sp. nov. Journal of Phycology. 1: 34-38.
14) Olsen, AI. Olsen, Y. Attarmadal, Y. Chrisie, K. Birkbeck, TH. Skjermo, J. Vadstein, O. 2000. Effects of short term feeding of microalgae on the bacterial flora associated with juvenile Artemia franciscana. Aquaculture 190:11–25.
15) Pruzzo, C. Crippa, A. Bertone, S. Pane, L. Carli, A. 1996. Attachment of Vibrio alginolyticus to chitin mediated by chitin binding proteins. Microbiology 142:2181–2186.
16) Ranta, E. Bengtsoon, J. Mc Manus, J. 1993. Growth, size and shape of Daphnia longispina, D. magna and D. pulex. Annales Zoologic Fennici . 30:299-311.
17) Savas, S. Erdogan, O. 2006. The effect of food (Scenedesmus acuminatus (Von Lagerheim) R.H. Chodat) densities and temperature on the population growth of the Cladoceran Ceriodaphnia quadrangula (O.F. Muller, 1785). Journal of Fishery and Aquatic Science, 23: 113-116.
18) Schuett, C. Doepke , H. 2009. Endobiotic bacteria and their pathogenic potential in cnidarian tentacles. Helgol Mar Reserch doi 10.1007/s10152-009-0179-2.
19) Selmi, G. 2001. Ectosymbiotic bacteria on ciliated cells of a rotifer. Tissue Cell 33:258–261.
20) Srivastava, A. Rathore, RM. Chakrabarti, C. 2006. Effects of four different doses of organic manures in the production of Ceriodaphnia cornuta, Bioresource Technology, 97:1036 -1040.
21) Tang, KW. 2005. Copepods as microbial hotspots in the ocean: effects of host feeding activities on attached bacteria. Aquatic Microbial Ecology38:31–40.

22) Tang, KW. Bickel, SL. Dziallas, C. Grossart, HP. 2009a. Microbialactivities accompanying decomposition of cladoceran and copepod carcasses under different environmental conditions. Aquatic Microbial Ecology 57:89–100.

Isolation and Identification of Dominant Bacteria from Zooplankton Culture Media

R. Sharafi[1*], O. Farhadian[2], M. Soleimani[3]

*Corresponding Author's E-mail: Raminsharafi11@yahoo.com

Abstract

Bacteria and zooplankton are important components of the pelagic food web and major contributors to pelagic biodiversity and biogeochemical processes. Bacteria and zooplankton can be closely linked in occurrence and ecological functions. Zooplankton can use of different food that in this experimental fed with Scenedesmus quadricauda. The results showed that the bacteria in copepod and cladocera belong to Alcaligenes and Aeromonas genera, respectively. The bacterial population in cladocera medium was 10 times more than the population in copepod medium. Further investigations recommend for identification and diversity of bacteria from aquatic environments.

Keywords: Zooplankton, Bacteria, Biochemical identification, Scenedesmus quadricauda.