بررسی اثرهای اکوفیزیولوژیک سیانوباکتری خاکزی Nostoc sp. به عنوان شاخصی از اصلاح خاک‌های شور و بررسی توانمندی رشد و بقا و برون ریزش آمونیوم و محتوی رنگیزه‌ای در شرایط دمایی بالا

مریم صفایی‌کتولی[۱]*، شادمان شکروی[۲]، فریبا امیرلطیفی[۱]، زهرا حسینی[۱]

چکیده

سیانوباکتریوم خاکزی از نظر ویژگی‌های دارویی، توانمند است و دارای خواص ضد قارچی، ضد ویروسی و ضد باکتریایی است و دو ترکیب آن بر علیه HSVII و فعالیت ضعیف ضد سرطانی دارد. کاربرد سیانوباکتریوم خاکزی *Nostoc* sp. برای کاهش شوری و دوام در دمای بالا است. نمونه‌برداری از شالیزارهای استان گلستان در طی یک دوره یک ساله انجام گرفت. نمونه‌های خاک کشت شده، پس از تخلیص و شناسایی، سیانوباکتریوم گزینش شده، در محیط کشت مایع BGO-11 تحت شدت نور ۲ میکرومول کوانتا بر مترمربع در ثانیه، دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد و روشنایی سفید مداوم قرار گرفت. تیمار شوری اعمال شده، در شرایط کمبود دی‌اکسیدکربن، از نوع کلرورسدیم و به میزان ۱٪ بودند. رشد بر اساس کدورت سنجی (OD750) تعیین شده، سنجش رنگیزه‌های کلروفیلی و فیکوبیلی پروتیینی پس از تهیه عصاره متانولی انجام گرفت. برون ریزش ترکیبات آمونیومی در روزهای مختلف و در شوری ۱٪ انجام گرفت. هم‌چنین اثر توام دو استرس دما و شوری وکاهش آن از طریق رنگیزه‌ها بررسی شد. نتایج نشان داد نمونه استعداد بقاء در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد را دارد. بیش‌ترین برون ریزش آمونیوم در ۱٪ و روز دوم و در شرایط در زیوه، بیش‌ترین محتوی رنگیزه‌ای مربوط به کارتنوئید و در شیشه کلروفیل a و کارتنوئید است. بیش‌ترین میزان کلروفیل a در روز سوم و کارتنوئیدها در روز اول می‌باشد و نتیجه‌گیری کلی بدین شکل می‌باشد که نمونه قابلیت بقاء در خاک‌های شور و شرایط محیطی گرم و مرطوب را دارد.

کلمه‌های کلیدی: برون ریزش آمونیوم - دما- شوری - وضعیت رنگیزه‌ای – نوستوک.

۱- عضو باشگاه پژوهشگران جوان دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرگان.

۲- استادیار گروه زیست‌شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرگان.

* عهده‌دار مکاتبه (E-Mail:Safaei2580@yahoo.com)

تاریخ دریافت: پاییز۱۳۸۶ تاریخ پذیرش: بهار۱۳۸۷

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

سیانو باکتری‌ها (سیانوفیت‌ها یا جلبک‌های سبز - آبی) دارای کاربردهای بسیاری هستند. امروزه استفاده از جلبک‌های سبز - آبی در بیوتکنولوژی پزشکی و کشاورزی جنبه‌های کاربردی به خود گرفته است. از کاربردهای شناخته شده سیانوفیت‌ها ترکیبات متفاوت دارویی اعم از آنتی‌بیوتیک‌ها، ترکیبات ضد قارچی و ضد ویروسی می‌باشد. برنج به‌طور گسترده در مناطقی که دارای شرایط آب و هوایی مرطوب است، کشت می‌شود و وجود شرایط اشباع و لایه‌ای از آب دایم به روی خاک، رشد جلبک‌های سبز - آبی را ایجاد می‌کند. فلور جلبک‌های سبز - آبی مزارع برنج شامل گونه‌های *Anabaena*، *Anabaenopsis*، *Aulosira*، *Cylindrospermum*، *Nostoc*، *Calothrix*، *Tolypothrix*، *Scytonema*، *Fischerella*، *Hapalosiphon*، *Mastigocladus*، *Stigonema*، *Westiella*، *Westiellopsis*، *Campylonema*، *Microchaete* می‌باشد که تثبیت کننده ازت هستند. علاوه بر تثبیت ازت، این جلبک‌ها ویتامین B_{12} ، اکسین‌ها و اسیدآسکوربیک را برون ریزش می‌کند که ممکن است این مواد سهمی در رشد برنج داشته باشند. جلبک‌های سبز - آبی معمولاً توسط لعابی پوشیده شده‌اند و شناسایی آن‌ها در مزارع غرقابی برنج به سادگی امکان پذیر است (Boussiba, 1988). در سیانوباکتریا استراتژی‌های خاصی برای استفاده از نور محدود وجود دارد. وجود دستگاه فیکوبیلی زوم یکی از این استراتژی‌ها است. فیکوبیلی زوم‌ها سیانوباکتریا را قادر می‌سازند که در شرایط کم نوری مانند شالیزارها یا درون خاک‌ها با تنش موجود مقابله کنند (سلطانی و همکاران ۱۳۸۴). دما از راه تأثیرهایی که بر روی فعالیت آنزیمی دارد، رشد گونه‌ها را کنترل می‌کند. سرعت رشد در دمای پایین برای سند سموس کم می‌باشد. دمای مفید را بین ۲۴ تا ۳۱ درجه سانتی‌گراد گزارش کرده‌اند که در آن دارای سرعت رشد ۱/۲۴ می‌باشد. دما هم‌چنین بر روی جذب عنصری در جلبک‌ها تأثیر دارد. اندازه‌گیری غلظت‌های عناصر در Scenedesmus pannonicus بعد از یک دوره ۴ ساعته در دمای ۱۰ و ۲۲ درجه سانتی‌گراد حاکی از آن است که در مورد عناصر مس Cu و لانتیم La تأثیر دما مشاهده نمی‌شود. این امر نشان دهنده‌ی نبود یک جذب متابولیسمی است. جذب ارسنیک(As)، تنگستن(w)، روی(Zn) ، کادمیم(Cd) در دمای بالا افزایش می‌یابد. ولی فقط درمورد ارسنیک (As) یک افزایش منظم در جذب دیده می‌شود. مقادیر به نسبت بالای تنگستن(w)، روی(Zn)، کادمیم(Cd) در دماهای ۵ ، ۶ و ۱۰ درجه سانتی‌گراد نشان دهنده جذب زیاد و غیر وابسته به پروسه‌های انرژتیک می‌باشد (سلطانی و همکاران، ۱۳۷۲). با توجه به این‌که برنج در غذای روزانه مردم ایران، دارای جایگاهی خاص است و از این نظر این گیاه در کشاورزی ایران به نوعی گیاه زراعی استراتژیک محسوب می‌شود و نیز با توجه به مسئله ضرورت استفاده از کودهای بیولوژیک در آینده، مسئله بقا و رشد موجود در شرایط به نسبت مشابه شالیزار می‌تواند برای ابعاد کاربردی مفید باشد (هاشم و همکاران، ۱۹۸۸).

Archive of SID

www.SID.ir

بسیاری از اکوسیستم‌های کشاورزی تحت تأثیر شوری هستند، بنابراین برای گیاهان زراعی مناسب نیستند. از جمله این مناطق می‌توان به زمین‌های کشاورزی کمربند ساحلی کشور اشاره کرد که از آب دریا متأثر هستند و شوری آن‌ها در مقایسه با آب دریا کم‌تر است (Adams & All, 1999). هدف از این پژوهش سازش و پایداری نمونه در محیط‌های با شوری کم و دماهای بالا می‌باشد.

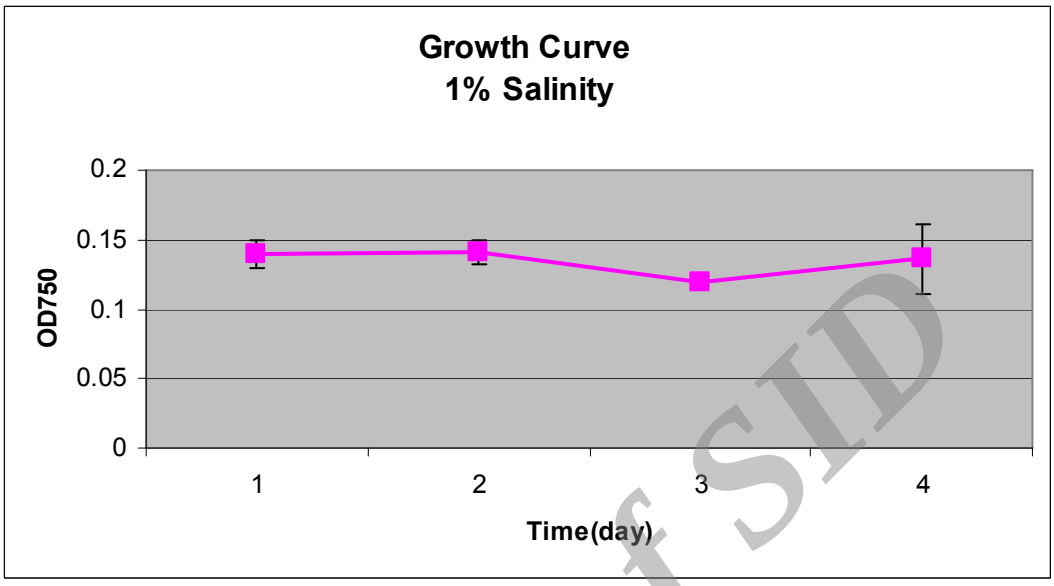
مواد و روش‌ها

نمونه‌های خاک از شالیزارهای استان گلستان، در طول دوره زمانی یک ساله جمع‌آوری شدند. کشت نمونه‌های خاک مطابق روش کشت سیانوباکتری‌های خاکزی انجام گرفت (Kaushik, 1987). جداسازی و شناسایی مقدماتی و شناسایی در حد گونه با استفاده Anagnostidis & All (۱۹۹۰) انجام گرفت؛ سپس نمونه به محیط کشت BG-11 که فاقد نیتروژن بوده، وارد شد. نمک‌های واجد نیتروژن چه در میکرو و چه در ماکرو المان‌ها به‌طور کامل از محیط حذف شدند. برای نگهداری نمونه به شرایط نور محدود در حد ۲ میکرو مول کوانتا بر مترمربع در ثانیه (که توسط لامپ فلورسانت تأمین می‌شد)، دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد و pH ۷/۲ انتقال داده شد (Soltani & All, 2005). بررسی‌ها در ارلن‌های با حجم ۲۵۰ میلی‌لیتر محتوی ۱۰۰ میلی‌لیتر سوسپانسیون انجام شد. نمونه توسط دستگاه شیکر به مدت ۱ ساعت هم زده شده و سپس به اتاق کشت منتقل شدند. پیش از تلقیح، نمونه به مدت ۴۸ ساعت برای ایجاد سازگاری به محیط مایع وارد شد. نمونه‌ها به مدت یک ساعت توسط پمپ‌های آکواریومی هوا دهی شد. بررسی اولیه تیمار شوری در ۱٪ نمک است. از شرایط هوا دهی (عدم محدودیت دی‌اکسیدکربن) استفاده شده است. در مرحله دوم اثر توام تیمار شوری و دما که از دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد استفاده می‌شود. رشد بر اساس کدورت‌سنجی، با استفاده از اسپکتروفتومتر (OD750) انجام شد. کاروتنوئیدها بر اساس Jensen (۱۹۷۸) و فیکوبیلی پروتیین‌ها بر اساس سلطانی و همکاران (۱۳۸۴) اندازه‌گیری شدند. به همین ترتیب وضعیت رنگیزه‌ای به صورت در زیوه In vivo در طول موج‌های ۴۸۰- ۶۲۰-۶۵۰-۶۸۰ نانومتر تعیین شد (Suda & All, 2002). برون ریزش آمونیوم از روش فنات انجام شد (Solorzano, 1969). آنالیز آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS Ver 11 و Sigmaplot انجام گرفت.

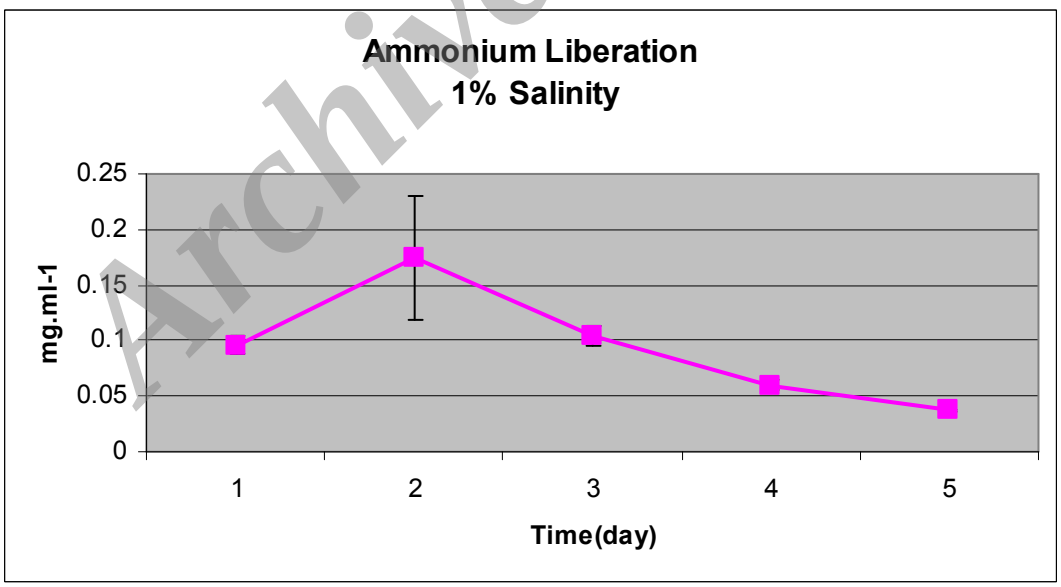
Archive of SID

www.SID.ir

نتایج

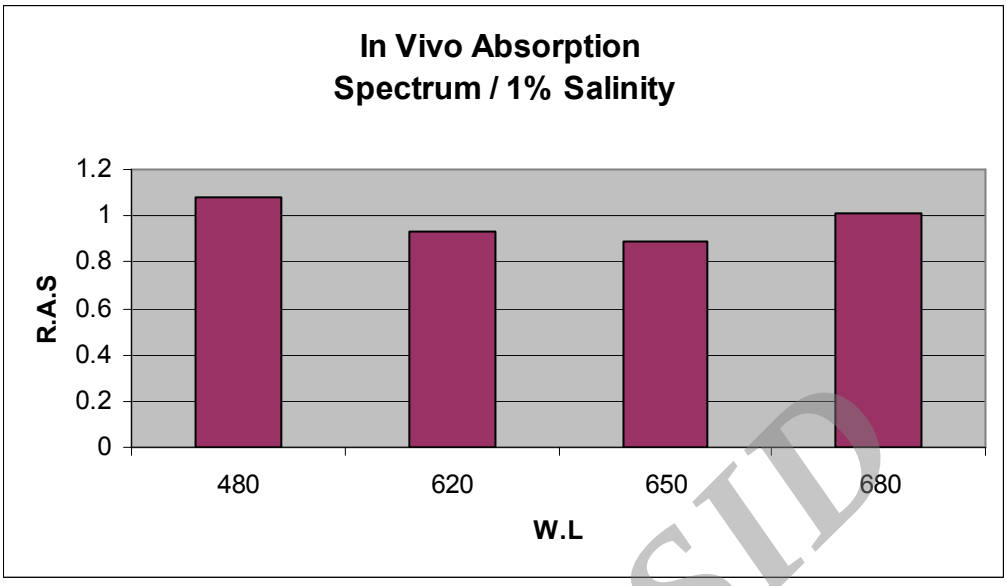


نمودار ۱- منحنی رشد در سیانوباکتریوم .Nostoc sp در شرایط شوری ۱٪ و دمای ^{oc} ٤٥ و هوا دهی و شیکر



نمودار ۲- برون ریزش آمونیوم در سیانوباکتریوم .Nostoc sp در شرایط شوری ۱٪ با هوا دهی و شیکر

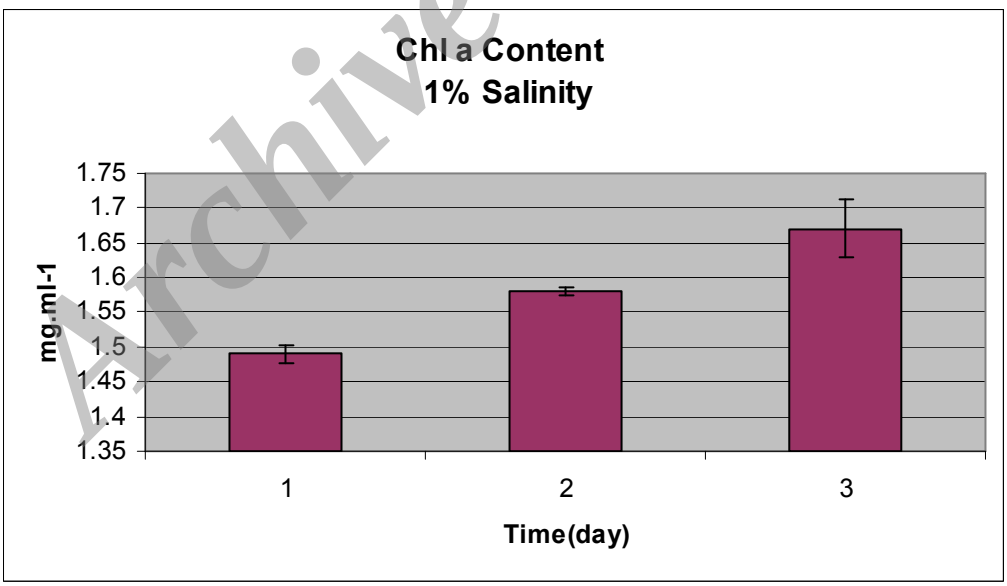
Archive of SID
www.SID.ir



RAS: Relative Absorption Spectrum WL: Wavelenght

نمودار۳- مقایسه در زیوه رنگیزه‌های فیکوبیلی پروتیین

در شرایط شوری۱٪ و دمای ^{OC} ٤٥ در سیانوباکتریوم .Nostoc sp



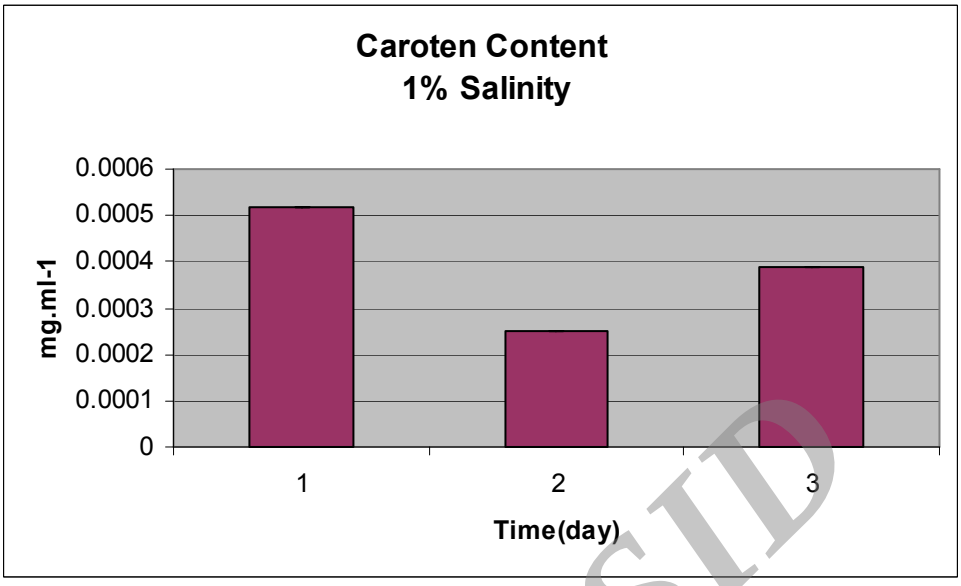
RAS: Relative Absorption Spectrum WL: Wavelenght

نمودار٤- محتوی در شیشه رنگیزه‌ای کلروفیل a

در شرایط شوری ۱٪ و دمای ^{OC} ٤٥ در سیانوباکتریوم .Nostoc sp

Archive of SID

www.SID.ir



RAS: Relative Absorption Spectrum WL: Wavelenght
نمودار۵- محتوی در شیشه رنگیزه‌ای کارتنوئید
در شرایط شوری ۱٪ و دمای ^{OC} ٤٥ در سیانوباکتریوم .Nostoc sp

Archive of SID

بحث

این‌که در شالیزارها نوسان شوری به خصوص با تغییر وضعیت بارندگی و آب و هوا روی می‌دهد بدیهی است، اما انتخاب دامنه ۰/۰٪ (محیط کشت) تا ۱٪ برای سنجش قابلیت سازگاری با شوری ازپژوهش‌های (Boussiba, 1988) سیانوباکتری *Nostoc* سوای برخی موارد غیرعادی، وضعیت از نظر دامنه بردباری به شوری حداقل در نمونه‌های موجود در شالیزار مشابه به‌نظر می‌رسد (Rogers & Gallon, 1988). به‌عنوان یک پژوهش برای انتخاب شوری مناسب در کشت آکواریومی نمونه در همین شوری قرار داده شد و میزان برون ریزش آمونیوم اندازه‌گیری شد. مشاهده رشد نمونه در شرایط هوا دهی و شیکر، عدم تلقیح گاز دی‌اکسیدکربن نشان داد که رشد در شوری ۱٪ نیز انجام می‌شود و نتایج به‌دست آمده با بررسی‌های Adams & All (۱۹۹۹) سازگار است و این مسئله در شرایط دمایی ۲۸ درجه سانتی‌گراد می‌باشد. هنگامی‌که دما تغییر می‌کند یعنی از ۲۸ به ۴۵ درجه سانتی‌گراد می‌رسد، الگوهای رفتاری نمونه تغییر می‌کند و بهترین رشد مربوط به شوری ۱٪ می‌باشد؛ در روز چهارم از فاز رشد به نقطه رشد در شوری ۱٪ می‌باشد و برون ریزش آمونیوم و وضعیت رنگیزه‌ای آن مطابق نمودار (۲-۳) مورد بررسی قرار گرفت که پیک برون ریزش ترکیبات آمونیومی در روز دوم مشاهده شد، تأیید دیگر بر نتایج این بررسی، از مقایسه آن با نتایج کسب شده در شکروی و همکاران (۲۰۰۳) بر روی سیانوباکتریوم

www.SID.ir

Fischerella sp. می‌باشد و نکته مورد توجه آن‌که بین رشد و برون ریزش آمونیوم در شوری بهینه همبستگی وجود دارد(r_2 =۰/۶).

در شرایط شوری ۱٪ نمونه دارای برون ریزش قابل توجهی است. این امر به آن معنی است که متابولیسم نیتروژن در نمونه وضعیت طبیعی دارد و مازاد نیتروژن همگون شده در طی دی آزوتروفی به محیط آزاد می‌شود (Stal, 1995). سنجش رنگیزه‌های مختلف، کارتنوئید، فیکوسیانین، آلوفیکوسیانین، فیکواریترین در شرایط، عدم تلقیح گاز دی‌اکسیدکربن نشان داده شده است که در شوری ۱٪ بیش‌ترین محتوی رنگیزه مربوط به کارتنوئیدها می‌باشد. این امر با آن‌چه در شکروی و همکاران (۱۳۸۲) و سلطانی (۲۰۰۵) آمده است، سازگار می‌باشد.

سپاس‌گزاری

نگارندگان وظیفه خود می‌دانند، از تمامی افرادی که در طول انجام این پژوهش کمال همکاری را داشته‌اند صمیمانه سپاس‌گزاری نمایند. از سرکار خانم رسایی (کارشناس آزمایشگاه ژنتیک) و هم‌چنین سرکار خانم کیایی (کارشناس آزمایشگاه تحقیقات) و از آقایان آیینه و بیک‌نژاد (کارشناسان آزمایشگاه شیمی) تشکر ویژه می‌نماییم.

Archive of SID

www.SID.ir

منابع

خاوری‌نژاد،ر؛ فلاحیان،ف؛ شکروی،ش. ۱۳۸۰. بررسی تأثیر شدت‌های نوری محدود و تناوب نوری بر رشد، وضعیت رنگیزه‌ای و فرکانس هتروسیست سیانوباکتریوم *Nostoc sp.* . مجله علوم پایه دوره دکتری دانشگاه آزاد اسلامی. شماره ۴۰ زمستان.

خاوری‌نژاد،ر؛ ریاحی،ح؛ شکروی،ش. ۱۳۸۱. بررسی تأثیر شوری، اسیدیته و عدم تلقیح دی‌اکسیدکربن بر رشد، وضعیت رنگیزه‌ای و فرکانس هتروسیست سیانوباکتریوم *Nostoc sp.* . مجله علوم پایه دوره دکتری دانشگاه آزاد اسلامی. شماره ۴۱ بهار.

سلطانی،ن؛ خاوری نژاد،ر؛ طباطبایی یزدی،م؛ شکروی،ش؛ فرناندز والینته،ا. ۱۳۸۴ . بررسی خواص آنتی‌میکروبیال و فیزیولوژی سیانوباکتری‌ها در محیط‌های افراطی. پایان نامه دکترای تخصصی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه تربیت معلم تهران.

شکروی،ش؛ سلطانی،ن؛ بافته چی،ل. ۱۳۸۱. تدوین تکنولوژی استفاده از سیانوباکتری‌ها به عنوان کود بیولوژیک در شالیزارها. شورای عالی تحقیقات نهاد ریاست جمهوری (طرح ملی) . مجری: پژوهشکده علوم پایه کاربردی، جهاد دانشگاهی، دانشگاه شهید بهشتی.

شکروی،ش؛ ساطعی،آ . ۱۳۸۲. بررسی پتانسیل سیانوباکتری به منظور تلقیح در شالیزار. گزارش طرح پژوهشی، معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرگان.

Adams, David J. and.Duggan, P.S. 1999. Heterocyst and Akinete differentiation in cyanobacteria. Tansley Review No 107 New Phytologist 144: 3-33.

Anagnostidis K. and Komarek J.. 1990. Modern approaches to the classification of cyanobacteria..S tigonematales.- Archieves for hydrobiology supl4: PP 224-286.

Boussiba S.. 1988. Anabaena azollae as biofertilizer.- In: Stadler, T.,J., Millon, M.C.Verdus, Y.Karamanos,H.Morvan and D.Christiaen (ed.), Algal biotechnology Elsevier applied science.

Desikachary,T.V.,. 1959. Cyanophyta.- Indian council of agricultural research, monographs on Algae New Delhi, India.

Geitler, L.. 1932. Cyanophyceae von Europa Kryptogamen flora Akademiche Verlagsgesellschaft.- Leipzig.

Archive of SID

www.SID.ir

Ghasemi,Y.; Tabatabaei Yazdi, M.; Shokravi, S.; Soltani,N., and Zarrini,G.. 2003. Antifungal and antibacterial activity of paddy – fields from the north of Iran.- Journal of science, Islamic republic of Iran 14(3) : 203 – 209.

Hashem, M.A., Gallon, J.R and Chaplin, A.E.. 1988. Nitrogen fixation by oscillatoria sp. USC 138 Under alternating light and dakness.in.

Jensen,A.. 1978. Chlorophylls and carotenoides- in: Handbook of Phycological Methods, Physiological and Biochemical Methods(ed.) Hellebust,J.A. and Craigie, J.S., Cambridge University Press.

John, D. M.; Whitton,B.W., and Brook, A.J.. 2002 . The Freshwater Algal Flora of The British Isles - Cambridge University Press.

Kaushik, B.D..1987. Laboratory methods for blue-green algae - Associated Publishing Company, New Delhi, India.

Prescott, G.W..1962. Algae of the western great lake area.- W.M.C. Brown Company Pub.

Ramos J.L. and Madueno F.. 1986. Induction of increase in the heterocyst frequency of *Anabaena* sp. Strain ATCC33047. Effect on ammonium photoproduction, FEMS Microbiology Letters, Volume 36, issue 1, page 73.

Rogers, L and Gallon, J. K.. 1988. Biochemistry of algae and cyan obacteria. OxfordScientific Pub.

Shokravi S.; Tabatabaei Yazdi, M.; Ghasemi Y.; Baftechi,L. and Soltani,N.. 2003. The effects of light intensities and duration on antibacterial production abilities, morphological variations and ammonium liberations of *Fischerella* sp. collected from Paddy-fields of Iran.

Solorzano, L.. 1969. Determination of ammonia in natural waters by the phenol hypochlorite method. Limnology. Ocenography. 14, 799-801.

Soltani, N., Khavari-Nejad, R., Tabatabaie, M., Shokravi, SH., Valiente, E.F.. 2005b. Variation of Nitrogenase Activity, photosynthesis and pigmentation of cyanobacterium *Fischerella ambigua* strain FS18 under different irradiance and pH. World Journal of Microbiology and Biotechnology. Vol 22, No6, 571-576.

Archive of SID

www.SID.ir

Stal, J.S.. 1995. Physiological ecology of cyanobacteria in microbial mats and other communities.- New Phytol 131, 1-32.

Suda, S., Watanabe, M.M., Otsuka, S., Mahakahant, A., Yongmanitchai, W., Nopartnraporn, N., Liu, Y and Day, J.G .2002. Taxonomic revision of water–bloom-forming species of *Oscillatorioid* Cyanobacteria , International Journal of systematic and Erolutionary Microbiology , PP:1577-1594.

Archive of SID

www.SID.ir