مقاله کوتاه

تعیین زمان دو تا شدن (Doubling time) و رسم منحنی رشد دو گونه *Nostoc muscorum* و *Nostoc ellipsosporum* با استفاده از تکنیک اندازه گیری کلروفیل در محیط کشت آلن

بهاره نوروزی و علی احمدی مقدم

دانشگاه شهید باهنر کرمان، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی

تاریخ دریافت: ۸٤/۰۷/۰٤ تاریخ پذیرش: ۸۵/۰٤/۱۷

چکیده

سیانوباکتریهای دیازوتروف که معمولاً در همه جا وجود دارند نقش مهمی را در تثبیت نیتروژن و در نتیجه در نگهداری و باروری خاک بازی می کنند. چرخه زندگی سیانوباکترهای هتروسیست دار با توجه به نقش آنها در تثبیت ازت بویژه در شالیزارهای ایران مطالعات ناچیزی انجام شده است. در تحقیق حاضر نمونه برداری، جداسازی و خالص سازی و شناسایی سیانوباکترهای هتروسیست دار از شالیزارهای استان گلستان انجام شد و نتایج نشان داد که دو گونه *Nostoc ellipsosporum* و *Nostoc muscorum* فراوان ترین آنها هستند. بمنظور رسم منحنی رشد، هر گونه بصورت مجزا در محیط کشت مایع آلن کشت داده شدند و منحنی رشد با استفاده از غلظت کلروفیل رسم و زمان دو تاشدن هر گونه محاسبه گردید. نتایج حاصل از رسم منحنی رشد و محاسبه زمان دو تا شدن نشان داد که گونه *N. ellipsosporum* دارای فاز لگاریتمی و زمان دو تا شدن طولانی تری نسبت به *N. muscorum* است که می تواند باعث افزایش مدت فعالیت نسبت به گونه دیگر و در نتیجه تثبیت مقدار بیشتر ازت شود.

واژهای کلیدی: منحنی رشد، زمان دو تا شدن، *Nostoc moscorum* ، محیط کشت آلن، *Nostoc ellipsosporum*.

سیانوباکتریها با قابلیت تثبیت نیتروژن (٤) بعنوان اصلاح کنندگان خاک و کود بیولوژیک امروزه در بیوتکنولوژی مطرح می شوند. نتایج بسیاری از مطالعات و بررسیها نشان می دهد که شالیزار بعنوان بهترین زیستگاه برای رشد و پرورش سیانوباکتریهای هتروسیست دار است (۷). با توجه به توان بالقوه سیانوباکتریهای هتروسیست دار در تثبیت ازت اتمسفری، اهمیت این موجودات در تأمین ازت شالیزارها و افزایش محصول برنج که غذای اصلی نیمی از جمعیت جهان است آشکار می شود (۱۰). با توجه به اینکه عمل تثبیت ازت در سیانوباکتریهای هتروسیست دار در شرایط عاری از اکسیژن انجام می شود غرقابی بودن خاکهای شالیزار و در نتیجه کاهش اکسیژن باعث می شود تا آنزیم نیتروژناز فعال شود و فعالیت تثبیت نیتروژن در این شرایط به حداکثر برسد. در چنین شرایطی میانگین تثبیت ازت هوا سالانه در حدود ۳۰ کیلوگرم در هکتار باشد ولی گزارشهایی از تثبیت ازت هوا بین ٦۰ الی ۹۰ کیلوگرم در سال نیز داده شده است (۲۰). بعضی از محققین نشان داده اند که تثبیت نیتروژن حاصل ازجلبکها پس از رشد آنها و تجزیه سلولها در دسترس برنج قرار می گیرد و باعث افزایش محصول برنج می شوند. بهمین دلیل به سیانوباکتریها در اصطلاح کود حیاتی (Biofertilizer) نیز می گویند (۱۲ و ۱۱). تعیین منحنی رشد جلبکهای سبز-آبی محاسبه فاز لگاریتمی و زمان دو تا شدن آنها و تأثیر این زمان در تکثیر آنها کاملا از نظر اقتصادی توجیه پذیر

Archive of SID
www.SID.ir

است، لذا تعیین گونه مناسبتر با فاز لگاریتمی طولانی تر و زمان دو تا شدن بیشتر برای استفاده بعنوان کود بیولوژیک از اهمیت بسزایی برخوردار است. مطالعات انجام شده در ایران در این زمینه بسیار کم است لذا نیاز به تحقیقات بیشتر در زمینه سیانوباکتریها در کشور محسوس است. بهمین دلیل در این تحقیق سعی شد قدمی در راه پیشبرد این هدف برداشته شود.

در پاییز ۱۳۸۳ از خاکهای مختلف پنج شالیزار استان گلستان نمونه برداری بر طبق روش رانگاسوآمی (۱۸) انجام شد. جهت کشت نمونه های خاک، محیط کشت BG-11 که نمکهای نیتروژن از آن حذف شده بود مورد استفاده قرار گرفت. بعد از آماده سازی محیط کشت pH در حد ۷/۱ تنظیم و سپس اتوکلاو گردید (۳ و۵). سپس پتریدیشهای محتوی اینوکولوم سیانوباکتریها در داخل اتاقک رشد با شدت نوری ۱۵۰۰ تا ۲۰۰۰ لوکس و دمای ۲۸ درجه سانتی گراد قرار داده شد (۱۴و۱۳). بمنظور جداسازی و خالص نمودن بهر لیتر محیط کشت مایع BG-11ده گرم آگار نیز اضافه شد. شناسایی بر طبق کلیدهای شناسایی پرسکات (۱۷)، آناگنوستیدیس و کومارک (۲)، دسیکاچاری (۹)، آناند (۳)، استاینر (۲۱)، ریپکا و همکاران (۱۹)، سنترا (۲۰) انجام شد. در میان بیست گونه شناسایی شده دو گونه *N . ellipsosporum* و *N. muscorum* که در تمام مناطق نمونه برداری شده حضور فراوانی داشتند انتخاب شدند (۱۵، ۱۶). بمنظور آگاهی از سیکل سلولی *Nostoc muscorum* , *Nostoc ellipsosporum* ، منحنی رشد این دو گونه با استفاده از غلظت کلروفیل رسم گردید. در واقع غلظت کلروفیل با توجه به تحقیقات انجام شده در این زمینه (۸) شاخصی مناسب برای تعیین تراکم سیانوباکتریها در طول سیکل زندگی آنهاست. در این روش، دو نمونه انتخابی در محیط کشت مایع آلن (۱) کشت داده شدند. از هر نمونه ۳ تکرار انتخاب و بطور جداگانه به محیط کشت اضافه شد. جهت اندازه گیری غلظت کلروفیل، از روز اول تلقیح ، بصورت یک روز در میان مقدار کلروفیل در نمونه های جلبکی اندازه گیری شد. جذب کلروفیل بصورت کمی با خواندن جذب محلول حاصل در طول موج ٦٦٣ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتری Cary 50 با استفاده از یک ضریب جذب ویژه ۷۸/۷٤ بر اساس فرمول زیر تعیین شد (۸). A=£ c*b* (A= جذب خوانده شده، ضریب جذب £=۷۸/۷٤ گرم بر لیتر. سانتیمتر، b=۱ سانتیمتر و c =غلضت کلروفیل) می باشد. زمان دوتا شدن دو گونه با استفاده از فورمولهای زیر و با توجه به (شکلهای ۱- الف وب) محاسبه گردید (٦).

$K = \ln (N_2/N_1)/ (t_2/t_1)$ (نرخ رشد)

$Div.\ day^{-1} = K/ \ln_2$ (تقسیم به ازای هر روز)

$1/Div.day^{-1}$ = (زمان دو تا شدن) که در آن N_2 و N_1 میزان غلظت کلروفیل که خود شاخصی از تراکم سیانوباکتریها در ابتدا و انتهای فاز لگاریتمی یعنی در روزهای۵ =t_1 و۱۱=t_2 برای گونه *Nostoc muscorum* و ۳ =t_1 و ۱۱ =t_2 برای گونه *Nostoc ellipsosporum* است.

زمان دو تا شدن *Nostoc muscorum* بر اساس فرمول فوق بصورت زیر بدست آمد:

$K= \ln (۰/٦۱۲۵ \div ۰/۱۷) / ٦ = ۰/۲۱۳٦$ $Div.\ day^{-1}= ۰/۲۱۳٦ \div ۰/٦۹۳= ۰/۳۰۸۲۲$

$N_2 = ۰/٦۱۲۵$ زمان دو تا شدن = ۱÷ ۰/۳۰۸۲۲= ۳/۲٤٤

$N_1= ۰/۱۷$ $Ln_2= ۰/٦۹۳$

زمان دو تا شدن *Nostoc ellipsosporum* بر اساس فرمول فوق بصورت زیر بدست آمد:

$K= \ln (/٦۲۸۲ \div ۰/۱۲) / ۸ = ۰/۲۰٦۹$ $Div.\ day^{-1}= ۰/۲۰٦۹ \div ۰/٦۹۳= ۰/۲۹۹۸$

$N_2 = ۰/٦۲۸۲$ زمان دو تا شدن = ۱÷ ۰/۲۹۸۸= ۳/۳۳

$N_1= ۰/۱۲$ $Ln_2= ۰/٦۹۳$

Archive of SID

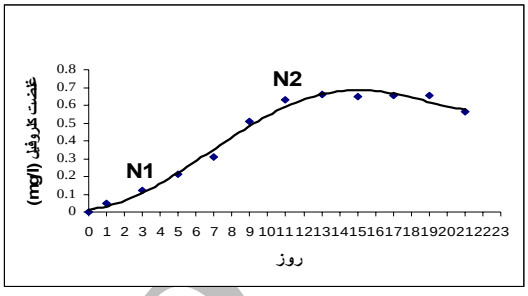
www.SID.ir

اعداد بدست آمده میانگین سه تکرار برای هر گونه در سه ارلن ۵۰۰ میلی لیتری جداگانه می باشند. نتایج حاصل از منحنی رشد *N. ellipsosporum* نشان داد که این گونه در فاصله روز ۱ تا ۳ در فاز تأخیری و از روز ۳ تا ۱۱ در فاز لگاریتمی و از روز ۱۱ تا ۱۹ در فاز ثابت است (شکل۱- الف) درحالیکه نتایج حاصل از منحنی رشد *N. moscorum* نشان داد که این گونه در روزهای ۱ تا ۵ در فاز تأخیری و از روز ۵ تا ۱۳ در فاز لگاریتمی و در روزهای ۱۳ تا ۱۹ در فاز ثابت است و از این روز به بعد وارد فاز مرگ می شود (شکل۱- ب). نتایج حاصل از اندازه گیری زمان دو تا شدن نشان داد که *N. muscorum* با زمان کمتر (G=3.244) نسبت به *N. ellipsosporum* (G=3.33) فاز لگاریتمی کوتاهتر و فاز تأخیری طولانی تری دارد. با توجه به نتایج حاصل از ترسیم منحنی رشد و محاسبه زمان دو تا شدن در دو گونه *N.ellipsosporum* و *N.muscorum* نتیجه می شود که گونه *N.ellipsosporum* فاز تأخیری کوتاهتر و فاز لگاریتمی طولانی تری و زمان دو تا شدن بیشتری نسبت به گونه *N.muscorum* دارد که این امر نشان می دهد که گونه *N.muscorum* با زمان دو تا شدن کمتر و نرخ رشد بیشتر سریعتر فاز لگاریتمی خود را به پایان رسانده و وارد فاز ایستایی می شود. همینطور بدلیل اینکه این دو گونه از محیط کشت جامد به مایع منتقل شدند فاز تأخیری در هر دو مشاهده می شود و زمان فاز تأخیری که سلولهادر آن واجد آنزیمهای لازم برای استفاده از مواد غذایی می شوند و همینطور خود را با شرایط جدید وفق دهند در گونه *N.muscorum* طولانی تر است. اما در گونه *N.ellipsosporum* این دوره با سرعت بیشتری خاتمه می یابد و وارد فاز لگاریتمی می شود. با توجه به توان بالقوه سیانوباکتریها در تثبیت ازت اتمسفری و اثر فوق العاده آن در افزایش محصول برنج که غذای نیمی از جمعیت جهان را بخود اختصاص می دهد، تحقیقات بسیار زیادی در مورد تاکسونومی این موجودات در هند انجام شده است (۲۱) و نتایج نشان داده است که سیانوباکتریهای هتروسیست دار بیشترین فلور جلبکی را در شالیزارها تشکیل می دهند. استفاده از سیانوباکتریها بعنوان کود بین سالهای ۱۹۶۰ تا ۱۹۷۲ اولین بار در هندوستان ابداع شد (۱۱). حال با توجه به نتایج حاصله می توان انتظار داشت که *N.muscorum* با زمان تقسیم کمتر تعداد بیشتری سلول حاصل از تقسیم در شالیزار آزاد می کند که در صورت تأمین شرایط محیطی احتمال تولید بیومس بیشتر وجود دارد و در عین حال زودتر به مرحله مرگ می رسد و مواد ازت دار آن به محیط رها می شود. از این رو پیشنهاد می شود که *N.muscorum* با فاز لگاریتمی کوتاهتر و فاز تأخیری طولانی تر بعنوان کود حیاتی ارجح نسبت به گونه *N. ellipsosporum* در شالیزارها مورد استفاده قرار گیرد. با این حال وجود فاز لگاریتمی طولانی تر در *N. ellipsosporum* می تواند باعث افزایش مدت فعالیت نسبت به گونه دیگر و در نتیجه مقدار بیشتری ازت شود. بنابراین گونه *N.ellipsosporum* در دوره کمی طولانی تر می تواند بعنوان کود برتر مورد استفاده قرار گیرد. بدیهی است که قدرت تکثیر و میزان کلروفیل از جمله توانایی های مؤثر جلبکها در رشد و غلبه در اکوسیستم هستند. با اینحال شناخت نیازهای غذایی، شرایط محیطی رشد و مهمتر از همه میزان فعالیت آنزیمها و دانستن این امر که آیا کدامیک از این گونه ها در این مرحله ازت بیشتری تولید می کند از موارد لازم برای تحقیق بیشتر در راستای درک کاملتر از فعالیت این میکروارگانیسمها است. از آنجا که تحقیق در زمینه فعالیتهای فیزیولوژیک و بررسی شرایط اکولوژیک این میکروارگانیسمها انجام نشده است تحقیق حاضر می تواند شروع مناسبی در این امر باشد. مسلم است که با ادامه کار درمحیطهای دیگر و بر روی گونه های مختلف زمینه مساعدی در راستای استفاده از این میکرو ارگانیسمهای مفید در سیستمهای زراعی و غیره بوجود خواهد آمد. باید ذکر شود که در کشورهای آسیایی و بویژه هندوستان تحقیقات زیادی در این زمینه صورت گرفته است، بعنوان مثال استفاده از این میکروارگانیسمها

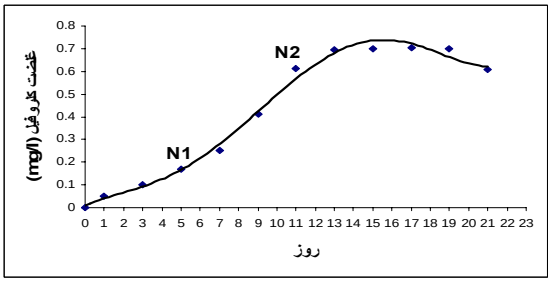
Archive of SID

www.SID.ir

پس از تعیین میزان توانایی آنها در تثبیت ازت از مصرف بی رویه کود های ازتی بویژه در شالیزارها جلوگیری کرده است (۳).



شکل ۱ (الف): منحنی رشد *Nostoc ellipsosporum* با استفاده از اندازه گیری غلظت کلروفیل در طول ۲۱ روز. هر عدد میانگین سه تکرار است. N_2 و N_1 میزان غلظت کلروفیل است، که خود شاخصی از تراکم سیانوباکتریها در ابتدا و انتهای فاز لگاریتمی یعنی در روزهای t_1= ۳ و t_2= ۱۱ برای گونه *Nostoc ellipsosporum* است.



شکل ۱ (ب): منحنی رشد *Nostoc moscorum* با استفاده از اندازه گیری غلظت کلروفیل در طول ۲۱ روز. هر عدد میانگین سه تکرار است. که در آن N_2 و N_1 میزان غلظت کلروفیل که خود شاخصی از تراکم سیانوباکتریها در ابتدا و انتهای فاز لگاریتمی یعنی در روزهایt_1= ۵ و t_2=۱۱ برای گونه *Nostoc muscorum* است.

منابع

1– Allen, M. B and Arnon D. I., 1955. Studies on nitrogen fixing blue green algae, PL,Physiol. 30: 366-372.

2– Anagnostidis, K and Komarek, J., 1999. Modern approach to the classification system of cyanophytes. 4-Nostocales. Arch. Hydrobiol. /Suppl., Algological Studies, 50- 53, pp. 248-317.

3– Anand, N., 1990. Hand book of blue-green algae. Printed by Gajendra singh Gahlot at shiva offset press, India. 173pp.

4– Angadi, S. B., 1990. Algal floristic composition of some cultivated soils of Karnataka state India. *Perspectives phycology*. Today and tomorrows printers and Publishers, New Delhi, Indian, pp. 417-421.

5– Angadi, S. B., 1990. Cyanobacteria culture media. Available on internet at: http://faculty.clintoncc.suny.edu/faculty/Michael.Gregory/files/Bio%20102/Bio%20102%20Laboratory/Prokaryotes/Procaryotes.htm

6– Angadi, S. B ., 2004. Algal growth phases including determination of the growth rate and population doubling time. Available on internet at: http://www.marine.csiro.au/microalgae/methods/growth%20rate.htm.

7– Bharati, S.G., 1990. Floristic studies on soil Algae. A new concept based on physico-chemical factors. *Perspectives phycology*. Today and tomorrows printers and publishers, pp. 411-415.

8– Codd, G. A. K. Okabe, and W. D. P. Stewart., 1980. Cellular compartmentation of photosynthetic and respiratory enzymes in the heterocystous cyanobacteria *Anabaena cylindrical*. Microbial. 124: 149-154.

9– Desikhachary, T. V., 1959. Cyanophyta. pp. 185-565. Indian council of agricultural research publishers.

10– Fogg, G. E ., Stewart, W. D. P ., Fay, P and Walsby, A. E., 1973. The Blue-green Algae. Academic press-London and New York. A subsidiary of Harcourt Brace Jovanovich publishers, pp. 311-342.

11– Hashem, M. A., 1998. Ecophysiological studies of Cyanobacteria in paddy soils of Bangladesh. Kluwer Academic Publishers, printed in great Britain, 39, pp. 333- 344.

12– Hegde, G. R and Malammanavar, S. G., 1988. Some Noteworthy rice fields algae of Dharwad Karnataka state. *Phykos*, 27, pp.4-7.

Archive of SID
www.SID.ir

13– Kashic, B.D., 1987. Laboratory methods for Blue-green Algae. Associated Publishing co, New Delhi, pp: 17-63.

14– Lobban, C. S., Chapman, D. J and Kremer, B. P., 1988. Experimental physiology. A laboratory manual. Cambridge University press, pp.35-46.

15– Nowruzi B and Ahmadi Moghadam A., 2006. IRAN. Journ. BOT. Institute of agriculture.11(2): 171-174.

16– Nowruzi B., 2005. Ecological study of cyanobacteria in three ecosystems paddy fields, wheat fields and a forest in Golestan province. M. Sc thesis. University of shahid Bahonar. Kerman. Iran. pp. 52- 62.

17- Prescott, G. W., 1962. Algae of western Great Lakes area. pp. 521-550. Cranbrook instt of sci publ.18: Rangaswamy, G., 1996. Agricultural microbiology.-Asia Publishing House, Bombay. pp.54-76.

19– Rippka, R, Josette, D, Waterbury, J.B, Herdman, M & Roger, Y. S., 1979. Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of Cyanobacteria. Journal of General Microbiology, 111: 1-61.

20– Santra, S. C., 1993. Biology of Rice fields blue green algae. Daya publishing House, 184 pp.

21– Stanier, R. Y and Cohen-Bazire, G., 1977. Phototrophic Prokaryotes: The Cyanobacteria. Annual Review of Microbiology, pp. 225-274.

Short paper

Determination of generation time and growth curve of *Nostoc muscorum* and *Nostoc ellipsosporum* by measuring of chlorophyll in modified Allen's medium

Nowruzi B. & Ahmadi Moghadam A.

Biology Dept., Faculty of sciences, Shahid Bahonar University, Kerman, Iran

Abstract:

Diazotrophic cyanobacteria, which are nearly found everywhere, have important role in N fixation and play a vital role in improving and establishing the soils. Little studies have been carried out on the life cycle of heterocystous cyanobacteria in paddy fields of Iran. Sampling, purification and identification of cyanobacteria from paddy fields of Golestan province was carried out and showed that *Nostoc ellipsosporum* and *N.muscorum* are the most abundant species of the sites. To draw the growth curves of the species each was grown on Allen culture medium separately and their growth curves were drawn according to their chlorophyll amounts. Doubling time of each species was also calculated based on the chlorophyll data. The results showed that *N.ellipsosporum* has longer doubling time and logarithmic phase than *N.muscorum*. Hence, it can have longer activity and fix more N in the ecosystem.

Key words: growth curve, generation time, *Nostoc moscorum*, *Nostoc ellipsosporum*, modified Allen's medium.

Archive of SID

www.SID.ir