

شناسایی مولکولی و مطالعه فیزیولوژیک و مورفولوژیک سیانوباکتری *Nostoc sp. ISC101* تحت تیمارهای مختلف نفت خام

فریا امیرلطیفی*^۱، ندا سلطانی^۲، سارا سعادت‌مند^۳، شادمان شکروی^۴، مهروز دزفولیان^۵

^۱ دانشجوی دکتری گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران

^۲ دانشیار گروه میکروبیولوژی نفت، پژوهشکده علوم پایه کاربردی جهاد دانشگاهی، تهران

^۳ استادیار گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران

^۴ دانشیار گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرگان، گرگان

^۵ استادیار گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج، کرج

تاریخ پذیرش: ۹۱/۱۲/۱۴

تاریخ دریافت: ۹۱/۸/۷

چکیده

نفت یک فرآورده سمی برای سیستم‌های بیولوژیک و یکی از آلوده‌کننده‌های اصلی محیط‌زیست محسوب می‌شود. میکروارگانیسم‌های تجزیه‌کننده هیدروکربن‌های نفتی معمولاً در محیط‌های دریایی یافت می‌شوند. در این بررسی اثر نفت خام بر بیومتری، ریخت‌شناسی، ساختار سلولی و پاسخ‌های فیزیولوژیک سیانوباکتری *Nostoc sp. ISC101* مورد آزمایش قرار گرفت و شناسایی مولکولی توسط بررسی توالی جزئی ژن 16S rRNA انجام پذیرفت. پس از خالص‌سازی، نمونه در محیط کشت مایع BG11₀ تحت تیمارهای مختلف نفت خام (شاهد، ۱، ۲/۵، ۵ و ۷ درصد) قرار گرفت. بررسی‌های مورفولوژیک و ساختاری توسط میکروسکوپ نوری و الکترونی (SEM) انجام گردید. نتایج نشان داد که تفاوت معنی‌داری در اندازه سلول‌های رویشی و هتروسیست‌ها با تغییرات نفت مشاهده نشد. سنجش کلروفیل و فیکوبیلی پروتئین‌ها در فاز لگاریتمی و با روش طیف‌سنجی انجام شد. نتایج فیزیولوژیک حاکی از آن بود که میزان رشد با افزایش میزان نفت خام افزایش یافت، بیشترین میزان رشد در تیمار ۱ درصد نفت خام مشاهده شد. میزان کلروفیل در نمونه شاهد بیشترین مقدار بود. میزان فیکوبیلی پروتئین‌ها در شاهد و تیمارها اختلاف معنی‌داری نداشت. نتایج این تحقیق نشان داد که نمونه بقای خود را در تیمارهای اعمال شده حفظ نموده و ترکیبات نفتی برای آن سمی نبود.

واژگان کلیدی: آلودگی نفتی، بیومتری، ساختار سلول، فیزیولوژی، مورفولوژی، نوستوک، 16S rRNA.

مقدمه

می‌شود و از طریق این دریای محصور و کم عمق منتقل می‌شود حادث‌تر است (Al Hasan et al., 2001). نفت خام یک ترکیب پیچیده از هزاران ترکیباتی است که می‌تواند بالقوه توسط گروه بزرگی از میکروارگانیسم‌های خاک و آب تجزیه شود. ریزجلبک‌ها تجزیه‌کننده‌ی هیدروکربن‌ها هستند و بخش مهمی از اکوسیستم خاک را تشکیل می‌دهند که بخش قابل توجه

آلودگی نفتی از جدی‌ترین آلودگی‌های زیست محیطی شناخته شده است. مشکل آلودگی نفتی به ویژه در مناطق تولیدکننده نفت مانند خلیج فارس که حدود ۶۰ درصد نفت انتقالی جهان در آن تولید

*نویسنده مسئول: amirlatifi100@yahoo.com

سمیت آن نیز مهم است. مطالعات زیادی روی اثر هیدروکربن‌های نفتی نامحلول در زی توده‌ی فیتوپلانکتون‌های طبیعی در قسمت شمالی اقیانوس هند انجام شده است و نشان داده شد که اثر هیدروکربن‌های نفتی نامحلول بستگی به گونه و ماهیت هیدروکربن‌های نفتی دارد (Megharaj et al., 2000). برخی از سیانوباکتری‌ها دارای توانایی تجمع دادن هیدروکربن‌ها در را دارند. مطالعات با میکروسکوپ الکترونی نشان داد که سلول‌های این سویه‌ها هیدروکربن را در فضای بین تیلاکوئید خود ذخیره می‌کنند. این سویه‌ها نمی‌توانند هیدروکربن‌های تجمع یافته را تجزیه کنند این کار را باکتری‌هایی که معمولاً در همکاری با سیانوباکتری‌ها در محیط‌های طبیعی موجودند انجام می‌دهند (Al-Hasan et al., 2001).

سیانوباکتری *Nostoc sp. ISC101* که در این بررسی مورد توجه قرار گرفته است، از سیانوباکتری‌های دارای هتروسیست می‌باشد. به دلیل داشتن هتروسیست می‌تواند عمل تثبیت ازت مولکولی را در این اندام‌های خاص انجام دهد. ویژگی‌های مورفولوژیک مثل مورفولوژی ریشه، سلول‌های رویشی، هتروسیست‌ها و آکانت‌ها، شکل کلنی، شکل سلول انتهایی، وجود غلاف و وزیکول‌های گازی، همچنین سیکل زندگی از ویژگی‌هایی هستند که در بررسی‌های مورفولوژیک مورد استفاده قرار می‌گیرند (Rajaniemi et al., 2005) و از عکس‌های الکترونی SEM برای بررسی ساختار سلولی سیانوباکتری‌ها استفاده می‌شود (Diestra et al., 2005). همچنین در خصوص اثر نفت خام بر پاسخ‌های فیزیولوژیک، Gamila و Ibrahim (۲۰۰۴) و Diestra و همکاران (۲۰۰۷) بر روی رشد بررسی‌هایی انجام داده‌اند. نتایج این آزمایشات نشان می‌دهد که تیمار کشت‌های جلبکی با نفت خام باعث افزایش سرعت رشد و تولید زیاد بیومس جلبکی می‌شود. Singh و همکاران (۲۰۱۲) ارتباط دما و اثر آن را در تولید

(۲۷ درصد) زی توده‌ی میکروبی خاک است (Megharaj et al., 2000). رفتار این میکروارگانیسم‌ها مقاومت و بردباری بالای این موجودات را در شرایط افراطی محیطی نشان می‌دهد (Diestra et al., 2007). گذشته از آسیب‌های جدی که هیدروکربن‌های نفتی به محیط وارد می‌کنند بررسی اثرات سمی آنها روی میکروارگانیسم‌های خاک و فعالیت آنها اهمیت دارد. اثرات هیدروکربن‌های نفتی به ویژه نفت خام در جلبک‌های دریا و آب شیرین مطالعه شده (Kumar et al., 2009; Agbozu and Opuene, 2009; Atlas and Bragg, 2009; Dubey et al., 2011)، ولی اطلاعاتی درباره‌ی اثرات نفت روی جمعیت سیانوباکتری‌ها و جلبک‌ها در اکوسیستم‌های خاک در ایران و سطح بین‌المللی کمتر منتشر شده است.

میکروارگانیسم‌ها از لحاظ متابولیسمی توانایی استفاده از منابع هیدروکربنی را داشته بنابراین می‌توانند در این خاک‌های آلوده زندگی کنند. آلودگی‌ها معمولاً به‌عنوان منابع انرژی برای این میکروارگانیسم‌ها هستند. عمل پاکسازی آلودگی‌ها توسط موجودات زنده که زیست‌پالایی نام دارد، فرایندی است که از توانایی‌های کاتابولیکی ارگانیسم‌های زنده برای تقویت سرعت حذف آلودگی‌ها استفاده می‌کند. زیست‌پالایی از طریق استفاده از پتانسیل‌های متابولیکی موجود در میکروارگانیسم‌ها و عملکردهای کاتابولیکی یا از طریق معرفی ژن‌های کد کننده این عملکردها به تجزیه دست پیدا می‌کند (Ilynia et al., 2003). شواهد نشان می‌دهد گونه‌های متفاوت جلبک‌های سبز-آبی به‌طور طبیعی هم ترکیبات آروماتیک هیدروکربن‌ها و هم زئوبیوتیک‌ها را تجزیه می‌کنند. این فرایند با اکسیداسیون آن‌ها به اجزایی با وزن مولکولی کمتر یا با تغییر آن به اجزایی با قطبیت بیشتر انجام می‌پذیرد (Gamila et al., 2003).

پاسخ جلبک‌ها به هیدروکربن‌های نفتی می‌تواند متفاوت باشد. همچنین ماهیت هیدروکربن‌ها در میزان

فیکوبیلی پروتئین‌ها مورد بررسی قرار دادند. این مطالعه بیان کرد که خوگیری به دما همراه با سازگاری رنگی (CCA) و تولید فیکوسیانین، آلفوفیکوسیانین و فیکواریترین در برخی از سیانوباکتری‌های مقاوم به دما از جمله *Oscillatoria* sp. N9DM بود.

هدف از این تحقیق مطالعه بررسی اثر ترکیبات نفتی بر تغییرات بیومتری، مورفولوژیک، ساختاری و فیزیولوژی سیانوباکتری *Nostoc* sp. ISC101 جداسازی شده از سواحل شمال ایران بود.

مواد و روش‌ها

سیانوباکتری *Nostoc* sp. ISC101 از سواحل شمال ایران جمع‌آوری و بعد از انتقال به آزمایشگاه بر روی محیط‌های کشت جامد کشت داده شد. پس از پاساژهای متوالی کلنی‌های خاص مربوط به نمونه جداسازی و بر روی پلیت‌های مجزا قرار داده شدند (Andersen, 2005). سپس نمونه‌ها به محیط کشت تخصصی مایع BG110 منتقل شدند. تیمارهای مختلف نفت خام (شاهد ۱، ۲/۵، ۵ و ۷ درصد) در محیط کشت BG110 فاقد منبع کربنی به ریزجلبک‌ها به طور جداگانه داده شد و تحت شرایط مطلوب کشت از نظر دما 30 ± 2 درجه سانتی‌گراد، نور ۶۰ میکرومول فوتون بر متر مربع بر ثانیه، pH ۷ و هوادهی قرار گرفتند.

نرخ رشد با روش Soltani و همکاران (۲۰۰۶) اندازه‌گیری شد. برای تعیین غلظت کلروفیل، سلول‌ها با متانول خالص استخراج شد و بعد از ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، توسط روش طیف سنجی در طول موج ۶۶۵ nm اندازه‌گیری شدند (Marker, 1972). فیکوبیلی پروتئین‌ها بعد از شوک اسمزی استخراج شد و به روش طیف سنجی در فاز لگاریتمی در طول موج‌های ۶۱۵، ۶۱۰ و ۵۶۲ نانومتر اندازه‌گیری شدند (Bermejo et al., 2002).

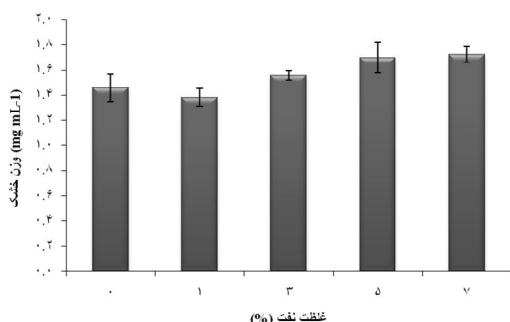
از ابتدای تیماردهی، وضعیت کلنیزاسیون و بیومتری نمونه‌ها بصورت متوالی مورد بررسی قرار گرفت. بدین‌منظور اسلایدهای نیمه دائمی از تیمارها تهیه شده و آنالیزهای مورفولوژیک با بهره‌گیری از این اسلایدها انجام گرفت.

برای مطالعه مورفولوژی ریشه‌ها و سلول‌ها از یک میکروسکوپ نوری دوربین‌دار Olympus CX 40 و برای آنالیز تصاویر از نرم‌افزار Olympus Dp Soft version 4.0 software استفاده شد. در بررسی‌های ریخت‌شناسی و بیومتری، شکل کلنی‌ها و رنگ آن‌ها، ابعاد سلول‌های رویشی و سلول‌های تخصصی مانند هتروسیست‌ها و شکل آن‌ها، شکل سلول انتهایی و وجود یا عدم وجود غلاف مورد بررسی قرار گرفت (Gugger and Hoffmann, 2004).

برای تهیه عکس با استفاده از میکروسکوپ الکترونی (SEM)، نمونه‌ها به مدت ۴ ساعت در ۲/۵ درصد گلوটারآلدهید فیکس شدند، و در بافر فسفات (PBS) شستشو داده شدند. سپس نمونه‌ها ساتریفوتژ شده و در غلظت‌های متوالی الکل (۱۰، ۳۰، ۵۰، ۷۰، ۹۰ و ۱۰۰ درصد) دهیدراته شدند. در نهایت، تمام نمونه‌ها بر روی قطعات فلزی گذاشته شده و با لایه‌ای از طلا پوشش داده شدند (Diestra et al., 2007).

تکنیک‌های مولکولی نیز برای شناسایی سویه *Nostoc* sp. ISC101 استفاده شد. به‌منظور شناسایی مولکولی نمونه مورد نظر، ابتدا DNA از نمونه تازه با استفاده از کیت استخراج DNA ژنومی شرکت فرمنتاز (K0512) استخراج شد (Nübel et al., 2000). تکثیر ژن 16S rRNA به وسیله PCR در نمونه ذکر شده برای اولین بار و با استفاده از دو گروه پرایمر رفتی PA (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3') و برگشتی PH (5'-AAG GAG GTG ATC CAG CCG CA-3') صورت گرفت. برای نشان دادن DNA از ژل الکتروفورز افقی ژل آگارز ۱/۲ درصد حاوی رنگ DNA safe stain الکتروفورز گردید و نتیجه

اندازه‌گیری وزن خشک استفاده شد.



شکل ۱. مقایسه وزن خشک سیانوباکتری *Nostoc sp.* ISC101 در تیمارهای مختلف نفت خام.

طبق نمودار وزن خشک نمونه، نه تنها وجود نفت خام بازدارنده رشد نبوده بلکه تیمارهای نفت خام موجب افزایش رشد نمونه بود (شکل ۱). ماکزیمم وزن خشک جلبک در غلظت ۷ درصد نفت خام در روز ۱۲ تلقیح به میزان 1.725 mg mL^{-1} ، در حالی که کمترین وزن خشک 1.383 mg mL^{-1} در غلظت ۱ درصد نفت خام بوده که این اختلاف بین نمونه شاهد و غلظت ۱ درصد با دیگر تیمارها معنی‌دار بوده است ($P < 0.05$).

الکتروفورز با استفاده از دستگاه Gel Documentation مورد عکسبرداری قرار گرفت. محصول PCR جهت تعیین توالی به شرکت ژن فناوران ارسال گردید. پس از تعیین توالی ژنی ناحیه مورد نظر، توالی ژنی حاصل با انجام عملیات BLAST با توالی ژن‌های ثبت شده در بانک‌های جهانی ژن مقایسه و درصد تشابه ژنی نمونه مورد نظر با نمونه‌های موجود در بانک ژن تعیین گردید. در توالی‌های ژن 16S rRNA ۹۷ درصد شباهت به *Nostoc* مشاهده شد. توالی‌های نوکلئوتیدی شرح داده شده در این بررسی به NCBI تحت شماره الحاقی NCBI: JX972170 ارائه شد.

اطلاعات بدست آمده توسط نرم‌افزارهایی مانند Excel، SPSS 18 برای تجزیه و تحلیل نتایج مورفولوژی و پایگاه اطلاعاتی NCBI برای تجزیه و تحلیل نتایج مولکولی مورد استفاده قرار گرفت. آنالیزهای آماری بر اساس سه تکرار در هر آزمون و آنالیز واریانس یک‌طرفه ANOVA و طرح Tukey انجام گرفت.

نتایج

در این پژوهش به منظور بررسی میزان رشد سیانوباکتری در تیمارهای مختلف نفت خام از

جدول ۱. میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی در غلظت‌های مختلف نفت در سیانوباکتری *Nostoc sp.* ISC101

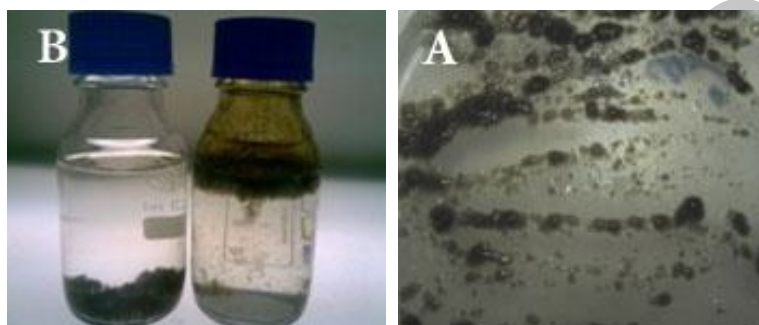
فیکوبیلی پروتئین‌ها	آلوفیکوسیانین	فیکوسیانین	فیکواریتین	کلروفیل	نفت خام (درصد)
$0.782 \pm 0.69a$	$0.47 \pm 0.08a$	$0.109 \pm 0.15a$	$0.380 \pm 0.34a$	$4.782 \pm 1.24b$	شاهد
$0.762 \pm 0.71a$	$0.190 \pm 0.17a$	$0.172 \pm 0.17a$	$0.189 \pm 0.18a$	$0.535 \pm 0.22a$	۱
$1.074 \pm 1.66a$	$0.255 \pm 0.34a$	$0.241 \pm 0.42a$	$0.194 \pm 0.31a$	$0.709 \pm 0.49a$	۲/۵
$0.639 \pm 0.94a$	$0.127 \pm 0.13a$	$0.126 \pm 0.22a$	$0.123 \pm 0.21a$	$0.477 \pm 0.20a$	۵
$0.353 \pm 0.61a$	$0.090 \pm 0.16a$	$0.057 \pm 0.10a$	$0.057 \pm 0.10a$	$0.454 \pm 0.12a$	۷

حروف یکسان نشان دهنده عدم تفاوت معنی‌دار است. داده‌ها $X \pm SE$ را نشان می‌دهند.

میزان کلروفیل با میزان $4.782 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ در نمونه شاهد مشاهده شد. با توجه به نتایج آنالیز آماری اختلاف معنی‌داری بین مقدار کلروفیل نمونه شاهد با تیمارهای

جدول ۱، نتایج حاصل از اندازه‌گیری محتوای کلروفیل را در نمونه شاهد و نمونه‌های تحت تیمار با غلظت‌های مختلف نفت خام نشان می‌دهد. بیشترین

مشاهده شدند (شکل A). همانطور که در شکل B نشان داده شده است، بعد از انتقال به محیط مایع و تیمار نفت خام توده‌های سیانوباکتری در نمونه شاهد (بدون تیمار نفتی) در پایین ظرف قرار گرفتند در صورتی که در نمونه ۷ درصد نفت خام در زیر لایه نفتی قرار گرفتند. این پدیده نشان دهنده تمایل بالای این سیانوباکتری برای استفاده و تجزیه هیدروکربن‌های نفتی به‌عنوان منبع کربن بود.



شکل ۲. تشکیل کلنی سیانوباکتری *Nostoc sp. ISC101* در محیط کشت جامد (A) و رشد نمونه در محیط کشت مایع (B) در نمونه شاهد (سمت چپ) و نمونه تیمار ۷ درصد نفت خام (سمت راست)

می‌باشد و وضعیت هتروسیست‌ها بیشتر بینابینی بوده، اما در برخی ریشه‌ها هتروسیست به صورت رأسی نیز دیده شد. شکل ۳ راست، ریشه‌های نمونه *Nostoc sp. ISC101* را در اطراف قطرات ترکیبات نفتی نشان می‌دهد. همچنین شکل هتروسیست در تمامی تیمارها بیضوی و استوانه‌ای بود. همچنین این نمونه دارای غلاف موسیلاژی بوده که در عکس‌های الکترونی SEM در نمونه شاهد و ۷ درصد نفت خام به وضوح دیده شد (شکل ۴).

۱، ۲/۵، ۵ و ۷ درصد نفت خام مشاهده شد. همچنین این جدول مقادیر رنگی‌های فیکوبیلی پروتئینی را در غلظت‌های مختلف نفت خام نشان می‌دهد. همانطور که در جدول ۱ ملاحظه می‌گردد، اختلاف معنی‌داری بین شاهد و تیمارها در این خصوص وجود نداشت. مشخصات ریخت‌شناسی این سویه در جدول ۲ و شکل‌های ۴-۲ نشان داده شده است. کلنی‌ها در محیط کشت جامد به شکل توپ‌های کوچک قهوه‌ای رنگ

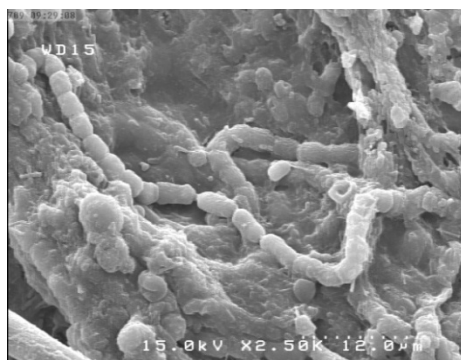
همانطور که در شکل ۳ مشاهده می‌شود شکل ریشه‌ها بصورت منحنی و بیشتر بصورت انفرادی قرار گرفتند. شکل سلول‌های انتهایی هم در نمونه شاهد و هم در نمونه‌های تیمار شده گرد تا بیضوی دیده شد و کاملاً از دیگر سلول‌های رویشی قابل تشخیص بود. شکل سلول‌های رویشی در نمونه شاهد استوانه‌ای و به شکل مستطیل، و در نمونه‌های تیمارهای نفتی، استوانه‌ای و مربعی بود. رنگ ریشه‌ها و سلول‌های رویشی در همه تیمارها به رنگ سبز دیده شد. این نمونه دارای سلول‌های تخصص یافته هتروسیست



شکل ۳. شکل سلول‌های سیانوباکتری *Nostoc* sp. ISC101 در نمونه شاهد (سمت چپ) و تیمار ۷ درصد نفت خام (سمت راست) توسط میکروسکوپ نوری

نفت خام نسبت به نمونه شاهد اختلاف معنی‌دار نداشت. همچنین تخریب و انحطاط نسبی در دیواره سلول‌های رویشی در تیمار ۷ درصد نفت خام مشاهده نشد.

تکنیک میکروسکوپ الکترونی (SEM) نیز برای تعیین تغییرات مورفولوژیک استفاده شد. تصاویر بدست آمده توسط SEM نشان می‌دهد که طول و عرض سلول‌های رویشی در نمونه ۷ درصد تیمار



شکل ۴. شکل سلول‌های سیانوباکتری *Nostoc* sp. ISC101 در نمونه شاهد (چپ) و تیمار ۷ درصد نفت خام (راست) توسط میکروسکوپ الکترونی SEM

عرض هتروسیست‌ها بدست آمد. نتایج در مورد ابعاد هتروسیست‌ها نشان داد گرچه طول هتروسیست‌ها در تیمار ۷ درصد نفت خام بیشتر و در تیمار ۱ درصد کمتر بود و همچنین عرض هتروسیست‌ها در نمونه ۲/۵ درصد نفت خام بیشتر و در تیمار ۱ درصد نفت خام کمتر بود، ولی این اختلاف در ابعاد سلول‌های رویشی و هتروسیست‌ها معنی‌دار نبود ($P < 0/05$).

همانطور که در جدول ۲ نشان داده شده است طول سلول‌های رویشی در تیمار ۵ درصد نفت خام $9/97 \pm 1/4$ میکرومتر و در تیمار ۷ درصد نفت خام $8/83 \pm 1/73$ میکرومتر بود. بیشترین عرض سلول‌های رویشی در تیمار ۱ درصد ($6/65 + 0/45$ میکرومتر) و کمترین در نمونه شاهد ($5/47 + 0/59$ میکرومتر) بود. ولی بطورکلی اختلاف معنی‌داری بین شاهد و تیمارها مشاهده نشد. نتایج مشابهی در خصوص طول و

جدول ۲. مشخصات مورفولوژیک سیانوباکتری *Nostoc sp. ISC101* تحت تیمارهای مختلف نفت خام

نفت خام (درصد)					مشخصات مورفولوژیک
۷	۵	۲/۵	۱	شاهد	
انفرادی، منحنی	انفرادی، منحنی	انفرادی، منحنی	انفرادی، منحنی	انفرادی، منحنی	مورفولوژی ریشه
+	+	+	+	+	غلاف موسیلاژی
گرد	گرد	گرد	گرد، بیضوی	گرد تا نیمه گرد	شکل سلول انتهایی
استوانه‌ای، مربع، سبز	استوانه‌ای، مربع، سبز	استوانه‌ای، مربع، سبز	استوانه‌ای، مربع، سبز	استوانه‌ای، سبز	وضعیت سلول‌های رویشی
۶۰۰±۰/۵۱a	۶۰۶±۱/۳۱a	۶۵۳±۰/۷۴a	۶۶۶±۰/۴۵a	۵/۴۷±۰/۵۹a	عرض سلول‌های رویشی (میکرومتر)
۸/۳۸±۱/۷۳a	۹/۹۷±۱/۴۰a	۸/۶۰±۱/۱۶a	۹/۸۰±۱/۵۹a	۹/۵۱±۰/۹۳a	طول سلول‌های رویشی (میکرومتر)
بیضوی، بینابینی و رأسی	بیضوی، بینابینی و رأسی	بیضوی، بینابینی و رأسی	بیضوی، بینابینی و رأسی	بیضوی، بینابینی و رأسی	وضعیت هتروسیست
۸/۷۷±۱/۰۰a	۸/۲۰±۰/۷۵a	۹/۲۱±۱/۱۹a	۷/۳۹±۰/۶۶a	۸/۹۶±۱/۸۴a	عرض هتروسیست (میکرومتر)
۱۲/۹۱±۲/۱۲a	۱۱/۱۵±۱/۱۶a	۱۱/۹۳±۱/۹۳a	۹/۴۰±۱/۴۲a	۱۱/۰۵±۲/۱۲a	طول هتروسیست (میکرومتر)

حروف یکسان نشان‌دهنده عدم تفاوت معنی‌دار است. داده‌ها $X \pm SE$ را نشان می‌دهند.

بحث

ساختار و فراساختار سیانوباکتری‌ها. این صفات با درخت‌های فیلوژنتیکی مشتق شده از توالی مولکولی نیز تطابق دارد. اولین تحقیقات مولکولی، رابطه قابل قبولی را بین طبقه‌بندی فنوتیپی و فیلوژنتیکی نشان نمی‌دادند. ولی درخت‌های تکاملی اخیر بر اساس توالی ژن 16S rRNA، رابطه مناسبی را با تاکسون‌های سیانوباکتریایی نشان می‌دهند. توالی‌های استخراج شده در مرحله ابتدایی مشابهت‌هایی نشان داد. سویه *Nostoc spongiaeforme* ۷۷ درصد با سویه *Nostoc entophyllum* شباهت داشته است.

اطلاعات بیشتری با استفاده از آزمایشات فیزیولوژیکی بدست آمد. گزارش‌های زیادی از اثرات هیدروکربن‌های نفتی بر سیانوباکتری‌ها وجود دارد (Diestra et al., 2007). محیط کشت فاقد کربن برای آزمایشات استفاده شد. نتایج فیزیولوژی نشان‌دهنده انعطاف‌پذیری فیزیولوژیکی نمونه بود. تیمار با نفت

مطالعات صورت گرفته بر روی سیانوباکتری‌های بومی ایران که در مناطق آلوده به نفت زندگی می‌کنند بسیار محدود می‌باشد (Soltani et al., 2012). این مطالعات کمتر به بررسی‌های همه جانبه نگر مانند این تحقیق پرداخته است و این کمبود در مورد جنس *Nostoc* نیز صدق می‌کند. تاکنون تاکسون تاکسونومی جنس *Nostoc* برپایه مشخصات مورفولوژیک و فیزیولوژیک بوده است. تنوع مورفولوژیک زیاد گونه‌های *Nostoc* با توجه به چرخه زندگی و شرایط محیطی آنها مانع شناسایی صحیح گونه‌های منحصر به فرد آن می‌شود (Teneva et al., 2012). لذا استفاده از مارکرهای مولکولی همراه با بررسی‌های پلی‌فازیک برای مطالعه و شناسایی گونه‌های جنس *Nostoc* ضروری به نظر می‌رسد. امروزه در استفاده از صفات مورفولوژیک از مشخصه‌های دیگری نیز بهره‌برداری می‌شود، مانند

که تمام سیانوباکتری‌ها فتواتوتروف هستند بسیاری از آنها می‌توانند از اجزای کربن زیستی غیر قابل انحلال برای رشد هتروتروفی یا میکسوتروفی در نور استفاده کنند (Al Hasan et al., 2001).

مشخصات مورفولوژیک مانند مورفولوژی ریشه، شکل و ابعاد سلول‌های رویشی، هتروسیست‌ها و آکاین‌ها و وضعیت قرارگیری آن‌ها، شکل سلول انتهایی، وجود یا عدم وجود غلاف و سیکل زندگی آن‌ها از جمله ویژگی‌های مورفولوژیک هستند که برای تغییرات مورفولوژیک در سیانوباکتری‌های خانواده Nostocales مانند *Nostoc*, *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Trichormus*, *Calothrix*, *Rivularia* مورد استفاده قرار گرفته است (Pan et al., 2005; Berrendero et al., 2008; Sili et al., 2011).

توجه به اجتماعات در محیط مایع و آرایش خاص آن‌ها در تیمارهای مختلف نفت خام بیانگر این مسئله است که سیانوباکتری‌ها به‌عنوان موجودات هوشمند در محیط‌های شاهد و تیمار نفت خام از آرایش خاص خود برخوردار هستند (شکل ۲). طریقه قرارگیری اجتماعات ریشه‌ها در محیط شاهد، به‌صورت پخش شدن در کف ظرف بود و در نمونه تیمارهای نفت خام ریشه‌ها به‌صورت مجتمع در زیر لایه نفتی قرار گرفتند. این حالت قرارگیری ریشه‌های جلبکی در کنار قطرات نفت، به منظور استفاده از این قطرات نفتی به عنوان منابع هیدروکربنی برای انجام متابولیسم سلولی است. زیرا برخی از سیانوباکتری‌ها قادرند از ترکیبات آلی اضافی از طریق هتروتروفی یا فتوهتروتروفی استفاده کنند. این نتایج با نتایج سایر محققان بر روی رفتار مشابه توسط سیانوباکتری‌های بومی ایران تطابق دارد (سلطانی و همکاران، ۱۳۸۷).

دقت در بررسی میکروسکوپی و شکل ریشه‌ها (شکل ۳) در شرایط کنترل و تیمار ۷ درصد نفت خام نشان داد که آرایش ریشه‌ها در تیمار ۷ درصد نفت خام

خام منجر به افزایش نرخ رشد و همچنین تولید بیومس جلبکی بیشتری شد. این نتایج مطابق نتیجه Kumar و همکاران (۲۰۰۸) می‌باشد که اظهار داشتند تمام سلول‌های تیمار داده شده در محیط کشت رشد کردند، این می‌تواند به دلیل تحریک تغییرات باشد که سلول‌ها را قادر به تنظیم تغییرات در شرایط فیزیولوژیکی متفاوت کرده است. میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی به غلظت‌های نفت خام بستگی دارد.

Antai و Esseini (۲۰۰۵) دلیل کاهش فیکوبیلی پروتئین‌ها را در جلبک‌ها تحت شرایط تنش بررسی کردند. آن‌ها بیان کردند که پاسخ به تنش در جلبک‌ها نشان دهنده میزان پروتئین است در حالی که شرایط تنش محیطی می‌تواند سنتز پروتئین‌های ویژه‌ای را در جلبک‌ها القا کند. همچنین میزان نرخ رشد در غلظت‌های متفاوت نفت خام نشان دهنده توانایی مصرف CO_2 و هیدروکربن‌ها توسط سیانوباکتری *Nostoc sp.* ISC101 می‌باشد. البته انواع مختلف نفت خام اثرات متمایزی بر روی سیانوباکتری‌ها دارند (Llirios et al., 2008). نتایج ما با نتایج Gamila و Ibrahim (۲۰۰۴) مطابقت دارد که بر روی اثر غلظت ۱ درصد نفت خام بر رشد جلبکی مطالعه کردند. آنها نتیجه گرفتند که تیمار محیط کشت جلبک با نفت خام منجر به افزایش رشد همراه با تولید بالای بیومس جلبکی شد. Gaur و Singh (۱۹۹۰) آزمایشات رشد تحت تیمارهای نفت خام را انجام دادند. آنها نتیجه گرفتند که نفت بازدارنده رشد سویه مورد مطالعه بود. همچنین Gaur و Kumar (۱۹۸۱) نتایج مشابهی را از اثر نفت خام بر ۴ جلبک تک سلولی منتشر کردند.

در سیانوباکتری‌ها فیکوبیلی پروتئین‌ها که به سطح استرومایی غشای تیلاکوئیدی متصل‌اند به عنوان گیرنده‌های اولیه نوری برای فتوسیستم II عمل می‌کنند. ساختار و عملکرد فیکوبیلی پروتئین‌ها در پاسخ به تنش‌های گوناگون متفاوت است. در حالی

نه تنها برهم نخورد بلکه شکل استوانه‌ای در سلول‌های رویشی و شکل بیضوی در هتروسیست‌ها حفظ شد. نکته مهم این است که نمونه در شرایط تیمار نفت خام از نظر مورفولوژی ریشه، شکل سلول‌های رویشی و هتروسیست‌ها تغییر خاصی نکرد و این نشان از قابلیت سازگاری در تیمارهای مختلف نفت خام را داشت. این مشاهدات با نتایج Rajaniemi و همکاران (۲۰۰۵) بر تکامل مورفولوژیک چند سیانوباکتری از خانواده Nostocales مطابقت می‌کند. علاوه بر این عکس‌های میکروسکوپ الکترونی (SEM) نیز این نتایج را تأیید کرد.

نتایج آنالیزهای بیومتریک نشان داد که در نمونه شاهد و نمونه تیمارهای نفت خام از نظر ابعاد سلول‌های رویشی و هتروسیست از نظر آماری تفاوت معنی‌داری وجود نداشت ($P < 0/05$) و نمونه در محیط بدون ترکیبات نفتی و محیط‌های نفت خام الگوی رفتاری یکسانی نشان داد و نمونه دارای ثبات شکل و ابعاد بود که یکی از صفات مهم محسوب می‌شود.

فلسفه وجود یا عدم وجود غلاف پیچیده است و با زمان و شرایط محیطی تغییر می‌کند. در حالت‌هایی که مشاهده می‌شود می‌توان این صفت را ناشی از خوگیری با شرایط محیطی یا تأثیرپذیری از محیط دانست که در بررسی‌های تاکسونومیک توجیه به این نکته حائز اهمیت است.

نتیجه‌گیری نهایی

در این تحقیق، عدم وجود سمیت ناشی از هیدروکربن‌های نفت برای سیانوباکتری *Nostoc* sp. مورد مطالعه توسط آزمایشات مورفولوژیک و فیزیولوژیک نشان داده شد. نتایج حاکی از افزایش رشد در تیمار ۷ درصد نفت خام، این نظر را تأیید می‌کند که این سیانوباکتری قادر به استفاده از ترکیبات هیدروکربنی نفت برای متابولیسم خود بود. شناسایی

مولکولی نمونه‌ها توسط بررسی توالی جزئی ژن 16s rRNA انجام پذیرفت. همچنین تصاویر میکروسکوپ نوری و الکترونی حاکی از حفظ بقای شکل سلول و تمامیت آن در تیمارهای نفت خام بود. مشاهدات مذکور این نظر را تأیید می‌کند که سیانوباکتری مورد مطالعه قادر است زندگی هتروتروفی داشته و از هیدروکربن‌های نفتی به عنوان منبع کربن استفاده کند. لذا از آنجایی که نفت یک فرآورده سمی برای سیستم‌های بیولوژیک و یکی از آلوده‌کننده‌های اصلی محیط زیست محسوب می‌شود، نتایج حاصل از این آزمایش می‌تواند بیانگر پتانسیل این سیانوباکتری برای استفاده از آن به‌عنوان کاندید تجزیه زیستی آلودگی‌های نفتی در مناطق آلوده باشد.

منابع

- سلطانی، ن.، بافته‌چی، ل. و شکروی، ش. (۱۳۸۷).
تأثیر هیدروکربن‌های نفتی بر میزان بقا و رنگیزه‌های سیانوباکتری‌های جدا شده از مناطق آلوده به نفت آبادان. فصلنامه پژوهش‌های علوم گیاهی دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرگان. جلد اول. شماره ۹. صفحات ۳۶-۲۹.
- Agbozu, I.E. and Opuene, K. (2009). Occurrence and diagenetic evolution of perylene in the sediments of Oginigba Creek, Southern Nigeria. *International Journal of Environmental Research*. 3 (1): 117-120.
- Al-Hassan, R.H., Khanafer, M., Eliyas, M. and Radwan, S.S. (2001). Hydrocarbon accumulation by picocyanobacteria from Persian Gulf. *Journal of Applied Microbiology*. 91: 533-540.
- Andersen, R.A. (2005). *Algal culturing techniques*. Elsevier Academic Press.
- Atlas, R. and Bragg, J. (2009). Bioremediation of marine oil spills: when and when not the Exxon Valdez experience. *Microbial Biotechnology*. 2(2): 213-221.
- Bermejo, R.N.R., Alva' rez-Pez, J.M., Acie'n Fernandez, F.G. and Molina Grima, E. (2002). Recovery of Pure B-phycoerythrin

- from the microalga porphyridium cruentum. *Journal of Biotechnology*. 93: 73-85.
- Berrendero, E., Elvira, P. and Pilar, M. (2008).** Genetic and morphological characterization of *Rivularia* and *Calothrix* (Nostocales, Cyanobacteria) from running water. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 58: 447-460.
- Diestra, E., Esteve, I., Castell, O. and Solé, A. (2007).** Ultrastructural changes in *Microcoleus chthonoplastes* growing in the presence of crude oil. Applications for ecological studies. *Modern Research and Educational Topics in Microscopy*. 453-460.
- Diestra, E., Sole, A., Marti, M., Garcia de Oteyza, T., Grimalt, J.O. and Esteve, I. (2005).** Characterization of an oil-degrading *Microcoleus* consortium by means of confocal scanning microscopy, scanning electron microscopy and transmission electron microscopy. Applications for ecological studies. *Scanning*. 27: 176-180.
- Dubey, S.K., Dubey, J., Mehra, S., Tiwari, P. and Bishwas, A.J. (2011).** Potential use of cyanobacterial species in bioremediation of industrial effluents. *African journal of Biotechnology*. 10(7): 1125-1132.
- Essien, J.P. and Antai, S.P. (2005).** Negative effects of oil spillage on beach microalgae in Nigeria. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. 21: 567-573.
- Gamila, H.A. and Ibrahim, M.B. (2004).** Algal bioassay for evaluating the role of algae in bioremediation of crude oil. *Environmental Contamination and Toxicology*. 73: 883-889.
- Gamila, H.A., Ibrahim, M.B.M. and Abd El-Ghafar, H.H. (2003).** The Role of cyanobacteria isolated strains in the biodegradation of crude Oil. *International Journal of Environmental Studies*. 60: 435-44.
- Gaur, J.P. and Kumar, H.D. (1981).** Growth response of four micro-algae to three crude oils and furnace oil. *Environmental Pollution. SerA* 25: 77-85.
- Gaur, J.P. and Singh, A.K. (1990).** Growth, photosynthesis and nitrogen fixation of *Anabaena doliolum* exposed to assam Crude Extract. *Bulletin Environmental Contamination and Toxicology*. 44: 494-500.
- Gugger, M.F. and Hoffmann, L. (2004).** Polyphyly of the true branching cyanobacteria (Stigonematales). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 54(2): 349-357.
- Ibrahim, I.B.M. and Gamila, H.A. (2004).** Algal bioassay for evaluating the role of algae in bioremediation of crude oil: I- Isolated strains. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 73: 971-978.
- Ilyina, A., Castillo Sanchez, M.I., Villarreal Sanchez, J. A., Ramirez Esquivel, G. and Candelas Ramirez, J. (2003).** Isolation of soil bacteria for bioremediation of hydrocarbon contamination. *Becht Mock. YH-TA. CEP*. 44(1): 88-91.
- Kumar, S., Habib, K. and Fatma, T. (2008).** Endosulfan induced biochemical changes in nitrogen – fixing cyanobacteria. *Science of Total Environment*. 403: 130-138.
- Kumar, S., Muralitharan, G. and Thajuddin, N. (2009).** Screening of hypersalin cyanobacterium, *Phormidium tenue*, for the degradation of aromatic hydrocarbons: naphthalene and anthracene. *Biotechnology Letters*. 150: 1997-2008.
- Llirós, M., Gaju, N., Oteyza, T.G., Grimalt, J.O., Esteve, I. and Martínez-Alonso, M. (2008).** Microcosm experiments of oil degradation by microbial mats. II. The changes in microbial species. *Science of the total environment*. 39: 39-49.
- Marker, A.F.H. (1972).** The use of acetone and methanol in the estimation of chlorophyll in the presence of phaeophytin. *Freshwater Biology*. 2: 361-385.
- Megharaj, M., Singleton, I., McClure, N.C. and Naidu, R. (2000).** Influence of petroleum hydrocarbon contamination on microalgae and microbial activities in a long-term contaminated soil. *Environmental Contamination and Toxicology*. 38: 439-445.
- Nübel, U., Garcia-Pichel, F., Clavero, E. and Muyzer, G. (2000).** Matching molecular diversity and Eco physiology of benthic cyanobacteria and diatoms in communities along a salinity gradient. *Environmental Microbiology*. 2: 217-226.
- Pan, X., Chang, F., Kang, L., Li, G., Li, D., Liu, Y., Shen, Y. and Wei, Z. (2008).** Morphological characteristics and phylogenetic relationship of *Anabaena* species from Lakes Dianchi and Erhai, China. *Hydrobiologia*. 614: 353-362.
- Rajaniemi, P., Hrouzek, P., Kastovska, K., Willame, R., Rantala, A., Hoffmann, L., Komarek, J. and Sivonen, K. (2005).** Phylogenetic and morphological evaluation of the genera *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Trichormus* and *Nostoc* (Nostocales, Cyanobacteria). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 55: 11-26.
- Sili, C., Mascalchi, C. and Ventura, S. (2011).** Evolutionary differentiation of the sister cyanobacterial genera *Cyanospira* Florenzano,

- Sili, Pelosi et Vincenzini and *Anabaenopsis* (Woloszyńska) Miller in response to extreme life conditions. *Fottea* (Czech Phycological Society). 11(1): 107-117.
- Singh, N.K., Parmar, A., Sonani, R.R. and Madamwar, D. (2012).** Isolation, identification and characterization of novel thermo tolerant *Oscillatoria* sp. N9DM: Change in pigmentation profile in response to temperature. *Process Biochemistry*.
- Soltani, N., Baftechi, L., Dezfulian, M., Shokravi, Sh. and Alnajjar, N. (2012).** Molecular and morphological characterization of oil polluted microalgae. *International Journal of Environmental Research*. 6 (2): 481-492.
- Soltani, N., Khavari-Nejad, R., Tabatabaie, M., Shokravi, Sh. and Valiente, E.F. (2006).** Variation of nitrogenase activity, photosynthesis and pigmentation of cyanobacterium *Fischerella ambigua* strain FS18 under different irradiance and pH. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 22 (6): 571-576.
- Teneva, L., Stoyanov, P., Mladenov, R. and Dzhambazov, B. (2012).** Molecular and phylogenetic characterization of two species of the genus *Nostoc* (Cyanobacteria) based on the *cpcB*-IGS-*cpcA* locus of the phycocyanin operon. *Journal of Bio Science and Biotechnology*. 1(1): 9-19.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>

Archive of SID