

بررسی خوگیری سیانوباکتری *Haplosiphon* sp. FS 44 به شرایط توام دی اکسید کربن و pH

*شادمان شکروی^۱، مریم صفایی کتولی^۲، سارا جرجانی^۱

۱. گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرگان، گرگان

۲. باشگاه پژوهشگران جوان، گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرگان، گرگان

دریافت: ۱۳۸۹/۵/۱۳ - پذیرش: ۱۳۸۹/۷/۴

چکیده

در این پژوهش، هدف بررسی خوگیری سیانوباکتری *Haplosiphon* sp. FS 44 به شرایط توام دی اکسید کربن و اسیدیته و قلیابیت بوده است. این گونه در شالیزارها و زمین‌های کشاورزی استان گلستان وجود دارد، ولی از نظر اکوفیزیولوژیک ناشناخته می‌باشد. نمونه خالص در محیط کشت مایع BG-110 وارد شد. تیمارهای دی اکسید کربن شامل عدم تلقیح و تلقیح دی اکسید کربن (در حد هوادهی) بود. در هر تیمار دی اکسید کربن، سه تیمار اسیدی (pH 5)، خنثی (pH 7) و قلیایی (pH 9)، اعمال گردید. بقاء، رشد، نرخ رشد ویژه، محتوای کلروفیل، فیکوسیائین، آلفیکوسیائین، فیکواریترین، به همراه برون ریزش آمونیم، فراوانی و بیومتری هتروسیست در هر کدام از تیمارهای ترکیبی اعمال شده بررسی گردیدند. نتایج نشان داد که سویه مذکور همانند دیگر سویه‌های استیگونماتالز و نوستوکالز بررسی شده، در شرایط اسیدی رشد نمی‌کند. نرخ رشد در شرایط خنثی و قلیایی در شرایط محدودیت دی اکسید کربن دارای اختلاف معنی‌دار نیست، ولی بکارگیری دی اکسید کربن سبب افزایش معنی‌دار نرخ رشد ویژه می‌گردد. سیستم فیکوبیلی زومی این گونه فاقد فیکواریترین است و در شرایط قلیایی ساختار خود را چه در بخش مرکزی و چه میله‌ای کامل می‌کند. در شرایط قلیایی فراوانی هتروسیست‌ها و ابعاد آن‌ها به بیشترین مقدار می‌رسند و با فعالیت نیتروژنازی همبستگی مثبت دارند. هتروسیست‌ها در روز چهارم آرایش استوانه‌ای و در روز پنجم پس از تلقیح آرایش تحت استوانه‌ای دارند. روی هم رفته، نتایج بدست آمده، این سویه را در کنار سیانوباکتری‌های دیگر از نظر بکارگیری به عنوان کود زیستی مستعد نشان می‌دهد.

کلمات کلیدی: خوگیری، سیانوباکتری، شالیزار، گلستان، هاپالوسیفون

مقدمه

آن‌ها محسوب می‌شود (شکروی و همکاران، ۱۳۸۱).
شرایط غرقابی سبب تغییر در محتوای دی اکسید کربن شالیزار می‌گردد و این امر همراه با دیگر تنش‌ها از

سیانوباکتری‌ها در شالیزارها تحت تاثیر مجموعه‌ای از تنش‌ها قرار دارند که دی اکسید کربن از عمده‌ترین

علاوه بر این، مورفولوژی خاص این نوع سیانوباکتری ها و شکل ریشه های آن ها، سبب گسترش آن ها در خاک زمین های کشاورزی و شالیزارها می گردد که به همراه برون ریزش طیف وسیعی از ترکیبات آنتی میکروبی، سبب حفظ و نگهدای خاک و نیز ضد عفونی کردن آن می شود (سلطانی و همکاران، ۱۳۸۴) مجموع این ویژگی ها سبب شده است تا بررسی سیانوباکتری های استیگونماتال در استان گلستان، از نظر بیوتکنولوژی کشاورزی ارزشمند نشان دهند (Anand et al., 1990).

بدین ترتیب نشان ویژه سازی این موجود از جنبه های مختلف و از جمله فیزیولوژی و اکوفیزیولوژی می تواند راهگشای استفاده های کاربردی آتی باشد. با توجه به اینکه برنج در غذای روزانه مردم ایران، حائز جایگاهی خاص است و از این نظر این گیاه در کشاورزی ایران به نوعی گیاه زراعی استراتژیک محسوب می شود و نیز با عنایت به مسأله ضرورت استفاده از کودهای بیولوژیک در آینده، مسأله بقاء و رشد موجود در شرایط نسبتاً مشابه شالیزار می تواند برای ابعاد کاربردی مفید باشد (شکروی و همکاران، ۱۳۸۱).

در ایران تاکنون در رابطه با نشان ویژه سازی سیانوباکتری های جنس هاپالوسیفون پژوهش متمرکزی انجام نگرفته است (www.Irandoc.ac.ir). بررسی هایی بر روی خواص آنتی باکتریال بر روی برخی گونه های سیانوباکتری استیگونماتال انجام گرفته که گونه ای از *Hapalosiphon* را شامل می شود (Soltani et al., 2005). در سیاه بالایی و همکاران (مکاتبه شخصی) این جنس در شالیزارهای استان گلستان معرفی گردیده است. در مورد سایر سیانوباکتری های استیگونماتال پژوهش هایی انجام شده است که به حوزه اکوفیزیولوژیک هم مربوط می شود. در شکروی و همکاران (۱۳۸۴) نمونه ای از *Stigonema* از نظر مورفولوژی و در شکروی و همکاران (۱۳۸۶) از نظر تاکسونومی مورد توجه قرار گرفته اند.

جمله شوری، نور و تاریکی می بایست توسط سیانوباکتری تحمل شده و منجر به از بین رفتن آنها نگردد. نمونه های توانمند از نظر بیوتکنولوژی کشاورزی، از جمله کود بیولوژیک در شالیزار، می بایست توانمندی هایی داشته باشند که تحمل به تغییرات شوری یکی از آنهاست (Boussiba, 1988).

سیانوباکتریای شالیزار در محدوده ای از تغییرات اسیدیته و قلیابیت قرار دارند که حتی می تواند به صورت روزانه در محیط شالیزار ظاهر گردد (شکروی و همکاران، ۱۳۸۱). غرقابی شدن شالیزارها سبب میشود که میان دی اکسید کربن و بی کربنات نوعی تعادل ایجاد گردد. عامل تعیین کننده این تعادل اسیدیته محیط است (Stal, 1995). وجود مکانیسم تراکمی فعال در بررسی های انجام شده بر روی گونه هایی از *Nostoc* (امیرلطیفی و همکاران، ۱۳۸۶) و *Fischerella* (شکروی و همکاران، ۱۳۸۱) نشان داده شده است. در شرایطی که محدودیت دی اکسید کربن آزاد در شرایط غرقابی وجود داشته باشد، القا شدن این مکانیسم برای حفظ حیات موجود ضروری است و به این لحاظ نمونه هایی که از نظر کاربردی (کود زیستی) توانمند محسوب می شوند می بایست قابلیت انعطاف در القای این مکانیسم و منابع لازم برای تامین انرژی آن را داشته باشند (شکروی و همکاران، ۱۳۸۷).

سیانوباکتر *Haplosiphon* sp. FS 44 از زمهره نمونه هایی است که از شالیزارهای استان گلستان گزارش شده است (شکروی و همکاران، ۱۳۸۴، سیاه بالایی و همکاران، ۱۳۸۶ در منابع نیامده). سیانوباکتری های استیگونماتال، به دلیل توانمندی در ابعاد متفاوت، می تواند در بیوتکنولوژی کاربردی ریزجلبک ها مورد توجه جدی قرار گیرد (شکروی و همکاران، ۱۳۸۱). توانمندی این گروه از سیانوباکتری ها از نظر برون ریزش ترکیبات نیتروژنه، از جمله آمونیم، سبب کارایی ذاتی آن ها به عنوان کود زیستی بویژه در استان گلستان که قطب کشاورزی است، می باشد (شکروی و ساطعی، ۱۳۸۲).

شادمان شکروی و همکاران

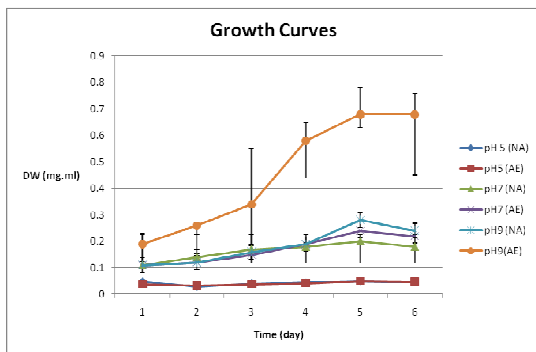
مواد و روش‌ها

نمونه‌های خاک از استان گلستان جمع آوری شدند. کشت نمونه‌های خاک مطابق روش کشت سیانوباکتری‌های خاکزی انجام گرفت (Kaushik, 1987). پس از تشکیل کلنی، جدا سازی و کشت‌های بعدی، سیانوباکتری *Haplosiphon sp.* به صورت خالص تهیه گردید (Kaushik, 1987). شناسایی مقدماتی و شناسایی در حد گونه با استفاده از Geitler (۱۹۳۲)؛ Desikachary (۱۹۵۹)؛ Prescott (۱۹۶۲)؛ Anagnostidis & Komarek (۱۹۹۰) و John و همکاران (۲۰۰۳) انجام گرفت. نمونه پس از شناسایی با عنوان *Haplosiphon sp.* FS 44 کد گذاری گردید و در موزه جلبکی پژوهشکده علوم پایه کاربردی جهاد دانشگاهی دانشگاه شهید بهشتی ثبت گردید. کشت در محیط مایع BG-110 و در شرایط نوری ۲ میکرو مول کوانتا بر متر مربع بر ثانیه (که توسط لامپ فلورسانت تأمین می‌گشت)، دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد و pH ۸ انجام گرفت (Soltani et al., 2006). برای توازن اسیدیته از ۲۵ میکرومولار HEPES استفاده گردید (Soltani et al., 2006) بررسی‌های فیزیولوژیک در ارلن‌های با حجم ۵۰۰ میلی‌لیتر محتوی ۳۰۰ میلی‌لیتر سوسپانسیون انجام شد. کشت‌ها به مدت ۱ ساعت هم زده شده و سپس به محفظه روشنایی منتقل گردیدند. پیش از تلقیح نمونه به مدت ۴۸ ساعت جهت ایجاد سازگاری وارد محیط کشت مایع شد. بررسی اولیه تیمارهای اسیدیته در شرایط سه گانه اسیدی، خنثی و قلیایی انجام گرفت (۹٫۷، ۵ pHs). بافرهای بکار رفته علاوه بر بافر فسفات، HEPES, MES, Tris بودند. تیمارهای دی‌اکسید کربن و بررسی مکانیسم تراکمی در شرایط محدودیت دی‌اکسید کربن (بدون هوادهی) و محدودیت نسبی (هوادهی) انجام گرفت (Poza Carion et al., 2001). رشد اساس وزن خشک (سلطانی و همکاران، ۱۳۸۴) اندازه گرفته شد. سنجش کلروفیل پس از استخراج با متانول با روش Marke (۱۹۷۲) انجام گرفت. فیکوبیلی پروتئین‌ها بر اساس

بافته چی و همکاران (۱۳۸۰) رشد و وضعیت رنگیزه‌ای *Fischerella sp.* را در تناوب نوری ۱۲ ساعت مورد بررسی قرار داده‌اند. شکروی و همکاران (۱۳۸۲)، قابلیت رشد نمونه در شرایط نوری مداوم را مورد بررسی قرار داده‌اند. فعالیت نیتروژنازی یک سویه شناسایی نشده (در حد گونه) از سیانوباکتری *Fischerella* در شرایط توأم اسیدیته و شدت‌های نوری مورد بررسی قرار گرفته است (Soltani et al., 2006). تأثیر شوری و اسیدیته بر بقا و رشد گونه‌هایی از *Fischerella* و *Nostoc* توسط صفایی و همکاران (۱۳۸۶) و امیر لطفی و همکاران (۱۳۸۶) مورد بررسی قرار گرفته است. تأثیر تناوب‌های نوری بر رشد و فرکانس هتروسیست سیانوباکتریوم *Fischerella* توسط وکیلی و همکاران (۱۳۸۵) بررسی شده است. تأثیر توأم نور و دی‌اکسید کربن بر سیانوباکتریوم *Nostoc Sp.* (Shokravi et al., 2006) و بررسی منابع نیتروژن و شوری بر روی سیانوباکتریوم متعلق به راسته استیگونماتالز *Fischerella Sp.* (Soltani et al., 2007-2008) در شرایط آزمایشگاهی مورد مطالعه قرار گرفته است.

هدف از این آزمایش نشان ویژه‌سازی نمونه بررسی نشده *Haplosiphon sp.* FS 44 می‌باشد که تا کنون مورد توجه قرار نگرفته است. تراکم بالای این نمونه در زمین‌های کشاورزی و شالیزارهای استان گلستان (شکروی و همکاران، ۱۳۸۴) ایجاب می‌کند که این نمونه مورد ارزیابی دقیق اکوفیزیولوژیک قرار گیرد. به عنوان گام نخست، بقا و رشد نمونه در شرایط توأم دی‌اکسید کربن و اسیدیته و قلیابیت در این بررسی مورد توجه قرار گرفته است. تصور می‌شود بکارگیری بررسی‌های توأم و ترکیبی در آزمایشگاه نتایج واقع بینانه تری نسبت به زمانی که هر تیمار به صورت جداگانه اعمال شود بدست می‌دهد (Poza-Carion et al., 2001).

نمی‌کند. برون ریزش ترکیبات نیتروژنه از جمله آمونیوم از الگوی رشد پیروی می‌کند (جدول ۱)، ضمن اینکه میزان برون ریزش در *Haplosiphon* Sp. FS 44 نسبت به سیانوباکتری‌های دیگر استیگونماتال نظیر *Fischerella* sp. FS33 بالاتر می‌باشد. این افزایش بخصوص در شرایطی که محدودیت دی اکسید کربن وجود نداشته باشد قابل مشاهده است (سلطانی و همکاران، ۱۳۸۴). در خصوص نمونه‌های نوستوکال مانند *Nostoc* Sp. (شکری و همکاران، ۱۳۷۸)، میزان برون ریزش در شرایط محدودیت و عدم محدودیت دی اکسید کربن با *Haplosiphon* Sp. FS 44 فاقد اختلاف معنی‌دار می‌باشد (ANOVA $p < 0.05$).



شکل ۱: مقایسه رشد (وزن خشک) در سیانوباکتری *Haplosiphon* sp.

FS 4 در شرایط متفاوت متفاوت دی اکسید کربن و pH

NA: عدم هوادهی، AE: هوادهی، DW: وزن خشک

سیانوباکتریوم *Haplosiphon* sp. FS 44 دارای فیکواریترین نیست. از این نظر با دیگر سیانوباکتری‌های استیگونماتال بررسی شده نظیر *Fischerella* sp. FS33 (سلطانی و همکاران، ۱۳۸۴) و *Stigonema* sp. (شکری و همکاران، ۱۳۸۴) مشابه است. کارایی سیستم فیکوبیلی زومی در شرایط اسیدی نقصان می‌یابد و بخش آلفیکوسیانینی حذف می‌شود. تغییر محتوای دی اکسید کربن تأثیری در بازیابی آلفیکوسیانین ندارد (جدول ۲). بر عکس در شرایط خنثی و قلیایی، بخش مرکزی فیکوبیلی زوم خود را بازیابی می‌کند. این بخش در شرایط خنثی از نظر کمیت بالاتر است. رنگیزه‌های بخش میله‌ای

سلطانی و همکاران (۱۳۸۴)، به صورت در شیشه سنجش گردیدند. برون ریزش آمونیوم بُر، با روش Solorzano (۱۹۶۹) انجام گرفت. بررسی‌های مورفولوژیک با استفاده از نمونه‌های زنده و نمونه‌های تثبیت شده در مونت گلیسرین، انجام گرفتند (شکری و همکاران، ۱۳۸۴). برای مشاهده و تشخیص و اندازه گیری ابعاد هتروسیست از میکروسکوپ فلورسانس استفاده گردید. فرکانس هتروسیست بر اساس Kaushik (۱۹۸۷) محاسبه گردید. آنالیزهای آماری با استفاده از نرم افزارهای SPSS Ver 11 و Sigmaplot انجام شد.

نتایج

سویه مذکور در شرایط اسیدی با مشکل رشد مواجه می‌شود (شکل ۱). رشد نمونه در شرایط اسیدی نسبت به شرایط قلیایی و شرایط خنثی به طرز معنی‌دار کاهش می‌یابد (ANOVA $p < 0.05$) دقت در شکل ۱ نشان می‌دهد که در دو روز اول بعد از تلقیح، نمونه با رشد منفی مواجه است. هرچند از روز دوم به بعد نمونه در شرایط اسیدی قابلیت بازیابی دارد ولی رشد اندک است. افزایش غلظت دی اکسید کربن تأثیری بر عدم تمایل سویه به شرایط اسیدی ندارد (شکل ۱). در شرایط قلیایی در صورتی که غلظت دی اکسید کربن با محدودیت مواجه باشد، رشد به طرز معنی‌دار نسبت به شرایط خنثی افزایش می‌یابد. همین امر در مورد شرایط قلیایی که محدودیت دی اکسید کربن وجود داشته باشد، صادق است (ANOVA $p < 0.05$) به نظر می‌رسد که سیانوباکتری *Haplosiphon* sp. FS 44 در شرایطی که عدم محدودیت دی اکسید کربن وجود داشته باشد، در شرایط قلیایی بالاترین میزان رشد را نشان می‌دهد (شکل ۱).

مقایسه بیشینه نرخ‌های رشد ضمن تأیید مطلب فوق (جدول ۱)، نشان می‌دهد که در شرایط خنثی، تغییر در غلظت دی اکسید کربن، تأثیری بر رشد نمونه ندارد. عدم فعالیت و یا فعالیت نسبی مکانیسم تراکمی دی اکسید کربن در این سویه، در شرایط خنثی، رشد را تحریک

خود می‌رسد و اختلاف آن با سایر تیمارها معنی دار می‌باشد (نتایج نیامده است). با توجه به شرایط برون ریزش آمونیوم به نظر می‌رسد که برون ریزش ترکیبات نیتروژنه در شرایط قلیایی و تلقیح دی اکسید کربن به بیشینه خود می‌رسد که ناشی از فعالیت بالای نیتروژنازی است. در شرایط خنثی، ابعاد هتروسیست‌ها، همانند فراوانی آن‌ها از الگوی یکسان و قابل پیش بینی تبعیت نمی‌کنند (جدول ۳).

تغییر شکل ظاهری هتروسیست‌ها در این نمونه جالب توجه است. از روز چهارم به روز پنجم، هتروسیست‌ها از حالت استوانه ای به تحت استوانه ای تغییر شکل می‌یابند. این تغییر شکل هم در شرایط خنثی و هم قلیایی مشاهده می‌شود (در شرایط اسیدی چنین حالتی مشاهده نگردید). به نظر می‌رسد که افزایش میزان دی اکسید کربن بر این امر بی اثر می‌باشد. به همین ترتیب شرایط رشد نمونه و بخصوص رشد بالای نمونه در شرایط قلیایی و عدم محدودیت دی اکسید کربن، عامل اصلی در این تغییر شکل نیست (جدول ۱ و ۳). بنابراین احتمال قوی وجود دارد که این تغییر شکل به زمان و مراحل تکوینی نمونه مربوط باشد.

از نوع فیکوسیانین هستند و در شرایط قلیایی، بویژه با افزایش دی اکسید کربن از نظر کمی افزایش معنی دار پیدا می‌کنند ($ANOVA p < 0.05$). محتوای کلروفیل، در شرایطی که محیط خنثی باشد و دی اکسید کربن محدودیت داشته باشد، بالاترین کمیت را دارد. این کمیت در شرایط اسیدی و قلیایی کاهش معنی دار پیدا می‌کند ($ANOVA p < 0.05$) (جدول ۲).

در شرایط اسیدی، همچنان که رشد نمونه کاهش چشمگیر می‌یابد، توان تولید هتروسیست به طور معنی دار کاهش می‌یابد (با توجه به عدم رشد نمونه در شرایط اسیدی، در نتایج نیامده است). بررسی‌های میکروسکوپی نشان می‌دهد که در این شرایط هتروسیست‌ها دیرتر به بلوغ می‌رسند و تعداد هتروسیست‌های بالغ اندک است. ضمن اینکه ابعاد هتروسیست‌ها از الگوی واحدی تبعیت نمی‌کنند. نتایج بررسی هتروسیست‌ها در شرایط قلیایی و خنثی، نشان می‌دهد که در شرایط قلیایی، هتروسیست‌ها نه تنها از نظر فراوانی بلکه از نظر اندازه به بیشینه خود می‌رسند (جدول ۳). به طور معمول، فرکانس هتروسیست‌ها می‌تواند بیانگر فعالیت نیتروژنازی باشد (شکروی و همکاران، ۱۳۷۸). اندازه گیری‌های مستقیم نشان می‌دهد که در این نمونه در شرایط قلیایی و عدم محدودیت دی اکسید کربن، فعالیت نیتروژنازی به بیشینه

جدول ۱: تاثیر توام دی اکسید کربن و pH بر بیشینه وزن خشک، نرخ رشد ویژه و بیشینه برون ریزش آمونیوم در سیانوباکتری

<i>Haplosiphon</i> sp. FS 44				
Culture conditions		MDW ⁵	SGR	MAL ⁵
pH	DIC	(mg/ml)	d ⁻¹	(mg/ml)
5	NA	0.05±0.017	0.09±0.011	0.02±0.017
	AE	0.05±0.016	0.052±0.023	0.084±0.07
7	NA	0.20±0.12	0.26±0.14	0.22±0.07
	AE	0.24±0.09	0.28±0.09	0.19±0.09
9	NA	0.26±0.14	0.24±0.19	0.27±0.11
	AE	0.68±0.08	0.62±0.09	0.41±0.14

NA: عدم هوادهی، AE: هوادهی، MDW: بیشینه نرخ رشد، SGR: نرخ رشد نسبی، MAL: بیشینه برون ریزش آمونیوم (روز پنجم با عدد ۵

مشخص شده است)

NA: no aeration,

AE: aeration

MDW⁵: Maximum Dry Weight (5th day after inoculation)

SGR: Specific Growth Rate

MAL⁵: Maximum Ammonium Liberation (5th day after inoculation)

جدول ۲: تاثیر توام دی اکسید کربن و pH بر کلروفیل و فیکوبیلی پروتئین‌ها در سیانوباکتری *Haplosiphon* sp. FS 44

Culture conditions		Chla	PBP	APC	PC
pH	DIC	$\mu\text{g mg dw}^{-1}$			
5	NA	6.81±1.3	8.99±1.4	Nd	8.99±1.4
	AE	6.13±0.2	6.25±2.34	nd	6.25±2.34
7	NA	24.40±0.9	56.17±9.5	12.3±1.4	44.73±8.1
	AE	19.48±1.	58.42±8.95	10.4±2.55	48.28±6.4
9	NA	11.99±2.8	61.48±20.8	7.80±9.4	53.68±11.4
	AE	8.32±0.7	97.59±5.9	6.57±1.5	91.02±4.4

NA: عدم هوادهی، AE: هوادهی

Nd = not detected
NA: no aeration,
AE: aeration,

جدول ۳: تاثیر توام دی اکسید کربن و pH بر فراوانی (فرکانس هتروسیست)، بیومتری (قطر) هتروسیست و مورفولوژی

هتروسیست در سیانوباکتریوم *Haplosiphon* sp. FS 44

pH	DIC	HF (%)	HB μ	HM
7	NA	4.6±1.2 ^a	7.87±1.78 ^a	CY
	AE	5.2±1.78 ^a	7.66±1.34 ^a	CY
	NA	4.8±1.78 ^b	6.2±1.78 ^b	SU-CY
	AE	7.2±1.78 ^b	6.2±1.78 ^b	SU-CY
9	NA	6.6±0.98 ^a	9.34±2.7 ^a	CY
	AE	6.7±1.4 ^a	10.87±2 ^a	CY
	NA	8.4±0.89 ^b	10.43±2 ^b	SU-CY
	AE	8.8±1.2 ^b	10.56±1 ^b	SU-CY

HF: فراوانی هتروسیست، HB: قطر هتروسیست، HM: مورفولوژی هتروسیست، CY: استوانه ای، SU-SY: تحت استوانه ای - روزهای پس از

تلقیح با اعداد چهار و پنج مشخص شده است.

HF: Heterocyst Frequency (^a Data from the 4th day, ^b Data from the 5th day).
HB: Heterocyst Broad (^a Data from the 4th day, ^b Data from the 5th day).
HM: Heterocyst Morphology (^a Data from the 4th day, ^b Data from the 5th day).
CY: Cylindrical, SU-CY: Sub cylindrical

بحث

مکانیسم تراکمی دو طرفه ای است که در شرایط اسیدی فعال شود (صفایی و همکاران، ۱۳۸۶). در صفایی و همکاران (۱۳۸۶)، سیانوباکتری استیگونماتال *Fischerella* sp. که از شالیزارهای استان گلستان جدا شده، مورد بررسی قرار گرفته است، در شرایط اسیدی فاقد مکانیسم تراکمی دی اکسید کربن بوده است و تفاوت در اسیدیت و قلیابیت نتوانسته این قابلیت را بوجود آورد. حفظ بقا در شرایط اسیدی، با آنچه در دیگر سویه‌های استیگونماتال نظیر *Fischerella* sp. FS18 (سلطانی و همکاران، ۱۳۸۴). برون ریزش ضعیف آمونیم در شرایط اسیدی، با حفظ بقای نمونه سازگار است ولی نمونه را از نظر کاربردی در شرایط اسیدی موجه جلوه نمی‌دهد (Anand et al., 1990).

سیانوباکتری *Haplosiphon* Sp. FS 44 در شرایط اسیدی بقای خود را حفظ می‌کند ولی قادر به رشد نیست. به نظر می‌رسد که شرایط اسیدی بویژه در دو روز اول، یا نوعی شوک همراه است که به شکل رشد منفی نمود می‌یابد. روی هم رفته تمایل این گونه به شرایط خنثی و قلیایی به مراتب بیشتر است. از این نظر با سایر سیانوباکتری‌های استیگونماتالی که تاکنون در استان گلستان بررسی شده اند، مشابه است (سلطانی و همکاران ۱۳۸۴؛ شکروی و همکاران، ۱۳۸۴؛ شکروی و ساطعی، ۱۳۸۲). رشد منفی در دو روز اول هم در حالت محدودیت و هم عدم محدودیت - نسبی - دی اکسید کربن روی می‌دهد. از این نظر این سیانوباکتری فاقد

استیگنوماتال و نوستوکال مشاهده نگردیده است (صفایی و همکاران، ۱۳۸۶).

توان تولید کلروفیل به عنوان شاخصی از سیستم فتوسنتزی، در تنش اسیدیته و قلیابیت و دی اکسید کربن، با رشد نمونه سازگار نیست و به نظر می‌رسد، روند متفاوتی نشان می‌دهند. تاثیر مجموع این دو تیمار، به خصوص از نظر تغییر آرایش مورفولوژیک در زمان‌های مختلف و شکل‌گیری مختلف می‌تواند در این زمینه موثر باشد (Verling and Alberts, 1980) دقت در نحوه آرایش و شکل‌گیری اجتماعات نشان داد که - به عنوان مثال - در شرایط قلیایی با عدم محدودیت نسبی دی اکسید کربن، نمونه‌ها تمایل خود را به اتصال به کناره‌های ظرف از دست می‌دهند و نیز از نظر ظاهری رنگ سبز کم‌رنگ به خود می‌گیرند که حاکی از تضعیف بیوسنتز کلروفیل در آن‌ها است. در شرایط قلیایی و شرایط خنثی، در هر دو حالت دی اکسید کربن، نمونه تمایل به اتصال به ظرف پیدا می‌کند و نیز رنگ نمونه به سبز تیره‌تر گرایش می‌یابد که می‌تواند ناشی از تشدید فعالیت کلروفیل در آن‌ها باشد.

کارایی سیستم فیکوبیلی زومی که در شرایط خنثی (بهینه برای رشد) ملاحظه می‌شود، شاهدی بر توان انرژی دهی برای اعمال مکانیسم تراکمی دی اکسید کربن است (Poza- Carion et al., 2001) در شرایط اسیدی بدلیل نبود بخش مرکزی در سیستم فیکوبیلی زومی، به طور طبیعی توان جمع‌آوری نور و رساندن آن به مرکز واکنش، به شدت کاهش می‌یابد (سلطانی و همکاران، ۲۰۰۴). عدم کارایی نمونه در جمع‌آوری دی اکسید کربن به میزان کافی در شالیزارها، بخصوص در شرایط غرقابی می‌تواند ناشی از همین باشد. به حرکت به سمت شرایط خنثی، دستگاه فیکوبیلی زومی تقویت می‌شود و بخش مرکزی متشکل از رنگیزه‌های آلفوکوسیوانین و بخش حاشیه‌ای متشکل از فیکواریترین، از نظر کمیت افزایش قابل توجه می‌یابد. یافته‌های مذکور با گزارش Burns و همکاران

افزایش معنی دار رشد نمونه در شرایط قلیایی، در صورت رفع محدودیت دی اکسید کربن، همراه با برون ریزش بالای آمونیوم و عدم فاز تاخیری در منحنی رشد، با آنچه در مورد القایی بودن مکانیسم تراکمی در سیانوباکتری‌ها و برخی ریزجلبک‌های سبز بیان شده قابل توجه است (Poza-Carion et al., 2001). کاهش نسبی عملکرد مکانیسم تراکمی سبب می‌شود که انرژی به سمت دیگر فرایندها و از جمله رشد گرایش یابد و از این نظر افزایش معنی دار رشد قابل توجه است (Stal, 1995). عدم اختلاف معنی‌دار در زیتوده در روزهای مختلف در شرایط قلیایی و خنثی، در شرایط تلقیح و عدم تلقیح - نسبی - دی اکسید کربن، شاهد دیگری بر این مدعاست. سیانوباکتریوم *Synechococcus PCC7942* نیز چنین وضعیتی را نشان می‌دهد (Yu et al., 1994) بر خلاف آنچه در گزارش‌های شکروی و همکاران (۱۳۸۱) و شکروی و همکاران (منتشر نگردیده)، آمده است، سیانوباکتری *Lyngbya sp. FS33 Agardh* نه در شرایط قلیایی افراطی (pH 9)، بلکه در شرایط خنثی، رشد بهینه را دارد. به نظر می‌رسد که سیستم تراکمی یک سویه (Poza-Carion et al., 2001) در این سویه فعال می‌باشد. بقای نمونه در شرایط بسیار اسیدی و قلیایی، آن را از نظر کاربردی توانمند نشان می‌دهد (Anand et al., 1990) وجود چنین مکانیسم‌هایی در سیانوباکتری‌های اسیلاتوریا مورد بحث جدی بوده است (Stal, 1995). در سیانوباکتری‌های *Lyngbya majuscula* و *Wollei L.* شواهدی از وجود چنین مکانیسمی بدست آمده است (شکروی و همکاران، منتشر نگردیده) با اینحال این مکانیسم‌ها عمدتاً دو طرفه بوده و در شرایط قلیایی همپوشانی می‌کنند که سبب رشد قابل توجه در این شرایط می‌شود. به نظر می‌رسد که نوسان‌هایی که در رشد در هنگام دور شدن از شرایط بهینه مشاهده می‌شود نوعی صفت گونه‌ای باشد که حداقل در سیانوباکتری‌های

استیگوناتال و نوستوکال در شکروی و ساطعی (۱۳۸۲) انجام شده است. در سلطانی و همکاران (۱۳۸۴)، نشان داده شده است که شرایط اسیدی و قلیایی در شرایط عدم محدودیت دی اکسید کربن، سبب تغییر در ابعاد هتروسیست‌ها در سیانوباکتری *Fischerella* sp. FS33 گردیده است. به نظر می‌رسد که در این سیانوباکتری نیز شرایط قلیایی سبب افزایش ابعاد هتروسیست‌ها می‌گردد. هرچند شدت‌های نوری تاثیر عمده در این امر دارند (سلطانی و همکاران، ۱۳۸۴). بررسی‌های بافته چلی و همکاران (۱۳۸۰) نشان داده است که در سیانوباکتری‌های استیگوناتال نظیر *Fischerella*، هتروسیست‌ها می‌توانند تحت تاثیر عوامل محیطی قرار گیرند ولی این تنوع پذیری در انشعابات از محور اصلی بیشتر است.

بر خلاف سیانوباکتری‌های استیگوناتال و نوستوکال بررسی شده در استان گلستان (وکیلی و همکاران، ۱۳۸۵، صفایی و همکاران، ۱۳۸۶، شکروی و همکاران، ۱۳۸۴، شکروی و همکاران، ۱۳۸۷، سلطانی و همکاران، ۱۳۸۴)، انعطاف پذیری مورفولوژیک در *Haplosiphon* sp. FS 44 قابل توجه می‌باشد. فلسفه تغییر آرایش فضایی هتروسیست‌ها در سیانوباکتری‌ها هنوز به طور کامل مشخص نیست (شکروی و همکاران، ۱۳۸۷)، بررسی فعالیت نیتروژنازی نشان داده است که میان اندازه هتروسیست‌ها و فعالیت نیتروژنازی همبستگی مثبت معنی دار وجود دارد ($r^2=0.86$) (در نتایج نیامده است) این امر دلیل دیگری دال بر تاثیر شرایط قلیایی توام با عدم محدودیت دی اکسید کربن بر رشد نمونه است، اما امکان بررسی تاثیر شرایط مورفولوژیک هتروسیست‌ها بر فعالیت نیتروژنازی وجود ندارد. همبستگی میان فراوانی (فرکانس) هتروسیست و فعالیت نیتروژنازی مثبت ولی ضعیف است (در نتایج نیامده). در شرایط خشتی این عدم همبستگی بیشتر مشهود است. در شرایط قلیایی، چه در حالت محدودیت و چه عدم محدودیت دی اکسید کربن، همبستگی افزایش می‌یابد.

(۲۰۰۵) بر روی سیانوباکتریوم *Synechococcus* *Elongatus* سازگار می‌باشد. توان نمونه برای رشد در شرایط خشتی، ناشی از القای مکانیسم تراکمی دو طرفه ای است که خود می‌تواند از تقویت سیستم فیکوبیلی زومی منشا بگیرد (شکروی و همکاران، ۱۳۸۷). در شرایط قلیایی، تمامیت دستگاه فیکوبیلی زومی حفظ می‌شود، ولی از توان آن کاسته می‌شود (Soltani et al. 2006). این یافته‌ها با وکیلی و همکاران (۱۳۸۵)، شکروی و همکاران (۱۳۷۸)، خاوری نژاد و همکاران (۱۳۸۰) در منابع نیامده) مطابق است. از نظر کاربردی، با در نظر گرفتن شاخص‌های Boussiba (۱۹۸۸) به نظر می‌رسد که توان سیستم فیکوبیلی زومی، چه از نظر ساختار و چه از نظر عملکرد با افزایش قلیاییت و محتوای دی اکسید کربن افزایش معنی دار پیدا می‌کند (Yamamaka and Glazer, 1981). افزایش بخش مرکزی و افزایش معنی دار رنگیزه‌های بخش میله ای، سبب افزایش عملکرد در فتوسنتز می‌شود که به صورت افزایش معنی دار رشد نمود می‌یابد. در سیانوباکتری نوستوکال *Nostoc* sp. UAM 205 (Valiente and Leganes, 1998) و سیانوباکتری استیگوناتال *Fischerella* sp. FS33 (Soltani et al, 2006)، چنین وضعیتی مشابه است.

فراوانی و شرایط بیومتری هتروسیست‌ها می‌توانند با دی آزوتروفی در ارتباط باشند (شکروی و همکاران، ۱۳۷۸). در سیانوباکتری‌های هتروسیستوس، از جمله نمونه‌های مربوط به شالیزار جدایش مکانی فتوسنتز و دی آزوتروفی، از طریق پیدایش هتروسیست‌ها امکان پذیر شده است. در بررسی‌های عمومی، افزایش فراوانی هتروسیست‌ها می‌تواند شاخصی از فعالیت نیتروژنازی باشد (شکروی و همکاران، ۱۳۷۸). در سیانوباکتری‌های نوستوکال و استیگوناتال بررسی شده در استان گلستان، هتروسیست‌ها از نظر مورفولوژی و بیومتری مورد بررسی قرار گرفته‌اند (شکروی و همکاران، ۱۳۸۴). بررسی رابطه بین رشد و فراوانی هتروسیست در سیانوباکتری‌های

نتیجه‌گیری نهایی

سیانوباکتری *Haplosiphon* sp. FS 44 دارای ویژگی‌هایی است که آن را از نظر کاربردی و از جمله به عنوان کاندیدای کود زیستی برای استفاده آبی در شالیزارها موجه نشان می‌دهد. در درجه نخست این سویه در شالیزارهای استان گلستان وجود دارد و از تراکم بالایی برخوردار است. رشد گونه در شرایط قلیایی و بویژه هنگامی که دی اکسید کربن در حد دی اکسید کربن هوا وجود داشته باشد، بالا می‌باشد. در شرایط خنثی و شرایط قلیایی نمونه می‌تواند با تنش‌های اسیدیته و قلیائیت و دی اکسید کربن خو بگیرد. مکانیسم تراکمی دی اکسید کربن در این گونه فعال می‌باشد و بویژه در شرایط خنثی و قلیایی در حالت محدودیت دی اکسید کربن سبب بقا و رشد نمونه می‌گردد. میزان برون ریزش آمونوم در شرایط خنثی و قلیایی با دیگر سویه‌های مورد مطالعه نوستوکال و استیگونماتال استان گلستان برابری می‌کند و از این نظر می‌تواند منبع غنی نیتروژن برای زمین‌های کشاورزی و شالیزارها محسوب شود. این گونه همانند دیگر گونه‌های استیگونماتال بررسی شده، دارای رنگیزه فیکواریترینی نیست ولی در شرایط قلیایی و بویژه هنگامی که عدم محدودیت نسبی دی اکسید کربن وجود داشته باشد، ساختار فیکوبیلی زوم کامل می‌شود و بخش مرکزی و میله ای آن که از رنگیزه‌های فیکوسیانینی تشکیل شده است، ویژگی خاص این نمونه انعطاف پذیری در ابعاد و مورفولوژی هتروسیست است که با فعالیت نیتروژن‌سازی بویژه در شرایط قلیایی همبستگی دارد. با توجه به جمیع شرایط، بکارگیری نمونه نه به صورت جداگانه بلکه به صورت آغازگرهای توام، در کنار سیانوباکتری‌های دارای هتروسیست می‌تواند منطقی باشد.

سپاسگزاری

نگارندگان وظیفه خود می‌دانند، از کلیه افرادی که در طول انجام این پژوهش، کمال همکاری را داشته‌اند، صمیمانه سپاسگزاری نمایند. سپاسگزاری خاص از سرکار

خانم رسایی (کارشناس آزمایشگاه ژنتیک) و سرکار خانم کیایی (کارشناس آزمایشگاه تحقیقات)، به ویژه ضروری است.

منابع

امیرلطیفی، ف.، شکروی، ش.، علمایی، م. (۱۳۸۶) بررسی بقا و رشد و وضعیت رنگیزه ای سیانوباکتری *Nostoc* Sp. در شرایط متفاوت اسیدیته و قلیائیت، پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرگان.

بافته چی، ل.، نژاد ستاری، ط.، ابراهیم زاده معبود، ح. و شکروی، ش. (۱۳۸۰) بررسی شدت‌های نوری بر رشد و بسامد هتروسیست سیانوباکتری *Fischerella* Sp. پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشکده علوم دانشگاه تهران.

سلطانی، ن.، خاوری نژاد، ر.، طباطبایی یزدی، م.، شکروی، ش. و فرناندز والیتنه، ا. (۱۳۸۴) بررسی خواص آنتی میکروبیال و فیزیولوژی سیانوباکتری‌ها در محیط‌های افراطی، پایان نامه دکترای تخصصی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه تربیت معلم تهران.

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

شکروی، ش. و ساطعی، آ. (۱۳۸۴) نشان ویژه سازی مورفولوژیک سیانوباکتری به منظور تلقیح در شالیزار،

- Geitler, L. (1932)** Cyanophyceae von Europa Kryptogamen flora Akademische Verlagsgesellschaft. Leipzig.
- John, D.M., Whitton, B.W. & 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.
- Leganés, F. & Fernandez-Valiente, E. (1991)** The relationship between the availability of external CO₂ and nitrogenase activity in the cyanobacterium *Nostoc* UAM205. *Journal of Plant Physiology* 139, 135-139.
- Mimuro, M., Lipschultz, C. & Gantt, E. (1986).** Energy flow in the phycobilisome core of *Nostoc* sp. (MAC): two independent terminal pigments. *Biochimica et Biophysica Acta* 852, 126-132.
- Poza-Carrion, C., Fernandez-Valiente, E., Fernandez Pinas, F. & Leganes, F. (2001).** Acclimation of photosynthetic pigments and photosynthesis of the cyanobacterium *Nostoc* sp. Strain UAM 206 to combined fluctuations of irradiance, pH, and inorganic carbon availability, *Journal of Plant Physiology* 158, 1455-1461.
- Prescott, G.W. (1962).** Algae of the western great lake area. W.M.C. Brown Company Pub.
- Reuter, W. & Müller, C. (1993).** Adaptation of the photosynthetic apparatus of cyanobacteria to light and CO₂. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 21, 3-27.
- Shokravi Sh., Amirlatifi F., Safaie M., Ghasemi Y., Neda Soltani (2006).** Some physiological responses of *Nostoc* sp. JAH 109 to the combination effects of limited irradiance, pH and DIC availability *Quarterly journal on plant science researches* Vol.number 3 pp: 55-63
- Solarzano, K. (1969).** Determination of ammonia in natural waters by phenol hypochlorite method. *Limnology and Oceanography* 14: 799–801.
- Soltani N., Khavari-Nejad R., Tabatabaei Yazdi M., Shokravi Sh., Fernandez-Valiente E. (2005).** Screening of Soil Cyanobacteria for
- گزارش طرح پژوهشی، معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرگان.
- شکروی، ش.، سلطانی، ن.، بافته چی، ل. (۱۳۸۷) سیانوباکتریولوژی، چاب اول، دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرگان
- صفایی، م.، شکروی، ش.، علمایی، م.، سلطانی، ن. (۱۳۸۶) بررسی بقا و رشد و وضعیت رنگیزه ای سیانوباکتری *Fischerella* sp. در شرایط متفاوت شوری، پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرگان.
- وکیلی، ف.، شکروی، ش.، قورچی بیگی، ک. و سلطانی، ن. (۱۳۸۵) بررسی رشد و وضعیت هتروسیست در سیانوباکتریوم *Fischerella ambigua* پایان نامه کارشناسی ارشد، گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرگان.
- Anagnostidis, K., Komarek, J. (1990).** Modern approaches to the classification of cyanobacteria. *Stigonematales. Archives for Hydrobiology* sup 14, 224-286.
- Anand, N.L., Radha, R.S., Hopper, G.R. & Subramanian, T.D. (1990).** Blue-green algae as biofertilizers: certain view points on the choice of suitable isolates. In: *Perspective in phycology, International symposium of phycology at university of Madras, New Delhi: Today and Tomorrow's Publishers.*
- Boussiba, S. (1988).** *Anabaena azollae* as biofertilizer. In: *Algal biotechnology*, eds. T., J. Stadler, M.C. Millon, Y. Verdu, H. M. Karamanos and D. Christiaen, Elsevier applied science.
- Burns R.J., Danielle MacDonald C., McGinn J.P., Campbell D.A. (2005).** Inorganic carbon repletion disrupts photosynthetic acclimation low temperature in the cyanobacterium *Synechococcus Elongatus*. *J. Phycology* 41: 322-334
- Desikachary, T.V. (1959).** Cyanophyta. Indian council of agricultural research monographs on Algae New Delhi, India.

- Stal, J.S. (1995).** Physiological ecology of cyanobacteria in microbial mats and other communities. *New Phytology* 131, 1-32.
- Valiente, E.F. & Leganes, L. (1989).** Regulatory effect of pH and Incident Irradiance on the levels of Nitrogenase activity in the cyanobacterium *Nostoc* sp.UAM205 *Journal of Plant Physiology*, 135, 623-627.
- Vierling, E. F & Alberte, R.S. (1980).** Functional organization and plasticity of the photosynthetic unit of the cyanobacterium *Anacystis nidulans*. *Physiologia Plantarum* 50, 93-98.
- Yamamaka, G. & Glazer, A.N. (1981).** Dynamic aspects of phycobilisome structure: modulation of phycocyanin content of *Synechococcus* phycobilisomes. *Archives of Microbiology* 130, 23-30.
- Yu, J.W., Price, G.D. & Badger, M.R. (1994).** Characterization of CO₂ and HCO₃⁻ uptake during steady-state photosynthesis in the cyanobacterium *Synechococcus* PCC7942. *Australian Journal of Plant Physiology* 21, 185-195.
- Antifungal and Antibacterial Activity, *Pharmaceutical biology*, 43(5) 455-459.
- Soltani, N., Khavari-Nejad, R., Tabatabaie, M., Shokravi, Sh., Valiente, E.F. (2006).** Variation of Nitrogenase Activity, photosynthesis and pigmentation of cyanobacterium *Lyngbya* sp. *FS33 Agardh* strain FS18 under different irradiance and pH. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 22(6): 571-576.
- Soltani N., G.Zarrini, Y.Ghasemi, Sh.Shokravi and L.Baftechi (2007).** Characterization of soil cyanobacterium *Fischerella* sp. FS18 under NaCl stress *Journal of Biological Sciences* 7(6): 931-936
- Soltani N., R.A. Khavarinejad, M.Tabatabaie Yazdi and Sh.Shokravi (2008).** Growth and metabolic Feature of cyanobacterium *Fischerella* sp.FS18 in different Combined Nitrogen sources *Iranian journal of science*, 18 (2): 123-128
- Soltani Neda, Siahbalaie Roghaieh and Shadman Shokravi (2010).** Taxonomical characterization of cyanobacterium *Fischerella* sp.FS 18- A multidisciplinary approach *International journal on Algae* Vol.1. Number 9 pp: 48-55

Studying of acclimation of the cyanobacterium *Haplosiphon* sp. FS 44 to the combination Effects of pH and carbon dioxide concentration

*Shokravi, Sh¹., Safaie, M²., Jorjani, S².

1. Department of Biology, Islamic Azad Univ.-Branch Gorgan, Gorgan, Iran
2. Young Reaserchers Club, Department of Biology, Islamic Azad Univ. Branch Gorgan, Gorgan, Iran

Abstract

The aim of this research was studying of the acclimation of the cyanobacterium *Haplosiphon* sp. FS 44 to combination effects of carbon dioxide concentration and acidity and alkalinity. This strain seems common but ecophysiologicaly unexplored in paddy-fields of Golestan province. Axenic strain has been incubated in BG-11 medium. Carbon dioxide treatments were uninoculation and relatively inoculated. In each treatments acidic (pH 5), neutral (pH7) and alkaline (pH 9) conditions have been treated. Survival, growth, chlorophyll, phycocyanin, allophycocyanin, phycoerythrin contents in addition of ammonium liberation, frequency and biometry of heterocysts, have been evaluated in each treatments. Results showed that like other explored stigonematalean and nostocalean cyanobacteria, this strain can not growth in acidic condition. The difference of growth rates seems insignificant between acidic and alkaline conditions but carbon dioxide enrichments cause significant increase of growth rate. Phycobilisome system of this strain lack phycoerythrin and may complete structure both at the core and the rode at alkaline conditions. Heterocyst frequency and biometry reach to maximum rate at the alkaline conditions and seems positive correlation with nitrogenase activity. Heterocyst show cylindrical morphology at the 4th and sub-cylindrical at the 5th after inoculation. Collectively results beside the other cyanobacteria show this strain such potent as been used as biofertilizer.

Keywords: Acclimation, Cyanobacterium, Golestan, Hapalosiphon, Paddy field