نشریه پژوهش‌های اکوفیزیولوژی گیاهی ایران، شماره پیاپی ۳۲، سال هشتم، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۲/صفحات: ۴۲-۳۱

بررسی امکان خوگیری سیانوباکتریوم *Lyngbya obscura* به شرایط دمایی مداوم و شوک‌های دمایی افراطی پایین

جعفر محمدیان موسی‌آبادی[۱]، عاطفه بشرویه‌نژاد[۲]، ندا سلطانی[۳]، شادمان شکروی*[۴]

[۱]استادیار گروه زیست‌شناسی، بخش فن‌آوری‌های زیستی نوین، دانشگاه صنعتی مالک اشتر، تهران

[۲] کارشناس‌ارشد، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاداسلامی واحد گرگان، گرگان

[۳] دانشیار، گروه زیست‌شناسی، پژوهشکده علوم پایه کاربردی، جهاد دانشگاهی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران

[۴] دانشیار، گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرگان، گرگان

تاریخ دریافت: ۹۱/۳/۱۳ تاریخ پذیرش: ۹۱/۷/۱۵

چکیده

در این پژوهش، هدف بررسی امکان خوگیری سیانوباکتریوم *Lyngbya obscura* به شرایط دمایی مداوم پایین (۱۰ درجه سانتی‌گراد)، افراطی پایین (انجماد) و شوک‌های دمایی فوق افراطی پایین (۱۶- درجه سانتی‌گراد) بود. نمونه برداری از شالیزارهای استان گلستان در طی یک دوره یکساله انجام گرفت. پس از تخلیص و شناسایی، سیانوباکتریوم *Lyngbya obscura* تحت شدت نور ۲ میکرومول کوانتا بر مترمربع در ثانیه، دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد و روشنایی سفید مداوم قرار گرفت. تیمارهای دمایی به صورت جداگانه اعمال گردید. تیمار ۱۶- درجه سانتی‌گراد، به مدت ۳۰ دقیقه در روز اعمال گردید. در هر مورد بقا، رشد، نرخ رشد ویژه، محتوای کلروفیل، رنگیزه‌های کاروتنوئیدی، فیکواریترین، فیکوسیانین، آلوفیکوسیانین به صورت در شیشه و در زیوه بررسی گردید. نتایج نشان داد که نمونه بقای خود را در هر سه حالت حفظ می کند. محتوای کلروفیل و فیکو بیلی پروتئین‌ها، بخصوص فیکواریترین در شرایط فوق افراطی و پایین دمایی اختلاف معنی‌داری از خود نشان ندادند. در دمای انجماد نمونه تا روز پنجم رشد منفی داشت ولیکن توانست رشد خود را بازیابی کند. سیستم فتوسنتزی نمونه در هر سه تیمار کارایی خود را از دست نداد. محتوای کاروتنوئیدی تحت تاثیر شوک‌های فوق افراطی دمایی تغییر معنی‌دار نکرد. روی هم رفته نمونه مذکور، دارای ویژگی‌های جالب توجه برای مقابله با دمای پایین است که می‌تواند جهت تولید انبوه در زمین‌های کشاورزی استان گلستان و نیز تلقیح احتمالی به دیگر زمین‌های کشاورزی برای مقابله با آسیب‌های دمایی پایین، نظیر زمستان‌های سرد و طولانی، مورد توجه قرار گیرد.

واژگان کلیدی: اکوفیزیولوژی، دما، خوگیری، سیانوباکتری، شالیزار، گلستان، لینگبیا

مقدمه

سیانو باکتری‌های استان گلستان ناشناخته هستند (شکروی و همکاران، ۱۳۸٤). با وجود اینکه این استان از قطب‌های کشاورزی و دامپروری کشور محسوب می‌شود و با توجه به اینکه سیانو باکتری‌ها از توانمندی قابل توجهی جهت استفاده در بیوتکنولوژی کشاورزی برخوردارند، اطلاعات موجود در مورد سیانوباکتری‌ها بخصوص اکوفیزیولوژی سیانو باکتری‌های شالیزارها و زمین‌های کشاورزی تکافوی نیازهای موجود برای هرگونه برنامه ریزی اقتصادی و کاربردی جهت بهره برداری کشاورزی و

* نویسنده مسئول: sshokravi@yahoo.com

دیگر جنبه‌های سیانوباکتریولوژی کاربردی را نمی کند.(شکروی و ساطعی، ۱۳۸۲). در مقایسه با عوامل محیطی نظیر نور و محتوای دی‌اکسید کربن، تاثیر دما بر رشد سیانوباکتری‌های استان به مراتب کمتر مورد توجه قرار گرفته است (صفایی و همکاران، ۱۳۸۷). در حال حاضر اطلاعاتی در خصوص تاثیر دما بر سیانوباکتری‌های استان گلستان و بخصوص واکنش‌های این موجودات به تنش‌های دمایی افراطی وجود ندارد.

سیانو باکتری‌ها در زیستگاه‌هایی با اختلاف دمایی قابل توجه وجود دارند. مناطق قطبی، دارای فلور سیانوباکتریایی خاص خود است. اطلاعات روزافزون نشان می دهد که غنی‌ترین اجتماعات میکروبی از نظر زی توده در مناطق قطبی به سیانوباکتری‌ها اختصاص دارد (Elster et al., 1999; Tang et al., 1997). در عین حال هرروز گزارش‌های جدیدی از سیانوباکتری‌های چشمه‌های آب گرم (دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد) و نیز مناطق نزدیک به آتشفشان‌ها و نواحی بیابانی منتشر می گردد (شکروی و همکاران، ۱۳۸۵). این تنوع از نظر مکانیسم‌های سازگاری قابل توجه است. نمونه‌هایی از سیانوباکتری‌های اسیلاتوریال گزارش شده‌اند که با زی توده بالا در لایه‌های یخی قطب، سراشیبی‌های یخی، رودخانه‌های یخی (یخچال‌های طبیعی) و توده‌های برفی وجود دارند و از سوی دیگر در شرایط دمایی کاملاً متفاوت، یعنی محیط‌های با دمای افراطی بالا از قبیل خاک‌های بیابانی و در شکاف سنگ‌های مرتبط با حرارت مرکزی می‌توانند زنده بمانند و تولید مثل کنند (Vincent and Howard-Williams, 2000; Warwick and Howard-Williams, 2001).

با توجه به این، مکانیسم سازگاری و توانمندی سیانوباکتری‌ها در خوگیری به شرایط دمایی افراطی، در دو دهه اخیر مورد توجه قرار گرفته است (شکروی و همکاران، ۱۳۸۷). اینکه سازگاری سیانوباکتری‌ها به شرایط دمایی افراطی پایین به نوعی در حافظه اطلاعاتی آن‌ها ثبت شده باشد قابل توجه است. شواهد تاریخی نشان می‌دهد که انتشار وسیع یخبندان و شاید حتی یخبندان جهانی، در چندین مقطع در پرکامبرین رخ داده است (Vincent and Howard-Williams, 2000; Warwick and Howard-Williams, 2001). بعد از آن نیز نظریاتی در مورد وقوع یخ بندان‌های طولانی در دوره پالئوپروتوزوئیک در حدود ۲۳۰۰ میلیون سال قبل (Kirschvinck et al., 2000) و نیز در نئوپروتوزوئیک بین ۵۷۰ و ۷۵۰ میلیون سال قبل وجود دارد (Hoffman, 1999; Hoffmanet et al., 1998). با توجه به این، بسیار محتمل است که سیانوباکتری‌ها، اطلاعات مربوط به سازگاری‌های دمایی افراطی پایین را جهت حفظ بقا و پرهیز از غافلگیر شدن و معدوم شدن در شرایط مشابه احتمالی در آینده در سیستم اطلاعاتی خود حفظ کرده باشند. به‌نظر می‌رسد که اجتماعات سیانوباکتری چه به‌صورت انفرادی و چه در قالب پشته‌ها و توده‌های میکروبی و بیوفیلم (شکروی و همکاران، ۱۳۸۷)، توانایی بالایی برای حفظ بقا در دوره‌های یخبندان در مناطق سردسیر فعلی کره زمین دارند (Vincent and Howard-Williams, 2000) و این می‌تواند شاهدی بر این مدعا باشد. بدین ترتیب شاید نوعی پیش‌بینی از قبل در مورد نمونه‌های ایران در رابطه با سازگاری با دماهای پایین وجود داشته باشد. اما از سویی تاکنون بررسی خاصی انجام نشده است که بتوان به آن استناد کرد و از سوی دیگر، به نظر می‌رسد که استفاده بی‌رویه از کودهای شیمیایی، آفت‌کش‌ها و علف‌کش‌ها در زمین‌های کشاورزی ایران، منجر به بروز بحران‌های زیست‌محیطی شده که از آن جمله می‌توان به‌عدم تعادل میکروفلور خاک‌های کشاورزی و نیز از دست رفتن قابلیت در پایداری و حفظ تعادل در برابر تنش‌ها و از جمله تنش‌های دمایی

اشاره نمود (شکروی و همکاران، ۱۳۸۱). در بررسی گونه‌های Westiella در چشمه‌های آب گرم، نشان داده شده است که معدودی از گونه‌ها نظیر *Westiella laminosa* می‌توانند با نوسان‌های دمایی پایین خو بگیرند و مابقی از این قابلیت برخوردار نیستند.

با توجه به اینکه استان گلستان از قطب‌های کشاورزی کشور است، حفظ تعادل میکروفلور تحت تنش‌های محیطی و از جمله دما حائز اهمیت جدی است. اینکه استفاده بی رویه از کودهای شیمیایی، علف‌کش‌ها و آفت‌کش‌ها، سبب تضعیف توان مقابله نمونه با دماهای افراطی شده باشد محتمل است (شکروی و همکاران، ۱۳۸۱) و اگر چنین باشد تکرار دوره‌های سرما و گرمای شدید و از جمله زمستان بسیار سرد و یخ‌بندان ۱۳۸٦، می‌تواند نتایج فاجعه باری برای کشاورزی منطقه به همراه داشته باشد. برعکس اگر میکروفلور توانایی حفظ تعادل دمایی را حفظ کرده باشند، می‌توان امیدوار بود که در صورت استفاده از ریز جلبک‌ها به‌صورت تلقیح مصنوعی و یا ایجاد محدودیت در بکارگیری ترکیبات شیمیایی، بتوان زمین‌های کشاورزی را در شرایط بحرانی دمایی از نظر کارایی حفظ نمود. سیانوباکتریوم *Lyngbya obscura* واجد ویژگی‌هایی است که آن را از نظر بیوتکنولوژی توانمند نشان می‌دهد. این نمونه بدلیل وجود غلاف موسیلاژی و نیز تنوع پذیری مورفولوژیک قابل توجه، نمونه‌ای کارا در مقابله با شرایط افراطی شوری، خشکی و نیز اسیدیته به نظر می رسد (منادی، ۱۳۸۸). رشد قابل توجه و برون ریزش آمونیوم، بکارگیری آن به عنوان یکی از ترکیبات آغازگر در کودهای زیستی و اصلاح گرهای خاک را موجه نشان می‌دهد (شکروی و ساطعی، ۱۳۸۲). اما در خصوص توان فعالیت نیتروژنازی در شرایط مذکور و مهم تر از آن خوگیری به تنش‌های دمایی مورد بررسی قرار نگرفته است. در صورتی که نتایج این بررسی‌ها، توانمندی نمونه را در این موارد نیز تایید کند، می توان به‌عنوان نمونه ای کارا در بیوتکنولوژی کشاورزی، جهت پژوهش‌های آینده به آن امیدوار بود (Boussiba,1988).

شکروی و همکاران (۱۳۸٤)، در نشان ویژه سازی مورفولوژیک سیانوباکتری‌های خاکزی استان گلستان، بخشی را به سیانوباکتری‌های اسیلاتوریال اختصاص داده‌اند. به‌همین ترتیب در شکروی و همکاران (۱۳۸۷)، سیانوباکتری *Oscillatoria* sp. مورد توصیف جدید تاکسونومیک قرار گرفته است. در رابطه با تاثیر دما بر سیانوباکتری‌ها شکروی (۱۳۸٤)، شکروی و همکاران (۱۳۸۵)، امیرلطیفی و همکاران (۱۳۸٦)، سلطانی و همکاران (۱۳۸٤)، شکروی و همکاران (۱۳۸۷) بررسی‌ها را نه به‌طور تخصصی بلکه به‌عنوان بخشی از کار انجام داده‌اند که به سیانو باکتری‌های استیگو نماتال و نوستوکال و نیز جلبک‌های سبز تک سلولی و کلنی اختصاص داشته‌اند. کاراکتریزاسیون تاکسونومیک سیانوباکتری *Fischerella ambigua* FS 18 تحت شرایط توام نور و pH توسط شکروی و همکاران (۱۳۸۷) انجام گرفت که بخشی از آن به دما اختصاص داشت. صفایی و همکاران (۱۳۸۷) به تاثیر دما بر *Nostoc* sp. به‌طور اختصاص پرداختند. در این بررسی به‌عنوان گام نخست، خوگیری به تنش‌های پایین دمایی در شرایط آزمایشگاهی به‌عنوان هدف برگزیده شد. در این بررسی، خوگیری سیانوباکتریوم *Lyngbya obscura* به دماهای افراطی بالا و پایین و بسیار پایین (۱٦- درجه سانتی‌گراد) مورد توجه قرار گرفت. هدف کلان آن بود که وضعیت نمونه با الگوی جهانی سیانوباکتری‌ها از نظر خوگیری

به نوسان‌های دمایی تطبیق داده شود و در صورت عدم توانمندی در خوگیری در پژوهش‌های بعدی دلایل این امر جستجو شود. بدنبال این اهداف کاربردی نیز مد نظر بوده است.

مواد و روش‌ها

نمونه‌های خاک از استان گلستان در سال ۱۳۸۸ جمع‌آوری شدند. کشت نمونه‌های خاک مطابق روش کشت سیانوباکتری‌های خاکزی انجام گرفت (Kaushik, 1987). پس از تشکیل کلنی جداسازی و کشت‌های بعدی، سیانوباکتریوم *Lyngbya obscura* به‌صورت خالص تهیه گردید (Kaushik, 1987). شناسایی مقدماتی و شناسایی گونه با استفاده از کلیدهای شناسایی معتبر (Getler, 1932; Anagnostidis and Komarck, 1990; Prescott, 1962; John et al., 2002; Dsikachary, 1959) انجام گرفت. کشت در محیط BG-11 و در شرایط نوری ۲ میکرومول کوانتابر متر مربع بر ثانیه (که توسط ۱ لامپ فلورسانت تامین گشت) در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد و pH۷/۲ انجام گرفت.

بررسی‌ها درارلن‌هایی با حجم ۲۵۰ میلی‌لیتر محتوی ۱۰۰ میلی‌لیتر سوسپانسیون انجام شد. کشت‌ها به مدت ۱ ساعت هم زده شده و سپس به اتاق کشت منتقل گردیدند. پیش از تلقیح نمونه به‌مدت ٤٨ ساعت جهت ایجاد سازگاری به محیط مایع واردگردیدند.

بررسی اولیه تیمارهای دما توسط دستگاه ژرمیناتور برای دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد به‌طور مداوم، دمای صفر درجه با استفاده از نگهداری در یخ (به‌مدت ۳ ساعت) و دمای ١٦- درجه سانتی‌گراد، با استفاده از نگهداری کوتاه مدت (۳۰ دقیقه) در فریزر و سپس انتقال سریع به محیط عادی و بررسی تغییرات (به‌صورت شوک دمایی) انجام گرفت. رشد بر اساس کدورت سنجی با استفاده از اسپکتروفتومتر (OD_{750}) انجام شد. سنجش کلروفیل پس از استخراج با متانول انجام گرفت. فیکوبیلی پروتئین‌ها بر اساس سلطانی و همکاران (١٣٨٤) و کاروتنوئیدها بر اساس Jensen (۱۹۷۸) به‌صورت در شیشه سنجش گردیدند. پس از استخراج کلروفیل به‌صورت در شیشه از طریق بررسی همبستگی و تعیین معادله خط ثابت رشد نسبی محاسبه گردید. برای بدست آوردن ثابت ویژه رشد می‌توان از وزن خشک یا کلروفیل استفاده کرد. زمان مضاعف شدن بر اساس بیومس و بر مبنای روش محاسبه شکروی و همکاران (۱۳۸۲) بدست آمد. به‌همین ترتیب وضعیت رنگیزه‌ای و ثابت جذب رنگیزه‌ای به‌صورت درزیوه درطول موج‌های ٤٨٠-٦٢٠-٦٥٠-٦٨٠ نانومتر با روش Vincent و Howard- Williams (۲۰۰۰) تعیین گردید. آنالیزهای آماری بااستفاده از نرم‌افزارهای SPSS با سه تکرار برای هر سنجش انجام گرفت.

نتایج

رشد سیانوباکتریوم: *Lyngbya obscura* در شرایط دمایی افراطی و فوق افراطی پایین متوقف نشد. مقایسه نرخ رشد ویژه (جدول ۱)، نشان داد که حداقل بکارگیری دمای صفر درجه سانتی‌گراد و دمای بسیار افراطی ١٦- درجه سانتی‌گراد، سبب شد که ثابت رشد به ۰/۱۱ برسد که نشان از توانایی حفظ بقای نمونه دارد. همچنین رشد نمونه در شرایط شوک‌های دمایی افراطی بسیار پایین (١٦- درجه سانتی گراد) نه تنها ثابت ویژه رشد را کاهش نداد بلکه به‌طور معنی‌داری ($P<0/05$) سبب افزایش آن شد (جدول ۱).

جدول ۱. مقدار نرخ رشدو زمان مضاعف شدن در دماهای ١٦- و صفردرجه سانتی‌گراد در سیانوباکتریوم *Lyngbya obscura*

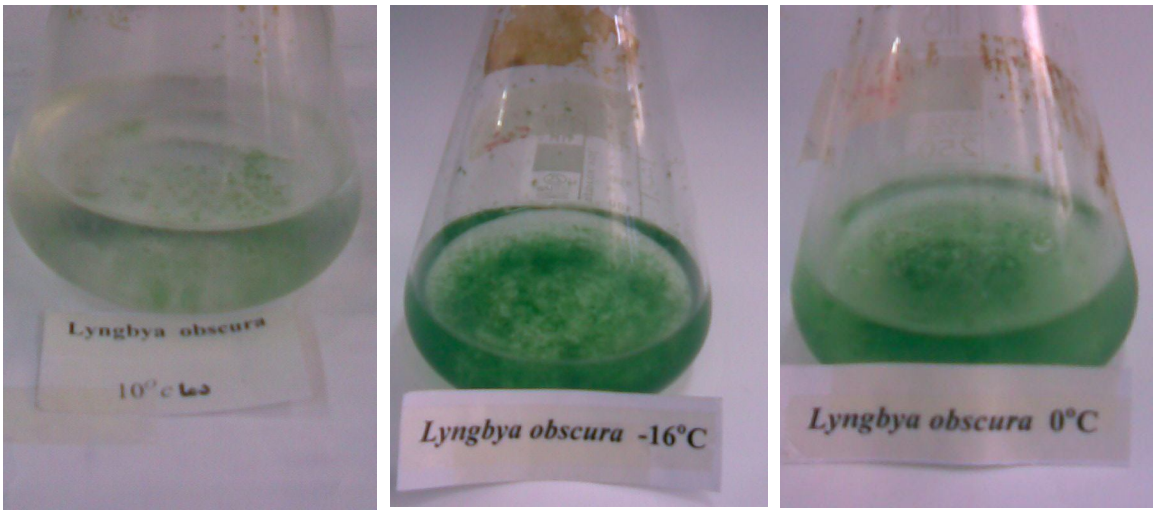
نوع تیمار	زمان مضاعف شدن (G)	ثابت ویژه رشد (μ)
دمای ۰ درجه‌سانتی‌گراد	۵/۷۳	۰/۱۱
دمای ١٦- درجه‌سانتی‌گراد	۰/۹۱	۰/٦٩

جدول ۲ نشان می‌دهد که سیانوباکتریوم *Lyngbya obscura* از نظر تولید رنگیزه‌های اصلی تحت تاثیر دماهای افراطی پایین قرار نگرفت. اختلاف میزان کلروفیل تحت تاثیر تیمارهای دمایی حتی در روزهای مختلف بی معنی بود (P<۰/۰۵). بیشترین میزان کلروفیل مربوط به دمای انجماد بود (۲/۹۹ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) که در روز پنجم مشاهده شد (جدول ۲). پایین‌ترین میزان تولید کلروفیل مربوط به شرایط فوق افراطی ۱۶- درجه سانتی‌گراد بود که به روز هشتم بعد از تلقیح مربوط می‌شد.

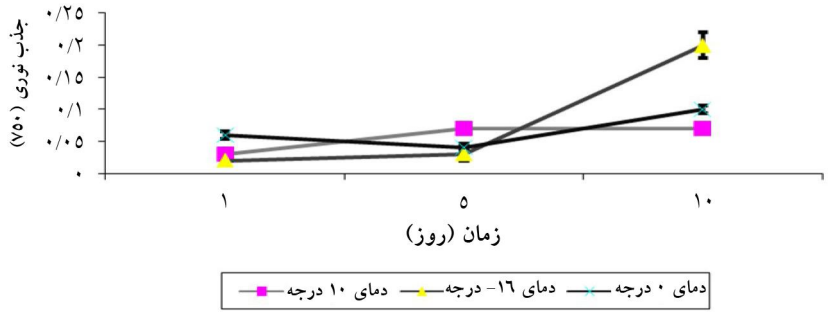
جدول ۲. مقدار کلروفیل در دماهای ۱۰، ۰، ۱۶- درجه سانتی‌گراد در روزهای مختلف در سیانوباکتریوم *Lyngbya obscura*

نوع تیمار	مقدار کلروفیل ($mg.ml^{-1}$) در روز پنجم	مقدار کلروفیل ($mg.ml^{-1}$) در روز ششم	مقدار کلروفیل ($mg.ml^{-1}$) در روز هفتم	مقدار کلروفیل ($mg.ml^{-1}$) در روز هشتم
دمای ۰°C	۲/۹۹±۰/۰۲	۲/۹۸±۰/۰۱	۲/۹۸±۰/۰۲	۲/۹۷±۰/۰۳
دمای ۱۰°C	۲/۹۷±۰/۰۱	۲/۹۹±۰/۰۱	۲/۹۹±۰/۰٤	۲/۹۹±۰/۰۲
دمای ۱٦°C-	۲/۹۸±۰/۰۲	۲/۹۷±۰/۰۰۵	۲/۹٦±۰/۰۱	۲/۹۳±۰/۰۱

مقایسه ابتدایی اجتماعات بویژه از نظر رنگ نشان داد که میان شرایط دمایی انجماد و زیر انجماد (۱٦- سانتی‌گراد) تفاوت محسوس رنگ وجود ندارد. علاوه بر این حتی نمونه هنگامی که در شرایط فوق افراطی قرار می‌گیرد، اجتماعات خود را از حالت مرکز گرا به حالت پراکنده در می‌آورد. تفاوت رنگی که در نمونه مربوط به تیمار ۱۰ درجه مشاهده می‌شود (شکل ۱) ناشی از عدم یکسان بودن زمان عکس‌برداری بود. بر خلاف تیمارهای انجماد و زیر انجماد، بدلیل مشکلاتی که در چاپ عکس پیش آمد، از عکس مربوط به مراحل ابتدای تلقیح استفاده گردید. اما مشاهدات نشان داد که میزان تولید رنگ و شکل اجتماعات تا حدی مشابه دو حالت دیگر بود. هرچند مقداری مرکز گرایی در این شرایط مشاهده می‌شود. در هیچکدام از شرایط دمایی اعمال شده، مسئله تمایل به چسبندگی به بدنه ظروف مشاهده نگردید که با شرایط نمونه در حالت تیمار بهینه دمایی (در تصاویر نیامده) مشابه بود و می‌تواند دلیل دیگری بر عدم بروز نوعی تغییر افراطی در رفتار نمونه باشد.



شکل ۱. مقایسه اجتماعات سیانوباکتریوم *Lyngbya obscura* در شرایط متفاوت دمایی.

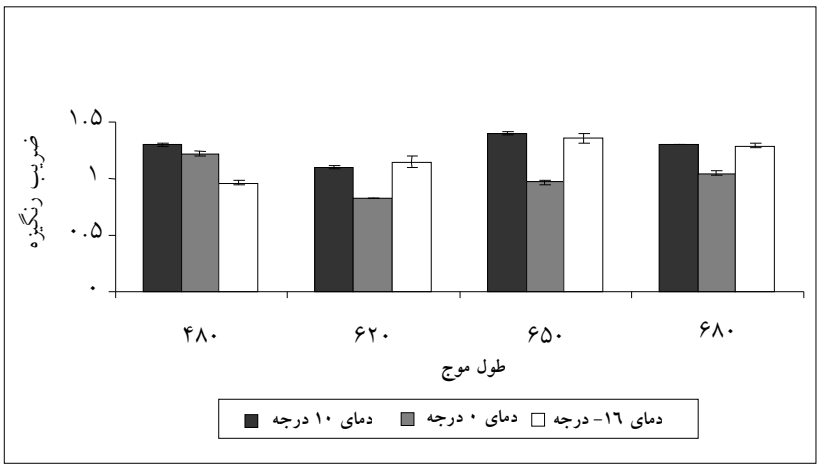


شکل ۲. مقایسه منحنی‌های رشد سیانوباکتریوم *Lyngbya Obscura* در دماهای ۱۰، ۰ و ۱۶- درجه سانتی‌گراد

دقت در منحنی رشد نمونه در شرایط فوق افراطی دما (شکل ۲)، نشان می‌دهد که فاز تاخیری در نمونه وجود نداشت. در خصوص رشد در شرایط انجماد، این پدیده تا روز پنجم پس از تلقیح مشاهده گشت اما بعد از این، نمونه توانسته بدون طی فاز تاخیری وارد فاز تصاعدی شود. بیشینه رشد در دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد به مراتب پایین‌تر بود. ضمن اینکه نمونه از روز پنجم وارد فاز ایستایی شد و در عین حال میزان رشد آن در مقایسه با دو تیمار دیگر اندک بود (شکل ۲).

کاروتن زایی در شرایط نوری محدود کشت شده (۲ میکرومول کوانتا بر مترمربع در ثانیه)، در سیانوباکتریوم *Lyngbya obscura* متوقف نشد. استفاده از ثابت مقایسه‌ای در زیوه جذب نسبت به ثابت کدورت سنجی (شکل ۳) در شوک‌های دمایی افراطی پایین (۱۶- درجه سانتی‌گراد) نشان از وجود رنگیزه‌های ثانویه از نوع کاروتنوییدها داشت. در شرایط دمایی انجماد و بالای انجماد (۱۰ درجه سانتی‌گراد)، سیستم تولید کاروتنوییید فعال بود که می‌تواند نشانی از فعالیت فتوسنتزی باشد (با توجه به ثابت بودن نسبی مقادیر کلروفیل، جدول ۲ و شکل ۳).

محتوای آلو فیکوسیانین در دماهای افراطی و فوق افراطی پایین روند افزایشی نشان داد (شکل ۳). در مقایسه با دماهای پایین (ولی نه در حد انجماد و پایین‌تر از آن)، محتوای آلو فیکوسیانین مقدار قابل توجهی داشت و این امر با زمان همبستگی معنی‌دار نشان نداد (R^2=۰/۲۳). همین امر در مورد محتوای فیکوسیانینی هم صادق است (شکل ۳). محتوای فیکوسیانین نسبت به ضریب کدورت سنجی(OD_{750}) تقریباً معادل یک بود (شکل ۳).



شکل ۳. نمودار هیستوگرام ضریب نسبی رنگیزه‌ای در زیوه در سیانوباکتریوم *Lyngbya Obscura* در دمای ۱۰، ۰ و ۱۶- درجه سانتی‌گراد در روز هشتم بعد از تلقیح

محتوای فیکو بیلی پروتیئنی (جدول ۳)، در دمای افراطی پایین (۱۶-)، با دمای بالاتر از صفر (۱۰ درجه سانتی‌گراد) اختلاف معنی‌دار نشان نداد (P<۰/۰۵). این امر نه تنها در مورد محتوای کل فیکوبیلی پروتئین، بلکه به بخش‌های مختلف تشکیل‌دهنده سیستم فیکوبیلی زومی یعنی رنگیزه‌های مرکزی (آلو فیکوسیانین) و بخش میله‌ای (فیکوواریترین و فیکوسیانین) نیز صدق می‌کند (جدول ۳). در این میان بیشترین میزان رنگیزه مربوط به فیکوواریترین‌ها بود. رنگ خاص صورتی ناشی از استخراج به صورت در شیشه که در هنگام استخراج در دماهای مختلف دمایی مشاهده گشت، ناشی از برون ریزش این رنگیزه و مقدار بالای آن در این گونه بود. تنها در دمای انجماد بود که رنگ محلول تغییر کرد. نتایج بدست آمده، با آنچه در بررسی‌های در زیوه (شکل ۳) بدست آمد سازگار می‌باشد.

جدول ۳. مقدار فیکو بیلی پروتیین‌ها در دماهای ۱۰، ۰، ۱۶- درجه سانتی‌گراد در سیانوباکتریوم *Lyngbya obscura*

نوع تیمار	مقدار فیکوسیانین ($mg.ml^{-1}$)	مقدار آلوفیکوسیانین ($mg.ml^{-1}$)	مقدار فیکوواریترین ($mg.ml^{-1}$)	مقدار فیکوبیلی پروتئین ($mg.ml^{-1}$)
دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد	۳/۰۷±۰/۰۱	۱/۹۰۳±۰/۰۱	٤/۸٥۲±۰/۰۱	۹/۸۲٥
دمای ۰ درجه سانتی‌گراد	۳/۰٥٦±۰/۰۰٥	۱/۸۹۷±۰/۰۰٥	۲/۸۳٥±۰/۰۱	۷/۷۸۸
دمای ۱٦- درجه سانتی‌گراد	۳/۰۲٥±۰/۰٤	۱/۸۸۷±۰/۰۱	٤/۷۹۹±۰/۰٥	۹/۷۱۱

بحث

تاکنون پژوهشی که اثر دماهای پایین (ده درجه سانتی‌گراد و پایین‌تر از آن) بویژه دماهای در حد انجماد و زیر نقطه انجماد را در سیانوباکتری‌ها بررسی کند، در ایران انجام نگرفته است. بنابراین نمی‌توان گفت که آیا دیگر سیانوباکتری‌های شالیزارهای استان گلستان نیز از الگوی مشابه الگوی رشد دمایی *Lyngbya obscura* تبعیت می کنند یا الگوی آن‌ها متفاوت است. در معدود بررسی‌های انجام شده (صفایی و همکاران، ۱۳۸۷؛ شکروی و همکاران، ۱۳۸۸) بر روی سیانوباکتری‌های نوستوکال و اسیلاتوریال نشان داده شد که رشد از از الگوی متداول سیانو باکتری‌های خاکزی (Boussiba, 1988). پیروی می کند ولی در این گزارش‌ها، به دماهای بالاتر از ده درجه سانتی‌گراد توجه شده است. با این همه تردیدی نیست که وجود نمونه ای مانند *Lyngbya obscura* از نظر رفتارهای دمایی بسیار جالب توجه می‌باشد. سیانوباکتریوم *Lyngbya* sp. که از شالیزارهای استان گلستان جمع‌آوری شده و در دماهای ده تا چهل و پنج درجه سانتی‌گراد مورد مطالعه قرار گرفته بود، در دمای پایین پانزده درجه قابلیت بقا و رشد و تولید رنگیزه‌ای خود را از دست می‌داد. به همین ترتیب در بررسی‌های صفایی و همکاران (۱۳۸۷)، نمونه نمی‌توانست در شرایط دمایی پایین تر از ده درجه بقای خود را حفظ کند. در دیگر بررسی‌های انجام شده، نشان داده شد که سیانوباکتری‌های همزیست مانند *Anabaena azollea* در دمای پایین‌تر از ۱۵ درجه سانتی‌گراد، رشد و فعالیت نیتروژنازی خود را از دست می دهند و قابلیت تولید هتروسیست در آن‌ها از بین می‌رود (Boussiba, 1988). با توجه به اینکه در همه این موارد نمونه‌ها از شالیزارها جمع‌آوری و نشان ویژه سازی شده‌اند، می‌توان گفت که به نظر می‌رسد رفتارهای سیانوباکتری مورد بررسی یعنی *Lyngbya obscura* رفتاری خاص و در میان نمونه‌های بررسی شده منحصر بفرد می‌باشد.

چنانکه در مقدمه توضیح داده شد، گستره بردباری دمایی در سیانوباکتری‌ها قابل توجه است و به‌ویژه نمونه‌های مناطق سردسیر بردباری‌های قابل توجهی به دماهای پایین دارند. از دید اکوفیزیولوژیک اگر آسیب انجماد به علت هیدراسیون سلولی ناشی از انجماد باشد، آنگاه مقاومت به فقدان آب ممکن است یک پیشنیاز مهم برای مقاومت به استرس انجماد باشد. نتایج نشان داده که در سیانوباکتری‌ها گونه‌ها یا نمونه ی با تحمل به خشکی بیشتر، بردباری بیشتری به استرس انجماد از نمونه‌هایی با بردباری به خشکی کمتر از خود نشان می‌دهد در واقع در نمونه‌هایی مانند *Nostoc commune* وجود زندگی در اجتماعات و به شکل کلنی، سبب مقاومت توام در برابر خشکی و انجماد می‌شود (Acea et al., 2002). در صورت خارج کردن موجود از زندگی کلنی و یا قرار دادن آن در کشت‌های آزمایشگاهی تحت شرایط انجماد، انرژی نوری جذب شده بوسیله کمپلکس فتوسیستم II به شکل انرژی گرمایی هدر می‌رود. هنگامی که اجتماعات تشکیل می‌شود و یا پوشش‌های ضخیم کلنی بر روی رشته‌ها بوجود می‌آید، به نظر می‌رسد که سیستم‌های حفاظتی، ریسه‌ها را از غیرفعال شدن در شرایط تنش دمایی محافظت کنند. نتایج نشان داده است که در شرایط وجود پوشش‌های محافظ، حتی در دماهای فوق افراطی نظیر ۳۶- درجه سانتی‌گراد، هنوز مقادیر زیادی از آب بطور مایع داخل سلول‌ها باقی می‌ماند. در این حالت فعالیت بالای فتوسیستم I بوسیله فتواکسیداسیون P700 نشان داده شده است. علاوه براین وجود ترکیباتی نظیر متانول، مقاومت به استرس انجماد را در این گونه‌ها بالا می‌برد (Yufang Lin et al ., 2004).

اینکه چنین مکانیسمی در سیانوباکتریوم *Lyngbya obscura* وجود داشته باشد و نقش پوشش محافظتی به غلاف نسبتا ضخیم نمونه محول شده باشد، اثبات نشده ولی به هرحال می‌توان آن را به‌عنوان نوعی فرضیه پیشنهاد کرد. وجود ترکیباتی مانند اسیدهای آمینه مایکوسپورین مانند که سابق بر این در تنش‌های فرابنفش موثر شناخته می‌شدند (شکروی و همکاران، ۱۳۸۱) و امروزه نقش‌های ضد تنش شوری نیز به آن‌ها نسبت داده می‌شود (شکروی و همکاران، ۱۳۸۷) و کشف روزافزون ترکیبات متفاوت در غلاف و پوشش‌های بیرون تریکوم، می‌تواند تاییدی بر این مدعا باشد (Vincent and Howard-Williams, 2000). ضمن اینکه در بررسی‌های Warwick و Williams (۲۰۰۱) علی‌رغم بحث نسبتاً جامعی که در مورد احتمال وجود غلاف به‌عنوان یک عامل حفظ کننده بقا و رشد در شرایط دمایی افراطی، صورت گرفته، مسئله تنوع پذیری مورفولوژیک سیانوباکتری‌های اسیلاتوریال و از جمله گونه *Lyngbya obscura* مورد توجه قرار نگرفته است. در بررسی‌های منادی (۱۳۸۸)، تاثیر عوامل محیطی و از جمله دما بر روی تنوع پذیری مورفولوژیک این گونه قابل توجه است و به نظر می‌رسد که وجود غلاف نوعی صفت اکتسابی باشد تا وراثتی (منادی، ۱۳۸۸). در دماهای در حد انجماد و پایین تر از آن، غلاف با قطر نسبتاً بیشتر از حد دمای عادی وجود دارد که این امر موید نظریه فوق است. اما وجود غلاف به عواملی نظیر اسیدیته حساس می‌باشد و اگر نمونه در شرایط نوسان‌های اسیدیته قرار گیرد، نسبت به دماهای پایین حساس می‌شود. در بررسی فوق تاثیر توام دما و pH به صورت مقدماتی انجام شد (بشرویه نژاد، ۱۳۸۸). نتایج نشان داد که در محدوده دمای بکار گرفته شده، نمونه نسبت به نوسان‌های اسیدیته و قلیاییت، علیرغم تغییر در ابعاد غلاف، نمونه توان مقابله با تنش‌های دمایی پایین را دارد. می توان پیشنهاد کرد که در نمونه مذکور مکانیسم‌های دیگری برای حفظ نمونه در تنش‌های دمایی افراطی پایین وجود دارند که در محدوده مکانیسم‌های داخلی هستند. از نوع مکانیسم‌هایی که به عنوان مثال به صورت ترکیبات شبه

مایکوسپورین برای مقابله با تنش‌های پرتوی پیشنهاد گردیده است (شکروی و همکاران، ۱۳۸۵). با توجه به اینکه امکان بررسی‌های ترکیبات درونی برای آزمایشگاه دانشگاه آزاداسلامی گرگان وجود ندارد، و گذشته از این، یافتن چنین ترکیبات احتمالی، نیاز به زمان طولانی دارد، در حال حاضر تا همین حد می‌توان اظهار نظر نمود.

عدم فاز تاخیری در شرایط ۱۶- درجه سانتی‌گراد، در بررسی‌های عادی اکوفیزیولوژیک با برون ریزش ترکیبات دیواره ای در ارتباط مستقیم است و به‌طور معمول بر مبنای برون ریزش ترکیبات دیواره ساز تفسیر می‌شود (Stal, 2000). به نظر می‌رسد عدم تغییر معنی دار کلروفیل و نیز عدم فاز تاخیری که حاکی از برون ریزش عادی ترکیبات دیواره ساز است، نشان از فتوسنتز طبیعی نمونه در این شرایط دمایی دارد. در دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد نیز وضعیت به همین ترتیب می‌باشد. می‌توان نتیجه گرفت که خوگیری نمونه به شرایط دمایی پایین و فوق افراطی پایین (۱۰ درجه و ۱۶- درجه سانتی‌گراد) در سیانوباکتریوم مورد مطالعه بدون مشکل انجام می‌شود. مسئله فاز منفی رشد در شرایط نگهداری در دمای انجماد، نمی‌تواند به‌طور قاطع به منزله کاهش عملکرد دستگاه فتوسنتزی باشد (جدول ۲). با توجه به اینکه محتوای فیکوسیانین و بخصوص آلو فیکوسیانین در نمونه در شرایط دمایی انجماد کاهش معنی‌داری نیافته است، به نظر می‌رسد که سیستم فیکوبیلی زومی قابلیت آن را دارد که در شرایط شوک‌های افراطی پایین (۱۶-درجه سانتی‌گراد) عملکرد خود را حفظ کند. این دلیل دیگری بر ثبات سیستم فتوسنتزی در شرایط تنش مذکور است. در شرایط انجماد (صفر درجه سانتی‌گراد)، این سیستم اندکی دچار اختلال عملکرد می‌شود که به‌صورت کاهش رنگیزه‌های فیکوبیلی پروتئینی نمود می‌یابد. این کاهش عملکرد (با توجه به غلظت کلروفیل و وضعیت درزیوه‌ای رنگیزه‌ها) سبب اختلال در رشد نمونه (رشد منفی) تا روز پنجم پس از تلقیح می‌گردد ولی از آن پس نمونه قابلیت آن را دارد که خود را با شرایط سرمایی جدید سازگار کند. رشد تصاعدی که بعد از روز پنجم آغاز می‌گردد ناشی از همین بازیابی فعالیت است. از نظر تولید کاروتنوئید، نمونه روندی تقریباً مشابه را طی می‌کند. نمونه‌های مناطق سردسیر، بویژه ارتفاعات تولید کاروتنوئید بالایی دارند (Round, 1981) اما به نظر می‌رسد که این تولید کاروتنوئید، به‌طور عمده به مسئله شدت بالای نور در این ارتفاعات مربوط باشد تا مسئله دما (Round, 1981). در بررسی‌های شکروی و همکاران (۱۳۸۷) بر روی *Lyngbya* sp. تولید کاروتنوئید در سویه مورد بررسی در دمای پایین‌تر از ۱۵ درجه سانتی‌گراد کاهش معنی‌دار پیدا می‌کرد. در بررسی‌های صفایی و همکاران (۱۳۸۷) بر روی نمونه دیگری از Lyngbya نتیجه مشابه بدست آمد. بنابراین امکان آن وجود دارد که بالا بودن مقدار کاروتنوئید با فعال بودن دستگاه فتوسنتزی در ارتباط باشد. اما در ارتباط مستقیم با دما، بیشتر نوعی صفت وابسته به گونه باشد تا اینکه در بین گونه‌های مختلف این جنس از عمومیت برخوردار باشد.

روی هم رفته، سیانوباکتریوم *Lyngbya obscura* در رابطه با محدوده دمایی که برای استان گلستان پایین محسوب می‌شود (۱۰ درجه سانتی‌گراد)، دماهای در حد انجماد (صفر درجه) و دماهای فوق افراطی پایین (۱۶- درجه سانتی‌گراد)، می‌تواند قابلیت خوگیری از خود نشان دهد. در خصوص دماهای افراطی پایین، اگر تیمار اعمال شده به‌صورت شوک دمایی باشد، این خوگیری بهتر انجام می‌شود. با توجه به اینکه برون ریزش آمونیوم در این نمونه وجود دارد (پاسخ‌های اکوفیزیوژیک ریزجلبک‌های محافظ زمین‌های کشاورزی در شرایط غیرطبیعی حرارتی

ناشی از حملات نظامی) و با توجه به نرخ رشد بالای نمونه در مقایسه با دیگر گونه‌های اسیلاتوریال بررسی شده (شکروی و همکاران، ۱۳۸۷؛ صفایی و همکاران، ۱۳۸۷؛ شکروی و ساطعی، ۱۳۸۲)، جالب توجه می‌باشد. می‌توان روی بکارگیری این نمونه به عنوان محافظ زمین‌های کشاورزی در شرایط سرمایی حاد، نظیر زمستان سال ۱۳۸٦، چه به‌صورت استفاده موضعی در زمین‌های استان گلستان و چه به‌صورت تلقیح در سایر زمین‌های کشاورزی (شکروی و همکاران، ۱۳۸۱)، فکر کرد. ضمن اینکه مورفولوژی نمونه تمایل به ایجاد پوسته نشان می‌دهد که در این‌صورت امکان تشکیل پشته‌های میکروبی در آن بالاست (Acea et al., 2002) اگر چنین باشد، امکان بکارگیری آن به‌عنوان تعدیل کننده دمایی و نیز تعدیل کننده احتمالی سایر عوامل محیطی نظیر شوری و اسیدیته و قلیاییت (شکروی و همکاران، ۱۳۸۷) وجود دارد. از سوی دیگر به نظر می‌رسد که نمونه مذکور حافظه تاریخی خود را از دست نداده و یا اینکه نوترکیبی‌های مختلف ناشی از روند تکاملی و یا بمباران‌های شیمیایی زمین‌های کشاورزی، نتوانسته در حوزه اطلاعاتی آن اختلال جدی ایجاد کند از این نظر نمونه از الگوی عمومی سیانوباکتری‌ها تبعیت می‌کند (شکروی و ساطعی، ۱۳۸۲).

نتیجه‌گیری نهایی

رفتارهای سیانوباکتری مورد بررسی یعنی *Lyngbya obscura* رفتاری خاص و در میان نمونه‌های بررسی شده منحصر بفرد می‌باشد. این سیانوباکتری دارای ویژگی‌های جالب توجه برای مقابله با دمای پایین است که می‌تواند جهت تولید انبوه در زمین‌های کشاورزی استان گلستان و نیز تلقیح احتمالی به دیگر زمین‌های کشاورزی برای مقابله با آسیب‌های دمایی پایین، نظیر زمستان‌های سرد و طولانی، مورد توجه قرار گیرد.

منابع

امیرلطیفی، ف.، شکروی، ش. و علمایی، م. (۱۳۸٦). بررسی بقاء و رشد و وضعیت رنگیزه‌ای سیانوباکتری *Nostoc* sp. در شرایط متفاوت اسیدیته و قلیاییت. پایان‌نامه کارشناسی‌ارشد. دانشگاه آزاداسلامی واحد گرگان.

بشرویه نژاد کریمی، ع. (۱۳۸۸). پاسخ‌های اکوفیزیوژیک ریزجلبک‌های محافظ زمین‌های کشاورزی در شرایط غیرطبیعی حرارتی ناشی از حملات نظامی. پایان‌نامه کارشناسی‌ارشد. دانشگاه آزاداسلامی واحد گرگان.

سلطانی، ن.، خاوری‌نژاد، ر.، طباطبایی‌یزدی، م.، شکروی، ش. و والنتیه، ف. (۱۳۸٤). 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. و بافته چی، ل. (۱۳۸۱). تدوین تکنولوژی استفاده از سیانوباکتریا به‌عنوان 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 به‌منظور تلقیح در شالیزار. گزارش طرح پژوهشی. معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرگان.

شکروی، ش.، سپهری، س. و ساطعی، آ. (۱۳۸٤). نشان ویژه سازی مورفولوژیک سیانوباکتری به‌منظور

تلقیح در شالیزار، گزارش طرح پژوهشی، معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرگان.

شکروی، ش.، سلطانی، ن. و بافته‌چی، ل. (۱۳۸۵). سیانوباکتریولوژی. چاپ نخست. انتشارات دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرگان.

شکروی، ش.، صفایی، م.، امیرلطیفی، ف. و حسینی، ز. (۱۳۸۷). نشان ویژه‌سازی تاکسونومیک سیانوباکتری به منظور تلقیح در شالیزار. گزارش طرح پژوهشی. معاونت پژوهشی دانشگاه آزاداسلامی واحد گرگان.

شکروی، ش.، صفایی، م. و امیرلطیفی، ف. (۱۳۸۷). بررسی تاثیر دما بر رشد و ویژگی‌های فیزیولوژیک سیانوباکتریوم *Nostoc* sp. فصلنامه پژوهش‌های علوم گیاهی.

صفایی، م.، شکروی، ش. و امیرلطیفی، ف. (۱۳۸۷). بررسی تاثیر دما بر رشد و وضعیت رنگیزه‌ای سیانوباکتری *Nostoc* sp. جمع‌آوری شده از شالیزارهای استان گلستان. طرح پژوهشی. معاونت پژوهشی دانشگاه آزاداسلامی گرگان.

منادی، ن. (۱۳۸۸). بررسی خوگیری جلبک‌های زمین‌های کشاورزی به شرایط افراطی محیطی ایجاد شده در اثر حملات احتمالی با استراتژی ایجاد تنوع پذیری مورفولوژیک. پایان‌نامه کارشناسی‌ارشد. دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرگان.

Acea, M.J., Prieto-Fernandez, A. and Diz-Cid, N. (2002). Cyanobacteria inoculation of heated soils: effect of microorganisms of C and N cycle on chemical composition in soil surface. Soil Biology and Biochemistr. 35:513-524.

Anagnositidis, K. and Komarek, J. (1990). Modern approaches to the classification of cyanobacteria. stigonematales. Archieves for Hydrobiology. 14: 224-286.

Boussiba, S. (1988). Anabaena azollae as biofertilizer. In: Algal biotechnology. eds T.J. Stadler, M.C. Millon, Y. Verdus. H.M. karamanos and D. christiaen, Elsevier applied science.

Desikachary, T.V. (1959). Cyanophyta. Indian coyncil of agricultural research, monographs on Algae New Dehli, India.

Elster, J., Lukesova, A., Svoboda, J., Kopecy J. and Kanda, H. (1999). Diversity and abundance of soil algae in the polar desert, sredrup pass, Central Ellesmere Island – Polar Record 35: 231-254.

Getler, L. (1932). Cyanophyceae von Europa kryptogamen Flora Akademiche Verlagsgesellschaft-leipzig.

Hoffman, P.F. (1999). The brak-up rodinia, birth of gondwana, true polar wander and the snowball Earth. Journal of African Earth Sciences. 28: 17-33.

Hoffman, P.F., Kaufman, A.J., Halverson, G.P. and Schrag, D.P. (1998). A Neoproterozoic snowball Earth. Journal of African Earth Sciences. 28: 17-33.

Jensen, A. (1978). Chlorophylls and carotenoides. In: Handbook of phycological Methods, physiological and Biochemical Methods. eds, J.A. Hellebust and J.S. Carigie. Cambridge University Press.

John, D.M., Witton, B.W. and Brook, A.J. (2002). The freshwater algal flora of the British Islescambridge university press.

Kaushik, B.D. (1987). Aboratory methods for blue –green algae. Associated publishing company. New Dehli, India.

Kirschvink, J.L., Faldos, E.J., Betrani, L.E., Beukes, N.J., Gutzmer, J., Meapa, L.N. and Steinberger, R.E. (2000). Plaeoproterozoic snowball Earth: Extreme Climeatic and geochemical global change and its biological consequences.-proc. Not Acad. Sci (1999). The break –up Rodinia, birth of Gondwana, true polar wander and the snowball Earth. Journal of African Earth Sciences. 28:17-33.

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

Round, J.W. (1981). Ecology of algae. Prenice Hall publication.

Stal, L.T. (2000). Cyanobacterial mats and stromatolites. In: Whitton, B. & Potts, M.(eds): Ecology of the cyanobacteria: their diversity in space and Time, p.61-120, kluwers Academic Press, Dordrecht.

Steponkus, P.L. (1984). Role of the plasma membrane in freezing and cold acclimation. Annual Review of Plant Phyysiology. 35: 543-584.

Tang, E.P.Y., Threblay, R., andVincent, W.F. (1997). Cyanobacterial dominaace of polar freshwater ecosystems: are hiyh latitude mat-formers adapted to the low temoerature

enuiroment? Journal of Phycology. 33:171-181.

Vincent, W.F., and Howard-Williams, C. (2000). Life on snowball earth .Science. 287: 2421-2431

Warwick, F.V. and Howard-Williams, C. (2001). Algae and extreme environments. Nova Hedwigia Beiheft. 123, p. 33-36.

Yufang, L., Manabu, H., Kashino, Y., Koike, H., Tuzi, S., and Satoh, K. (2004). Tolerance to freezing stress in cyanobacteria, Nostoc commune and some cyanobacteria with various tolerances to drying stress. Polar Bioscience. 17: 56-68.