بسم الله الرحمن الرحیم

دانشکده علوم پایه

گروه زیست شناسی

گرایش فیزیولوژی گیاهی

جداسازی، شناسایی و تعیین برخی پارامترهای فیزیولوژیکی سیانوباکتری‌های بومی شالیزارهای برنج استان گیلان

از:

نکیسا نیازی حصار سفیدی

اساتید راهنما:

دکتر جنت سرمد

دکتر محمدجواد مهدی پور مقدم

استاد مشاور:

مهندس حسن شکری واحد

اسفند ۱۳۹۲

این پایان نامه را ضمن تشکر و سپاس بیکران و در کمال افتخار و امتنان

تقدیم می نمایم به:

تنها خواهر مهربان و عزیزتر از جانم، آتوسا

و

همسر عزیزم حسین شمسی، که با حضور و همفکری هایش اهداف زندگی ام را منظم نمود

و در نهایت تواضع و خشوع

و توسل به آن فروغ ابدی

تقدیم می کنم به

ستاره های روشن زندگیم

پدر و مادرم

عزیزانی که فداکاری های بی دریغشان همواره برایم پشتوانه بوده و هرچه دارم و هرچه

هستم، از دعای آنان است.

سپاسگزاری

سپاس خدای را که سخنوران، در ستودن او بمانند و شمارندگان، شمردن نعمت های او ندانند و کوشندگان، حق او را گزاردن نتوانند. و سلام و دورد بر محمّد و خاندان پاک او.

بدون شک جایگاه و منزلت استاد، اجّل از آن است که در مقام قدردانی از زحمات بی شائبه ی او، با زبان قاصر و دست ناتوان، چیزی بنگاریم. اما از آنجایی که تجلیل از استاد، سپاس از انسانی است که هدف و غایت آفرینش را تامین می کند و سلامت امانت هایی را که به دستش سپرده اند، تضمین؛ بر حسب وظیفه و از باب "من لم یشکر المنعم من المخلوقین لم یشکر الله عزّ و جلّ": از پدر و مادر عزیزم و این دو معلم بزرگوارم که همواره بر کوتاهی و درشتی من، قلم عفو کشیده و کریمانه از کنار غفلت هایم گذشته اند و در تمام عرصه های زندگی یار و یاوری بی چشم داشت برای من بوده اند سپاس گذارم؛ از استاد با کمالات و شایسته؛ جناب آقای دکتر محمد جواد مهدی-پور مقدم و سرکار خانم دکتر جنت سرمد که در کمال سعه صدر، با حسن خلق و فروتنی، از هیچ کمکی در این عرصه بر من دریغ ننمودند و زحمت راهنمایی این رساله را بر عهده گرفتند؛ از استاد صبور و با تقوا، جناب آقای مهندس حسن شکری واحد، که زحمت مشاوره این رساله را در حالی متقبل شدند که بدون مساعدت ایشان، این پروژه به نتیجه مطلوب نمی رسید؛ و از استادان فرزانه و دلسوز؛ جناب آقای دکتر اکبر نورسته و سرکار خانم دکتر اکرم سادات نعیمی که زحمت داوری این رساله را متقبل شدند؛ کمال تشکر و قدردانی را دارم.

باشد که این خرد ترین، بخشی از زحمات آنان را سپاس گوید.

از خواهر عزیز و دوست داشتنی ام، آتوسای مهربانم سپاسگزارم که در تمامی لحظات همیاری ام نمود.

با سپاس بی دریغ خدمت دوستان گران مایه ام خانم ها سارا اسماعیلی، زهرا الماسی، نسترن محسنی و زهرا شرف الدین و جناب آقای یوسفی که مراصمیمانه و مشفقانه یاری داده اند و برای آنها از درگاه پروردگار متعال بهترینها را آرزو دارم.

نگیسا نیازی حصار سفیدی اسفند ۱۳۹۲

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

چکیده فارسی..... ذ
چکیده انگلیسی..... ر

فصل اول– مقدمه..... ۱
۱-۱- خصوصیات کلی سیانوباکتری‌ها..... ۲
۱-۲- طبقه‌بندی سیانوباکتری‌ها..... ۵
۱-۳- تقسیمات شاخه سیانوباکتری‌ها..... ۷
۱-۳-۱- رده سیانوفیسه..... ۸
۱-۳-۱-۱- راسته Chroococcales..... ۸
۱-۳-۱-۲- راسته Pleurcocapsales..... ۸
۱-۳-۱-۳- راسته Oscillatoriales..... ۹
۱-۳-۱-۴- راسته Nostocales..... ۹
۱-۳-۱-۵ راسته Stigonematales..... ۹
۱-۳-۲- رده پروکلروفیسه..... ۹
۱-۴- خصوصیات زیستی سیانوباکتری‌ها..... ۱۰
۱-۴-۱- دما..... ۱۰
۱-۴-۲- شوری..... ۱۰
۱-۴-۳- pH..... ۱۰
۱-۵- نقش و کاربردهای سیانوباکتری‌ها..... ۱۱
۱-۵-۱- کودهای بیولوژیک..... ۱۱
۱-۵-۲- بهبودی در رشد گیاهان..... ۱۳
۱-۵-۳- سیانوباکتری‌ها و اصلاح اراضی..... ۱۳
۱-۵-۴- پاکسازی محیط از عناصر سنگین..... ۱۴
۱-۵-۵- متابولیت‌های ثانویه در سیانوباکتری‌ها..... ۱۴
۱-۵-۵-۱- مسیرهای تولید متابولیت‌های ثانویه..... ۱۶
۱-۵-۶- اهمیت اکولوژیکی سیانوباکتری‌ها در محیط زیست..... ۱۹
۱-۶- اهمیت سیانوباکتری‌ها در طبیعت..... ۲۰
۱-۷- اهمیت اقتصادی سیانوباکتری‌ها..... ۲۱
۱-۸- توکسین‌های سیانوباکتریایی..... ۲۲
۱-۸-۱- انواع توکسین‌های سیانوباکتریایی..... ۲۳
۱-۹- هدف از انجام مطالعی..... ۲۳

فصل دوم - مواد وروش‌ها ۲۵
۲-۱- دستگاه‌ها و تجهیزات مورد استفاده ۲۶
۲-۲-مواد شیمیایی و محیط کشت ۲۶
۲-۳- نمونه‌برداری ۲۸
۲-۴- جداسازی سیانوباکتری‌ها از خاک‌های شالیزار ۲۹
۲-۴-۱- تهیه سری رقت ۲۹
۲-۴-۲- کشت اولیه نمونه‌ها ۳۰
۲-۵- خالص‌سازی نمونه‌ها ۳۱
۲-۶- شناسایی مورفولوژیکی سویه‌های خالص‌سازی شده ۳۲
۲-۷- انتقال به محیط کشت ۳۲
۲-۸- مشخصات اتاق کشت ۳۳
۲-۹- شناسایی مولکولی سویه‌های خالص‌سازی شده ۳۳
۲-۱۰- سنجش پارامترهای فیزیولوژیک ۳۵
۲-۱۰-۱- تعیین منحنی رشد روزانه ۳۵
۲-۱۰-۲- سنجش وزن خشک و نرخ رشد ۳۶
۲-۱۰-۳- سنجش کلروفیل ۳۶
۲-۱۰-۴- سنجش فیکوبیلی‌پروتئین‌ها ۳۷
۲-۱۰-۵- سنجش مقدار پروتئین کل ۳۸
۲-۱۱- تعیین پارامترهای فیزیکی و شیمیایی خاک ۳۹
۲-۱۱-۱- تعیین مقدار هدایت الکتریکی خاک ۳۹
۲-۱۱-۲- سنجش pH ۴۰
۲-۱۱-۳- مواد معدنی موجود در خاک ۴۰
۲-۱۱-۳-۱- ازت موجود در خاک ۴۰
۲-۱۱-۳-۲- پتاسیم ۴۱
۲-۱۲- محاسبات آماری ۴۱

فصل سوم - نتایج ۴۲
۳-۱-جداسازی و خالص‌سازی نمونه‌ها ۴۳
۳-۲- شناسایی مورفولوژیکی ۴۳
۳-۳-شناسایی مولکولی ۴۵
۳-۴-بررسی پارامترهای فیزیولوژیکی سیانوباکتری‌های جداسازی شده از شالیزارهای برنج استان گیلان ۵۳
۳-۴-۱- رسم منحنی رشد به روش کدورت سنجی (طول موج ۷۵۰ nm) ۵۳
۳-۴-۲- نرخ رشد ۶۲
۳-۴-۳- تغییرات روزانه محتوای رنگیزه کلروفیل a ۶۴
۳-۴-۳-۱- مقایسه مقدار کلروفیل a در روز هجدهم در جنس‌های جداسازی شده ۷۳

۳-۴-۴- مقدار پروتئین کل ۷۳
۳-۴-۵- فیکوبیلی‌پروتئین‌ها ۷۵
۳-۴-۵-۱- مقایسه محتوای فیکوبیلی‌پروتئین‌ها در روز هجدهم بین جنس‌های جداسازی شده ۸۴
۳-۵- آنالیز خاک شالیزارهای مورد بررسی ۸۴

فصل چهارم- بحث ۸۶
۴-۱- جداسازی، خالص‌سازی و شناسایی مورفولوژیکی ۸۷
۴-۲- شناسایی مولکولی سیانوباکتری‌های جداسازی شده ۸۸
۴-۳- بررسی رشد و برخی پارامترهای فیزیولوژیکی سیانوباکتری‌ها ۸۸
۴-۳-۱- بررسی منحنی رشد و نرخ رشد ۸۸
۴-۳-۲- تغییرات روزانه و محتوای کلروفیل a ۸۹
۴-۳-۳- مقدار پروتئین کل ۹۱
۴-۳-۴- محتوای فیکوبیلی‌پروتئین‌ها ۹۱
۴-۴- آنالیز خاک مناطق مورد بررسی ۹۲
۴-۵- نتیجه‌گیری کلی ۹۲
۴-۶- پیشنهادها ۹۳

منابع ۹۵

فهرست جداول

عنوان **صفحه**

جدول ۲-۱اسامی و مدل دستگاه‌های مورد استفاده ۲۶
جدول۲-۲ مواد استفاده شده ۲۷
جدول ۲-۳عناصر و مواد غذایی مورد نیاز برای رشد سیانوباکتری‌ها جهت تهیه ۱ لیتر محلول ۲۷
جدول ۲-۴ عناصر و مواد غذایی نادر(Micronutrients) در تهیه محیط کشت مناسب برای رشد سیانوباکتری‌ها ۲۸
جدول ۲-۵ برنامه دستگاه PCR مورد استفاده ۳۴
جدول ۲-۶ مواد و مقادیر مربوطه جهت انجام PCR ۳۵
جدول۲-۷ محتویات بافر استخراج ۳۹
جدول ۳-۱ خصوصیات مورفولوژیکی جنس‌های سیانوباکتری‌های شناسایی شده(Prescott,G.W ،۱۹۶۲) ۴۵
جدول ۳-۲ نرخ رشد سیانوباکتری‌های جداسازی و شناسایی شده از شالیزارهای مورد بررسی رد استان گیلان ۶۳
جدول ۳-۳ مقادیر پروتئین کل اندازه‌گیری شده از نمونه‌های سیانوباکتری‌های مورد بررسی ۷۴
جدول۳-۴ پارامترهای فیزیکی و شیمیایی خاک شالیزارهای مورد بررسی ۸۵

فهرست شکل‌ها

عنوان **صفحه**

شکل ۱-۱ درخت تکاملی سیانوباکتری‌ها بر اساس مارکر 16SrRNA ۷
شکل۱-۲ مسیرهای تولید متابولیت‌های ثانویه(Adam M.Burja et al., 2001) ۱۷
شکل۱-۳ انواع ترکیبات جداسازی شده از سیانوباکتری‌های دریایی ۱۸
شکل۱-۴ فعالیت بیوشیمیایی لیپوپپتید جدا شده از سیانوباکتری‌ها(Adam M.Burja et al., 2001) ۱۹
شکل ۲-۱ نمونه‌برداری از خاک شالیزارها در مرحله غرقابی ۲۹
شکل ۲-۲ نحوه رقیق‌سازی نمونه‌های خاک شالیزارهای برنج مورد بررسی ۳۰
شکل۲-۳ تصاویری از پلیت‌های حاوی خاک‌های رقیق شده کشت داده شده ۳۱
شکل۲-۴ نمونه‌های سیانوباکتری رشد یافته از خاک شالیزارهای برنج ۳۱
شکل ۲-۵ تصویری از سیانوباکتری‌ها ۳۲
شکل ۲-۶ نمونه‌ای از سیانوباکتری‌های انتقال داده شده از الف) محیط کشت جامد به ب) مایع ۳۳
شکل۲-۷ نمونه‌های آماده شده جهت سنجش میزان کلروفیل ۳۷
شکل۲-۸ نمونه‌های آماده شده برای سنجش میزان فیکوبیلی‌پروتئین‌ها ۳۸
شکل۳-۱ نمونه‌های جداسازی شده حاصل از کشت خاک شالیزار ۴۳
شکل ۳-۲ نمونه‌ای از کشت‌های مجدد انجام داده شده ۴۳
شکل ۳-۳ منحنی درصد فراوانی جنس‌های سیانوباکتری‌های شناسایی شده ۴۴
شکل ۳-۴ سیانوباکتری‌های رشد یافته به همراه لام مطوب از سیانوباکتری‌های جداسازی و شناسایی‌شده ۴۴
شکل ۳-۵ باندهای DNA استخراج شده بر روی ژل آگارز ۱٪ ۴۶
شکل ۳-۶ باندهای محصولات PCR ژن تکثیر شده 16SrRNA بر روی ژل آگارز ۲٪ ۴۶
شکل ۳-۷ منحنی رشد سیانوباکتری *Arthrospira* جداسازی شده از خاک غرقابی از منطقه غربی استان گیلان ۵۳
شکل ۳-۸ منحنی رشد سیانوباکتری *Nostoc* جدا سازی شده از خاک غرقاب از منطقه مرکز استان گیلان ۵۴
شکل ۳-۹ منحنی رشد سیانوباکتری *Dermocarpella* جداسازی شده از خاک غرقاب از منطقه غرب استان گیلان۵۴
شکل ۳-۱۰ منحنی رشد سیانوباکتری *Oscillatoria* جدا شده از خاک غرقاب از منطقه غرب استان گیلان ۵۵
شکل ۳-۱۱ منحنی رشد سیانوباکتری *Oscillatoria* از خاک خشک شالیزار از منطقه مرکزی استان گیلان ۵۵
شکل ۳-۱۲ منحنی رشد سیانوباکتری *Oscillatoria* جداسازی شده از خاک خشک شالیزار در منطقه جنوب استان گیلان ۵۶
شکل ۳-۱۳ منحنی رشد سیانوباکتری *Xenococcus* جداسازی شده ازخاک غرقاب در منطقه جنوب مرکز استان گیلان ۵۶
شکل ۳-۱۴ منحنی رشد سیانوباکتری *Chroococcus* جداسازی شده از خاک خشک شالیزار در منطقه جنوب استان گیلان ۵۷
شکل ۳-۱۵ منحنی رشد سیانوباکتری *Nostoc* جداسازی شده از خاک خشک در منطقه شرق استان گیلان ۵۷
شکل ۳-۱۶منحنی رشد سیانوباکتری *Leptolyngbya* جداسازی شده از خاک غرقاب در منطقه جنوب استان گیلان۵۸
شکل ۳-۱۷ منحنی رشد سیانوباکتری *Synechococcus* جداسازی شده از منطقه مرکزی استان گیلان ۵۸
شکل ۳-۱۸ منحنی رشد سیانوباکتری *Gloeochaete* جداسازی شده از شرق استان گیلان ۵۹

شکل ۳-۱۹ منحنی رشد سیانوباکتری *Oscillatoria* جداسازی شده از منطقه شرق استان گیلان ۵۹
شکل ۳-۲۰ منحنی رشد سیانوباکتری *Dermocarpella* جداسازی شده از منطقه غرب استان گیلان ۶۰
شکل ۳-۲۱ منحنی رشد سیانوباکتری *Synechococcus* جداسازی شده از منطقه غرب استان گیلان ۶۰
شکل ۳-۲۲ منحنی رشد سیانوباکتری *Leptolyngbya* جداسازی شده از منطقه شرق استان گیلان ۶۱
شکل ۳-۲۳ منحنی مقایسه رشد روزانه سیانوباکتری‌های جداسازی و شناسایی شده از شالیزارهای استان گیلان..... ۶۲
شکل ۳-۲۴ منحنی نرخ رشد سیانوباکتری‌های جداسازی و شناسایی شده ۶۴
شکل ۳-۲۵ تغییرات روزانه کلروفیل a سیانوباکتر *Arthrospira* شناسایی شده از منطقه غرب استان گیلان ۶۵
شکل ۳-۲۶ تغییرات روزانه کلروفیل*Nostoc* شناسایی شده از منطقه شرق استان گیلان..... ۶۵
شکل ۳-۲۷ تغییرات روزانه کلروفیل *Dermocarpella* شناسایی شده از منطقه غرب استان گیلان..... ۶۶
شکل۳-۲۸ تغییرات روزانه کلروفیل *Oscillatoria* شناسایی شده از منطقه غرب استان گیلان..... ۶۶
شکل۳-۲۹ تغییرات روزانه کلروفیل *Dermocarpella* از منطقه مرکزی استان گیلان ۶۷
شکل ۳-۳۰ تغییرات روزانه کلروفیل *Synechococcus* شناسایی شده از منطقه مرکزی استان گیلان ۶۷
شکل۳-۳۱ تغییرات روزانه کلروفیل *Xenococcus* شناسایی شده از منطقه جنوب استان گیلان..... ۶۸
شکل ۳-۳۲ تغییرات روزانه کلروفیل *Synechococcus* شناسایی شده از منطقه غرب استان گیلان..... ۶۸
شکل۳-۳۳ تغییرات روزانه کلروفیل *Chrococcus* شناسایی شده از منطقه جنوب استان گیلان..... ۶۹
شکل ۳-۳۴ تغییرات روزانه کلروفیل *Leptolyngbya* شناسایی شده از منطقه شرق استان گیلان..... ۶۹
شکل ۳-۳۵ تغییرات روزانه کلروفیل *Leptolyngbya* شناسایی شده از منطقه جنوب استان گیلان..... ۷۰
شکل۳-۳۶ تغییرات روزانه کلروفیل *Gloeochaete* شناسایی شده از منطقه شرق استان گیلان..... ۷۰
شکل۳-۳۷ تغییرات روزانه کلروفیل *Oscillatoria* شناسایی شده از منطقه مرکزی استان گیلان..... ۷۱
شکل۳-۳۸ تغییرات روزانه کلروفیل *Oscillatoria* شناسایی شده از منطقه جنوب استان گیلان..... ۷۱
شکل۳-۳۹ تغییرات روزانه کلروفیل *Oscillatoria* شناسایی شده از منطقه شرق استان گیلان..... ۷۲
شکل ۳-۴۰ تغییرات روزانه کلروفیل *Nostoc* شناسایی شده از منطقه مرکزی استان گیلان ۷۲
شکل۳-۴۱ مقایسه مقدار کلروفیل a در روز هجدهم در جنس‌های جداسازی شده..... ۷۳
شکل ۳-۴۲ مقدار پروتئین کل در فاز لگاریتمی رشد سیانوباکتری‌های جداسازی شده..... ۷۵
شکل۳-۴۳ مقایسه مقادیر فیکوبیلی‌پروتئین در *Arthrospira* جداسازی شده از غرب استان گیلان..... ۷۶
شکل ۳-۴۴ مقایسه مقادیر فیکوبیلی‌پروتئین در *Dermocarpella* جداسازی شده از غرب استان گیلان ۷۶
شکل۳-۴۵ مقایسه مقادیر فیکوبیلی‌پروتئین در *Leptolyngbya* جداسازی شده از شرق استان گیلان..... ۷۷
شکل۳-۴۶ مقایسه مقادیر فیکوبیلی‌پروتئین در *Oscillatoria* جداسازی شده از غرب استان گیلان..... ۷۷
شکل ۳-۴۷ مقایسه مقادیر فیکوبیلی‌پروتئین در *Synechococcus* جداسازی شده از مرکز استان گیلان..... ۷۸
شکل۳-۴۸ مقایسه مقادیر فیکوبیلی‌پروتئین در *Xenococcus* جداسازی شده از جنوب استان گیلان..... ۷۸
شکل۳-۴۹ مقایسه مقادیر فیکوبیلی‌پروتئین در *chroococcus* جداسازی شده از مرکز استان گیلان..... ۷۹
شکل۳-۵۰ مقایسه مقادیر فیکوبیلی‌پروتئین در *Dermocarpella* جداسازی شده از مرکز استان گیلان..... ۷۹
شکل ۳-۵۱ مقایسه مقادیر فیکوبیلی‌پروتئین در *Gloeochaete* جداسازی شده از شرق استان گیلان..... ۸۰
شکل ۳-۵۲ مقایسه مقادیر فیکوبیلی‌پروتئین در *Leptolyngbya* جداسازی شده از جنوب استان گیلان..... ۸۰
شکل ۳-۵۳ مقایسه مقادیر فیکوبیلی‌پروتئین در *Nostoc* جداسازی شده از مرکزی استان گیلان..... ۸۱

شکل۳-۵۴ مقایسه مقادیر فیکوبیلی‌پروتئین در *Nostoc* جداسازی شده از شرق استان گیلان..... ۸۱
شکل۳-۵۵ مقایسه مقادیر فیکوبیلی‌پروتئین در *Oscillatoria* جداسازی شده از جنوب استان گیلان ۸۲
شکل۳-۵۶ مقایسه مقادیر فیکوبیلی‌پروتئین در *Oscillatoria* جداسازی شده از مرکزی استان گیلان..... ۸۲
شکل ۳-۵۷ مقایسه مقادیر فیکوبیلی‌پروتئین در *Oscillatoria* جداسازی شده از شرق استان گیلان ۸۳
شکل ۳-۵۸ مقایسه مقادیر فیکوبیلی‌پروتئین در *Synechococcus* جداسازی شده از غرب استان گیلان..... ۸۳
شکل ۳-۵۹ مقایسه محتوای فیکوبیلی‌پروتئین‌ها در روز هجدهم در جنس‌های جداسازی شده..... ۸۴

چکیده

جداسازی، شناسایی و تعیین برخی پارامترهای فیزیولوژیکی سیانوباکتری‌های بومی شالیزارهای برنج استان گیلان

نکیسا نیازی حصارسفیدی

در طبقه بندی نوین، سیانوباکتری‌ها را بر اساس خصوصیات اکولوژیکی، تکاملی، مولکولی و مورفولوژیکی دسته بندی می‌کنند. تاکنون حدود ۲۵۰۰ گونه از این شاخه معرفی شده است. سیانوباکتری‌ها شامل گونه های تک سلولی و کلنی می‌باشند. برخی از سلول‌ها در سیانوباکتری‌های رشته‌ای از فرم عادی خارج شده و تمایز می‌یابند؛ که به آنها اکینت و هتروسیست گفته می‌شود. به طوریکه اکینت در مقاومت به تنش‌های محیطی و هتروسیست در تثبیت ازت نقش دارند. در شالیزار های برنج از سیانوباکتر های تثبیت کننده نیتروژن به عنوان کود برنج استفاده می‌شوند. در این پژوهش از خاک مناطق ریزوسفری شالیزارهای واقع در مناطق مرکزی، جنوب، شرق و غرب استان گیلان نمونه برداری شد. سپس نمونه های خاک تحت شرایط استریل به دو محیط کشت BG_{11} و BG_{110} در شرایط نور متغیر انتقال داده شدند. بعد از رشد اولیه میکروارگانیسم‌های موجود در خاک های کشت داده شده، خالص سازی سیانوباکتری‌ها از میان انواع میکروارگانیسم ها انجام گرفت که تمامی کشت های جدید، در بازه زمانی ۲۱ روز و در شرایط اتاقک رشد با دمای ۲±۲۴ درجه سانتیگراد، فتوپریود ۱۶ ساعت روشنایی و شدت نور ۲۰۰۰ لوکس کشت داده شدند. شناسایی مورفولوژیکی نمونه ها، بر اساس کلید شناسایی مورفولوژیکی معتبر، انجام شد. نتایج حاصل از شناسایی مورفولوژیکی نشان داد که تنوع سیانوباکتری‌ها در خاک‌های شالیزار بسیار زیاد بوده و انواع مختلفی از سیانوباکتری‌ها که عبارتند از: *Oscillatoria*، *Nostoc*، *Leptolyngbya*، *Synechococcus*، *Chroococcus*، *Xenococcus* ، *Gloeochaete*، *Arthrospira* و *Dermocarpella* شناسایی شد. شناسایی مولکولی برخی از سویه‌ها بر اساس تعیین توالی ژن 16SrRNA انجام گرفت. همچنین سیانوباکتری‌های جداسازی شده برای رسم منحنی رشد، نرخ رشد، سنجش کلروفیل a، فیکوبیلی‌پروتئین‌ها و پروتئین کل در شرایط آزمایشگاه و اتاقک رشد مورد مطالعه قرار گرفتند. نتایج مربوط به منحنی رشد و تغییرات روزانه کلروفیل a در فاز تاخیری، لگاریتمی و ایستایی در دوره‌های ۲۷ روزه کاملاً با یکدیگر همسو می‌باشند. بسته به نوع سیانوباکتری مورد بررسی، میزان فیکوبیلی‌پروتئین متفاوت بود. بیشترین مقدار فیکوبیلی‌پروتئین متعلق به *Nostoc* و کمترین مقدار در *Leptolyngbya* مشاهده شد که فاقد فیکواریترین می‌باشد. نتایج مربوط به بررسی پروتئین کل نشان داد که *Synechococcus* جداسازی شده از خاک‌های شالیزار واقع در مرکز استان و *Leptolyngbya* جداسازی شده از خاک-های شالیزار واقع در جنوب استان، به ترتیب بیشترین و کمترین مقدار پروتئین کل را دارا هستند.

کلمه‌های کلیدی: سیانوباکتری، شالیزار برنج، کلروفیل، فیکوبیلی‌پروتئین، هتروسیست

Abstract

Isolation, identification and characterization of local Cyanobacteria from rice paddy fields of Guilan province

Nakisa Niyazi Hesar Sefidi

In the new classification, cyanobacteria are ordered based on ecological characteristics, developmental and morphological studies. Almost 2500 species have been introduced to this field. Cells of some string colonies can be distinced to some different cells and modified to heterocysts and akinets. Akinets are created toward circumferential stresses and heterocysts play an important role in fixing nitrogen. Fixing nitrogen cyanobacteria are used as rice fertilizers in rice paddy fields. One of the most important use of cyanobacteria is to increase rice products. In this study, soils of rice paddy fields of south, west, east and center of Guilan province were sampled. Samples of soils were cultured under stril situation in BG_{11} and BG_{110} cultured mediums. After first culture, they were isolated and new subcultures of samples was done. All of subcultures have been set in growth chamber for 21 days under 24±2°C and 2000 lux changeable light with 16 hours luminosity. Morphological identification was done by use of creditable identification keys. Results of this field showed that there is a noticeable diverse in cyanobacteria of rice paddy field in Guilan province and different cyanobacteria with these names were identified: *Oscillatoria* ،*Nostoc* ،*Leptolyngbya* ،*Synechococcus* ،*Chroococcus* ، *Xenococcus* ، *Gloeochaete* ،*Arthrospira* and *Dermocarpella*. Molecular identification of some cyanobacteria by use of 16SrRNA gene sequencing was done. Isolated cyanobacteria were perused for growth curve, measurement of cholorophyll a and phycobilliproteins contents and total proteins under laboratory and growth chamber situations. Results of growth curve and cholorophyll a content show same periods lag, log and platto phases during 27 day. According to kind of cyanobacteria, existent phycobilliproteins contents of them are different. The maximum rate of phycobilliproteins content was for *Nostoc* and minimum rate was observed in *Leptolyngbya* that doesn't have any phycoertrin. *Synechococcus* of central regions of province and *Leptolyngbya* of southern area show maximum and minimum rate of total proteins.

Key word: cyanobacteria, rice paddy fields, heterocysts, phycobiliproteins, cholorophyll

فصل اول

مقدمه

۱-۱-خصوصیات کلی سیانوباکتری‌ها

سیانوباکتری‌ها پروکاریوت های گرم منفی هستند که کلروفیل a می سازند و از آن برای انجام فتوسنتز اکسیژنی استفاده می-کنند (Castenholz RW, 2001). از آنجایی که این میکروارگانیسم ها نیاز مختصری به عناصر غذایی دارند و تنها از آب، هوا و عناصر معدنی به عنوان منبع انرژی استفاده می کنند، لذا پتانسیل تولید آنها بسیار چشم گیر می باشد (Tamagnini et al. 2007).

در سیانوباکتری‌ها راهکارهای خاصی برای استفاده از نور محدود وجود دارد. وجود سیستم فیکوبیلی زوم یکی از آنها است. فیکوبیلی زوم ها، سیانوباکتری‌ها را قادر می سازند که در شرایط کم نوری مانند شالیزارها و یا درون خاک ها با تنش مقابله کنند (سلطانی و همکاران، ۱۳۸۴).

سیانوباکتری‌ها عمل فتوسنتز را به صورت فتواکسیژنیک انجام می‌دهند. سیانوباکتری‌ها دارای رنگیزه‌های کاروتن و گزانتوفیل گیرنده نوری و نیز رنگیزه های جانبی به نام فیکو بیلیو پروتئین هستند (آذرم و مهاجر، ۱۳۸۹). مجموع رنگدانه‌ها در گونه‌های این شاخه عبارت است از: کلروفیل a، فیکوسیانین c، فیکواریترین c، βکاروتن و گزانتوفیل‌ها عمدتاً زئا گزانتین، کریپتو گزانتین، میکسو گزانتین و ازسیوگزانتین. بسته به نسبت رنگدانه‌های موجود رنگ سلول‌ها از سبز تیره، تقریباً سیاه، تا زرد سبز، سبز زیتونی، سبز آبی، آبی آسمانی، بنفش و صورتی متفاوت است. مواد ذخیره‌ای سلولی عبارتند از: نشاسته ، پروتئین خاص سیانوفیسین و پلی ساکارید شبیه گلیکوژن که در واکنش با ید بی رنگ می شود (زارعی دارکی، ۱۳۹۰).

سلول‌ها با دیواره‌های چهارلایه‌ای نیز احاطه شده‌اند که از مواد لاتینی پلی ساکاریدی، پکتینی و مورئین‌ها تشکیل شده اند. در مورد اکثر اعضا یک لایه ژلاتینی چسبناک دیده می‌شود. در سلول‌های سیانوباکتری‌ها، اندامک‌هایی مانند هسته، کلروپلاست، دستگاه گلژی، میتوکندری، شبکه آندوپلاسمی و همچنین واکوئل‌های حاوی شیره سلولی با غشا احطه نشده‌اند. در پروتوپلاست، بخش مرکزی بی رنگ به عنوان نوکلئوپلاسم که حاوی رشته های DNA است (معادل هسته) و بخش رنگی محیطی به عنوان کروماتوپلاسم که در آن سیستم تیلاکوئیدها واقع‌اند قابل تشخیص است، لذا دستگاه فتوسنتزی تمایز یافته‌ای برای سلول وجود ندارد. در مورد اکثر گونه‌ها وجود واکوئل های گازی یک ویژگی خاص است (زارعی دارکی، ۱۳۹۰).

به لحاظ ریخت شناسی سیانوباکتری‌ها، شامل تیپ‌های ریسه تک سلولی، کلنی و پرسلولی می‌باشند که معمولاً اندازه میکروسکوپی دارند ولی گاهی اوقات آن‌ها کلنی‌هایی را تشکیل می دهند که با چشم غیر مسلح نیز قابل مشاهده است. فرم تاژک‌دار متحرک در این شاخه وجود ندارد (زارعی دارکی، ۱۳۹۰).

یک قسمت از ساختار رشته ای، فرم های پرسلولی تریکوم ها می‌باشد که شامل یک یا چندین ردیف سلول بوده و بین این ردیف‌ها یک رابطه پلاسمایی وجود دارد. غالباً تریکوم‌ها به همراه غلاف، رشته‌ها را تشکیل می دهند. رشته ها به حالت منشعب و غیر منشعب هستند که انشعابات آن‌ها ممکن است حقیقی یا کاذب باشد. در یک رشته منشعب، تریکوم‌های منشعب به دلیل تقسیم سلول‌ها در ابعاد مختلف بطور موازی در طول محور تریکوم رشد می کنند. در طول یک انشعاب کاذب، اغلب غلاف های منشعب مشاهده می‌شوند و تریکوم‌ها در حالت غیر منشعب باقی می‌مانند (زارعی دارکی، ۱۳۹۰).

سیانوباکتری‌ها به روش رویشی مانند دو نیم شدن، تکه تکه شدن، کلونی‌ها، هورموگونیا، هورموسیست‌ها، اکینت‌ها و به روش غیر جنسی(با تشکیل اندوسپورها و اگزوسپورها) تولیدمثل می‌کنند. تولیدمثل جنسی در آنها دیده نمی‌شود (زارعی دارکی، ۱۳۹۰).

سیانوباکتری‌ها به طور گسترده در شرایط متنوع انتشار یافته اند؛ بیشتر در آب‌های شیرین زندگی می کنند. آنها در دریاها و اقیانوس‌ها نیز دیده می‌شوند. در چشمه‌های آب گرم، روی سطح زمین و صخره‌های برهنه هم یافت می‌شود. آن‌ها بیشتر به صورت پلانکتون، بنتوز و پری‌فیتون زندگی می‌کنند و از عوامل مؤثر در تشکیل شکوفایی آبها هستند که گاهی نیز سم تولید می کنند. قادر به تثبیت نیتروژن بوده و به خاطر رشد انبوه سیانوباکتری‌ها در شالیزارهای برنج به هر هکتار از شالیزار حدود ۱۲-۲۵ کیلوگرم نیتروژن اضافه می‌کنند (زارعی دارکی، ۱۳۹۰).

مواد ذخیره‌ای در سیانوفیت‌ها پارامیلون است که به وسیله ید رنگ آن تغییر نمی‌کند یا به مقدار خیلی کم به رنگ زرد کم رنگ در می‌آید. پارامیلون در محدوه کلروپلاست تجمع یافته است که هم در اطراف پیرنوئید و هم مستقیماً در سیتوپلاسم وجود دارند. سلول فاقد دیواره سلولی است و سلول‌ها به وسیله پلیکل احاطه شده‌اند یا دارای لوریکا هستند (زارعی دارکی، ۱۳۹۰).

سیانوباکتری‌ها در مزارع برنج به وفور یافت می شوند و در حفظ حاصلخیزی مزارع برنج از طریق تثبیت نیتروژن حائز اهمیت هستند (Jeong-Dong & Choul-Gyun, 2006). فراوانی سیانوباکترها در مزارع برنج در کشورهای آسیایی که کشت برنج در

آنها انجام می گیرد، اهمیت زیادی دارد (Roger & Kulasooriya, 1980) با توجه به اینکه عمل تثبیت ازت در سیانوباکترهای هتروسیست[1] دار در شرایط عاری از اکسیژن انجام می شود، غرقابی بودن خاک های شالیزار و در نتیجه کاهش اکسیژن، باعث می شود تا آنزیم نیتروژناز فعال شود و فعالیت تثبیت نیتروژن در این شرایط به حداکثر برسد (Santra, 1993). وجود سیانوباکترها در مناطق معتدل به ویژه در خاک های قلیایی و آهکی مرسوم است. برخی از گونه ها از قبیل *Nostoc* بر روی سطح خاک، قابل رویت هستند (Weber, 2005).

فتوتروف بودن و عدم نیاز به مواد آلی در کشت سیانوباکتری‌ها، از نظر بیوتکنولوژی یک مزیت اقتصادی محسوب می‌شود که سیانوباکتری‌ها را نسبت به میکروارگانیسمهای دیگر برتری می‌بخشد. از طرفی داشتن مسیرهای متابولیکی ویژه و اطلاعات محدود ما از این ارگانیسم‌ها امکان دستیابی به ترکیبات جدید در این میکروارگانیسم‌ها را قوت می‌بخشد (Ananthni, 1972). از این‌رو سیانوباکتری‌ها از جمله میکروارگانیسم‌هایی هستند که امروزه به طور گسترده‌ای جهت تولید ترکیبات جدید مورد غربالگری قرار می‌گیرند و ترکیبات بسیاری با قابلیت‌های بیولوژیک مختلف از آنها شناسایی شده است که از آن جمله می‌توان به ترکیبات ضدمیکروبی اشاره نمود (Hashem, 1998). برای مثال، سیانوباکتری*Oscillatoria* اسیدهای چرب، تترا آمین، مشتقات اسپرمین و پیپیرازین را تولید می‌کند که دارای فعالیت ضدمیکروبی است (Jeong-Dong, 2007).

شکل غالب تغذیه در سیانوباکترها فتواتوتروفی می باشد که از کلروفیل a به عنوان رنگدانه اولیه فتوسنتزی استفاده می کنند و از فیکوبیلی پروتئین ها به عنوان رنگدانه‌های دریافت کننده نور بهره می برند. این میکروارگانیسم ها تحت شرایط آزمایشگاهی هتروتروف نیز می باشند. سیانوباکتری‌ها در حضور غلظت های بالای هیدروژن سولفید در محیط اطراف، فتوسنتز غیر اکسیژنی انجام می دهند (Dworkin et al., 2006).

سیانوباکتری‌ها به دو طریق در برابر نور خورشید سازگاری می یابند: ۱) از طریق تغییر دستگاه های فتوسنتزی که شامل تغییرات در سطح تیلاکوئید های فتوسنتزی در پاسخ به کیفیت و کمیت نور و ۲) تغییر در اندازه و ترکیبات فیکوبیلی پروتئین های فیکوبیلوزوم ها. همچنین سیانوباکتری‌ها به وسیله جذب سطحی امواج مضر و شکست این امواج مانع از ورود آنها به بخش های درون سلولی شده و از خود محافظت می کنند. البته سیانوباکتری‌ها از طریق تنظیمات شناور بودن و حرکات فعال، خود را در معرض نور قرار می دهند (Dworkin et al., 2006).

تنظیم مقدار آب موجود در سیانوباکتری‌ها به سه طریق انجام می شود: ۱) از طریق تشکیل وزیکول های گازی، ۲) از طریق متلاشی شدن وزیکول های گازی در نتیجه فشار بالای تورگر و ۳) از طریق تغییرات در چگالی سلول از طریق سنتز و تجزیه ترکیبات کربوهیدراتی (Dworkin et al., 2006).

بسیاری از سیانوباکتری‌ها از طریق آنزیم نیتروژناز تثبیت ازت را انجام می دهند. این آنزیم نسبت به اکسیژن حساس بوده و در حضور آن غیر فعال می شود. سیانوباکتری‌ها این مشکل را از طریق سلول های تمایز یافته ای به نام هتروسیست ها حل کرده اند که در این سلول ها تثبیت ازت به طور ویژه صورت می گیرد. همچنین تعدادی از سیانوباکترهای تک سلولی و رشته ای که فاقد هتروسیست هستند از طریق جداسازی فرایند های فتوسنتز و تثبیت ازت که به ترتیب در دوره‌های نوری و تاریکی رخ می دهند، تثبیت نیتروژن می کنند (Dworkin et al., 2006).

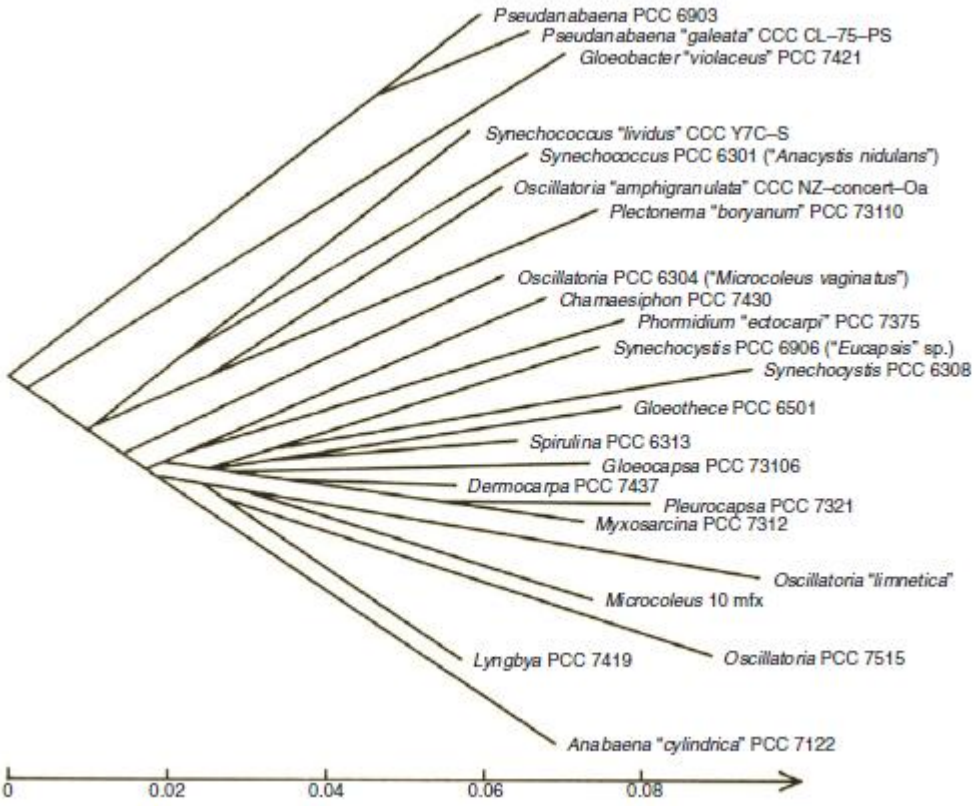
۱-۲- طبقه بندی سیانوباکتری‌ها

طبقه‌بندی Geitler، رده بندی جدید سیانوباکتری‌هایی است که بر اساس مورفولوژی گونه‌هایی که از محیط جمع شده بودند، استوار بود و اساس طبقه بندی‌های متعدد بعدی را تشکیل داد. به این نوع از طبقه‌بندی‌ها که استوار بر خصوصیات مورفولوژیکی است، طبقه‌بندی Geitlar می‌گویند. سپس Drouet و Daily با در نظر گرفتن اینکه بیشتر سیانوباکتری‌ها در واقع اکوفون‌های مورفولوژیک (اشکالی که دارای ژنوتیپ یکسان هستند و به واسطه تحریکات محیطی، تفاوت‌های فنوتیپیک نشان می‌دهند) متغیر هستند، تعداد نمونه‌های Geitler را به ۲۴ جنس و ۶۲ گونه کاهش داد. متاسفانه طبقه‌بندی Drouet به دلیل عدم بازتاب تنوع ژنتیکی بین سیانوباکتری‌ها در محیط کشت و طبیعت شکست خورد (Anagnostidis, 1990). او همچنین اطلاعات فیزیولوژیک، بیوشیمیایی و ژنتیک را در رده‌بندی خود در نظر نگرفته بود. محققین بعدی از کلون سوش به عنوان واحد اساسی تاکسونومیک استفاده کردند (Rippka, 1998). این روشی است که توسط باکتریولوژیست‌هایی که بر اساس یک مسیر پلی‌فازیک، جنس‌ها را تعیین می‌کنند، مورد استفاده قرار می‌گیرد. در این روش بسیاری از باکتریولوژیست‌ها از توصیف گونه‌ها خودداری می‌کنند (Castenholz & Waterbury, 1989).

به هر حال رده‌بندی سیانوباکتری‌ها به دلایل مختلف مشکل می‌باشد. به عنوان مثال، طبیعت رده‌بندی سنتی در طول یک قرن گذشته بر اساس صفاتی مانند انشعاب کاذب و صفات غلافی است. همچنین مورفولوژی سیانوباکتری‌ها به شدت تحت تاثیر عوامل محیطی قرار می‌گیرد.

در دو دهه گذشته استفاده از تکنیک‌های مولکولی برای شناسایی و رده‌بندی، بسیار رایج و متداول گشته است (Old & Primrose, 1989). در این روش از توالی ژنوم‌های مختلف و مقایسه آن در پایگاه‌های اطلاعاتی داده‌ها استفاده می‌گردد. بدین ترتیب به کمک PCR که امکان تکثیر ساده و سریع از یک قسمت مشخص از DNA را داده و در بسیاری از روش‌های بیولوژیک استفاده می‌شود، می‌توان برای آنالیز و مقایسه توالی‌ها استفاده کرد. این مناطق مانند مارکرهای مولکولی ویژه برای شناسایی گونه‌ها و روابط فیلوژنتیک آنها در سیانوباکتری‌ها نقش ایفا می‌کنند. رایج‌ترین مارکر تاکسونومیک 16SrDNA می-باشد (Patterson et al, 1994). ولی برای شناسایی گونه‌ها بهتر است از مارکرهای دیگر نظیر: دی‌نیتروژناز ردوکتاز (Dyble et al., 2002)، ریبولوز ۱،۵ بیس فسفات کربوکسیلاز- اکسیژناز (Gugger et al., 2002)، RNA پلی‌مراز (Wilson et al, 2000) و تمایز هتروسیست (Schiefer et al. 2002) استفاده کرد. پس از متداول شدن استفاده از روش‌های مولکولی برای شناسایی، درخت‌های فیلوژنتیک بر اساس توالی ژن 16SrRNA ترسیم گردید (Nelson & Cox, 2000). ترسیم و استفاده از درخت فیلوژنتیک در بررسی روند تکاملی سیانوباکتری‌ها و نیز قرابت درون گروهی و جایگاه آن‌ها در رده‌بندی سیانوباکتری‌ها موضوع تحقیقات فراوان می‌باشد. امروزه فیزیولوژیست ها بر اساس خصوصیات مورفولوژیکی، اکولوژیکی و تکاملی آنها را دسته بندی می کنند که شامل ۱۵۰ جنس و ۱۰۰۰ گونه است (Dworkin et al., 2006).

به طور کلی سیانوباکتری‌ها را به ۵ راسته تقسیم می کنند که عبارتند از: chroococales, Pleurocapsales, Oscillatoriales, Nostocales و Stigonematales. بر طبق شکل زیر اعضای راسته های Chroococcales و Oscillatoriales در میان درخت فیلوژنتیکی پراکنده‌اند که نشان می دهد این دو راسته نیای مشترک تکاملی ندارند. همچنین اعضای راسته Pleurocapsales خط منفرد یک سویه دارند که نشان دهنده اساس مونوفیلتیک تقسیم های چندتایی می باشند (شکل ۱-۱) (Dworkin et al., 2006).



شکل ۱-۱درخت تکاملی سیانوباکترها بر اساس مارکر 16SrRNA

۱-۳- تقسیمات شاخه سیانوباکتری‌ها

شاخه سیانوفیت‌ها به دو رده سیانوفیسه و پروکلروفیسه تقسیم می‌شود. رده سیانوفیسه شامل سیانوباکتری‌هایی است که همگی دارای فیکوبیلوزوم و رنگیزه‌های فیکوبیلینی هستند؛ در حالیکه رده دوم سیانوباکتری‌هایی را در بر دارد که فاقد فیکوبیلوزوم و رنگیزه‌های فیکوبیلینی هستند. لازم به ذکر است که این نوع طبقه‌بندی تحت مطالعه و بررسی بیشتر قرار دارد (Dworkin et al., 2006).