

بررسی رنگیزه‌های فیکوبیلین در سوبه‌های سیانوباکتری هتروسپیست دار جدا شده از شالیزارهای غرب استان مازندران

امیرعلی کلیایی^{۱*}، قربانعلی نعمت زاده^۲، ندا سلطانی^۳، شادمان شکروی^۴

^۱گروه کشاورزی، پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری طبرستان، ایران

^۲گروه کشاورزی، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی، ساری، ایران

^۳گروه میکروبیولوژی نفت، پژوهشکده علوم کاربردی جهاد دانشگاهی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران

^۴گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی، گرگان، ایران

تاریخ دریافت: ۹۵/۳/۱۳ تاریخ پذیرش: ۹۵/۷/۱۴

چکیده

سیانو باکتری‌ها ارگانسیم‌های فتوسنتز کننده گرم منفی می‌باشند. آنها یکی از موفق‌ترین گروه‌های ارگانسیم این سیاره به شمار می‌آیند که از شکل اولیه حیات تا تکامل امروزی بر روی زمین دیده شده‌اند. در طی تاریخچه تکامل طولانی‌شان، سیانوباکتری‌ها تغییراتی کارکردی پیموده‌اند که این تغییرات مسئول فیزیولوژی قابل انعطاف و مقاومت وسیع اکولوژی در این باکتری‌ها است. توانایی سیانوباکتری‌ها در مقاومت به دمای بالا، تشعشع ماورای بنفش، خشک شدن، تنش‌های شوری و آبی موجب موفقیت رقابتی در دامنه وسیعی از شرایط محیطی می‌گردد. گونه‌های متنوعی از سیانوباکتری‌ها ترکیبات متفاوتی از کروموفورها و فیکوبیلی پروتئین‌ها را در جهت بهبود توانایی برداشت نور در فرایند فتوسنتز به کار می‌برند. فیکوبیلی زوم‌ها به عنوان آنتن‌های اولیه برداشت کننده نور در فتوسیستم II در سیانوباکتری‌ها و جلبک‌های قرمز وجود دارند. هدف از این تحقیق بررسی رنگیزه‌های فیکوبیلین در سوبه‌های هتروسپیست دار جدا شده از شالیزارهای غرب استان مازندران می‌باشد. بعد از جمع آوری نمونه خاک و کشت سوبه در محیط کشت BG110، به منظور انجام پروسه خالص سازی کشت مجدد در محیط کشت جامد و مایع انجام گرفت. سپس سوبه‌ها از لحاظ ریخت‌شناسی بررسی شدند، نتایج نشان داد که به دلیل سازش سوبه در شرایط نوری قابل دسترس، گونه‌های مختلف از سیانوباکتری‌ها تنوع بالایی از فیکوبیلی پروتئین را در جهت بهینه سازی توانایی دریافت نور برای فتوسنتز بکار می‌گیرند. به گونه‌ای که میزان فیکوسیانین، آلفیکوسیانین و فیکو اریترین در هر سوبه متفاوت از سوبه دیگر بوده و بالاترین میزان این ترکیبات پروتئینی به ترتیب در سوبه (MGCY372) *Plectonema boryanum* مشاهده گردید.

واژه‌های کلیدی: آلفیکوسیانین، سیانوباکتری، فیکواریترین، فیکوبیلین، فیکوسیانین

مقدمه

(Stanier and Cohen, 1977). این گروه شامل

گونه‌هایی از باکتری با توانایی تثبیت ازت و سازگاری بسیار بالا نسبت به شرایط متنوع محیطی بوده و به صورت کلنی‌هایی در طیف وسیعی از محیط‌های آبی و خاکی ساکن شده‌اند (Tandeau et al., 1993, Pandey et al., 1995, Oren, 2000) فیکوبیلی

سیانوباکتری‌ها یا جلبک‌های سبز آبی گروه وسیع و متنوعی از باکتری‌های پروکاریوت فتوسنتز کننده با قابلیت استفاده از نور خورشید، آب و CO₂ می‌باشند

*نویسنده مسئول: amiralik6@gmail.com

برای استخراج فیکوبیلی پروتئین وجود ندارد. جداسازی و خالص سازی فیکوبیلی پروتئین‌ها از جلبک‌ها و سیانو باکتری‌ها می‌تواند بسیار پیچیده و زمان بر باشد و تحت تاثیر عواملی همچون دما، زمان استخراج، نوع بافر و pH قرار گیرد (Lawrenz et al., 2011). تحقیقات اخیر بمنظور تلاش برای بهینه سازی روش‌های استخراج و خالص سازی و ارزیابی رنگدانه‌ها و دستیابی به حداکثر عملکرد در حال گسترش می‌باشد (Zimba, 2012; H0rvath et al., 2013). یکی از روش‌های کارآمد جهت استخراج رنگدانه، تلفیق روش‌های مکانیکی و شیمیایی بمنظور خالص سازی پروتئین‌های رنگدانه ای می‌باشد و شامل استفاده از بافرهای متعدد (Bennet and Steward and 1973) هضم آنزیمی (Bogorad, 1984) استفاده از آژولکتین چسب، انجماد و خورد کردن مکانیکی و کاپیلاری الکتروفورز می‌باشد (Horvath, 2013; Lawrenz et al., 2011). فیکو بیلی پروتئین‌ها در بسیاری از سیانوباکتری‌ها جهت بالا بردن راندمان فتوسنتزی و کمک به جذب نور توسط کلروفیل بکار گرفته می‌شوند. این مولکول‌های آنتن شامل، فیکوبیلی پروتئین‌های رنگدانه ای و بخش پروتئینی غیر رنگدانه‌ای می‌باشند (Lawrenz et al., 2011). چهار ساختار تراپیپرول کلروموفور خطی (بیلین) شامل فیکوسیانوبیلین، فیکواریتروبیلین، فیکوواپولوبیلین و فیکواوروبیلین می‌تواند به‌عنوان فیکوبیلی پروتئین‌های سیانوباکتری‌ها شناخته شوند (Zimba, 2012).

گزارش‌های متعددی نشان می‌دهد که فیکوبیلی پروتئین‌ها کمپلکسی از بخش‌های رنگدانه-پروتئین می‌باشند که به سه دسته رنگدانه‌های آبی یا فیکوسیانین، رنگدانه‌های سبز-آبی یا آلفوفیکوسیانین و رنگدانه‌های قرمز یا فیکواریترین به ترتیب با قابلیت حداکثر جذب در طول موج‌های ۶۲۰، ۶۵۰ و ۵۶۵

پروتئین‌ها به‌عنوان گروه مهمی از رنگدانه‌های کمکی در پروسه‌های دریافت نور نقش مهمی در برداشت نوری در سیانوباکتری‌ها و کریپتو مونادها و پروکلروفیت‌ها ایفا می‌نماید (Lawrenz et al., 2011). سیستم‌های رنگدانه ای در سیانوباکتری‌ها مقدار کمی سیگنال فلوروسنسی را در کلروفیل تولید می‌نماید اما عملکرد فلوروسنسی فیکوبیلین‌ها بسیار بالا می‌باشد و می‌تواند به عنوان یک شاخص مهم در ارزیابی میزان فراوانی سیانوباکتری‌ها در محیط مورد استفاده قرار گیرد (Yentsch, 1979). امروزه دسترسی به غلظت‌های دقیق رنگدانه‌های فیکوبیلین در تعیین میزان تراکم جمعیت میکروارگانیسم‌ها بسیار حائز اهمیت می‌باشد. به طوری که نقش مهمی در بکارگیری تکنیک‌های سنجش از راه دور به منظور ارزیابی بوم‌های جلبکی ایفا می‌نماید (Wozniak et al., 2011). امروزه تکنیک‌های متعددی در جهت شناسایی ترکیبات فعال در سلول بمنظور ارزیابی و شناسایی میکروارگانیسم‌ها مورد استفاده قرار گرفته‌اند (Sobiechowska et al., 2010; Ston-Egiert et al., 2010; Roy et al., 2011). چنین روش‌هایی برای ارزیابی و تعیین بیوماس فیتوپلانکتون‌ها و تاکسونومی آن بر میزان کلروفیل و کاروتنوئید تمرکز می‌یابند و این در حالی است که مثال‌های بسیار معدودی برای فیکوبیلی پروتئین‌ها در دسترس می‌باشد (Lawrenz et al., 2011; Zimba, 2012). بطور معمول فیکوبیلین‌ها بالاترین میزان جذب را در طول موج ۴۵۰ تا ۶۶۰ نانومتر دارا می‌باشند. تنوع طیف جذبی فیکوبیلی پروتئین‌ها به دلیل تغییر جایگاه ویژه کروموفورها با سایر پروتئین‌ها می‌باشد (Bennet and Bogorad, 1973; Zhao et al., 2011). امروزه مطالعات گسترده ای بر روی فلورسانس رنگدانه‌های موجود در سیانوباکتری‌ها آغاز شده است (Babichenko et al., 2000; Seppala, 2009). اما روش‌های استاندارد

نمونه برداری خاک با استفاده از روش‌های متداول از مناطق مختلف شالیزارهای غرب استان مازندران انجام گردید. سپس با استفاده از محیط کشت اختصاصی BG110 جداسازی سیانوباکتری‌های هتروسیست دار از سطح خاک صورت گرفته و پس از کشت‌های متوالی در محیط جامد، ۱۹ سویه خالص از سیانوباکتری‌ها انتخاب گردیدند. بعد از اطمینان از خلوص، انتقال سویه‌ها به محیط کشت مایع جهت افزایش تولید بیوماس صورت پذیرفت. شرایط بهینه برای رشد هر سویه با در نظر گرفتن نیازهای دمایی، نوری و شرایط هوادهی مناسب فراهم گردید. هوادهی با شدت جریان ۲۰۰ میلی‌لیتر در دقیقه در ارلن‌های ۵۰۰ میلی‌لیتری و در شرایط نوری ۸۰ میکرومول فوتون در متر مربع بر ثانیه با ۴ لامپ فلورسانس و ایجاد دمای بهینه رشد در دامنه ۲۵ تا ۲۸ درجه سانتی‌گراد فراهم گردید. به منظور بررسی فیکوبیلین‌های موجود در هر سویه، بعد از رسیدن به حداکثر رشد از هر استوک ۳ میلی‌لیتر بیوماس تهیه و با اضافه نمودن محلول گلیسرول به منظور ایجاد شوک اسمزی و با استفاده از استات سدیم، میزان فیکوبیلین پروتئین بعد از قرائت جذب در طول موج‌های ۶۲۰، ۶۵۲ و ۵۶۲ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکترومتر از روش Bennet و Bogorad (۱۹۷۳) بر حسب میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تعیین گردیدند. برآورد کمی انواع فیکوبیلین‌ها طبق معادلات زیر صورت گرفت. سپس مقدار هر رنگی‌زه بر حسب میکروگرم بر میلی‌لیتر محاسبه گردید.

$$\text{فیکوسیانین (PC)} = (A_{620} - (0.474 \times A_{652})) / 5.34$$

$$\text{آلوفیکوسیانین (APC)} = (A_{652} - (0.208 \times A_{620})) / 5.09$$

$$\text{فیکواریترین (PE)} = ((A_{562} - (2.41 \times \text{PC})) - (0.849 \times \text{APC})) / 9.62$$

$$\text{فیکوبیلین کل (TPB)} = \text{PC} + \text{APC} + \text{PE}$$

جهت شناسایی مورفولوژی سویه‌ها از کلیدهای رایج شناسایی دسیکاچاری استفاده گردید (جدول ۱).

نانومتر می‌باشند (Grossman et al., 1994) گزارش‌های متعددی نشان می‌دهد که فیکوبیلی پروتئین‌ها تحت تاثیر فاکتورهای محیطی مانند نور، آب و pH قابل تغییر است (Grossman et al., 1994; Takano et al., 1995; Chaneva et al., 2007; Simeunovic et al., 2013). به گفته سلطانی و همکاران (۱۳۸۴)، تنش‌های محیطی از جمله شوری می‌تواند بر روی کارایی فتوسنتز و توان فیکوبیلی پروتئین‌ها تاثیر گذار باشد. کاربرد فیکوپروتئین‌ها به عنوان یک ترکیب ضد سمی و ضد سرطانی به عنوان رنگ دهنده غذایی به یک هدف بسیار مهم در صنعت غذایی و دارویی مد نظر قرار گرفته است (Chaneva et al., 2007). همچنین مصارف دارویی و آرایشی فیکوبیلی پروتئین‌ها (Kronick et al., 1986; Araoz et al., 1998) و فعالیت آنتی‌اکسیدانی، محافظ عصبی، ضد سرطانی و ضد عفونتی فیکوبیلین‌ها توسط محققین بسیاری گزارش شده است (Rimbau et al., 2003; Liu et al., 2000; Romay et al., 1999). گزارش‌ها نشان می‌دهد که پتانسیل گونه‌های متنوع سیانوباکتری‌ها برای تولید تجاری فیکوبیلی پروتئین‌ها متفاوت می‌باشد (Takano et al., 1995; Chen et al., 2007; Chaneva et al., 1996).

هدف از این تحقیق جمع آوری سویه‌های مختلف سیانوباکتری‌های هتروسیست دار شالیزارهای استان مازندران و بررسی تنوع و ظرفیت تولید رنگدانه‌های فیکوبیلی پروتئین سویه‌ها بوده است.

مواد و روش‌ها

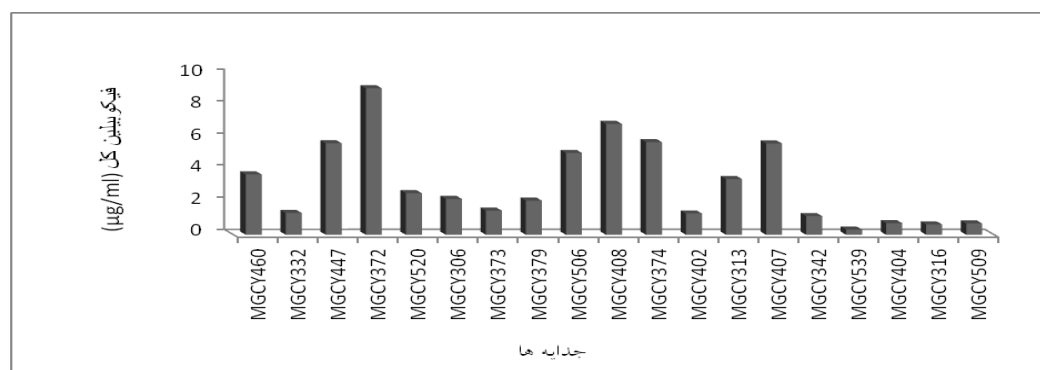
جدول ۱: نام سویه‌های مورد بررسی

کد سویه	نام سویه
MGCY460	unknOwn
MGCY332	<i>Nostoc microscopicum</i>
MGCY447	unknOwn
MGCY372	<i>Plectonema boryanum</i>
MGCY520	<i>Nostoc muscorum</i>
MGCY306	<i>Anabaena cylindrica</i>
MGCY373	<i>Calothrix stagnalis</i>
MGCY379	<i>Microchaete tenera</i>
MGCY506	unknOwn
MGCY408	<i>Aphanocapsa grevielli</i>
MGCY374	<i>Phormidium sp.</i>
MGCY402	<i>Chroococcus pallidus</i>
MGCY313	<i>Phormidium sp.</i>
MGCY407	unknOwn
MGCY342	<i>Anabaena cylindrica</i>
MGCY539	<i>Phormidium angustissimum</i>
MGCY404	<i>Calothrix stellaris</i>
MGCY316	<i>Calothrix atricha</i>
MGCY509	<i>Anabaena variabilis</i>

نتایج

MGCY407 به ترتیب از مناطق کلارآباد و نشتارود با میزان ۶/۹۲۷، ۵/۷۰۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر در مکان‌های بعدی قرار گرفتند. کمترین میزان فیکوسیلین پروتئین کل در سویه (MGCY539 *Phormidium angustissimum*) به میزان ۰/۳۲۷۷ میکروگرم بر میلی‌لیتر از منطقه نشتارود بوده است. دو سویه (*Calothrix atricha*) MGCY316 و MGCY509 (*Anabaena variabilis*) از مناطق عباس آباد و بابلسر نیز به ترتیب با ۰/۶۴۵ و ۰/۷۰۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر از میزان فیکوسیلین پروتئین کمتری نسبت به سایر سویه‌ها برخوردار بودند.

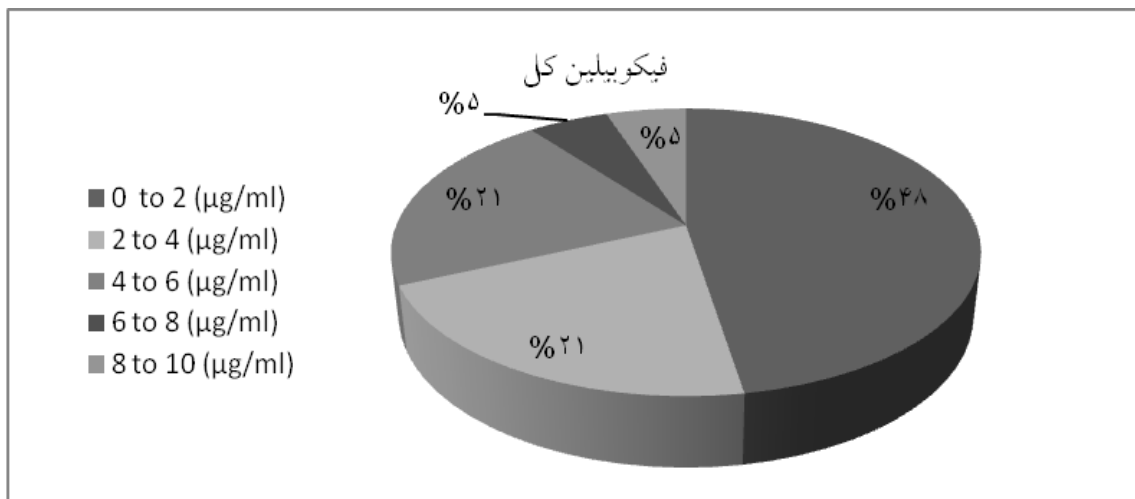
بررسی میزان فیکوسیلین کل در سویه‌های هتروسیست دار جدا شده از شالیزارهای غرب استان مازندران : بررسی‌های انجام شده بر روی ۱۹ سویه جدا شده از مناطق شالیزاری غرب استان مازندران موثداً آن است که میزان فیکوسیلین پروتئین‌ها در سیانوباکتری‌ها، متناسب با جنس سویه، شرایط محیطی و اقلیمی در هر سویه متغیر است (شکل ۱). بالاترین میزان فیکوسیلین کل در سویه MGCY372 (*Plectonema boryanum*) از منطقه کله بست به میزان ۹/۱۵۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر بوده و متعاقب آن سویه‌های MGCY408 (*Aphanocapsa grevielli*)



شکل ۱: میزان فیکوسیلین کل در ۱۹ سویه مورد بررسی از شالیزارهای غرب استان مازندران (برحسب میکروگرم بر میلی‌لیتر)

پروتئین کل در دامنه ۴ تا ۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر، ۵/۲۶ درصد دارای میزان فیکوبیلی پروتئین کل در دامنه ۶ تا ۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر و ۵/۲۶ از سویه‌ها نیز دارای میزان فیکوبیلی پروتئین کل در دامنه ۸ تا ۱۰ میکروگرم قرار گرفته‌اند (شکل ۲).

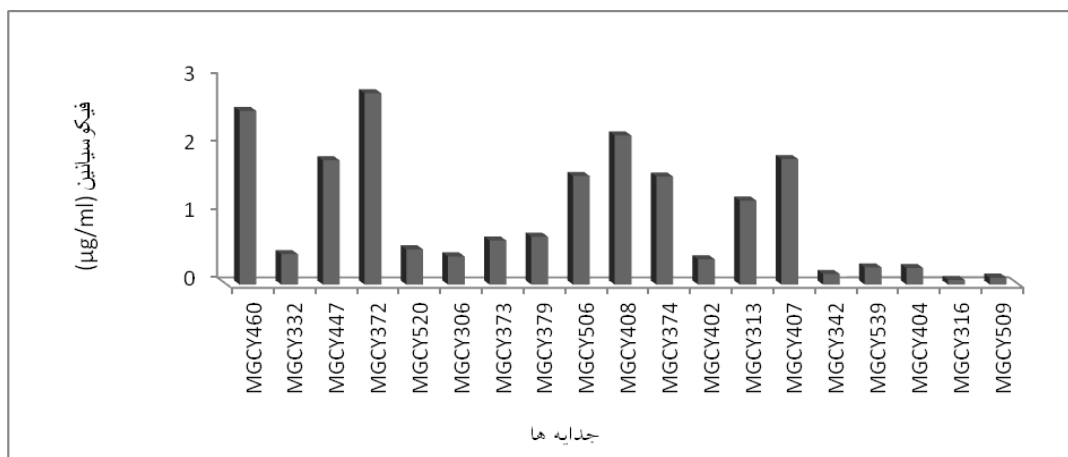
علاوه بر این نتایج این تحقیق در بررسی میزان فیکوبیلی پروتئین‌های کل نشان می‌دهد که ۴۷/۳۶ درصد از سویه‌ها دارای میزان فیکوبیلی پروتئین کل به میزان ۰ تا ۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر، ۲۱/۰۵ درصد دارای فیکوبیلی پروتئین کل به میزان ۲ تا ۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر، ۲۱/۰۵ درصد دارای میزان فیکوبیلی



شکل ۲: تنوع میزان فیکوبیلین کل در ۱۹ سویه مورد بررسی از شالیزارهای غرب استان مازندران (بر حسب درصد)

سایر سویه‌ها قرار داشت. کمترین میزان فیکوسیانین نیز مربوط به سویه *MGCY316* (*Calothrix atricha*) با میزان ۰/۰۶۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر از منطقه عباس آباد بوده است (شکل ۳). همچنین دوسویه *MGCY509* (*Anabaena variabilis*) و *MGCY342* (*Anabaena cylindrica*) از منطقه بابل‌سر و محمودآباد با میزان ۰/۱۰۱ و ۰/۱۵۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر از میزان فیکوسیانین پایین تری نسبت به سایر سویه‌ها برخوردار بوده است.

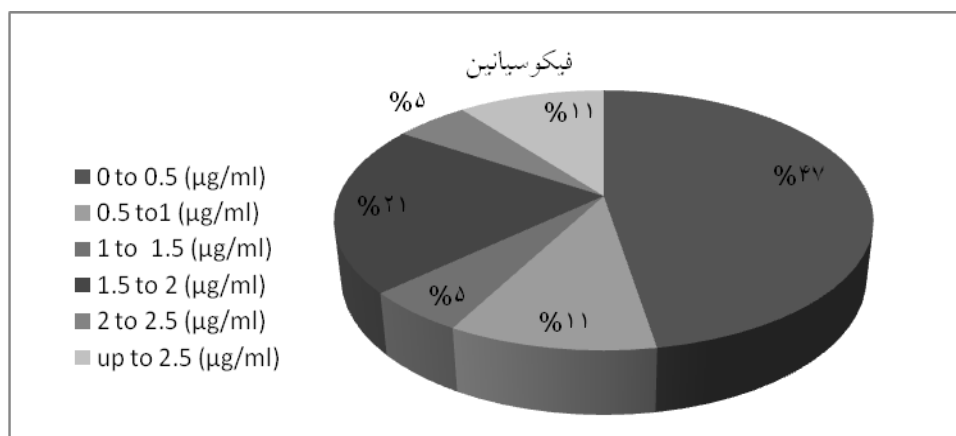
بررسی میزان فیکوسیانین در سویه‌های هتروسیست‌دار جدا شده از شالیزارهای غرب استان مازندران: نتایج آزمایش نشان می‌دهد که بالاترین میزان فیکوسیانین در سویه‌های *MGCY372* (*Plectonema boryanum*) به مقدار ۲/۸۱۲ میکروگرم در میلی‌لیتر از منطقه کله بست بوده و سویه‌های *MGCY460*، *MGCY408* (*Aphenocapsa grevilli*) و *MGCY407* به ترتیب از مناطق رامسر، کلارآباد و نشتارود با میزان ۲/۵۵۳، ۲/۱۹۱ و ۱/۸۴۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر در بالاترین جایگاه نسبت به



شکل ۳: میزان فیکوسیائین در ۱۹ سویه مورد بررسی از شالیزارهای غرب استان مازندران (برحسب میکروگرم بر میلی لیتر)

بین ۱ تا ۱/۵ میکروگرم، در ۲۱/۰۵ درصد سویه‌ها میزان فیکوسیائین بین ۱/۵ تا ۲ میکروگرم بر میلی لیتر، در ۵/۲۶ درصد سویه‌ها میزان فیکوسیائین بین ۲ تا ۲/۵ میکروگرم بر میلی لیتر و در ۱۰/۵۲ درصد سویه‌ها میزان فیکوسیائین بالاتر از ۲/۵ میکروگرم بر میلی لیتر گزارش گردید (شکل ۴).

بررسی‌های صورت گرفته بر روی میزان فیکوسیائین‌های موجود در ۱۹ سویه جدا شده نشان داد در ۴۷/۳۶ درصد از سویه‌ها میزان فیکوسیائین بین ۰ تا ۰/۵ میکروگرم در میلی لیتر، در ۱۰/۵۲ درصد از سویه‌ها میزان فیکوسیائین بین ۱ تا ۰/۵ میکروگرم بر میلی لیتر، در ۵/۲۶ درصد سویه‌ها میزان فیکوسیائین



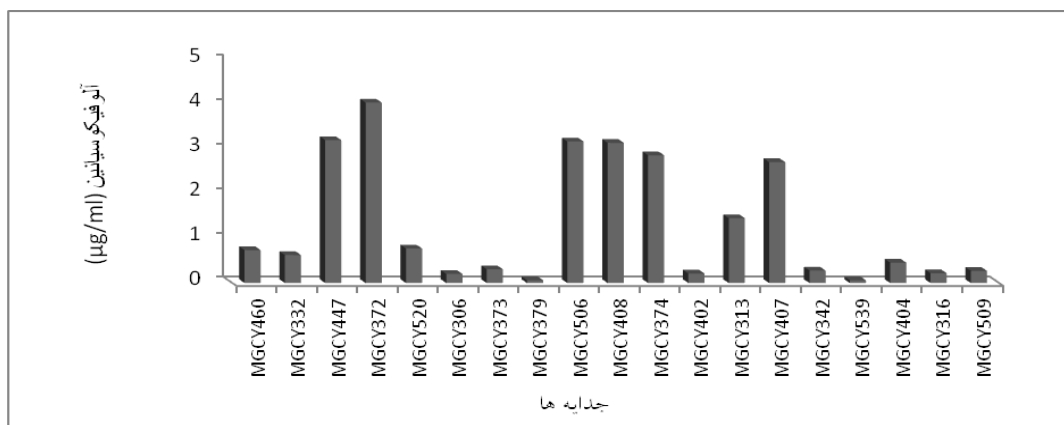
شکل ۴: تنوع میزان فیکوسیائین در ۱۹ سویه مورد بررسی از شالیزارهای غرب استان مازندران (برحسب درصد)

آلوفیکوسیائین در سویه *MGCY372* (*Plactonema boryanum*) به میزان ۴/۰۶۹ میکرو گرم در میلی لیتر از منطقه کله بست مشاهده شد. سه سویه *MGCY447* (*Phormidium* sp)، *MGCY506* و *MGCY408* (*Aphanocapsa grevielli*) به ترتیب از

بررسی میزان آلوفیکوسیائین در سویه‌های هتروسیست دار جدا شده از شالیزارهای غرب استان مازندران: بررسی میزان آلوفیکوسیائین در ۱۹ سویه مورد نظر در شکل (۵) قابل مشاهده است. با توجه به نتایج بدست آمده، بالاترین میزان

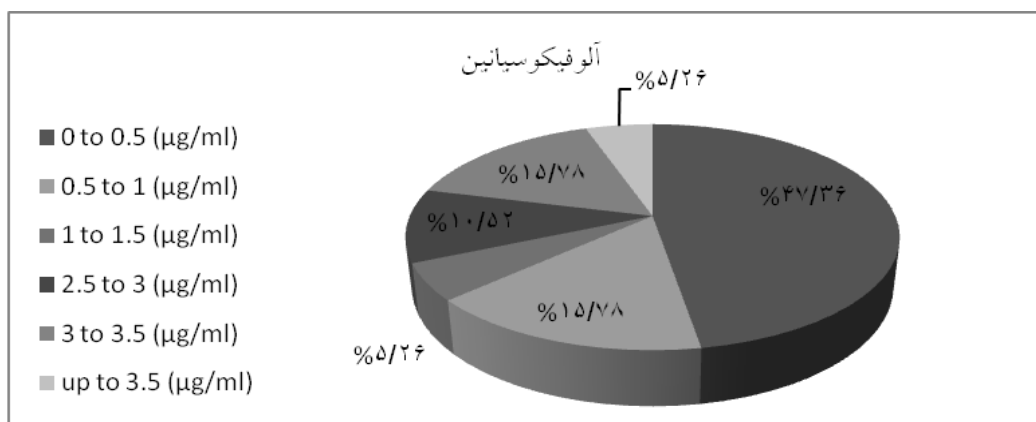
بر میلی‌لیتر از مناطق نشتارود و فریدون کنار بوده و سوبه‌های MGCY306 (*Anabaena cylindrica*)، MGCY402 (*Chroococcus pallidus*) به‌ترتیب از مناطق کلارآباد و نشتارود با میزان ۰/۲۱۳ و ۰/۲۰۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر از میزان آلفیکوسیانین کمتری نسبت به سایر سوبه‌ها برخوردار بودند.

مناطق عباس آباد، کله بست و کلارآباد با میزان ۳/۲۲۲، ۳/۱۹۳ و ۳/۱۶۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر در رتبه‌های بعدی قرار گرفتند. کمترین میزان آلفیکوسیانین نیز در دو سوبه MGCY539 (*Phormidium angustissimum*) و MGCY379 (*Microchaete tenera*) به میزان ۰/۰۶۲۸ میکروگرم



شکل ۵: میزان آلفیکوسیانین در ۱۹ سوبه مورد بررسی از شالیزارهای غرب استان مازندران (بر حسب میکروگرم بر میلی‌لیتر)

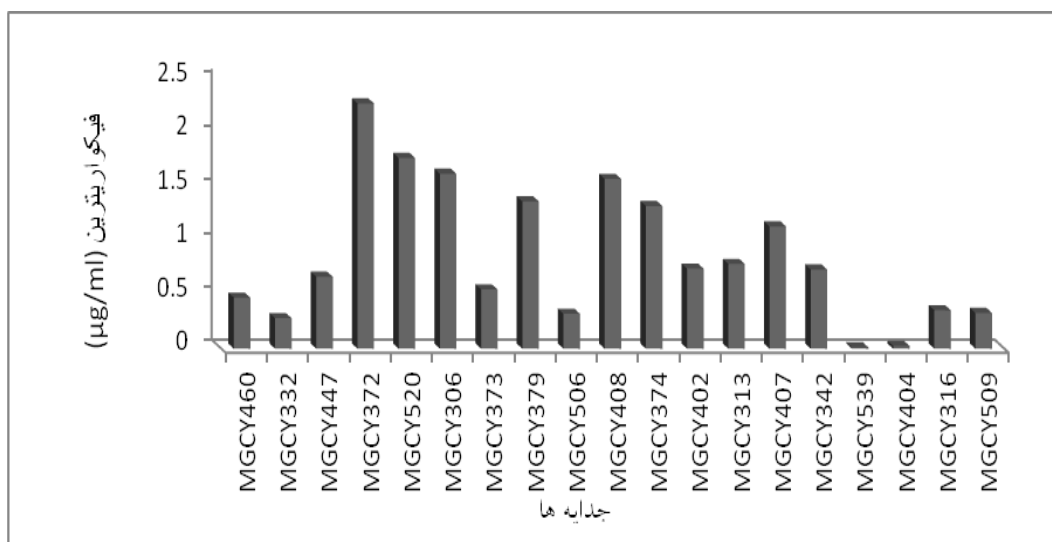
بررسی میزان آلفیکوسیانین در ۱۹ سوبه جدا شده نشان داد که با توجه به شکل (۶) در ۴۷/۳۶ درصد از سوبه‌ها میزان آلفیکوسیانین بین ۰ تا ۰/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر مشاهده گردید. در ۱۵/۷۸ درصد سوبه‌ها میزان آلفیکوسیانین در دامنه ۰/۵ تا ۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر، در ۵/۲۶ درصد از سوبه‌ها میزان آلفیکوسیانین در دامنه ۱ تا ۱/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر مشاهده شد و تنها در ۱۰/۵۲ درصد از سوبه‌ها میزان آلفیکوسیانین در دامنه ۲/۵ تا ۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر قرار گرفت. ۱۵/۷۸ درصد از سوبه‌ها دارای میزان آلفیکوسیانین در دامنه ۳ تا ۳/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر و ۵/۲۶ درصد از سوبه‌ها میزان آلفیکوسیانین در دامنه بالاتر از ۳/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر قرار گرفت.



شکل ۶: تنوع میزان آلفیکوسیانین در ۱۹ سوبه مورد بررسی از شالیزارهای غرب استان مازندران (بر حسب درصد)

کلارآباد با ۱/۷۶۹، ۱/۶۲۲ و ۱/۵۷۴ از فیکواریترین بالاتری نسبت به سایر سویه‌ها برخوردار هستند. کمترین میزان فیکواریترین نیز در سویه MGCY539 (*Phormidium angustissimum*) از منطقه نشتارود به میزان ۰/۰۱۱۹ میکروگرم بر میلی‌لیتر بوده و دو سویه MGCY404 (*Calothrix stellaris*) و MGCY332 (*Nostoc microscopicum*) از مناطق نشتارود و نور با ۰/۰۲۵ و ۰/۲۸۲ از فیکواریترین کمتری نسبت به سایر سویه‌ها برخوردار هستند.

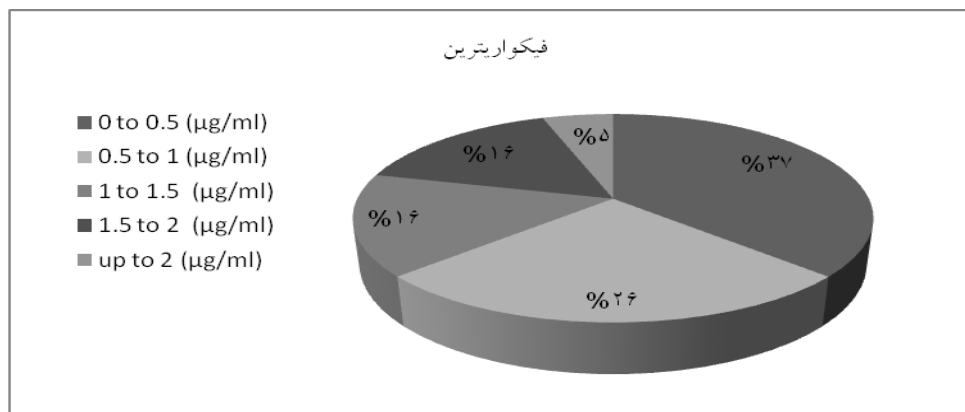
بررسی میزان فیکواریترین در سویه‌های هتروسیست دار جدا شده از شالیزارهای غرب استان مازندران: بررسی میزان فیکواریترین در ۱۹ سویه‌های جدا شده (شکل ۷) نشان داد که سویه MGCY372 (*Plectonema boryanum*) از کله بست به مقدار ۲/۲۷۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر بالاترین میزان فیکواریترین را نسبت به سایر سویه‌ها دارد و سه سویه MGCY520 (*Nostoc muscorum*)، MGCY306 (*Anabaena cylindrica*) و MGCY408 (*Aphanocapsa grevielli*) به ترتیب از مناطق آمل،



شکل ۷: میزان فیکواریترین در ۱۹ سویه مورد بررسی از شالیزارهای غرب استان مازندران (بر حسب میکروگرم بر میلی‌لیتر)

۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر، ۱۵/۷۸ درصد سویه‌ها میزان فیکواریترین در دامنه ۱ تا ۱/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر، ۱۵/۷۸ درصد سویه‌ها میزان فیکواریترین در دامنه ۱/۵ تا ۲ و در ۵/۲۶ درصد سویه‌ها میزان فیکواریترین بالاتر از ۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر مشاهده شد.

بررسی‌های انجام شده بر میزان فیکواریترین با توجه به شکل (۸) حاکی از آن است که ۳۶/۸۴ درصد سویه‌های جدا شده دارای میزان فیکواریترین در دامنه ۰ تا ۰/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر و ۲۶/۳۱ درصد از آنها دارای میزان فیکواریترین در دامنه ۰/۵ تا



شکل ۸: تنوع میزان فیکواریترین در ۱۹ سویه مورد بررسی از شالیزارهای غرب استان مازندران (بر حسب درصد)

بحث

با توجه به بررسی میزان فیکوبیلی پروتئین‌های موجود در سویه‌های جدا شده استنباط می‌گردد که هر سویه به تنهایی پتانسیل قابل توجهی نسبت به نوع رنگدانه‌های موجود خود را دارا می‌باشد که متناسب با اهداف تجاری در جهت مصارف دارویی، صنعتی و آرایشی می‌تواند مورد توجه قرار گیرد. چنین استنباط می‌شود که گونه‌های مختلف سیانو باکتری‌ها، ترکیبات متفاوتی از کرم‌فورها و فیکوبیلی پروتئین‌ها را در جهت بهینه‌سازی توانایی دریافت نور برای فتوسنتز بکار می‌گیرند و این بدلیل سازگاری سویه در شرایط نوری قابل دسترس می‌باشد (Babichenko et al., 2000; Seppala, 2009). همین امر زمینه تنوع گسترده‌ای را از حیث ظرفیت تولید رنگدانه ایجاد می‌نماید. به عنوان مثال در بررسی‌های انجام شده توسط Ojit و همکاران (۲۰۱۲) بالاترین میزان فیکواریترین، فیکوسیانین و آلفوفیکوسیانین در سویه *Phormidium Anabaena fuelleborni* و *Nostoc spongiaeforme* مشاهده گردید. امروزه به دلیل پتانسیل بالای سیانوباکتری‌ها در تولید دامنه‌ای از فیکوبیلی پروتئین‌ها و سایر ترکیبات رنگدانه‌ای، این میکروارگانیسم‌ها به عنوان منبع تولید فراورده‌های تجاری مورد توجه بسیاری از محققین

قرار گرفته‌اند. به عنوان مثال گونه‌های متنوعی از جنس نوستوک قابلیت تولید مقادیر قابل توجهی فیکواریترین را دارا می‌باشند (Babichenko et al., 2000; Seppala, 2009) و تحقیقات بنیادی در زمینه شناخت پتانسیل هر سویه می‌تواند زمینه را در جهت بهینه‌سازی روش‌های استخراج و دستیابی به این ترکیبات مفید فراهم آورد. امروزه از ترکیبات رنگدانه‌ای سیانوباکتری‌ها از جمله فیکوسیانین و فیکواریترین به عنوان ترکیبات با ارزش در صنایع مختلف استفاده می‌شود. جوهر بی‌بو و آبی رنگ تولید شده از فیکوسیانین در ژاپن با نام *Lina blue* به صورت پودر آبی رنگ در صنایع مختلف غذایی به عنوان رنگ خوراکی در بستنی‌آبنبات و فراورده‌های لبنی مورد استفاده قرار می‌گیرد. همچنین فیکوسیانین‌های جدا شده از جنس‌های مختلف سیانوباکتری‌ها از جمله اسپیرولینا به دلیل دارا بودن خاصیت غیر محلول در آب در صنایع آرایشی و تولید سایه و خط چشم و رژلب به صورت تجاری مورد استفاده قرار گرفته‌اند (Chen et al., 1996). به‌طورکلی نوع نگرش به فیکوبیلی پروتئین‌ها، متفاوت است و هرگونه نگرش مکتب فکری خاص خود را طلب می‌کند. بررسی‌های بیوتکنولوژی، تغییرات فیکوبیلی پروتئین‌ها را از نظر میزان تولید و تنوع تولید به‌عنوان یک محصول بررسی

می‌کند. اما نگرش‌های فیزیولوژیک و اکوفیزیولوژیک عمده توجه خود را به سیستم فتوسنتزی و آنتن‌های گیرنده و کمپلکس‌های جمع‌آوری کننده نور معطوف می‌دارد. در دو دهه اخیر، انتقال انرژی میان فتوسیستم‌های یک و دو و نقش فیکوبیلی پروتیین‌ها در حوزه فیزیولوژی مدرن و فیزیولوژی مولکولی مورد توجه جدی قرار گرفته است. در اکوفیزیولوژی، چه به صورت در زیوه و چه به صورت در شیشه سیستم‌های فیکوبیلی زومی به طور کلی مد نظر هستند و ارتباط آن‌ها با کنترل انرژی از طریق انتقال میان سیستم‌های نوری و بخصوص فتوسیستم دو که حتی وارد حوزه‌های ریزتر مانند انتقال میان گیرنده‌های الکترون از فتوفیتین گرفته تا کینون‌ها و البته کمپلکس فتولیز آب گردیده است. اینکه به کدام حوزه ورود کنیم، به موضوعیت بستگی دارد اما قدر مسلم بررسی ترکیبی اگر ممکن باشد کار دشواری است. ضمن اینکه ارتباط میان نقش فیکوبیلی پروتیین‌ها و سیستم فیکوبیلی زومی در رابطه با تنش‌های محیطی و تعمیم آن به کشت انبوه و گرفتن محصول برای پزشکی، داروسازی و کشاورزی، صنعت، محیط زیست و غیره فعلا امکان پذیر نیست. اطلاعات در این زمینه می‌بایست به مراتب بیش از این توسعه یابد. در خصوص نمونه‌های بومی ایران بدلیل عدم اطلاعات پایه در استان مازندران، ورود به بحث‌های جزئی فعلا منطقی نیست کما اینکه در استان گلستان که از حوزه اطلاعات پایه غنی تری برخوردار است، تجاربی پراکنده در این زمینه وجود دارد.

وجود ساختارهای تشکیل دهنده فیکوبیلی زومی، بخصوص فیکواریترین و آلفیکوسیانیین، در همه سویه‌ها قابل توجه است. در بررسی‌های Soltani و همکاران (۲۰۰۵) آلو فیکوسیانیین در گونه فیشرلای مورد بررسی تحت تاثیر اسیدیتته و قلیائیت به همراه شدت نور، بوجود نمی‌آمده اند. ساختمان پایه در

فیکوبیلی زومی تحت شرایط آزمایشگاهی جدید، نشان از ثبات این بخش دارد. هرچند البته در حال حاضر به قطعیت نمی‌توان گفت که این ثبات تحت تاثیر تنش‌های محیطی همچنان حفظ می‌شود. اما در کنار آلفیکوسیانیین وجود فیکواریترین با میزان به نسبت بالا در ۲۰ درصد از سیانوباکتری‌های جدا شده و تقریباً ۹۵ درصد از کل سیانوباکتری‌های جدا شده تایید دیگری بر ثبات سیستم فیکوبیلی زومی در نمونه‌های جمع‌آوری شده است.

در مورد فیکوسیانیین، به قطعیت می‌توان گفت که مقادیر کلی فیکوسیانیین در نمونه‌های جمع‌آوری شده به نسبت دیگر بررسی‌های انجام شده در گلستان توسط Shokravi و همکاران (۲۰۰۲) اگرچه عمومیت دارد و این دلیل دیگری بر ثبات سیستم فیکوبیلی زومی است اما از نظر کمیت به مراتب پایین‌تر می‌باشند. در سیانوباکتری‌هایی مانند *Phormidium tenue* که از نظر بردباری به تنش به‌خصوص شوری مقاوم نشان می‌دهند، این کاهش فیکوسیانیین جالب توجه است. با توجه به اینکه این سیانوباکتری در عمده پشته‌های میکروبی، نقش لایه فوقانی را دارد، کاهش مقدار آن (به صورت مقایسه ای)، در حال حاضر قابل توجیه نیست. چون تکرارهای آزمایش، احتمال خطای آزمایشگاهی را ضعیف کرده است، شاید بررسی‌های از نظر طیف‌های جذبی در زیوه و یا فیتوشیمیایی از طریق HPLC، بتواند اطلاعات دقیق تری بدهد.

نتیجه‌گیری نهایی

به‌طورکلی آنچه از بررسی‌های انجام شده می‌توان نتیجه گرفت آن است که ثبات سیستم فیکوبیلی زومی در نمونه‌های سیانوباکتری مناطق غرب استان مازندران دیده می‌شود اما هم اندازه و هم ساختار این سیستم، تحت شرایط محیطی به مراتب از مناطق

بالا کار می‌کند. شرایط آزمایشگاهی - شاید - عامل تغییر کمی و کیفی سیستم‌های فتوسنتزی باشد. بر طبق تحقیقات انجام شده، سویه‌های مختلف از خانواده سیانوباکتری‌های هتروسیست دار جمع‌آوری شده از شالیزارهای استان مازندران، دارای پتانسیل بالایی از ترکیبات ارزشمند ثانویه می‌باشند که می‌توان از این ترکیبات پپتیدی و رنگدانه‌های متنوع موجود در این گروه از ریز جلبک‌ها، در صنایع غذایی و دارویی بهره برد و حتی به عنوان مکمل‌های غذایی در صنایع دامپروری و طیور نیز می‌توانند حائز اهمیت باشند که جای دارد در این راستا تحقیقات گسترده تری صورت گیرد.

- cyanobacteria, edited by Bryant DA (Kluwer Academic, Dordrecht) 641-675.
- Horváth, H., Kovács, A.W., Riddick, C. and Présing, M. (2013).** Extraction methods for phycocyanin determination in freshwater filamentous cyanobacteria and their application in a shallow lake. *European Journal of Phycology*. 48: 278-286.
- Kronick, M.N. (1986).** The use of phycobiliproteins as fluorescent labels in immunoassay. *Journal of Immunological Methods*. 92: 1-13.
- Lawrenz, E., Fedewa, E.J. and Richardson, T.L. (2011).** Extraction protocols for the quantification of phycobilins in aqueous phytoplankton extracts. *Journal of Applied Phycology*. 23: 865-871.
- Liu, Y., Xu, L., Cheng, N., Lin, L. and Zhang, C. (2000).** Inhibitory effects of phycocyanin from *Spirulina platensis* on the growth of human leukemia K562 cells. *Journal of Applied Phycology*. 52: 125-130.
- Oren, A. (2000).** Salts and brines. In: *The ecology of cyanobacteria: their diversity in time and space*, edited by Whitton BA and Potts M (Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, the Netherlands) 281-306.
- Ojit Singh, K., Gunapati, O. and Tiwari, O. (2012).** New record of potential

همجوار کمتر می‌باشد. نتیجه دقیق در خصوص تاثیر عوامل محیطی یا به عبارت بهتر شرایط آزمایشگاهی، می‌بایست بعد از بررسی‌های ابزاری دقیق تر و نیز بهینه سازی شرایط کشت اعلام گردد.

وجود ساختارهای تشکیل دهنده فیکوبیلی زومی، بخصوص فیکواریترین و آلفوکوسیاینین، در همه سویه‌ها قابل توجه است. بررسی فلورستیک نشان می‌دهد که نمونه‌های جمع‌آوری شده از تراکم بالا و حتی غالبیت برخوردار هستند و این در حال حاضر محکم ترین دلیلی است که عدم دشواری خوگیری نمونه با شرایط طبیعی را نشان می‌دهد. به نظر می‌رسد که سیستم فتوسنتزی در شرایط طبیعی با کارایی

References

- Araoz, R., Lebert, M., and Hader, DP. (1998).** Electrophoretic applications of phycobiliproteins. *Electrophoresis*. 19: 215-219.
- Babichenko, S., Leeben, A., Poryvkina, L., van der Vagt, R. and de Vos, F. (2000).** Fluorescent screening of phytoplankton and organic compounds in sea water. *Journal of Environmental Monitoring*. 2: 378-383.
- Bennet, A. and Bogorad, L. (1973).** Complementary chromatic adaptation in filamentous blue-green alga. *Journal of Cell Biology*. 58: 419-435.
- Chaneva, G., Furnadzhieva, S., Minkova, K. and Lukavsky, J. (2007).** Effect of light and temperature on the cyanobacterium *Arthrothronema africanum*- a prospective phycobiliprotein-producing strain. *Journal of Applied Phycology*. 19: 537-544.
- Chen, F., Zhang, Y. and Guo, S. (1996).** Growth and phycocyanin formation of *Spirulina platensis* in photoheterotrophic culture. *Biotechnology Letters*. 18: 603-608.
- Grossman, A.R., Schaefer, M.R., Chiang, G.G. and Collier, J.L. (1994).** The responses of cyanobacteria to environmental conditions: light and nutrients. In: *The molecular biology of*

- algal populations in phytoplankton, filamentous alga, and sediments from the eastern basin of Lake Erie 2003–2005. *Journal of Great Lakes Research*. 36: 298–311.
- Soltani, N., Khavari-Nejad, R.A., Tabatabaei Yazdi, M., Shokravi, Sh. and Fernández-Valiente, E. (2005).** Physiological and antimicrobial characterizations of some cyanobacteria in extreme environments. Ph.D Thesis On plant Physiology.
- Stanier, R.Y. and Cohen-Bazire, G. (1977).** Phototrophic prokaryotes: the cyanobacteria. *Annual Review of Microbiology*. 31: 225-274.
- Steward, D.E. and Farmer, F.H. (1984).** Extraction, identification, and quantitation of phycobiliprotein pigments in phototrophic plankton. *Limnology and Oceanography*. 29: 392–397.
- Stoń-Egiert, J., Łotocka, M., Ostrowska, M. and Kosakowska, A. (2010).** The influence of biotic factors on phytoplankton pigment composition and resources in Baltic ecosystems: new analytical results. *Oceanologia*. 52: 101–125.
- Takano, H., Arai, T., Hirano, M. and Matsunaga, T. (1995).** Effect of intensity and quality of light on phycocyanin production by a marine cyanobacterium *Synechococcus* sp. NKBG042902. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 43: 1014-1018.
- Tandeau de Marsac, N. and Houmard, J. (1993).** Adaptation of cyanobacteria to environmental stimuli: new steps towards molecular mechanisms. *FEMS Microbiology Letters*. 104: 119-189.
- Woźniak, B., Bradtke, K., Darecki, M. and Dera, J. (2011).** SatBaltic a Baltic environmental satellite remote sensing system an ongoing project in Poland part 2: practical applicability and preliminary results. *Oceanologia*. 53: 925–958.
- Yentsch, C.S. and Yentsch, C.M. (1979).** Fluorescence spectral signatures: the characterization of phytoplankton populations by the use of excitation and emission spectra. *Journal of Marine Research*. 37: 471–483.
- cyanobacteria from Indian region falling indo-burma biodiversity hotspots north – east region of india and partial characterization for value addition. *Philippine Journal of Scienc.* 141(1): 57-66.
- Pandey, K.D., Kashyap, A.K. and Gupta, R.K. (1995).** Nutrient Status, algal and cyanobacterial flora of six streams of Schumacher Oasis, Antarctica. *Hydrobiologia*. 299 83-91.
- Piero Estrada, J.E., Bermejo Besc, P. and Villar del Fresno, A.M. (2001).** Antioxidant activity of different fractions of *Spirulina platensis* protean extract. *Il Farmaco*. 56: 497–500.
- Rimbau, V., Camins, A., Romay, C., Gonzalez, R. and Pallas, M. (1999).** Protective effects of C-phycocyanin against kainic acid-induced neuronal damage in rat. *Neuroscience Letters*. 276: 75-78.
- Romay, C., Gonzalez, R., Ledon, N., Ramirez, D. and Rimbau, V. (2003).** C-phycocyanin: abiliprotein with antioxidant, anti-inflammatory and neuroprotective effects. *Current Protein and Peptide Science*. 4: 207-216.
- Roy, S., Llewellyn, C.A., Egeland, E.S. and Johnsen, G. (2011).** Phytoplankton pigments: characterization, chemotaxonomy and applications in oceanography. Cambridge University Press, Cambridge. 165-194.
- Seppälä, J. (2009).** Fluorescence properties of Baltic sea phytoplankton. Monographs of the Boreal environment research (34). Edita Prima Ltd, Helsinki, p 83
- Shokravi, S., Soltani, N. and Baftechi, L. (2002).** Cyanobacteria as biofertilizer in paddy fields.- National Research Council of Islamic Republic of Iran, Grant no. NRCI 489-66.
- Simeunovic, J., Beslin, K., Svireev, Z., Kovac, D. and Babic, O. (2013).** Impact of nitrogen and drought on phycobiliprotein content in terrestrial strains. *Journal of Applied Phycology*. 25: 597-607.
- Sobiechowska, M., Bridoux, M., Ferreira Ferreira, A.H., Perez- Fuentetaja, A. and Alben, K. (2010).** Biomarkers of

- Cambridge University Press,
Cambridge, pp 375 – 411.
- Zimba, P.V. (2012).** An improved phycobilin extraction method. *Harmful Algae*. 17: 35–39.
- Zhao, K.H., Porra, R.J. and Scheer, H. (2011).** Phycobiliproteins. In: Roy S, Llewellyn CA, Egeland ES, Johnsen G (eds) *Phytoplankton pigments: characterization, chemotaxonomy and applications in oceanography*.