نشریه پژوهش‌های اکوفیزیولوژی گیاهی ایران، شماره ویژه: پژوهش‌های فیزیولوژی گیاهی، سال نهم، شماره ویژه بهار ۱۳۹۳ / صفحات: ۱۶۰-۱۵۱

شناسایی مولکولی و مطالعه اثر کلرید سدیم بر پاسخ‌های فیزیولوژیک و مورفولوژیک سیانوباکتری *Leptolyngbya* sp. ISC25

شقایق ایرانشاهی*[۱]، ندا سلطانی[۲]، طاهر نژادستاری[۳]، شادمان شکروی[٤] و مهروز دزفولیان[٥]

[۱] دکتری، گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران

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

[۳] استادیار، گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران

[٤] دانشیار، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد گرگان، گرگان

[٥] استادیار، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرج، کرج، ایران

تاریخ دریافت: ۹۱/۱۱/۷ **تاریخ پذیرش: ۹۲/٤/۱٤**

چکیده

تنش شوری یک عامل محدود کننده مهم محیطی می‌باشد که در صنعت کشاورزی اثر می‌گذارد. شناخت رفتار مورفولوژیک سیانوباکتری‌ها در سال‌های اخیر به‌دلیل پتانسیل بالای آن‌ها در برابر تنش شوری از اهمیت زیادی برخوردار شده است. در این تحقیق تاثیر شوری بر پاسخهای فیزیولوژیک، بیومتری و مورفولوژی سیانوباکتری *Leptolyngbya sp.* ISC25 مورد آزمایش قرار گرفت. همچنین شناسایی مولکولی توسط بررسی توالی جزئی ژن 16s rRNA انجام پذیرفت. بدین منظور نمونه سیانوباکتری پس از کشت خاک و خالص سازی به محیط کشت مایع BG11 منتقل گردید و تحت تیمارهای مختلف شوری (۰ و ۱ و۲ و۳ و٤ و۵ درصد) قرار گرفت. از ابتدای تیماردهی، هر روز وضعیت کلنیزاسیون و بیومتری نمونه‌ها مورد بررسی قرار گرفت. مطالعات ساختاری و بیومتری به‌ترتیب با کمک میکروسکوپ الکترونی روبشی SEM و نوری انجام شد. سنجش کلروفیل و فیکوبیلی پروتئین‌ها در فاز لگاریتمی و با روش طیف سنجی انجام شد. نتایج حاکی از آن بود که بهترین نرخ رشد مربوط به شاهد بود. میزان رنگیزه‌ها اعم از کلروفیل و تمامی فیکوبیلی‌پروتئین‌ها با افزایش نمک کاهش نشان دادند. بررسی مورفولوژی با میکروسکوپ نوری حاکی از تکه تکه شدن ریسه‌ها در شوری ٤ و ۵ درصد بود. بررسی تغییرات ساختاری با کمک عکس الکترونی SEM در شاهد و تیمار شوری نشان دهنده اضمحلال نسبی سلول‌ها در تیمار ۵ درصد شوری بود. بطورکلی نتایج نشان داد که نمونه مورد آزمایش نسبت به شوری حساس بوده و افزایش کلرید سدیم تاثیرات مخرب بر متابولیسم، ریخت‌شناسی و ساختار این سیانوباکتری دارد.

واژه‌های کلیدی: بیومتری، ریخت‌شناسی،، سیانوباکتری، شوری، رنگیزه‌های فتوسنتزی، 16s rRNA، SEM.

مقدمه

بیش از ۲۰ درصد زمین‌های کشاورزی جهان که ۱/۳ غذای جهان را تامین می‌کنند تحت تاثیر شوری می‌باشند (Gaber, 2010). مطالعات نشان داده است که تنش‌های محیطی از جمله شوری، بر فیزیولوژی و ریخت‌شناسی موجودات زنده از جمله سیانوباکتری‌ها تاثیرگذار است. توزیع گسترده سیانوباکتری‌ها در شرایط شوری افراطی یک ابزار مناسب برای مطالعه اثر شرایط تنش‌زا روی متابولیسم سلول‌ها می‌باشد (Egamberdieva et al., 2008). گرچه مقدار اندک

*نویسنده مسئول: Sh.iranshahi@gmail.com

NaCl برای برخی عملکردهای متابولیکی در سیانوباکتری‌ها ضروری است (Garcia-Gonzalez, 1987; Thomas and Apte, 1984; Sanchez-maeso et al., 1986)، اما افزایش شوری به‌عنوان یک فاکتور غیرزیستی از رشد آن‌ها جلوگیری می‌کند (Apte et al., 1987; Hegemann, 2011). سیانوباکتری‌ها برای بقا و رشد خود به تنظیم پتانسیل آب سیتوپلاسمی از طریق دفع فعال یونهای معدنی اضافی از سلول می‌پردازند. بنابراین موجود با کمک تجمع ترکیبات محلول و بیان پروتئین‌های تنش شوری به سازگاری با محیط می‌پردازد (Hegemann, 2011).

اما از لحاظ جایگاه تاگزونومیک این موجودات زنده، تا چندی پیش طبقه‌بندی سیانوباکتری‌ها بیشتر بر پایه خصوصیات مورفولوژیکی صورت می‌گرفت (Lyra et al., 2001) ولی انعطاف پذیری بالای سیانوباکتری‌ها در محیط‌های مختلف باعث گردید که مشکلات زیادی در شناسایی این میکروارگانیسم‌ها پدید آید. امروزه روش‌های مدرن به کمک تکنیک‌های سنتی آمده‌اند (Komarek and Anagnostidis, 1989). این دو نگرش لازم و ملزوم یکدیگرند. امروزه آنالیز مولکولی توالی ژن‌های کد کننده زیر واحدهای سازنده RNA ریبوزومی به منظور شناسایی میکروارگانیسم‌های مختلف گسترش قابل توجهی یافته است. ناحیه کد کننده ژن 16S rRNA سیانوباکتری‌ها ناحیه‌ای به شدت حفاظت شده است و میتوان توالی ژن کد کننده این بخش از ژنوم را پس از تکثیر به کمک تکنیک PCR تعیین کرد (Berrendero et al., 2008؛ فرامرزی و همکاران، ۱۳۸۹).

مطالعه ریخت‌شناسی و تاکزونومیکی سیانوباکتری‌ها در سطح بین‌المللی توسط گروه‌های مختلفی صورت گرفته است (Rajaniemi et al., 2005; Pan et al., 2008; Berrendero et al., 2008).

همچنین در خصوص بررسی‌های فیزیولوژیک در سیانوباکتری‌ها تحت تنش شوری نیز مطالعاتی در ابعاد بین‌المللی صورت گرفته (Suleyman et al., 2008; Sundaram and Soumya, 2011; Stal, 2007) اما در داخل کشور این بررسی‌ها به میزان کمتری مورد توجه بوده است. از جمله این مطالعات می‌توان به بررسی صورت گرفته در خصوص فراساختار *Hapalosiphon* sp. FS18 از استیگونماتال‌ها اشاره کرد (سلطانی و همکاران، ۱۳۸٤؛ Soltani et al., 2010). سیانوباکتری *Hapalosiphon* sp. FS56 جمع آوری شده از زمین‌های کشاورزی استان گلستان با ترکیبی از فیزیولوژی و مورفولوژی، توسط جرجانی و همکاران (۱۳۸۹) مورد بررسی قرار گرفته است.

با توجه به تاثیرات منفی قابل ملاحظه‌ای که شوری بر سیانوباکتری‌ها دارد، بررسی توام تغییرات فیزیولوژیک و مورفولوژیک آن‌ها تحت استرس‌های نمکی کمتر مورد توجه قرار گرفته است. بنابراین رویکرد اصلی این تحقیق به مطالعه ریخت‌شناسی این میکروارگانیسم‌ها تحت تنش شوری است. بدین‌منظور از میکروسکوپ نوری و میکروسکوپ الکترونی (SEM) برای بررسی تغییرات مورفولوژی استفاده شد (Herandez-Marine et al., 2004).

با در نظر گرفتن محدود بودن مطالعات صورت گرفته بر روی سیانوباکتری‌های بومی در ایران از دیدگاه فیزیولوژی و ریخت‌شناسی تحت تنش شوری، در این مطالعه ضمن شناسایی مولکولی سیانوباکتری *Leptolyngbya sp.* ISC25، به بررسی تاثیرات شوری بر این تغییرات در میکروارگانیسم مورد مطالعه پرداخته شد.

مواد و روش‌ها

جنس *Leptolyngbya* sp. ISC25 از خاک‌های مسجد سلیمان با موقعیت جغرافیایی x=0339545,y=3535959 جدا شد. بعد از جداسازی نمونه، عمل خالص سازی با استفاده از روش پلیت آگار انجام شد. این عمل با انجام پاساژهای متعدد صورت گرفت. سپس نمونه خالص شده به محیط کشت مایع منتقل شد و ازدیاد نمونه در فاز آزمایشگاهی صورت گرفت. نمونه‌ها در محیط کشت BG11 تحت تیمارهای مختلف شوری (۰، ۱، ۲، ۳، ٤ و ٥ درصد) و شرایط مطلوب کشت از نظر دما ۳۰±۱°C و تحت هوادهی با سرعت جریان min^{-1} ۲۰۰mL و شدت ثابت $\mu E\ m^{-2}\ s^{-1}$ ۳۰۰ قرار داده شد.

به منظور شناسایی مولکولی نمونه مورد نظر، ابتدا DNA از نمونه تازه با استفاده از کیت استخراج DNA ژنومی شرکت فرمنتاز (K0512) استخراج شد (Nübel et al., 2000). تکثیر ژن 16S rRNA به وسیله PCR در نمونه ذکر شده برای اولین بار و با استفاده از دو گروه آغازگر مستقیم PA (AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG) و معکوس PH (AAG GAG GTG ATC CAG CCG CA) صورت گرفت. برای نشان دادن DNA از ژل الکتروفوز افقی (۱ درصد) استفاده گردید. از بافر TBE استفاده شد. محصول PCR جهت تعیین توالی به شرکت ژن فناوران ارسال گردید. پس از تعیین توالی ژنی ناحیه مورد نظر، توالی ژنی حاصل با انجام عملیات BLAST با توالی ژن‌های ثبت شده در بانک‌های جهانی ژن مقایسه و درصد تشابه ژنی نمونه مورد نظر با نمونه‌های موجود در بانک ژن تعیین گردید.

برای بررسی ریخت‌شناسی، اسلایدهای نیمه دائمی از تیمارها بصورت یک روز در میان تهیه شده و آنالیزهای مورفولوژیک با بهره‌گیری از این اسلایدها انجام پذیرفت. برای تهیه لام نیمه دائم، نمونه جلبک به همراه یک قطره گلیسیرین بر روی لام قرارداده شد. پس از قرار دادن لامل بر روی گلیسیرین و نمونه، نمونه جلبک با فشار انگشت بر روی لامل از حالت توده‌ای خارج شده و در انتها جهت حفظ نمونه و جلوگیری از خشک شدن آن، اطراف لامل به کمک چسب انتالن پوشیده شد. به منظور بررسی لام‌ها از میکروسکوپ نوری Olympus استفاده گردید. در بررسی‌های مورفولوژیک و بیومتریک، شکل کلنی‌ها، رنگ آن‌ها، ابعاد سلول‌های رویشی و سلول‌های تخصصی مانند هتروسیست‌ها و شکل آن‌ها، شکل سلول انتهایی و وجود یا عدم وجود غلاف مورد بررسی قرار گرفت (Gugger and Hoffmann, 2004).

نرخ رشد با روش Soltani و همکاران (۲۰۰٦) انجام شد. برای تعیین غلظت کلروفیل، سلول‌ها با متانول خالص استخراج شده و بعد از ٢٤ ساعت در دمای ٤ °C ، توسط روش طیف سنجی در طول موج ٦٦٥ nm اندازه گیری شدند (Marker, 1972). فیکوبیلی پروتئین‌ها بعد از شوک اسمزی استخراج شده و به روش طیف سنجی در فاز لگاریتمی در طول موج‌های ٦٥٢، ٦١٥ و٥٦٢ nm اندازه گیری شدند (Bermejo et al., 2002).

جهت آماده‌سازی نمونه برای میکروسکوپ الکترونی ابتدا نمونه را در گلوتار آلدهید ۲/۵ درصد به مدت ٤ ساعت قرار داده و پس از تثبیت نمونه‌ها با بافر PBS شستشو داده شدند. سپس نمونه‌ها سانتریفوژ و با کمک الکل‌های (۱۰، ۳۰، ۵۰، ۷۰ و ۱۰۰ درصد) آبگیری شدند. در نهایت نمونه‌ها روی صفحه فلزی گذاشته و با ورقه طلا پوشش داده شدند و عکس‌های الکترونی گرفته شد.

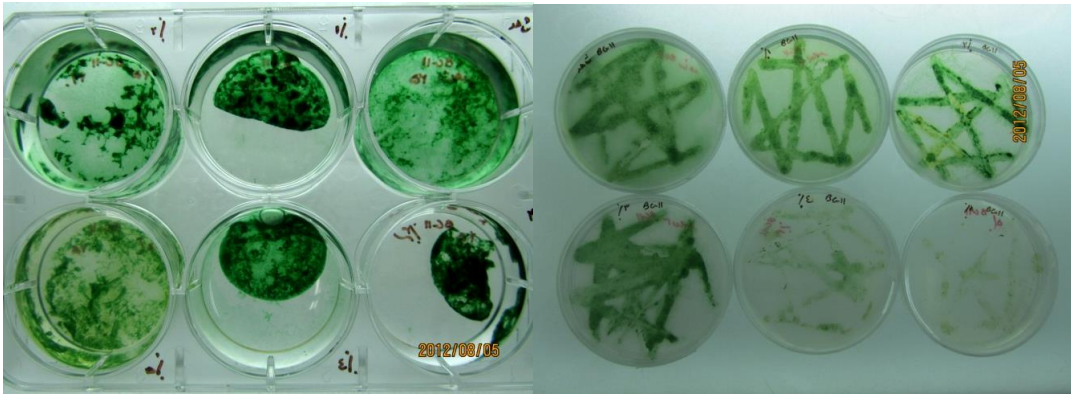
به‌منظور انجام آنالیزهای آماری از نرم‌افزار SPSS ver19, Excel استفاده شد. آنالیزهای آماری بر اساس

ده تکرار در هر آزمون و آنالیز واریانس یکطرفه ANOVA و طرح Tukey انجام گرفت.

نتایج

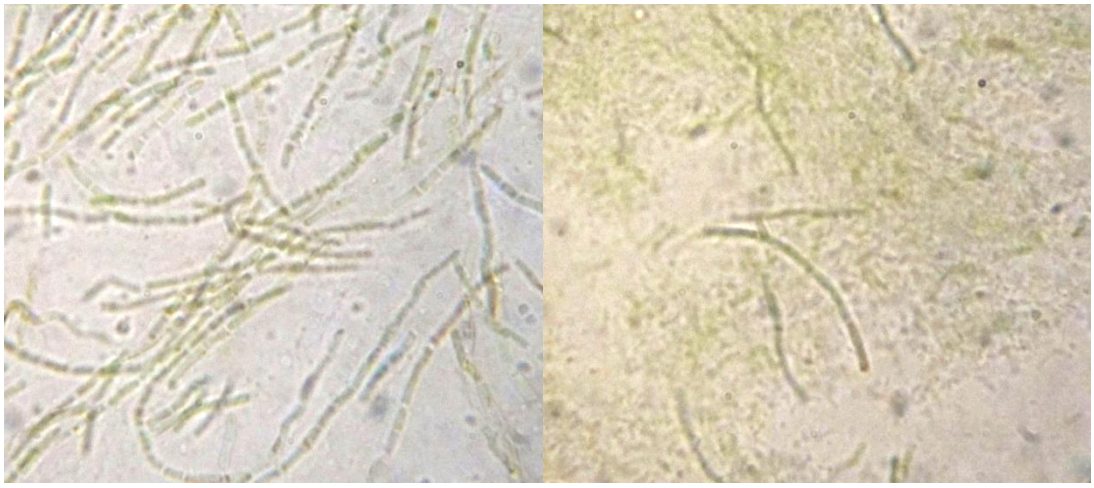
بررسی‌های مولکولی بر روی ناحیه حفظ شده 16s rRNA با استفاده از پرایمرهای اختصاصی سیانوباکتری صورت پذیرفت. در این ناحیه منطقه بسیار متغیری وجود دارد که تشخیص مولکولی جنس را بطور دقیق امکان پذیر می‌سازد. نتایج حاصل از سکانسینگ توالی‌های 16s rRNA موید صحت نتایج مورفولوژیک در شناسایی جنس‌های مورد آزمایش بود. مقایسه سکانس ژنی نمونه بررسی شده با توالی ژن‌های ثبت شده در بانک جهانی ژنی NCBI (www.nbci.nlm.nih.gov) به واسطه انجام عملیات BLAST نشان‌دهنده وجود بالاترین سطح تشابه با *Leptolyngbya* به میزان ۹۸٪ بوده و با شماره JX972170 در بانک NCBI قابل دسترسی است.

وضعیت کلنیزاسیون در محیط کشت مایع و جامد در شکل ۱ نشان داده شده است. با افزایش شوری رنگ اجتماعات از سبز تیره به سبز روشن تغییر پیدا کرده است و پراکنش آن‌ها به صورت صفحه‌ای و متمایل به کناره پلیت بوده است. مطالعات مورفولوژی با میکروسکوپ نوری در نمونه شاهد نشان داد که نمونه مورد نظر دارای اجتماعات پراکنده و سبز رنگ می‌باشد. ریسه راست، گاهی در انتها خمیده است؛ سلولها مستطیل تا مستطیل بیضی می‌باشد، گرانول‌ها بسیار مبهم می‌باشند، دیواره دارای فشردگی اندک یا فاقد فشردگی است، ابعاد سلول µm ۳/۰٤ طول و µm ۱/۵ عرض است؛ غلاف موسیلاژی بسیار نازک و بی‌شکلی که به سختی قابل ملاحظه است در اطراف سلول‌ها مشاهده می‌شود؛ ولی اطراف اجتماعات سلولی غلاف کاملا" مشخص می‌باشد. سلول راسی گنبدی یا صاف گاهی دارای خمیدگی است.



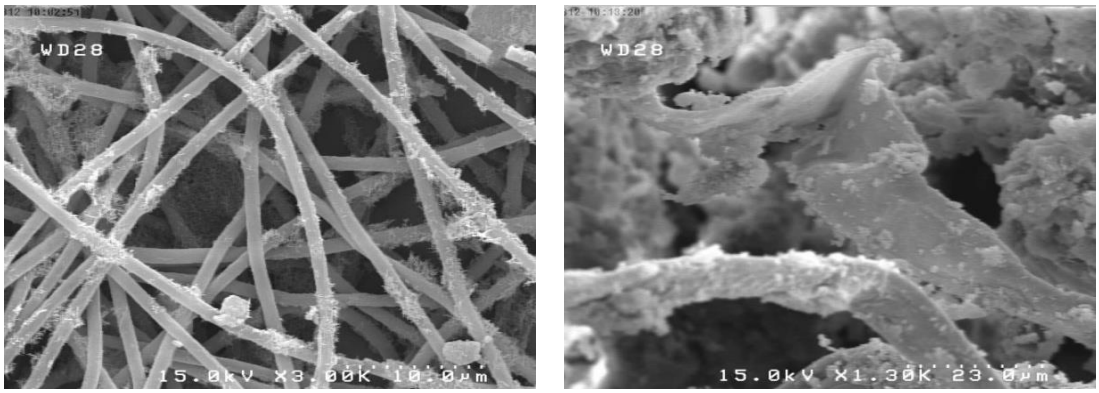
شکل ۱: سیانوباکتری *Leptolyngbya* sp. ISC25 در محیط کشت مایع تحت تیمارهای مختلف شوری (راست) و محیط کشت جامد تحت تیمارهای مختلف شوری (چپ).

شکل سلول‌های رویشی در نمونه شاهد و تیمار ۱ درصد شوری تغییر پیدا نکرده است. با افزایش شوری ریسه‌ها در حال اضمحلال بوده که این حالت از شوری ۲ درصد قابل ملاحظه است و در شوری ۵ درصد ریسه‌ها کاملاً تحلیل رفته و سلول‌ها از حالت مکعب مستطیل به کروی درآمده است، در واقع نمونه به سمت فاز مرگ رفته و تراکم سلول‌های سالم و تغییر نیافته کاهش پیدا کرده است. بالاترین میزان رشد در نمونه شاهد مشاهده گردید و با افزایش شوری کاهش روند رشد دیده شد (شکل ۲).



شکل ۲: شکل سلول‌های سیانوباکتری *Leptolyngbya* sp. ISC 25 در نمونه شاهد (چپ) و تیمار ۵ درصد شوری (راست) توسط میکروسکوپ نوری.

نتایج حاصل از مطالعه وضعیت کلی ریسه‌ها توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) حاکی از آن است که سلول‌ها در تیمار ۵ درصد شوری کاملاً مضمحل شده‌اند (شکل ۳).



شکل ۳: شکل ریسه‌های سیانوباکتری *Leptolyngbya* sp. ISC25 در نمونه شاهد (چپ) و تیمار ۵ درصد شوری (راست) توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی SEM.

با توجه به جدول ۱ طول سلول‌های رویشی در شاهد بیشتر و با افزایش شوری، طول سلول‌ها کاهش یافته و در تیمار ۵ درصد شوری سلول‌ها کاملاً از بین رفته‌اند. مشاهده عرض سلول‌های رویشی در نمونه شاهد و تیمارها حکایت از عدم وجود تفاوت معنی‌دار بین نمونه‌ها است. در تیمار ۵ درصد شوری کلیه سلول‌های رویشی از بین رفته‌اند. اختلاف بین شاهد و تیمار ۵ درصد شوری معنی‌دار می‌باشد (P>۰/۰۵) ANOVA, .

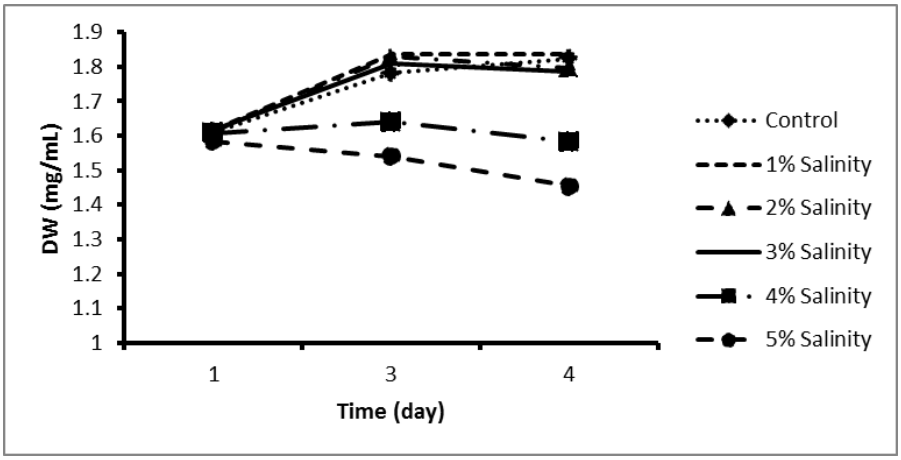
جدول ۱: خصوصیات مورفولوژیکی سیانوباکتری *Leptolyngbya* sp. ISC25 تحت تیمارهای مختلف شوری

شوری (٪)	رنگ اجتماعات	شکل اجتماعات در محیط مایع	شکل سلول انتهایی	غلاف موسیلاژی	طول سلول‌های رویشی (µm)	عرض سلولهای رویشی (µm)
شاهد	سبزتیره	پراکنده	گنبدی یا صاف	بسیار نازک	3.04 ± 0.98^{c}	1.5 ± 0^{b}
۱	سبزتیره	مجتمع	گنبدی یا صاف	بسیار نازک	2.11 ± 0.62^{b}	1.5 ± 0^{b}
۲	سبزتیره	مجتمع	گنبدی یا صاف	بسیار نازک	1.96 ± 0.75^{b}	1.5 ± 0^{b}
۳	سبزتیره	مجتمع	گنبدی یا صاف	بسیار نازک	2.07 ± 0.65^{b}	1.5 ± 0^{b}
٤	سبزروشن	مجتمع	گنبدی یا صاف	بسیار نازک	2.11 ± 0.76^{bc}	1.5 ± 0^{b}
٥	سبزروشن	پراکنده	–	–	–	–

حروف یکسان نشان‌دهنده عدم تفاوت معنی‌دار است.

داده‌ها $X \pm SE$ را نشان می‌دهند.

در این پژوهش به منظور بررسی میزان رشد سیانوباکتری در تیمارهای مختلف شوری از اندازه‌گیری وزن خشک استفاده شده است. منحنی‌های رشد مربوطه در شکل ٤ نشان داده شده است.



شکل ٤: مقایسه منحنی رشد سیانوباکتری *Leptolyngbya* sp. ISC.25 در تیمارهای مختلف

بر اساس نتایج فیزیولوژیکی، وجود شوری بازدارنده رشد بوده و تیمارهای کلرید سدیم موجب کاهش رشد نمونه بوده است (شکل٤). ماکزیمم بیومس جلبکی در تیمار شاهد به میزان $1/82\ mg\ mL^{-1}$، در حالی که کمترین بیومس $1/58\ mg\ mL^{-1}$ در غلظت ٥ درصد شوری بوده است که این تفاوت‌ها معنی‌دار می‌باشد (ANOVA, P>۰/۰۵). همانطورکه در شکل ٤ مشاهده می‌شود بهینه رشد در حضور نور و بدون شوری تحت شرایط هوازی صورت گرفته است.

جدول ۲، نتایج حاصل از اندازه گیری محتوای کلروفیل را در نمونه شاهد و نمونه‌های تحت تیمار با غلظت‌های مختلف کلرید سدیم نشان می‌دهد. بیشترین میزان کلروفیل با میزان $٤/٢٨٨\ \mu g\ mL^{-1}$ در نمونه ی شاهد مشاهده شده است. با توجه به نتایج آنالیز آماری اختلاف معنی داری بین مقدار کلروفیل نمونه ی شاهد با تیمارهای ۱، ۲، ۳، ٤ و ٥٪ کلرید سدیم مشاهده شده است. همچنین این جدول مقادیر رنگیزه‌های فیکوبیلی‌پروتئینی را در غلظت‌های

مختلف کلرید سدیم نشان می‌دهد. بیشترین میزان فیکوسیانین و آلوفیکوسیانین در شاهد با اختلاف معنی‌داری با تیمارها مشاهده شد. همچنین همانطور که در جدول نشان داده شده است، این نمونه سیانوباکتری فاقد رنگیزه فیکواریترین می‌باشد.

جدول ۲: میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی در غلظت‌های مختلف کلرید سدیم در سیانوباکتری *Leptolyngbya* sp. ISC25

شوری (٪)	Chl	PE	PC	APC	PBP
	($\mu g\ mgdw^{-1}$)				
شاهد	٤/٢٨٨±٠/٠٣^{e}	٠	٢٤/٥٠٧±٠/٦٥^{f}	٤/٤٨٩±٠/٥٥^{e}	٢٨/٩٩٦±٠/٥٧
١	٣/٣٨٦±٠/١٨^{d}	٠	١٩/٠٠٠±١/٤١^{e}	٣/٩٨±٠/٣٨^{e}	٢٢/٩٨±٠/٣٩
٢	٣/٠٥٤±٠/١٤^{d}	٠	١٥/٤٤٧±٠/٦٨^{d}	٢/٩٢٩±٠/١١^{d}	١٨/٣٧٦±٠/٤٢
٣	٢/٦٨٦±٠/٠٩^{c}	٠	٩/٢٤٤±٠/٢٤^{c}	١/٧٤٨±٠/٠٣^{c}	١٠/٩٩٢±٠/١٢
٤	٢/٣٠٠±٠/١٨^{b}	٠	٦/٩٧٤±٠/١٣^{b}	١/١٠٠±٠/٠٣^{b}	٨/٠٧٤±٠/٠٧
٥	١/٣٧±٠/١٦^{a}	٠	٠	٠	٠

حروف یکسان نشان‌دهنده عدم تفاوت معنی‌دار است؛ داده‌ها X ±SE را نشان می‌دهند.

بحث

آنچه مسلم است، طبقه‌بندی کلاسیک یا سنتی سیانوباکتری‌ها بر پایه خصوصیات مورفولوژیکی مانند اندازه سلول، حضور واکوئل‌های گازی و غلاف موسیلاژی می‌باشد (Valerio et al., 2009). بعضی از این خصوصیات تحت شرایط مختلف محیطی تغییر پیدا می‌کنند بنابراین مطالعه مولکولی می‌تواند یک ابزار قوی برای روشن کردن موقعیت تاکسونومیک باشد. در این مطالعه شناسایی دو جانبه مولکولی و ریخت‌شناسی بر روی نمونه مورد نظر صورت گرفت. بررسی مولکولی در ناحیه ژنی 16S rRNA تایید کننده صحت نتایج شناسایی مورفولوژیک در سطح جنس بود. اگر چه ناحیه ژنی 16S rRNA برای شناسایی در سطح گونه مناسب نیست اما در این ناحیه منطقه متغیری موجود است که تشخیص مولکولی جنس را با دقت نسبتا بالایی امکان پذیر می‌سازد (سلطانی و همکاران، ۱۳۸۷). صفات مورفولوژیک برگزیده برای رده‌بندی صفات شفاف و روشن نبوده است. این صفات حتی در شرایط ثابت محیطی در طول یک دوره رشد و در طول سن جلبک تغییر می‌کند (سلطانی و همکاران، ۱۳۸٤).

پراکنش سیانوباکتری در شوری‌های مختلف (۱، ۲، ۳، ٤ و ۵ درصد) نشان می‌دهد که با افزایش شوری پراکنش آن‌ها در محیط مایع به صورت صفحه‌ای است. سیانوباکتری‌ها به عنوان موجودات هوشمند در محیط‌های مختلف از آرایش خاصی برخوردار هستند و احتمالاً برای زنده ماندن و مقابله با تنش این آرایش را از خود نشان می‌دهند در حالی که در شوری ۵ درصد توان مقابله با این شوری را ندارد و از حالت صفحه‌ای به حالت پراکنده در می‌آیند. می‌توان این صفت را ناشی از تاثیر این تنش بر ریخت‌شناسی سیانوباکتری‌ها دانست (Perona et al., 2003).

دقت در بررسی میکروسکوپی نشان می‌دهد که شکل سلول‌های رویشی در تیمار ۱ درصد تغییر پیدا نکرده است. اما اضمحلال سلول‌ها از شوری ۲ درصد شروع می‌شود و در شوری ۵ درصد به بالاترین حد خود می‌رسد. اطلاعات بدست آمده نشان دهنده این

مطلب است که شوری اثر تخریب کننده‌ای در مورفولوژی سلول‌ها دارد و سلول‌ها را به سمت فاز مرگ برده و باعث کاهش تراکم سلول‌ها شده است. این الگو در مورد غالب جلبک‌های سبز-آبی استیگمونماتال، نوستوکال و اسیلاتوریاسه گزارش شده صدق می‌نماید (صفایی و همکاران، ۱۳۸٦). در واقع افزایش شوری موجب القا پاسخ‌های سازشی در سیانوباکتری‌ها می‌گردد و بسته به نوع جلبک این پاسخ‌ها متفاوت است (سلطانی و همکاران، ۱۳۸٤). شوری بالا با افزایش جذب یون‌های Na^{+}, Cl^{-} موجب کاهش رشد می‌شود. با وجود اینکه سدیم یک عنصر لازم برای سیانو باکتری‌ها است (Garcia-Gonzalez et al., 1987). اما افزایش مقدار آن اثر تخریبی بر روی نمونه دارد. تنش شوری از فاکتورهای محدود کننده‌ای است که بر روی رشد میکروارگانیسم‌ها اثر می‌گذارد (Whitton and Potts, 2000). عکس‌های میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) تغییرات در ساختار سلولی را تایید می‌کند، این تغییرات سمی بودن سدیم را در غلظت‌های بالای شوری نشان می‌دهد و از آنجا که سیانوباکتری‌ها تمایل به دهیدراته شدن دارند، غلاف موسیلاژی آن‌ها بسیار فشرده می‌شود (Herandez et al., 2004).

شواهد نشان می‌دهد که بررسی‌های صورت گرفته بیشتر بر پایه فیزیولوژی بوده و بررسی توام ریخت‌شناسی و مولکولی صورت نگرفته است. این پژوهش می‌تواند حائز نتایج بررسی ترکیبی مولکولی و مورفولوژی بوده و به دلیل مورفوتیپ‌های متغیر و متنوع سیانوباکتری‌ها قابل توجه باشد. در این بررسی نتایج نشان داد، شوری که یکی از معضلات زمین‌های کشاورزی ایران است می‌تواند بر روی مورفولوژی سیانوباکتری‌ها تاثیرگذار باشد، بطوری‌که نشان داده شد سیانوباکتری مورد مطالعه به شوری بالا (بالاتر از ۵ درصد) حساس بوده و در این شوری از بین می‌رود. اضمحلال سلولی، توقف متابولیسم و فعالیت‌های فیزیولوژیکی را در بردارد. لذا این سیانوباکتری نمی‌تواند کاندید مناسبی برای اصلاح بیولوژیکی خاک باشد.

نتایج فیزیولوژی نشان دهنده حساسیت فیزیولوژیکی این نمونه به شوری است. تیمار با کلرید سدیم منجر به کاهش نرخ رشد و همچنین جلوگیری از تولید بیومس جلبکی بیشتری شده است. این نتایج مطابق نتایج Soltani و همکاران (۲۰۰۷) و Shanleyraj و Anand (۲۰۰٦) می باشد که اظهار داشتند کلرید سدیم ممکن است که تا شوری ۱ درصد باعث کاهش معنی‌دار رشد سیانوباکتری شود، ولی در شوری‌های بالاتر کاهش رشد در اغلب سیانوباکتری‌ها مشاهده می گردد. البته میزان حساسیت بستگی به گونه سیانوباکتری دارد. مثلاً *Cylindrospermopsis* نسبت به شوری حساس‌تر بوده و رشد آن در کلرید سدیم بالاتر از ۰/٦ درصد کاهش می یابد (Moisander et al., 2002). تحمل رشد در شوری‌های پایین ممکن است به سازش سیانوباکتری به محیطی که از آن جدا گشته، مانند محیط‌های دریایی بستگی داشته باشد (Rosales et al., 2005). نتایج همچنین نشان دادند که میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی اعم از کلروفیل و فیکوبیلی‌پروتئین‌ها در شوری بالاتر از ۱ درصد کاهش می‌یابد. این کاهش ممکن است مربوط به سمیت کلرید سدیم و بازدارندگی آن برای بیوسنتز آلفا آمینولوولینیک اسید دهیدروژناز و پروتوکلروفیلید ردوکتاز باشد (Ouzounidou, 1995).

نتیجه‌گیری نهایی

نتایج فیزیولوژیک و مورفولوژیک در این تحقیق نشان می‌دهد که سیانوباکتری *Leptolyngbya* sp. ISC 25 قادر به تحمل شوری نبوده بلکه کلرید سدیم

ترکیبی سمی برای آن می‌باشد. از آنجا کـه شـوری از معظـلات بسـیاری از زمین‌هـای کشـاورزی در ایـران می‌باشد، نظـر بـه حساسـیت گونـه مـورد مطالعـه بـه غلظت‌های بالاتر از ۱٪ کلرید سدیم، *Leptolyngbya* sp. ISC 25 نمونه مناسبی برای استفاده جهت اصـلاح بیولوژیکی خاک‌های شور نمی‌باشد.

قدردانی و تشکر

بدینوسـیله نگارنـدگان از پژوهشـکده علـوم پایـه کاربردی جهاد دانشگاهی برای حمایت از انجـام ایـن پروژه تشکر می‌نمایند. در ضمن همکـاری‌هـای مـوثر سرکار خانم بافته‌چی و جناب آقای بلفیون قابل تقدیر می‌باشد.

منابع

جرجـــانی، س.، شـــکروی، ش. و دزفولیـــان، م. (۱۳۸۹). بررســی تنــوع پــذیری مورفولوژیــک سیانوباکتریوم خاکزی در شـرایط تـوأم pH و دی اکسید کربن در شرایط محدودیت افراطـی شـدت نور. پایـان نامـه کارشناسـی ارشـد، دانشـگاه آزاد اسلامی واحد گرگان.

سلطانی، ن.، خاوری‌نژاد، ر.، طباطبـایی یـزدی، م.، شکروی، ش. و فرناندز والینته، الـف. (۱۳۸٤). بررسـی خـواص آنتـی میکروبیـال و فیزیولـوژی سیانوباکتری‌ها در محیط‌های افراطـی. پایـان نامـه دکتری تخصصی، گروه زیست شناسـی، دانشـکده علوم، دانشگاه تربیت معلم تهران.

سلطانی، ن.، دزفولیان، م.، شکروی، ش.، بافته‌چـی، ل. و احسان، ش.(۱۳۸۷). جداسازی و شناسـایی مورفولوژیک و مولکولی گونـه‌های جدیـد سـیانو باکتری از منطقه فیروزکوه (استان تهران) با استفاده از محیط‌های کشـت مختلـف. شـماره ۸. جلـد ٤. صفحات: ۳۱۹-۳۲۸.

صـــفایی‌کتـــولی، م. شـــکری ، ش. علمـــایی، م. و سلطانی، ن. (۱۳۸۵). بررسـی رشـد و وضـعیت انگیـزه‌ای سـیانوباکتریای خـاکزی در رابطـه بـا تنش‌های شـوری در شـرایط آزمایشـگاهی. پایـان نامه کارشناسی ارشد دانشگاه آزاد اسلامی گرگان.

فرامرزی، م. فروتن‌فر، ح. و شـکیبایی، م. (۱۳۸۹). بیوتکنولـوژی ریـز جلبک‌هـا. انتشـارات دانشـگاه علوم پزشکی تهران. صفحه ۳۹۸.

Apte, SK., Reddy, BR. and Thomas, J. (1987). Relationship between sodium influx and salt tolerance of nitrogen-fixing cyanobacteria. Applied and Environmental Microbiology. 53:1934-1939.

Bermejo, R.N.R., Alva´rez-Pez, J.M., Acie´n Ferna´ndez, F.G. and Molina Grima, E. (2002). Recovery of pure B-phycoerythrin from the microalga *Porphyridum Cruentum*. Journal of Biotechnology. 93: 73-85.

Berrendero, E., Perona, E., and Mateo, P. (2008) Genetic and morphological characterization of *Rivularia* and *Calothrix* (Nostocales, Cyanobacteria) from running water. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 58:447–460.

Egamberdieva, D. Kamilova. F., Validov, S., Gafurova, L., Kucharova, Z. and Lugtenberg, B. (2008). High incidence of plant growth-stimulating bacteria associated with the rhizosphere of wheat grown on salinated soil in uzbekistan. Environmental Microbiology. 10:1-9.

Gaber, MA. (2010). Antioxidative defense under salt stress. Plant Signaling and Behavior. 5(4): 369-374.

Garica-Gonzalez, M., Sanchez-Maeso, E., Quesada, A. and Feenandez, E. (1987). Sodium requirement for photosynthesis and nitrate assimilation in a mutant of *Nostoc muscorum*. Journal of Plant Physiology. 127: 423-429.

Gugger, M.F. and Hoffmann, L. (2004). Polyphyly of the true branching cyanobacteria (Stigonematales). International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 54(2):349–357.

Hegemann, M. (2011). Molecular biology of cyanobacterial salt acclimation. FEMS Microbiology Reviews .35: 87-123.

Hernandez-Marine, M., clavero, E. and Roldan, M. (2004). Microsocopy methods applied to research on cyanobacteria. Limnetica. 23 (1-2): 179-186.

Sanchez–Maeso, E., Fernandez-pinas, F., Garcia-Gonzalez, M. and Fernandez-valiente, E. (1986). Sodium requirement for photosynthesis and its relationship with dinitrogen fixation and external Co2 concentration in cyanobacteria. Plant Physiology. 5:585-587.

Shanleyraj, S. and Anand, N. (2006). Responses of four strains of cyanobacteria to salinity stress. Seaweed Research and Utilization. 28(1):127-138.

Soltani, N., Siahbalaei, R. and Shokravi, Sh. (2010). A new description of *Fischerella ambigua* (Nag.) Gom. A multidisciplinary approach. International Journal on Algae. 12(1):19-36.

Soltani, N., Khavari-Nejad, R., Tabatabaie, M., Shokravi, Sh. and Valiente, E.F. (2006). Variation of Nitrogenase Activity, photosynthesis and pigmentation of cyanobacterium *Fischerella ambigua* strain FS18 under different irradiance and pH. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 22 (6): 571-576.

Soltani, N., Zarrini, G., Ghasemi, Y., Shokravi, Sh. and Baftehchi, L. (2007). Characterization of a soil cyanobacterium *Fischerella* sp. FS 18 under NaCl stress. Journal of Biological Sciences. 7(6):931-936.

Stal, L.J. (2007). Cyanobacteria: Diversity and versatility, clues to life in extreme environment. In: Algae and cyanobacteria in extreme environment Edited by: Seckbach J. The Netherland: Springer. 659-680.

Suleyman, I., Allakhverdiev, S.I. and Murata, N. (2008). Salt stress inhibits photosystems II and I in cyanobacteria. Photosynthesis Research. 98:529-539.

Sundaram, Sh. and Soumya, K.K. (2011). Study of physiological and biochemical alterations in cyanobacterium under organic stress. American Journal of Plant Physiology. 6(1):1-16.

Thomas, J. and Apte, Sk. (1984). Sodium requirement and metabolism in nitrogen-fixing cyanobacteroa. Journal of Biosciences. 6: 771-794.

Valerio, E., Chambel, L., Sergio. P, Natalia, F., Paulo, p. and regerio, T. (2009). Molecular identification, typing and traceability of cyanobacterial from freshwater reservoirs. Microbiology. 155: 642-656.

Whitton, A.B. and Potts, M. (2000). The Ecology of cyanophyta. Kluwer Academic Publishers. 233-255.

Komarek, J. and Anagnostidis, K. (1989) Modern approach to the classification system of cyanophytes, 4-Nostocales. Archive for Hydrobiologie Supplement. 82 (56): 274-345.

Lyra, Ch., Suomalinen, S., Gugger, M., Vezie, Ch., Sundman, P., Paulim, L. and Sivonen, K. (2001). Molecular characterization of plank tic cyanobacteria of anabaena, A phanizomenon, microcystis and planktothrix genera. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 51:513-526.

Marker, A.F.H. (1972). The use of acetone and methanol in the estimation of chlorophyll in the presence of phaeophytin. Freshwater Biology. 2: 361-385.

Moisander, P.H., McClinton, E. and Paerl, H.W. (2002). Salinity effects on growth, photosynthetic parameters, and nitrogenase activity in Estuarine planktonic cyanobacteria. Microbial Ecology. 43:432-442.

Nübel, U., Garcia-Pichel, F., Clavero, E. and Muyzer, G. (2000). Matching molecular diversity and ecophysiology of benthic cyanobacteria and diatoms in communities along a salinity gradient. Environmental Microbiology. 2: 217-226.

Ouzounidou, G. (1995). Cu-ions mediated changes in growth, chlorophyll and other ion contents in a Cu-tolerant Koeleria splendens. Biologia Plantarum. 37:71-78.

Pan, X., Chang, F., Kang, L., Li, G., Li, D., Liu, Y., Shen, Y. and Wei, Z. (2008). Morphological characteristics and phylogenetic relationship of *Anabaena* species from Lakes Dianchi and Erhai, China. Hydrobiologia. 614: 353–362.

Perona, E., Abola, M., Bonilla, I. and pilar, P. (2003). Cyanobacterial diversity in a Spanish river determined by means of isolation of cultures. Morphological variability of isolates in relation to natural populations. Algological Studies. 109: 475-486.

Rajaniemi, p., Hrouzek, P., Kasˇtovska, K., Willame, R., Rantala, A., Hoffmann, L., Koma´rek, J. and Sivonen, K. (2005). Phylogenetic and morphological evaluation of the genera *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Trichormus* and *Nostoc* (Nostocales, Cyanobacteria). International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 55: 11–26.

Rosales, N., Ortega, J., Mora, R. and Morales, E. (2005). Influence of salinity on the growth and biochemical composition of the cyanobacterium *Synechococcus* sp. Ciencias Marinas. 31(2):349-355.