

مقاله پژوهشی

بررسی مقایسه‌ای و شاخص سازی فیزیولوژیکی پلی ساکاریدها خارج سلولی در کشت سلول و تکثیر سیانوباکتری‌ها

رضوان کرمی برزآباد^۱، ابوالفضل باغبانی آرانی^۲

^۱ نویسنده مسئول، گروه کشاورزی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران.

^۲ گروه کشاورزی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران.

* (نویسنده مسئول مکاتبات): R.karami@pnu.ac.ir

تاریخ پذیرش: شهریور ۱۴۰۱

تاریخ دریافت: تیر ۱۴۰۱

DOI:10.30495/JDB.2022.1963634.1319

<https://dorl.net/dor/20.1001.1.2008692.1401.15.1.6.0>

چکیده

پلی ساکاریدهای خارج سلولی ترکیبات پلی مری هستند که در بعضی از جنس‌های سیانوباکتری‌ها تولید می‌شوند. در این پژوهش، ویژگی‌های فیزیولوژیکی و پلی ساکاریدهای خارج سلولی در سه سیانوباکتری مختلف؛ ریشه‌ای هتروسیست‌دار، ریشه‌ای بدون هتروسیست و تک سلولی بررسی و مقایسه شده است. نتایج مربوط به نرخ رشد و منحنی رشد این سه نمونه نشان می‌دهند که سیانوباکتر تک سلولی *Synechococcus sp.* نسبت به دو سویه ریشه‌ای هتروسیست‌دار *Nostoc sp.* و ریشه‌ای بدون هتروسیست *Phormidium sp.* رشد بیشتری دارد. این در حالی است که سنجش پلی ساکاریدهای این سه نمونه نشان می‌دهد تولید پلی ساکاریدهای خارجی هر سه نمونه در انتهای فاز رشد این نمونه‌ها به بیشینه می‌رسد و اینکه سویه *Phormidium sp.* توانایی تولید بیشترین میزان پلی ساکاریدها به ویژه خارج سلولی را دارد در حالی که بررسی فعالیت نیتروژنازی این سویه‌ها نیز نتیجه‌ای مطابق رشد آنها داشت. به گونه‌ای که سویه *Synechococcus sp.* بیشترین میزان فعالیت نیتروژنازی را دارد و نمونه *Nostoc sp.* با اختلاف جزئی در مقام دوم است. به این ترتیب نتیجه گیری می‌شود که سویه *Phormidium sp.* نمونه مستعدی است که قابلیت تولید پلی ساکاریدها بویژه پلی مرهای خارج سلولی را به میزان زیادی دارد و می‌تواند در بخش‌های مختلف با پلی مرهای سنتتیکی چون زانتان رقابت نماید.

کلیدواژه‌ها: پلی ساکاریدهای خارج سلولی، *Synechococcus sp.*، *Nostoc sp.*، *Phormidium sp.*

مقدمه

معمولاً متشکل از ۶ یا تعداد بیشتری از منوساکاریدهای مختلف هستند، تشکیل می‌دهد. این ساختارها با پلی مرهای باکتریایی یا ماکرو جلبک‌ها که معمولاً کمتر از ۴ منومر دارند متفاوت است [۱]. بررسی‌های مختلفی که بر روی آگزوپلی ساکاریدهای سیانوباکتریایی شده نشان می‌دهد که حدود ۱۲ منوساکارید

پلی ساکاریدهای خارج سلولی (آگزوپلی ساکاریدهای سیانوباکتریایی (EPS)) ترکیب منحصر به فردی از هتروپلی ساکاریدهایی هستند که حدود ۷۵% آن‌ها را پلی مرهایی که

¹ Exopolysaccharide

ظاهری^۴ انجام می‌شد، این میکروارگانیسم‌ها به ۵ زیر شاخه: Chroococcales, Pleurocapsales, Oscillatoriales, Nostocales و Stigonematales تقسیم شده‌اند [۶].

سیانوباکتری‌های زیر گروه (Chroococcales) I و II (Pleurocapsales) نک سلولی‌های کروی هستند. در زیر گروه I سلول‌ها به روش تقسیم دوتایی تقسیم می‌شوند در حالیکه تکثیر سلول‌ها در زیر گروه II به صورت تقسیم چند تایی و تولید سلول‌های کوچکی بنام baecocytes است که به راحتی در محیط پراکنده می‌شوند. زیر گروه‌های III-V شامل سیانوباکتری‌های ریشه‌ای با اشکال ظاهری متفاوت هستند. در زیر گروه III (Oscillatoriales) تنها سلول‌های رویشی وجود دارند اما زیرگروه‌های IV (Nostocales) و V (Stigonematales) علاوه بر سلول‌های رویشی، هتروسیست؛ سلول‌های تخصص یافته ویژه‌ای که در شرایط هوایی عمل تثبیت نیتروژن را انجام می‌دهند؛ و اکینت؛ سلول‌های راکتی^۵ که در استرس‌های محیطی مانند سرما و خشکی بقاء خود را حفظ می‌کنند؛ نیز مشاهده می‌شوند. اختلاف زیر گروه‌های V و IV در این است که ریشه‌هایی که در زیر گروه V قرار می‌گیرند معمولاً انشعاب دار هستند [۷].

معمولاً سوش‌های تولید کننده پلی‌ساکاریدهای آزاد (RPS) از زیر گروه‌های I, III, IV سیانوباکتری‌ها هستند. البته برخی موارد استثنا مانند سوش *Mastigocladus laminosus* (زیر گروه V) نیز وجود دارد [۸]. تاکنون شواهدی در خصوص سوش‌های تولید کننده RPS از زیر گروه II یافت نشده است. به این ترتیب، زیر گروه‌های I, III, IV مورد بررسی قرار گرفته و نمونه‌های اصلی تولید کننده ترکیبات EPS آن‌ها ارزیابی شده‌اند.

انتخاب نمونه‌ها

بر اساس اطلاعات و گزارش‌های مربوط به سیانوباکتری‌های تولید کننده آگرو پلی‌ساکاریدی و با توجه به موجود بودن نمونه‌ها در کلکسیون ریز جلبکی، سه نمونه شامل، *Nostoc sp.* (ISC 101), *Phormidium sp.* (ISC 108), *Synechococcus sp.* (ISC 106) که به ترتیب متعلق به زیر

مختلف از هگزوزها؛ مانند گلوکز، گالاکتوز، مانوز، فروکتوز؛ پنتوزها؛ مانند ریبوز، گزیلوز، آرابینوز؛ دزوکسی هگزوزها؛ فوکوز، رامنوز، متیل رامنوز؛ هگزوزهای اسیدی؛ اسیدهای گلوکورونیک گالاکتورونیک در ساختار این پلی‌ساکاریدها دخیل هستند [۱، ۲ و ۳]. گاهی وجود انواع خاصی از منوساکاریدها (قندهای متیله و/یا قندهای آمینو) مانند N-استیل گلوکزآمین، ۲ و ۳-O-متیل رامنوز، ۳-O-متیل رامنوز، ۴-O-متیل رامنوز و ۳-O-متیل گلوکز نیز در ساختار آنها گزارش شده است.

ویژگی دیگر آگرو پلی‌ساکاریدهای سیانوباکتریایی، خاصیت آب‌گریزی^۱ آن‌ها است که در ارتباط با اتصال استر با گروه استیل (بیش از ۱۲٪ وزن خشک EPS)، نیمه پتیدی و وجود قندهای دزوکسی مانند فوکوز و رامنوز است. این خصوصیات سبب خاصیت امولسیون کنندگی پلی‌ساکاریدها می‌شود در غیر این صورت این ترکیبات به شدت آب دوست هستند.

گزارش شده که برخی ماکرومولکول‌ها مانند پلی‌پتیدها نیز در ساختارهای EPS های سیانوباکتریایی مشاهده شده‌اند [۴]. این پلی‌پتیدها غالباً شامل گلیسین، آلانین، والین، لوسین، ایزولوسین و فنیل آلانین هستند. پلی‌پتیدهایی غنی از گلیسین، آلانین، والین، لوسین، ایزولوسین و فنیل آلانین در EPS های *Cyanospira capsulata*, *Nucula calcicola* گزارش شده است. در *Schizothrix sp.* پروتئین‌های ویژه کوچکی غنی از آسپارتیک اسید مشاهده شده است. در کل، ترکیب شیمیایی، نوع و مقدار آگرو پلی‌ساکاریدهای تولید شده توسط یک سوش بخصوص سیانوباکتریایی ویژگی ثابت است و بیشتر به گونه‌های مختلف و شرایط کشت وابسته است. در حالی که ترکیب قندی EPS تولید شده توسط یک سوش از نظر کمی و کیفی مقداری تفاوت دارد و مخصوصاً این اختلاف با سن کشت مرتبط است.

اطلاعات کمی در خصوص معماری و خواص جریان‌ی^۲ آگرو پلی‌ساکاریدها موجود است اما آنچه مسلم است وجود تعداد زیادی از منوساکاریدهای مختلف با انواع متنوعی از پیوندها بیانگر واحدهای پیچیده ساختاری و معماری خاص این ماکرومولکول‌ها می‌باشند [۵].

هرچند که سیانوباکتری‌ها تک‌نمایی^۳ هستند اما شکل ظاهری متنوعی دارند. در طبقه‌بندی سنتی که عموماً بر اساس ویژگی‌های

¹ Hydrophobicity

² rheology

³ monophyletic

⁴ morphologic

⁵ resting cells

فرمول (۱): سنجش میزان کلروفیل (میکروگرم بر میلی لیتر)

$$\text{Chl } a = 13.14 \times A_{665\text{nm}}$$

برای تعیین نرخ رشد، از روز اول کشت نمونه‌ها در محیط مایع هر سه روز یک بار از هر نمونه ۳ تکرار برداشت کرده و جذب نوری آنها در طول موج ۷۵۰ نانومتر در مقابل شاهد محیط کشت یادداشت می‌شود. زمانیکه نمونه‌ها وارد فاز رشد تصاعدی (لگاریتمی) می‌شوند در دور روز متوالی طبق فرمول (۲) نرخ رشد محاسبه می‌شود.

فرمول (۲): سنجش نرخ رشد

$$D = \ln(\text{OD}_{20\text{th}} - \text{OD}_{17\text{th}}) / t_{20} - t_{17}$$

Ln لگاریتم نپرین، t_2 روز دوم، t_1 روز اول

جهت دست یابی به پلی ساکاریدهای متصل به دیواره سلول، ابتدا سوسپانسیون جلبکی را کاملاً هم زده و هموژن کرده و سپس در ۳ تکرار ۱ میلی لیتر از سوسپانسیون جلبکی را برداشته و به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۵۰۰۰ سانتریفوژ می‌کنیم. محلول روئی را خارج کرده و پلیت جلبکی را با آب مقطر دو بار شستشو می‌دهیم. سپس پلیت شسته شده جهت ارزیابی و سنجش پلی ساکاریدهای متصل به دیواره سلولی به روش Dubois و همکاران (۱۹۵۶) مورد بررسی قرار می‌گیرد [۹].

سنجش پلی ساکاریدهای خارج سلولی یا آگزوپلی ساکاریدها
ابتدا در ۳ تکرار ۱ میلی لیتر از سوسپانسیون جلبکی هموژن شده را برداشت می‌کنیم و به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۵۰۰۰ سانتریفوژ می‌کنیم. سوپرناتانت حاصله را جهت بررسی و سنجش پلی ساکاریدهای خارج سلولی به روش Dubois و همکاران (۱۹۵۶) مورد استفاده قرار می‌دهیم [۹]. میزان پلی ساکاریدها بر اساس روش کالریمتریک (رنگ سنجی) Dubois و همکاران (۱۹۵۶) محاسبه شد [۹]. به این ترتیب محلول حاوی قند (اعم از قندهای متصل یا آگزوپلی ساکاریدها) را داخل لوله‌های آزمایش می‌ریزیم. سپس ۰/۰۵ میلی لیتر فنل ۸۰٪ و همزمان ۵ میلی لیتر اسید سولفوریک خالص را به آن اضافه می‌کنیم. لوله‌ها به مدت ۱۰ دقیقه باید ثابت مانده و سپس ۲۰-۱۰ دقیقه در حمام آب گرم 30°C -۲۵ هم زده می‌شوند. در این واکنش که به شدت

گروه‌های I, III, IV هستند انتخاب شده و مورد بررسی قرار گرفتند.

کشت و تکثیر

به جهت اطمینان از خالص بودن نمونه‌ها و نیز برای ازدیاد آنها ابتدا نمونه‌ها به روش پلیت کانت آگار، در محیط کشت جامد داخل پلیت کشت داده شدند. برای این منظور محیط کشت‌های اختصاصی آنها تهیه شد (محیط کشت BG11 برای نمونه نوستوک و محیط کشت BG11 برای نمونه‌های فرمیدیوم و سینکوکوکوس) پس از افزودن آگار، محیط‌ها توسط اتوکلاو استریل شده و درون پلیت های یکبار مصرف استریل منتقل می‌شوند. بعد از سرد شدن و بستن محیط‌ها، سیانوباکتری‌های مورد نظر بر روی آنها تلقیح می‌شوند و در اتاق کشت قرار می‌گیرند.

پس از رشد نمونه‌ها در محیط کشت جامد و اطمینان از عاری بودن آنها از باکتری‌ها و ناخالصی‌های سیانوباکتریایی دیگر، آن‌ها هموژن شده و جهت ازدیاد به محیط کشت مایع منتقل می‌شوند. ارلن‌های حاوی محیط کشت مایع نیز در اتاق کشت قرار گرفتند و توسط پمپ‌های مخصوص آکواریوم هوادهی شدند.

سنجش‌های فیزیولوژیک

از روش Marker (۱۹۷۲) برای سنجش کلروفیل استفاده شد. بدین منظور در سه تکرار ۱ میلی لیتر از سوسپانسیون جلبکی کاملاً یکنواخت، به مدت ۱۰ دقیقه در سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ و بخش رویی آن خارج گردید [۸]. سپس ۱ میلی لیتر متانول خالص به رسوب باقی مانده اضافه و با شدت بالا ورتکس گردید. نمونه‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در تاریکی (یخچال) قرار گرفتند. پس از این مدت، نمونه‌ها مجدداً به مدت ۱۰ دقیقه در سرعت ۱۲۰۰۰ (rpm) سانتریفوژ شدند و طیف جذبی بخش رویی با استفاده از اسپکتروفوتومتر در طول موج ۶۶۵ نانومتر در مقابل شاهد متانول ثبت شد. غلظت کلروفیل با استفاده از فرمول (۱) بر حسب میکروگرم کلروفیل بر میلی لیتر محاسبه شد که در آن $A_{665\text{nm}}$ جذب نمونه در طول موج ۶۶۵ نانومتر است (Marker, 1972).

پیروی می‌کند به این ترتیب هر سه این نمونه‌ها دارای فاز سکون نسبتاً طولانی هستند و فاز رشد تصاعدی آنها بصورت پیوسته است و در این بازه زمانی مورد مطالعه اثری از فاز مرگ و سکون در آنها به چشم نمی‌خورد. با بررسی این شکل مشاهده می‌شود که تغییرات نرخ رشد دو نمونه نوستوک و فورمیدیوم بسیار نزدیک به هم است و تنها با اختلاف کمی میزان نرخ رشد فرمیدیوم پائین تر از نوستوک است. این در حالی است که نرخ رشد سینکوکوکوس در مقایسه با این دو بالاتر است.

کلروفیل

سنجش میزان کلروفیل نمونه‌های مورد نظر در این بازه زمانی (۴۶ روزه) نیز در شکل ۳-۱۰ صورت گرفته است. بررسی منحنی رشد (بر اساس تغییرات میزان کلروفیل) نمونه نوستوک (شکل ۵) نشان می‌دهد که تغییرات میزان کلروفیل در این جلبک با نرخ رشد آن هماهنگ است به این ترتیب فاز سکون طولانی و فاز رشد مداوم از ویژگی‌هایی است که تغییرات کلروفیل هم آن را نشان می‌دهد. شکل ۶ منحنی رشد سینکوکوکوس را در طول زمان بر اساس میزان کلروفیل نشان می‌دهد. همان طور که مشاهده می‌شود این منحنی نیز با نرخ رشد این جلبک هماهنگی دارد به گونه‌ای که فاز سکون این جلبک بسیار کوتاه است و در فاز رشد تغییراتی دیده می‌شود اما نکته مهم آن پیوسته بودن فاز رشد آن و عدم وجود فاز مرگ یا سکون در طی این مدت زمانی است. شکل ۷ منحنی رشد جلبک فرمیدیوم را بر حسب تغییرات میزان کلروفیل آن در طول زمان نشان می‌دهد. در این شکل نیز مانند منحنی تغییرات نرخ رشد، در ابتدا فاز سکون کوتاهی وجود داشته و پس از آن فاز رشد به صورت پیوسته مشاهده می‌گردد در این نمونه نیز در طی این مدت زمان اثری از فاز مرگ یا سکون مشاهده نشد.

مقایسه منحنی‌های رشد این سه نمونه (شکل ۱۰) نشان می‌دهد که دو نمونه نوستوک و سینکوکوکوس در بازه زمانی مورد مطالعه الگوی رشدی مشابهی دارند فقط در پایان این دوره میزان رشد نوستوک کاهش می‌یابد درحالی‌که سینکوکوکوس با همان سرعت و روند سابق به رشد خود ادامه می‌دهد. در مقایسه با این دو نمونه فرمیدیوم میزان رشد کمتری دارد.

گرمازا است، رنگ زرد مایل به نارنجی تشکیل می‌شود که برای چند ساعت ثابت است. جذب محلول‌های قندی در طول موج ۴۸۵ نانومتر و در مقابل شاهد که آب مقطر است خوانده می‌شود. مقدار قندها با توجه به منحنی استاندارد که به روش فنل- اسید سولفوریک [۹] جهت تعیین غلظت کل قندها بر حسب گلوکز (میکروگرم در میلی لیتر) رسم شده و نیز با توجه به فرمول (۳) محاسبه می‌شود.

فرمول (۳): سنجش میزان قندها (میکروگرم در میلی لیتر)

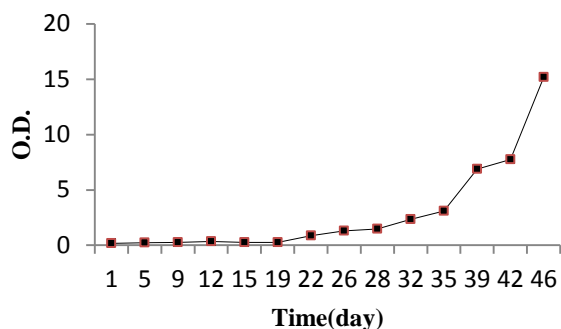
$$X = Y/0.0089$$

X میزان قند، Y جذب قندها در طول موج ۴۸۵ نانومتر است.

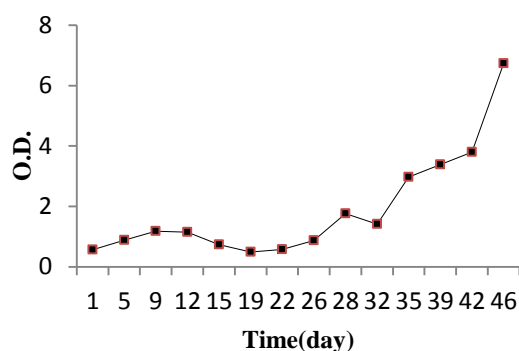
برای اندازه‌گیری فعالیت نیتروژنازی کلیه نمونه‌ها در محیط کشت بدون نیتروژن ((BG110 به صورت جداگانه کشت داده شدند. فعالیت نیتروژنازی با استفاده از آزمون احیای استیلن Stewart و همکاران (۱۹۸۰) انجام شد [۱۰].

نتایج سنجش‌های فیزیولوژیکی

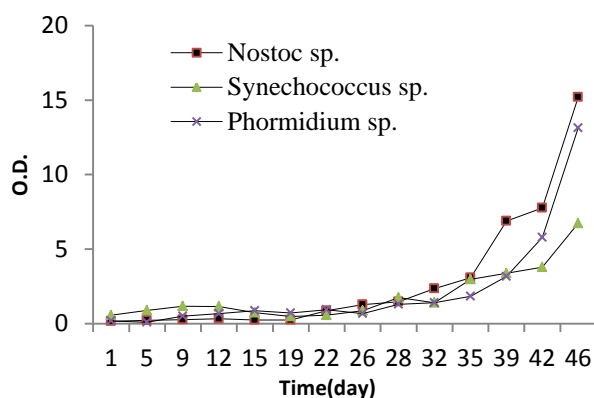
نرخ رشد در یک بازه زمانی ۴۶ روزه بررسی و میزان تغییرات آن در طول موج $\lambda=750\text{nm}$ ارزیابی گردید. از محیط کشت فاقد جلبک به عنوان شاهد استفاده شد. نمودار تغییرات نرخ رشد نمونه‌های انتخابی (۱۰۱، ۱۰۸ و ۱۰۶) در شکل‌های زیر آمده است. شکل ۱ تغییرات نرخ رشد جلبک *Nostoc sp.* را در این بازه زمانی نشان می‌دهد. همان طور که مشاهده می‌شود این جلبک دارای فاز سکون طولانی در ابتدای رشد و تداوم فاز لگاریتمی بدون وجود فاز مرگ و سکون در این بازه مورد بررسی می‌باشد. میزان نرخ رشد (μ) این جلبک 0.091 D^{-1} است. شکل ۲ تغییرات نرخ رشد جلبک *Synechococcus sp.* را در این بازه زمانی نشان می‌دهد. بر اساس این شکل این نمونه نیز دارای فاز رشد پیوسته و بدون فاز سکون می‌باشد. میزان نرخ رشد این نمونه 0.248 D^{-1} است. شکل ۳ تغییرات نرخ رشد جلبک *Phormidium sp.* را در این بازه زمانی نشان می‌دهد. بر اساس شکل این نمونه نیز فاز رشد پیوسته دارد و بدون فاز سکون می‌باشد. میزان نرخ رشد این نمونه 0.089 D^{-1} است. مقایسه منحنی‌های مربوط به نرخ رشد این سه نمونه (شکل ۴) نشان می‌دهد که نرخ رشد نمونه‌های مورد بررسی از الگوی واحدی



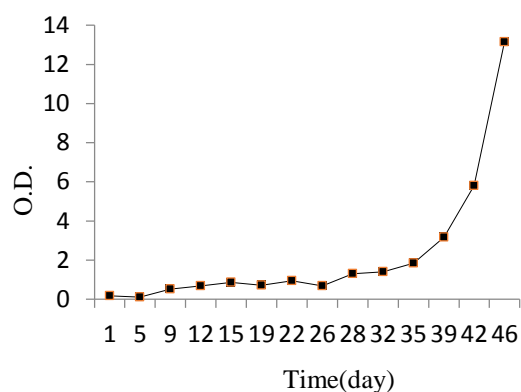
شکل ۲- منحنی نرخ رشد *Synechococcus* sp. (ISC 106) در زمان



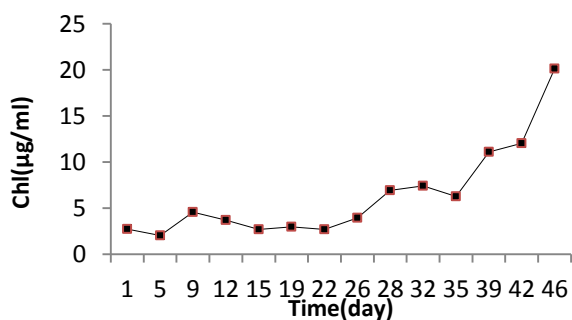
شکل ۱- منحنی نرخ رشد *Nostoc* sp. (ISC 101) در زمان



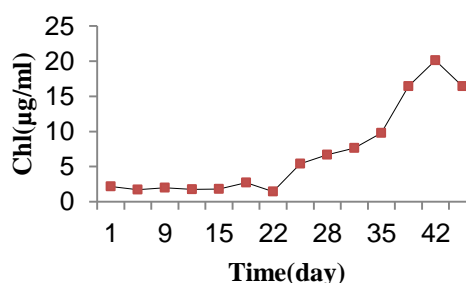
شکل ۴- مقایسه منحنی های نرخ رشد نمونه های *Nostoc* sp., *Synechococcus* sp., *Phormidium* sp.



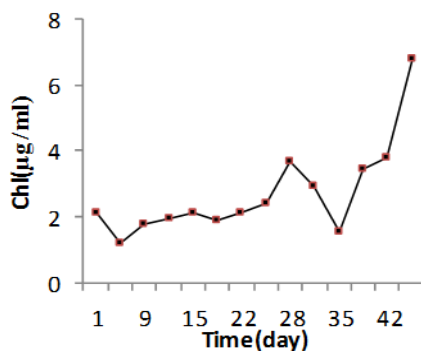
شکل ۳- منحنی نرخ رشد *Phormidium* sp. (ISC 108) در زمان



شکل ۶- منحنی رشد *Synechococcus* sp. بر حسب تغییرات کلروفیل در طول زمان



شکل ۵- منحنی رشد *Nostoc* sp. بر حسب تغییرات کلروفیل در زمان



شکل ۷- منحنی رشد *Phormidium* sp. بر حسب تغییرات کلروفیل در زمان

پلی‌ساکاریدها

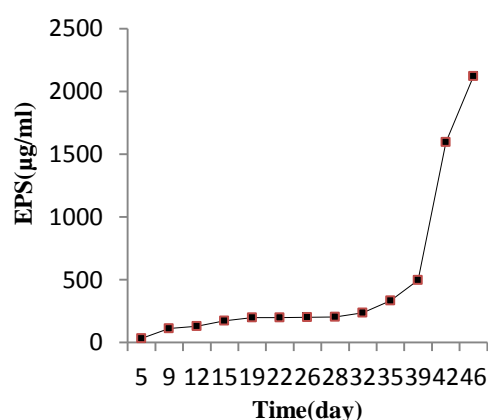
شکل‌های ۸ و ۱۲ تغییرات پلی‌ساکاریدهای نوستوک را در طول زمان نشان می‌دهد. شکل ۸ تغییرات پلی‌ساکاریدهای خارجی (EPS)(Exocellular Polysaccharides) رها شده در محیط کشت را در طول زمان نشان می‌دهد. بر اساس این شکل ملاحظه می‌شود که میزان این پلی‌ساکاریدها تا روز بیست و دوم کشت افزایش بسیار کمی داشته و از روز بیست و دوم به بعد متناسب با رشد تصاعدی نمونه ترشح آنها افزایش می‌یابد و این روند افزایشی تا پایان دوره ادامه دارد به نحوی که حتی در روزهای پایانی سنجش ترشح این قندها به بیشترین میزان خود می‌رسد.

اما در خصوص قندهای متصل به سلول (Capsular Polysaccharides) (CPS) وضعیت متفاوت است. مطابق شکل ۳-۱۱ میزان این قندها به نسبت قندهای آزاد بیشتر است و از ابتدای کشت نمونه تا پایان دوره سنجش با روند افزایشی به صورت منظم مقدار آنها افزایش می‌یابد. جالب ذکر است که این روند تا پایان دوره ادامه دارد یعنی همانند قندهای آزاد، این قندها نیز بیشترین میزان خود را در روزهای پایانی نشان می‌دهند. شکل‌های ۹ و ۱۰ تغییرات پلی‌ساکاریدها را در سینکوکوکوس نشان می‌دهد. به این ترتیب، شکل ۹ منحنی پلی‌ساکاریدهای خارجی *Synechococcus sp.* را در زمان نشان می‌دهد. مطابق این شکل، ترشح پلی‌ساکاریدها خارجی تا یک ماه اول رشد کمی دارد و پس از آن تا پایان زمان سنجش میزان ترشح آنها افزایش چشمگیری می‌یابد که متناسب با روند افزایشی رشد بر حسب میزان کلروفیل نمونه است. در این نمونه هم بیشترین میزان ترشح

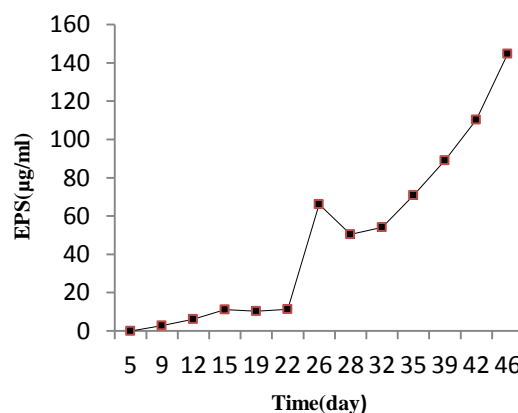
در روزهای پایانی مشاهده شده که این روند ادامه می‌یابد. همان طور که در شکل ۱۰ ملاحظه می‌شود، در این نمونه نیز تولید قندهای متصل از ابتدای کشت نمونه شروع شده و در پایان دوره به حالت ثابت می‌رسد اما نکته قابل توجه این است که میزان قندهای متصل به سلول به نسبت قندهای آزاد آن بسیار کمتر است. شکل‌های ۱۱ و ۱۲ تغییرات پلی‌ساکاریدها را در فرمیدیوم نشان می‌دهند. به این ترتیب شکل ۱۱ میزان پلی‌ساکاریدهای آزاد (خارجی) فرمیدیوم را در زمان نشان می‌دهد. در این نمونه نیز مانند دو نمونه قبل تولید پلی‌ساکاریدهای خارجی تا حدود یک ماه روند یکنواخت و کمی دارد اما پس از آن و متناسب با رشد تصاعدی نمونه افزایش چشمگیری در تولید آن مشاهده می‌شود.

همان طور که مشاهده می‌شود تولید این قندها از ابتدای رشد تا پایان دوره به صورت منظم افزایش یافته ولی نکته قابل توجه در این مورد کاهش چشمگیر میزان آنها به نسبت پلی‌ساکاریدهای خارجی است.

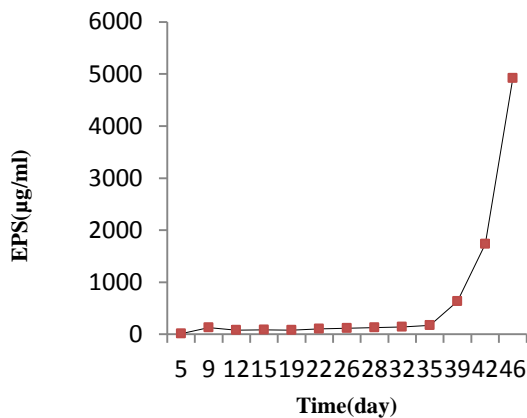
شکل ۱۳ تولید پلی‌ساکاریدهای خارجی را در ۳ نمونه مورد بررسی مقایسه می‌کند. بر اساس این شکل ملاحظه می‌شود که تولید این نوع از قندها در نمونه‌های مورد بررسی از الگوی ثابتی پیروی می‌کنند به این صورت که تا یک ماه اول رشد تولید آنها بسیار ناچیز است و پس از آن در انتهای فاز رشد تولید آنها افزایش می‌یابد. از میان ۳ نمونه مورد بررسی جلبک *Phormidium sp.* بیشترین میزان تولید پلی‌ساکاریدهای خارجی را دارد.



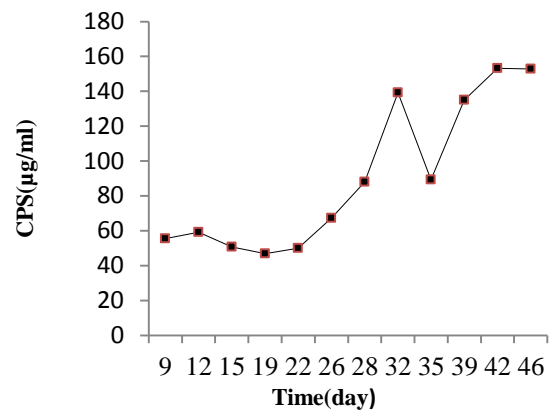
شکل ۹- منحنی میزان پلی‌ساکاریدهای خارجی *Synechococcus sp.* در زمان



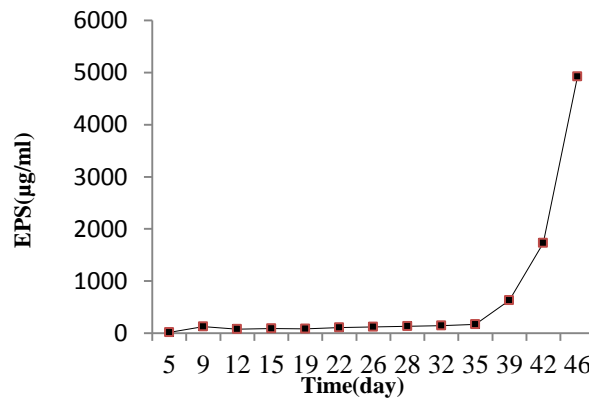
شکل ۸- منحنی میزان پلی‌ساکاریدهای خارجی رها شده در محیط کشت *Nostoc sp.* در زمان



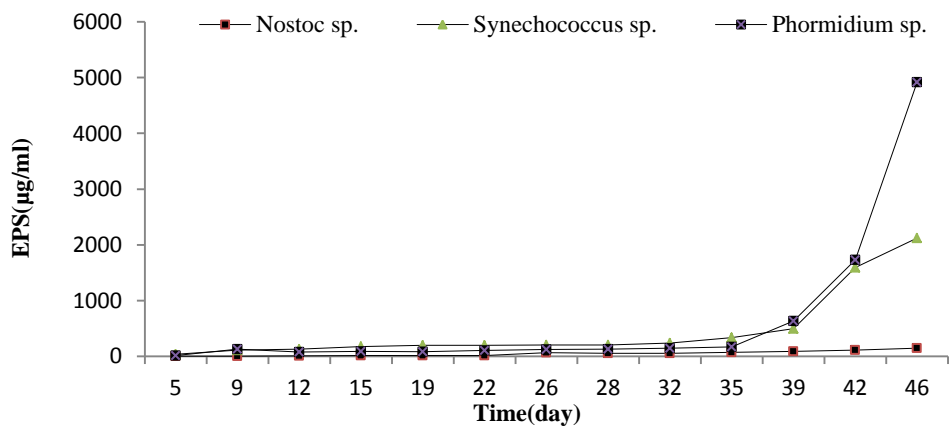
شکل ۱۱- منحنی میزان پلی ساکاریدهای خارجی *Phormidium sp.* در زمان



شکل ۱۰- منحنی میزان پلی ساکاریدهای متصل به دیواره سلول *Synechococcus sp.* در زمان



شکل ۱۲- منحنی میزان پلی ساکاریدهای خارجی *Phormidium sp.* در زمان

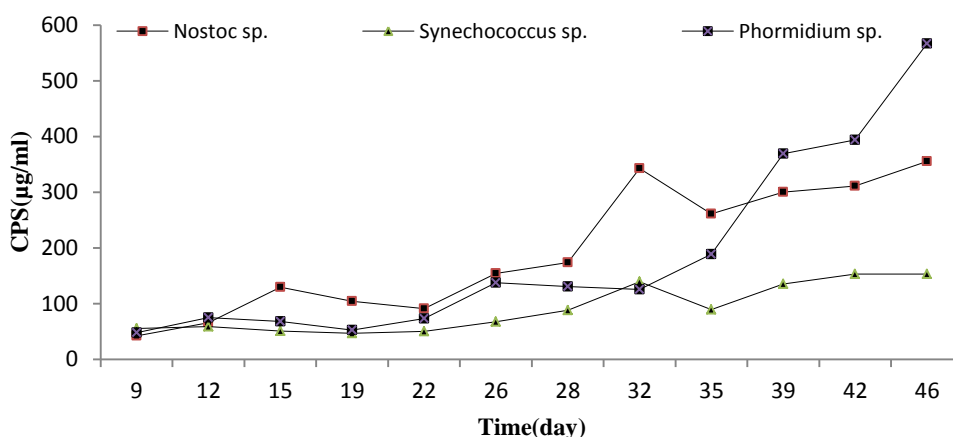


شکل ۱۳- مقایسه تولید پلی ساکاریدهای خارجی در سه نمونه جلبکی در زمان

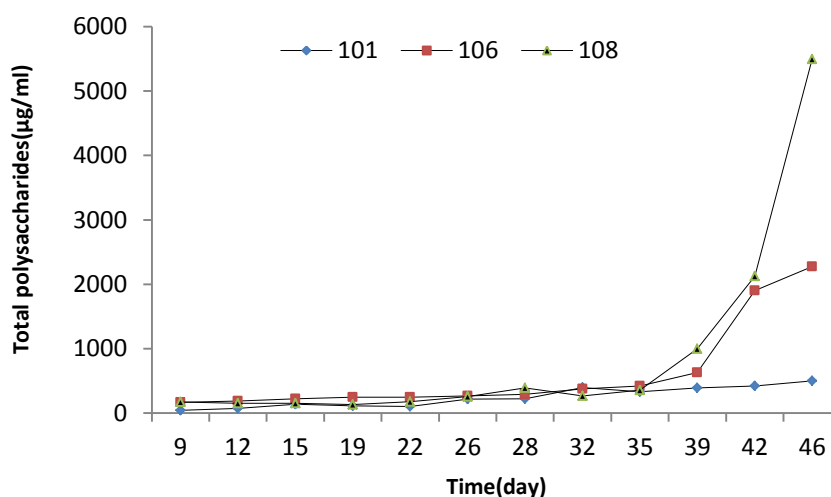
بررسی نشان می‌دهد که *Phormidium sp.* در مقایسه با دو نمونه دیگر بیشترین میزان تولید پلی ساکاریدهای متصل به دیواره سلول را دارد.

همچنین بر اساس شکل ۱۵، در جلبک فرمیدیوم مقدار کل پلی ساکاریدها بیشتر از دو نمونه دیگر است.

در شکل ۱۴ تولید پلی ساکاریدهای متصل به دیواره سلول این سه نمونه مقایسه شده است. همان طور که ملاحظه می‌شود میزان تولید پلی ساکاریدهای متصل در مقایسه با قندهای آزاد بسیار کمتر است. این قندها از ابتدای رشد نمونه تا پایان رشد با روند افزایشی تولید می‌شوند. مقایسه تولید آنها در نمونه‌های مورد



شکل ۱۴ - مقایسه تولید پلی‌ساکاریدهای متصل به سلول در سه نمونه جلبکی در زمان



شکل ۱۵ - مقایسه پلی‌ساکاریدهای کل در سه نمونه (نوستوک ۱۰۱، سینکوکوکوس ۱۰۶ و فرمیدیوم ۱۰۸).

در این نمونه نیز فعالیت نیتروژنازی از رشد خوبی برخوردار است و تغییرات آن با رشد نمونه هماهنگ است. فعالیت نیتروژنازی تا پایان دوره رشد این نمونه با آهنگ ملایمی رو به افزایش است. در شکل ۱۹ نیز فعالیت نیتروژنازی فرمیدیوم با تولید پلی‌ساکاریدهای خارجی آن مقایسه شده است. همان طور که ملاحظه می‌شود در این نمونه نیز مانند نمونه سینکوکوکوس میزان فعالیت نیتروژنازی بیشتر از تولید پلی‌ساکاریدهای خارجی آن است.

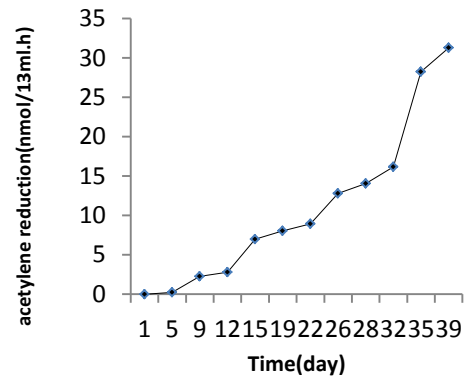
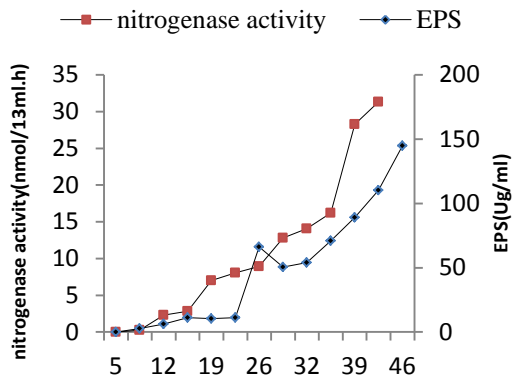
در شکل ۲۰ - میزان فعالیت نیتروژنازی سه نمونه نوستوک، سینکوکوکوس و فرمیدیوم با یکدیگر مقایسه شده است. با توجه به شکل ملاحظه می‌شود که دو نمونه نوستوک و سینکوکوکوس

نیتروژناز

شکل ۱۶ منحنی تغییرات فعالیت نیتروژنازی نوستوک را در طول زمان نشان می‌دهد. همان طور که مشاهده می‌شود فعالیت نیتروژنازی نیز همزمان با رشد نمونه شروع شده و حتی تا پایان دوره رشدی به فعالیت خود ادامه می‌دهد به نحوی که تغییرات آن با رشد نمونه هماهنگ است.

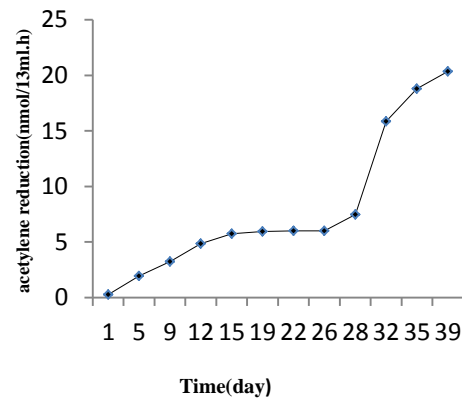
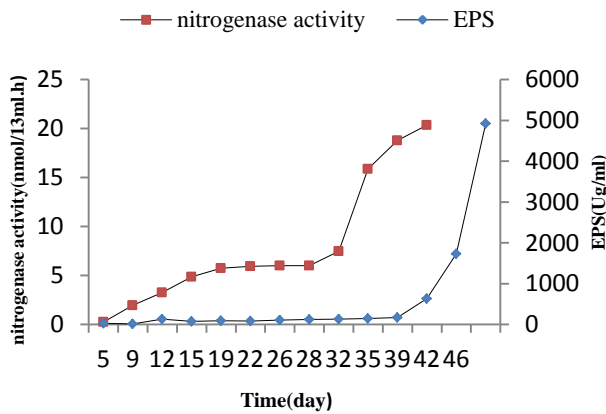
لازم به ذکر است که بررسی تغییرات فعالیت نیتروژنازی این نمونه با تولید پلی‌ساکاریدهای خارجی آن (شکل ۱۷) نیز حاکی از هماهنگی و تطابق روند افزایشی این دو فعالیت در نمونه نوستوک است. شکل ۱۸ تغییرات فعالیت نیتروژنازی نمونه فرمیدیوم را در زمان نشان می‌دهد. همان طور که مشاهده می‌شود

بیشترین مقدار فعالیت نیتروژنازی را دارند و در نمونه فرمیدیوم این میزان کمتر است.



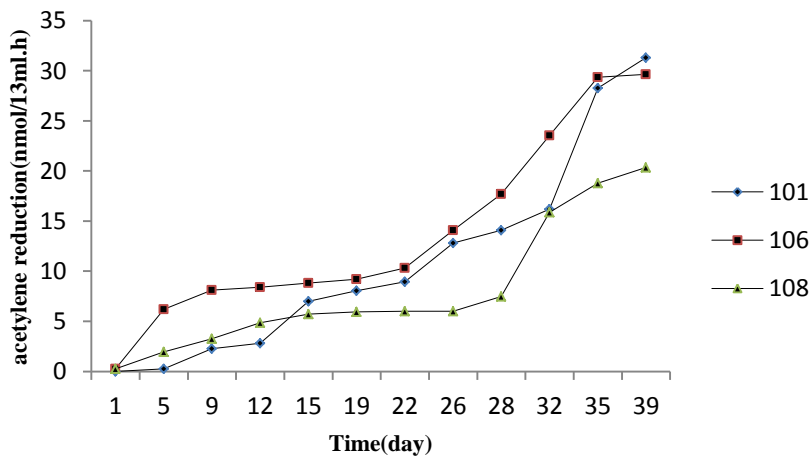
شکل ۱۶- بررسی تغییرات فعالیت نیتروژنازی *Nostoc sp.* در زمان خارجی. مقایسه تغییرات فعالیت نیتروژنازی و تولید پلی ساکاریدهای

شکل ۱۷- بررسی تغییرات فعالیت نیتروژنازی *Nostoc sp.* در زمان خارجی.



شکل ۱۸- مقایسه تغییرات فعالیت نیتروژنازی و تولید پلی ساکاریدهای خارجی *Phormidium sp.* در زمان

شکل ۱۹- بررسی تغییرات فعالیت نیتروژنازی *Phormidium sp.* در زمان



شکل ۲۰- مقایسه فعالیت نیتروژنازی نمونه‌های مورد بررسی (*Nostoc sp.* 101; *Synechococcus sp.* 106; *Phormidium sp.* 108)

بحث

بر اساس بررسی‌های مربوط به منحنی رشد نمونه‌های مورد بررسی مشخص می‌شود که هر سه نمونه از دوره رشدی طولانی برخوردار هستند به نحوی که در مدت زمان بررسی (۴۶ روز) همگی در بالاترین میزان رشد خود هستند و هیچ‌گونه اثری از ثابت شدن رشد یا ورود آنها به فاز مرگ مشاهده نشد. نتایج مربوط به بررسی نرخ رشد سه نمونه نوستوک، سینکوکوکوس و فرمیدیوم در بین روزهای ۳۲ تا ۳۵ نشان می‌دهد که *Synechococcus sp. ISC 106* بیشترین نرخ رشد را نسبت به دو نمونه دیگر دارد و این در حالی است که نرخ رشد دو نمونه ریشه‌ای (نوستوک و فرمیدیوم) بسیار نزدیک به هم بوده ولی از نمونه سینکوکوکوس کمتر است. به عبارتی می‌توان نتیجه گرفت که جلبک‌های تک سلولی به نسبت نمونه‌های ریشه‌ای نرخ رشد بیشتری دارند. این نتایج با نتایج حاصل از Kiai (۲۰۱۳) مطابقت کامل دارد [۱۱] چرا که در این پژوهش نیز آمده که سویه *Synechococcus elongatus* بالاترین میزان نرخ رشدی را نسبت به نمونه‌های *Nostoc spongiaeforme*، *Phormidium fragile* دارد و اینکه دو نمونه نوستوک و فرمیدیوم که هر دو از نمونه‌های ریشه‌ای هستند نرخ رشدی نزدیک به هم ولی پائین تر از سینکوکوکوس دارند. نتایج مربوط به مقایسه منحنی رشد نمونه‌ها بر اساس تغییرات کلروفیل نیز نشان می‌دهد که از میان این سه نمونه سینکوکوکوس و نوستوک رشد الگوی رشدی مشابهی دارند اما میزان رشد سینکوکوکوس با اختلاف جزئی بیشتر از نوستوک است و این در حالی است که نمونه فرمیدیوم نسبت به این دو نمونه کمترین میزان رشد را دارد. این بار نیز این نتایج با نتایج حاصل از Kiai (۲۰۱۳) هماهنگ است [۱۱] چرا که در مطالعات و پژوهش‌های انجام شده توسط Kiai (۲۰۱۳) در خصوص اندازه‌گیری محتوای کلروفیل توسط سیانوباکتری‌های ریشه‌ای و تک سلولی، باز هم سویه *Synechococcus elongatus* بیشترین محتوای کلروفیل را نسبت به نمونه‌های ریشه‌ای مانند نوستوک و فرمیدیوم دارد که خود شاهدهی بر بیشتر بودن رشد این سویه نسبت به سایر نمونه‌ها است. به این ترتیب، نتایج مربوط به تعیین نرخ رشد (μ) و منحنی رشد بر حسب میزان کلروفیل با یکدیگر همپوشانی کامل دارند و هر دو موید بیشتر بودن رشد سینکوکوکوس که نمونه‌ای

تک سلولی است نسبت به نمونه‌های ریشه‌ای است. این نتایج با نتایج سایر پژوهشگران از جمله Kiai (۲۰۱۳) نیز مطابقت کامل دارد [۱۱].

نتایج مربوط به اندازه‌گیری قندها نشان می‌دهند که از میان نمونه‌های مورد بررسی قندهای متصل به سلول (CPS) در سویه نوستوک بسیار بیشتر (تقریباً دو برابر) از میزان قندهای آزاد (RPS) است در حالیکه در دو نمونه دیگر وضعیت متفاوت است به نحوی که در سینکوکوکوس میزان قندهای آزاد بسیار بیشتر از قندهای متصل است در حالی که در سویه فرمیدیوم میزان این قندها نسبتاً با هم برابر است. این نتایج با گزارشات Nicolau و همکاران (۱۹۹۹) در خصوص تولید پلی ساکاریدهای خارجی در سیانوباکتری‌های هتروسیست دار و غیرهتروسیست مطابقت دارد [۱۲] چرا که مطابق نتایج او معمولاً میزان پلی ساکاریدهای آزاد در سیانوباکتری‌ها (RPS) بیشتر از CPS و یا در مواردی به میزان مشابه یافت می‌شوند. البته در این مورد استثنائاتی وجود دارد که می‌توان به مواردی چون *Nostoc linckia* و *Anabaena sp. 7120* [۱۳] اشاره کرد که در این موارد معمولاً میزان پلی ساکاریدهای آزاد کمتر از پلی ساکاریدهای متصل به سلول (CPS) هستند که این مورد در سویه نوستوک مورد بررسی در این پژوهش نیز صادق بود. بررسی‌های Singh و Das (۲۰۱۱) [۱۴] در خصوص بهینه‌سازی و نشان ویژه‌سازی پلی ساکاریدهای سیانوباکتریایی نشان می‌دهند که سیانوباکتری‌های ریشه‌ای در مقایسه با فرم‌های تک سلولی پلی ساکاریدهای بیشتری را تولید می‌کنند که این مسئله در خصوص نمونه‌های مورد بررسی این تحقیق نیز صادق بود چرا که صرفنظر از رشد این نمونه‌ها که فرم‌های تک سلولی (سینکوکوکوس) رشدی بیشتر از نمونه‌های ریشه‌ای داشتند، ولی نمونه فرمیدیوم بیشترین میزان تولید پلی ساکاریدها را دارد. به این ترتیب اگر هدف اصلی این تحقیق، پژوهش در خصوص سویه‌ای باشد که قابلیت تولید پلی ساکاریدهای آن زیاد باشد باید از نمونه‌های ریشه‌ای و از میان آنها سویه‌ای چون *Phormidium sp.* را انتخاب کرد.

به‌طور کلی بر اساس پژوهش‌های صورت گرفته در مورد ویژگی‌های پلی ساکاریدهای خارجی سیانوباکتری‌ها نتیجه‌گیری می‌شود که سویه فرمیدیوم یکی از مناسب‌ترین سویه‌ها از لحاظ

با هم هماهنگ و همسو عمل می‌کنند. این نتایج با گزارشات Staal و همکاران (۲۰۰۱) [۱۶] در خصوص اندازه‌گیری فعالیت نیتروژنازی در سیانوباکتری‌ها مطابق است. این پژوهشگران نیز در پژوهش‌های خود عنوان کرده‌اند که رابطه خطی مشخصی ($P < 0.001$) بین میزان احیاء استیلین و مقدار کلروفیل که شاخصی از رشد است وجود دارد. البته این امر در شرایطی است که هیچ تیمار خارجی بر نمونه‌ها مانند تجمع اکسیژن، خود سایه گسترده‌تری نمونه‌ها و یا سایر پارامترهای تداخلی اعمال نشود. مقایسه همزمان فعالیت نیتروژنازی با تولید پلی ساکاریدها در این نمونه‌ها نیز نشان می‌دهد که فعالیت نیتروژنازی این نمونه‌ها بسیار بیشتر از تولید ترکیبات پلی ساکاریدی در آنها است.

نتیجه‌گیری

با در نظر گرفتن کلیه نتایج و جمع بندی آن‌ها می‌توان اظهار نظر کرد که تمام نمونه‌های سیانوباکتریایی اعم از تک سلولی، ریشه‌ای هتروسیست‌دار و ریشه‌ای بدون هتروسیست همگی دارای قابلیت تولید ترکیبات پلی ساکاریدی (پلی ساکاریدهای آزاد و متصل به سلول) هستند. انتخاب جنس و سویه‌ای که مناسب‌ترین باشد بسته به نوع و هدف کار پژوهشی متفاوت است چرا که اگر منظور تنها تثبیت بیولوژیکی نیتروژن و انجام فعالیت نیتروژنازی باشد در این صورت نمونه‌های تک سلولی که رشد بهتر و سریع‌تری دارند کاندیدهای مناسبی به حساب می‌آیند اما در صورتیکه هدف اصلی تولید و بررسی ترکیبات پلی ساکاریدی جهت مصارف گوناگون پزشکی، داروسازی، غذایی، آرایشی بهداشتی، صنعتی و... باشد، مطابق نتایج حاصله سویه‌های ریشه‌ای مناسب‌ترین انتخاب‌ها هستند.

در این پژوهش و با توجه به بررسی داده‌ها و نتایج محققین دیگر نتیجه‌گیری می‌شود که سویه فرمیدیوم (ISC108) سویه مناسبی از نظر تولید قابل توجه پلی ساکاریدها با شرایط و ویژگی‌های قابل توجه است.

البته از آنجا که این باب از پژوهش دریچه‌ای جدید است و بررسی و تحقیقات اندکی در این خصوص صورت گرفته جا دارد که در پژوهش‌های آتی جنبه‌های گوناگون ترکیبات پلی ساکاریدی اعم از ساختار، آرایش قندها، میزان پیچیدگی، بررسی‌های فیزیکی و شیمیایی و نیز خواص و کاربردهای آنها نیز بررسی

تولید پلی ساکاریدهای خارجی است. در این خصوص می‌توان به پژوهش Vicente-Garcia و همکاران (۲۰۰۴) [۱۵] در مورد جداسازی و نشان ویژه‌سازی پلی ساکاریدهای خارجی یکی از سویه‌های فرمیدیوم اشاره کرد. در این پژوهش سویه *Phormidium 94a* که از مناطق خشک مکزیک جدا سازی شده است به‌عنوان سویه‌ای مناسب از نظر تولید پلی ساکاریدهای خارجی با خصوصیات ویژه معرفی شده است. بر این اساس یکی از مهمترین ویژگی‌های یک پلی ساکارید که آن را برای مصارف صنعتی قابل استفاده می‌کند، وزن ملکولی بالای آن است که نتایج پژوهش‌های انجام شده روی این نمونه حاکی از صحت این امر است؛ بنابراین با توجه به نتایج حاصل از این پژوهش و جمع‌بندی نتایج سایر پژوهش‌های مرتبط می‌توان نتیجه‌گیری کرد که سویه فرمیدیوم نمونه مناسبی برای تولید پلی ساکاریدهای خارج سلولی است که این ترکیبات به نوعی قابل رقابت با ترکیبات شیمیایی مشابه خود هستند. نکته قابل توجه در تولید پلی ساکاریدهای خارج سلولی، زمان تولید این ترکیبات است که با توجه به نتایج حاصله مشاهده می‌شود تولید آنها در اوایل دوره رشد بسیار کند است اما بتدریج و در اواخر دوره رشدی (از روز ۳۵ به بعد) روند افزایشی می‌یابد. این یافته‌ها نیز با نتایج پژوهش‌های Sing و Das مطابقت دارد چرا که آنها نیز نشان دادند که تولید پلی ساکاریدهای خارج سلولی در سویه *Nostoc calicicola RDU-2* در ۴۴ روز رشد و تحت شرایطی آزوتروفی به بیشینه میزان خود می‌رسد.

نتایج مربوط به بررسی فعالیت نیتروژنازی نمونه‌ها نشان می‌دهد که از میان نمونه‌های مورد بررسی، سویه *Synechococcus sp.* (ISC106) بیشترین میزان فعالیت نیتروژنازی را دارد این در حالی است که نمونه *Nostoc sp.* (ISC101) با اختلافی جزئی از فعالیت نیتروژنازی نسبتاً خوبی برخوردار است و سویه *Phormidium sp.* (ISC108) در میان این سه نمونه کمترین فعالیت نیتروژنازی را دارد. مقایسه این منحنی با منحنی رشد نمونه‌ها نشان می‌دهد که تغییرات فعالیت نیتروژنازی با رشد نمونه‌ها هماهنگ است به این ترتیب نمونه سینکوکوکوس که بیشترین میزان رشد و نرخ رشدی را در بین سه نمونه دارد از بالاترین میزان فعالیت نیتروژنازی نیز برخوردار است پس نتیجه‌گیری می‌شود که رشد و فعالیت نیتروژنازی کاملاً

- the presence of phaeophytin. *Freshwater Biology* 1972; 2:361-385.
- [9]. Dubois M, Gilles K.A, Hamilton J.K, Rebers P.A, Smith F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances, *Analytical Chemistry* 1956; 28(3): 350-356.
- [10]. Stewart W.D.P, Futzgerrald G.P. Burris R.H. Acetylene reduction by nitrogen-fixing blue-green algae. *Archive fur Mikrobiology* 1968; 62:336-348.
- [11]. Kiai, E. Investigating the effect of environmental factors on cyanobacteria candidates for biodiesel production, PhD thesis in Biology - Microbiology, Islamic Azad University, Science and Research Unit, Faculty of Basic Sciences, Department of Biology 2013.
- [12]. Nicolaus B, Panico A, Lama L, Romano I, Cristina Manca M, De Giulio A, Gambacorta A. Chemical composition and production of exopolysaccharides from representative members of heterocystous and non-heterocystous cyanobacteria. *Phytochemistry* 1999; 52: 639-647.
- [13]. Gloaguen V, Morvan H, Hoffman L. *Arch. Hydrobiol. Suppl.* 109 *Algol studies* 1995; 78,53.
- [14]. Singh S, Das Sh. Screening, production, optimization and characterization of cyanobacterial polysaccharide, *World J. Microbiol. Biotechnol* 2011; 27:1971-1980.
- [15]. Vicente-Garcia V, RIOS-Leal E, Calderon-Dominguez G, Canizares-Villanueva R.O, Olvera-Ramirez R. Detection, isolation, and characterization of exopolysaccharide produced by a strain of *Phormidium* 94a isolated from an arid zone of Mexico, *Biotechnology and Bioengineering* 2004; 85(3): 306-310.
- [16]. Staal M, Lintel-Hekert S, Harren F, Stal L. Nitrogenase activity in cyanobacteria measured by the acetylene reduction assay: a comparison between batch incubation and on-line monitoring, *Environmental Microbiology* 2001; 3(5): 343-351.
- شوند تا راهگشایی کامل جهت تحقیقات آتی گردند چرا که با انجام این تحقیقات و سایر تحقیقات تکمیلی راه برای جایگزینی این بیوپلی‌مرها با ترکیبات شیمیایی معادل آنها باز می‌شود.
- منابع**
- [1]. De Philippis R, Vincenzini M. Exocellular polysaccharides from cyanobacteria and their possible applications, *FEMS Microbiology Reviews* 1998; 22: 151-175.
- [2]. De Philippis R, Sili C, Paperi R, Vincenzini M. Exopolysaccharide-producing cyanobacteria and their possible exploitation: a review; *Journal of Applied Phycology* 2001; 13: 293-299.
- [3]. De Philippis R, Vincenzini M. Outermost polysaccharidic investments of cyanobacteria: nature, significance and possible applications, *Recent Research Developments in Microbiology* 2003; 7: 13-22.
- [4]. Kawaguchi T, Ala Sayegh H, Decho A. Development of an indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay to detect extracellular polymeric substances (EPS) secreted by the marine stromatolite-forming cyanobacteria, *Schizothrix* sp. *Journal of Immunoassay & Immunochemistry* 2003; 24: 29-39.
- [5]. Pereira S, Zille A, Micheletti E, Moradas-Ferreira P, DePhilippis R, Tamagnini P. Complexity of cyanobacterial exopolysaccharides: composition, structures, inducing factors and putative genes involved in their biosynthesis and assembly. *FEMS Microbiology Reviews* 2009; 33: 917-941.
- [6]. Castenholz R.W. Editors. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Springer, New York 2001.
- [7]. Tomitani A, Knoll A.H. Cavanaugh C.M. Ohno T. The evolutionary diversification of cyanobacteria: Molecular- Phylogenetic and paleontological perspectives. *PNAS* 2006; 103:5442-5447.
- [8]. Marker A.F.H. The use of acetone and methanol in the estimation of chlorophyll in

Comparative study and physiological indexation of extracellular polysaccharids in cell culture and cyanobacterial proliferation

Karami Borz- Abad R.^{1*}, Baghbani- Arani A.²

¹ Assistant Professor, Department of Agriculture Science, Payame Noor University, Tehran, Iran.

² Assistant Professor, Department of Agriculture Science, Payame Noor University, Tehran, Iran.

* (Corresponding author): R.karami@pnu.ac.ir

DOI:10.30495/JDB.2022.1963634.1319

<https://dorl.net/dor/20.1001.1.2008692.1401.15.1.6.0>

Received: June 2022

Accepted: September 2022

Abstract

Extracellular Polysaccharides or Extracellular Polymeric Substances, EPS are polyester compounds that are produced in some cyanobacterial genera. In this study, physiological characteristics and extracellular polysaccharides have been investigated and compared in three different cyanobacteria; a heterocystic bundled, a nonheterocystic bundled and single cell strain. The results of growth rates and growth curves of these three samples indicate that cyanobacterium unicellular *Synechococcus* sp. Compared to heterocystic bundled; *Nostoc* sp. and nonheterocystic bundled *Phormidium* sp. is growing more. Meanwhile, the polysaccharide measurements of these three samples show that the production of the polysaccharides of all three samples at the end of the growth phase reaches the maximum and that the strain of *Phormidium* sp. has the ability to produce the highest amount of polysaccharides, especially extracellular, whereas the nitrogenase activity of these strains was also consistent with their growth, so that the strain of *Synechococcus* sp. has the most nitrogenase activity and *Nostoc* sp. has a second rank in this regard, with a minor difference. In this way it is concluded that the strain of *Phormidium* sp. is a prime example that has the ability to produce polysaccharides, especially extracellular polymers, to a large extent scale, and can compete in different sectors with synthetic polymers such as xanthan.

Keywords: Extracellular polysaccharides, *Synechococcus* sp., *Nostoc* sp., *Phormidium* sp.