نشریه فیزیولوژی محیطی گیاهی، سال دهم، شماره ۳۸، تابستان ۱۳۹۴ / صفحات: ۲۳-۱۱

بررسی رنگیزه‌های فیکوبیلین در سویه‌های سیانوباکتری هتروسیست دار جدا شده از شالیزارهای شرق استان مازندران

علی شمس*[۱]، قربانعلی نعمت‌زاده[۲]، ندا سلطانی[۳]، شادمان شکروی[٤]

[۱] دانشجوی دکتری، پژوهشکده ژنتیک و زیست فن‌آوری طبرستان، طبرستان

[۲] استاد، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی، ساری

[۳] دانشیار، گروه میکروبیولوژی نفت، پژوهشکده علوم کاربردی جهاد دانشگاهی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران

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

تاریخ دریافت: ۹٤/۲/۲۰ تاریخ پذیرش: ۹٤/۵/۱۵

چکیده

سیانوباکتری‌ها از جمله گروه پروکاریوت‌های فتوسنتز کننده می‌باشند که نسبت به دامنه وسیعی از شرایط محیطی سازگار شده‌اند. علاوه بر آن سیانوباکتری‌ها به‌عنوان منابع غنی فیکوپروتئین با کاربرد دارویی و صنعتی، نیز مورد توجه قرار گرفته‌اند. گونه‌های مختلف سیانوباکتری، ترکیبات متفاوتی از کروموفور و فیکوبیلی پروتئین‌ها را به منظور بهبود توانایی برداشت نور در فرایند فتوسنتزخود بکار می‌برند. هدف از این تحقیق بررسی رنگیزه‌های فیکوبیلین در سویه‌های هتروسیست دار جدا شده از شالیزارهای شرق استان مازندران بود. بعد از جمع‌آوری نمونه خاک از شالیزارهای شرق استان مازندران و کشت سویه در محیط کشت $BG11_0$، بمنظور انجام پروسه خالص‌سازی، کشت مجدد در محیط کشت جامد و مایع انجام گرفت. سپس سویه‌ها از لحاظ ریخت‌شناسی بررسی شدند. نتایج نشان داد که به‌دلیل سازگاری سویه‌های مورد نظر با شرایط نوری قابل دسترس این منطقه مشخص شد گونه‌های مختلف سیانوباکتری‌ها از فیکوبیلی پروتئین‌های متنوعی در جهت بهینه‌سازی توانایی دریافت نور جهت فتوسنتز استفاده می‌نمایند. به گونه‌ای که میزان فیکوسیانین، آلوفیکوسیانین و فیکو اریترین در هر سویه متفاوت از سویه دیگر بوده و بالاترین میزان این ترکیبات پروتئینی به‌ترتیب در سویه‌های (*Phormidium minnesotense*) *Lyngbya diguetii* مشاهده گردید.

واژه‌های کلیدی: آلوفیکوسیانین، سیانوباکتری، شالیزاز، فیکواریترین، فیکوبیلین، فیکوسیانین

مقدمه

فیکوبیلی پروتئین‌ها به‌عنوان گروه مهمی از رنگیزه‌های کمکی نقش مهمی در دریافت نور در سیانوباکتری‌ها و کریپتو موناده‌ها و پروکلروفیت‌ها ایفا می‌نماید. 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 جهت دریافت فوتون‌های نوری شامل فیکوبیلی پروتئین‌های رنگیزه‌ای و بخش پروتئینی غیر رنگیزه‌ای می‌باشند (Lawrenz et al., 2011). چهار ساختار تتراپیرول کلروموفور خطی (بیلین) شامل فیکوسیانوبیلین، فیکواریتروبیلین، فیکووایولوبیلین و فیکواوروبیلین می تواند به عنوان فیکوبیلی پروتئین‌های سیانوباکتری‌ها

*نویسنده مسئول: ali.shams11@gmail.com

شناخته شوند (Zimba, 2012). سیانوباکتری‌ها یا جلبک‌های سبز آبی گروه وسیع و متنوعی از باکتری‌های پروکاریوت فتوسنتز کننده با قابلیت استفاده از نور خورشید، آب و CO_2 می‌باشند (Stanier and Cohen, 1977). این گروه شامل گونه ای از باکتری‌ها با توانایی تثبیت ازت و سازگاری بسیار بالا نسبت به شرایط متنوع محیطی بوده و به‌صورت کلنی‌هایی در طیف وسیعی در محیط‌های آبی و خاکی ساکن شده‌اند (Tandeau et al., 1993; Pandey et al., 1995; Oren, 2000). سیستم‌های رنگیزه‌ای در سیانوباکتری‌ها مقدار کمی سیگنال فلورسنسی در کلروفیل تولید می‌نماید اما عملکرد فلوروسنسی فیکوبیلین‌ها بسیار بالا می‌باشد و می‌تواند به‌عنوان یک شاخص مهم در ارزیابی میزان فراوانی سیانوباکتری‌ها در محیط مورد استفاده قرار گیرد (Yentsch and Yentsch, 1979). امروزه دسترسی به غلظت‌های دقیق رنگیزه‌های فیکوبیلین در تعیین میزان تراکم جمعیتی میکرو ارگانیسم‌ها بسیار حائز اهمیت می‌باشد. به‌طوری‌که نقش مهمی در بکارگیری تکنیک‌های سنجش از راه دور به‌منظور ارزیابی بلوم‌های جلبکی ایفا می‌نماید (Wozniak et al., 2011). گزارش‌های متعددی نشان می‌دهد که فیکوبیلی پروتئین‌ها کمپلکسی از بخش‌های رنگدانه پروتئین می‌باشند که به سه دسته رنگیزه‌های آبی یا فیکوسیانین، رنگیزه‌های سبز آبی یا آلوفیکوسیانین و رنگیزه‌های قرمز یا فیکواریترین به‌ترتیب دارای قابلیت حداکثر جذب در طول موج‌های ٦٢٠، ٦٥٠ و ٥٦٥ نانومتر می‌باشند (Grossman et al., 1994). گزارش‌های متعددی نشان می‌دهد که فیکوبیلی پروتئین‌ها تحت تاثیر فاکتورهای محیطی مانند نور، آب و pH قابل تغییر هستند (Grossman et al., 1994, Takano et al., 1995; Chaneva et al., 2007; Simeunovic et al., 2013). سلطانی و همکاران ١٣٨٤، دریافتند که تنش‌های محیطی از جمله شوری می تواند برروی کارایی فتوسنتز و توان فیکوبیلی پروتئین‌ها تاثیر گذار باشد.

امروزه استفاده از فیکو بیلی پروتئین‌ها به‌عنوان ترکیبات ضدسرطانی، ضدسمی و رنگ‌های خوراکی در صنعت غذایی و دارویی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است (Chaneva et al., 2007). همچنین مصارف دارویی و آرایشی فیکوبیلی پروتئین‌ها (Kronick, 1986, Araoz et al., 1998) و فعالیت آنتی‌اکسیدانی، محافظ عصبی، ضدسرطانی و ضدعفونتی فیکوبیلین‌ها توسط محققین بسیاری گزارش شده است (Rimbau et al., 1999; Liu et al., 2000; Romay et al., 2003). گزارش‌ها نشان می‌دهد که پتانسیل گونه‌های متنوع سیانوباکتری‌ها برای تولید تجاری فیکوبیلی پروتئین‌ها متفاوت می‌باشد (Takano et al., 1995; Chen et al., 1996; Chaneva et al., 2007).

امروزه تکنیک‌های متعددی جهت شناسایی ترکیبات فعال در سلول بمنظور ارزیابی و شناسایی میکروارگانیسم‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرند (Sobiechowska et al., 2010; Ston-Egiert et al., 2010; Roy et al., 2011). چنین روش‌هایی برای ارزیابی و تعیین بیوماس فیتوپلانگتون‌ها 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). به‌طور معمول فیکوبیلین‌ها بالاترین میزان جذب را در طول موج ٤٥٠ تا ٦٦٠ نانومتر دارا می باشند. تنوع طیف جذبی فیکوبیلی پروتئین‌ها به دلیل تغییر جایگاه ویژه کروموفورها نسبت به سایر پروتئین‌ها است (Bennet and Bogorad, 1973; Zhao et al., 2011). امروزه مطالعات گسترده ای بر روی فلورسانس رنگیزه‌های

موجود در سیانوباکتری‌ها آغاز شده است (Babichenko et al., 2000; Seppala, 2009). اما روش‌های استانداردی 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 همچنین تحت تاثیر عواملی همچون دما، زمان استخراج، نوع بافر و pH قرار گیرد (Lawrenz et al., 2011). تحقیقات اخیر به‌منظور تلاش برای بهینه‌سازی روش‌های استخراج و خالص سازی و ارزیابی رنگیزه‌ها و دستیابی به حداکثر عملکرد در حال گسترش می‌باشد (Zimba, 2012; Horvath et al., 2013).

یکی از روش‌های کارآمد جهت استخراج رنگیزه، تلفیق روش‌های مکانیکی و شیمیایی به‌منظور خالص سازی پروتئین‌های رنگیزه‌ای است که شامل استفاده از بافرهای متعدد (Bennet and Bogorad, 1973)، هضم آنزیمی (Steward and Farmer, 1984) استفاده از آزولکتین چبس، انجماد و خورد کردن مکانیکی و کاپیلاری الکتروفورز می‌باشد (Horvath et al., 2013, Lawrenz et al., 2011). با توجه به مطالب فوق هدف از این تحقیق بررسی رنگیزه‌های فیکوبیلین در سویه‌های سیانوباکتری هتروسیست دار جدا شده از شالیزارهای شرق استان مازندران بود.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری خاک با استفاده از روش‌های متداول از مناطق مختلف شالیزارهای شرق استان مازندران انجام گردید. سپس با استفاده از محیط کشت اختصاصی $BG11_0$ جداسازی سیانوباکتری‌های هتروسیست دار از سطح خاک صورت گرفته و پس از کشت‌های متوالی در محیط جامد، ۱۸ 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 هوا دهی مناسب فراهم گردید. هوا دهی با شدت جریان ۲۰۰ میلی‌لیتر در دقیقه در ارلن‌های ۵۰۰ میلی‌لیتری و در شرایط نوری ۸۰ میکرومول فوتون در مترمربع بر ثانیه با ٤ لامپ فلورسانس و ایجاد دمای بهینه رشد در دامنه ۲۵ تا ۲۸ درجه سانتی‌گراد فراهم گردید. به‌منظور 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 به‌منظور ایجاد شوک اسمزی و با استفاده از استات سدیم، میزان فیکوبیلی پروتئین بعد از قرائت جذب در طول موج‌های ٦٢٠، ٦٥٢ و ٥٦٢ 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.

فیکوسیانین (PC)= (A_{620} –(0.474× A_{652}))/5.34

آلوفیکوسیانین(APC)= (A_{652} – (0.208 × A_{620})) /5.09

فیکواریترین (PE)= ((A_{562} – (2.41× PC))- (0.849 × (APC))/9.62

فیکوبیلین کل (TPB)= (PC+APC+PE)

جهت انجام شناسایی مورفولوژی سویه‌ها، از کلیدهای معتبر شناسایی استفاده گردید.

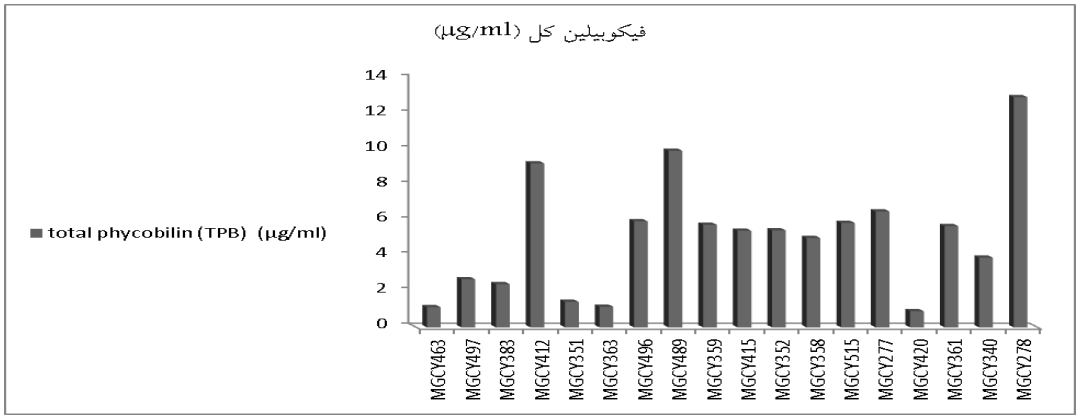
جدول ۱: نام سویه‌های مورد بررسی

نام سویه	کد سویه
Hapalosiphon flexuosus	MGCY463
Nostoc ellipsosporum	MGCY497
Stigonema ocellatum	MGCY383
Microchaete geopretiana	MGCY412
Stigonema turfaceum	MGCY351
Chrococcus sp.	MGCY363
Chrococcus minor	MGCY496
Phormidium tenue	MGCY489
Phormidium tenue	MGCY359
Nostoc muscorum	MGCY415
Microchaete geoppertiana	MGCY352
Anabaena variabilis	MGCY358
Unknown	MGCY515
Lyngbya diguetii	MGCY277
Phormidium tenue	MGCY420
Phormidium minnesotense	MGCY361
Anabaena cylindrical	MGCY340
Unknown	MGCY278

نتایج

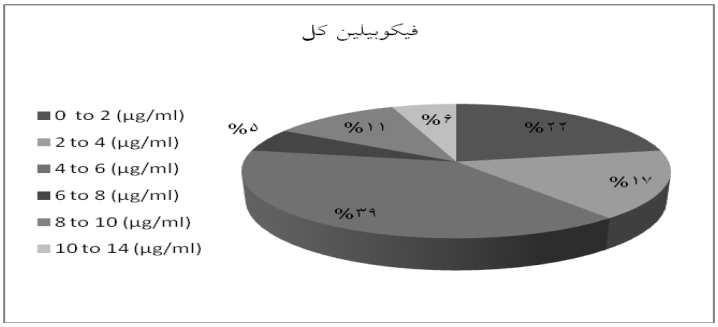
بررسی میزان فیکوبیلین کل در سویه‌های مورد بررسی

بررسی: بررسی‌های انجام شده بر روی ۱۸ سویه جدا شده از مناطق شالیزاری شرق استان مازندران موید آن است که میزان فیکوبیلی پروتئین‌ها در سیانوباکتری‌ها، متناسب با جنس سویه، شرایط محیطی و اقلیمی در هر سویه متغییر است (شکل ۱). بالاترین میزان فیکوبیلین کل در سویه MGCY278 (unknown) از منطقه بهشهر به میزان ۱۲/۹٤ میکروگرم بر میلی‌لیتر بوده و متعاقب آن سویه‌های *(Phormidium tenue)* MGCY489، *(Microchaete geopretiana)* به‌ترتیب از مناطق نکا، بهشهر با میزان ۹/۹۳٤، ۹/۲۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر در مکان‌های بعدی قرار گرفتند. کمترین میزان فیکو بیلی پروتئین کل در سویه MGCY420 (*Phormidium tenue*) به میزان ۰/۹۰۹ میکروگرم بر میلی‌لیتر از منطقه نکا بود. دو سویه MGCY363 *(Chrococcus minor)* و MGCY463 *(Hapalosiphon flexuosus)* از مناطق میانکاله و نکا نیز به‌ترتیب با ۱/۱٦۰ و ۱/۱۳٤ میکروگرم بر میلی‌لیتر از میزان فیکوبیلی پروتئین کمتری نسبت به سایر سویه‌ها برخوردار بودند (شکل ۱).



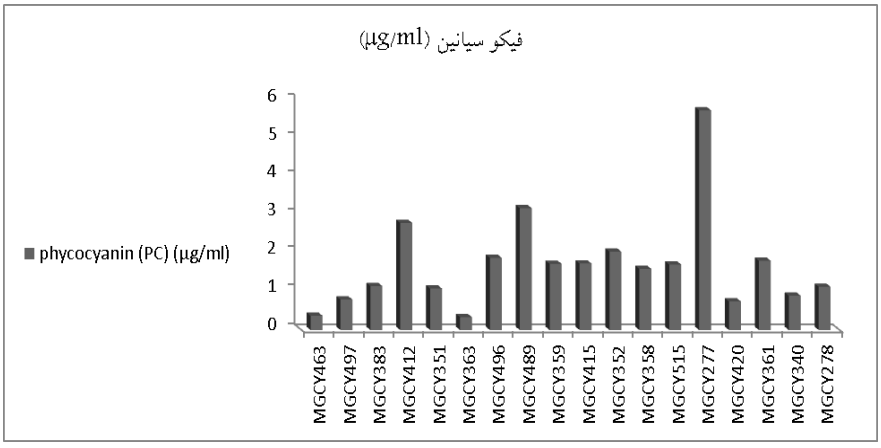
شکل ۱: میزان فیکوبیلین کل در ۱۸ سویه مورد بررسی از شالیزارهای شرق استان مازندران (برحسب میکروگرم بر میلی‌لیتر)

علاوه بر این نتایج این تحقیق در بررسی میزان فیکوبیلی پروتئین‌های کل نشان داد که ۲۲/۲۲ درصد از سویه‌ها دارای میزان فیکوبیلی پروتئین کل به میزان ۰ تا ۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر، ۱۶/۶۶ درصد دارای فیکوبیلی پروتئین کل به میزان ۲ تا ٤ میکروگرم بر میلی‌لیتر، ۳۸/۸۸ درصد دارای میزان فیکوبیلی پروتئین کل در دامنه ٤ تا ٦ میکروگرم بر میلی‌لیتر، ۵/۵۵ درصد دارای میزان فیکوبیلی پروتئین کل در دامنه ٦ تا ۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر و ۱۱/۱۱ درصد از سویه‌ها نیز دارای میزان فیکوبیلی پروتئین کل در دامنه ۸ تا ۱۰ میکروگرم و تنها ۵/۵۵ در صد در دامنه ۱۰ تا ۱٤ میکروگرم در میلی‌لیتر قرار دارند (شکل ۲).



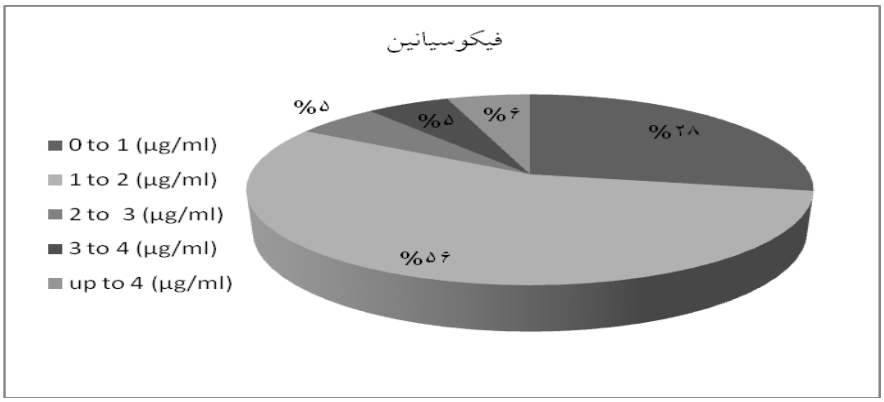
شکل ۲: تنوع میزان فیکوبیلین کل در ۱۸ سویه مورد بررسی از شالیزارهای شرق استان مازندران (برحسب درصد)

بررسی میزان فیکوسیانین در سویه‌های سیانوباکتری مورد بررسی: نتایج آزمایش نشان داد که بالاترین میزان فیکوسیانین در سویه‌های MGCY277 *(Lyngbya diguetii)* به مقدار ۵/۷۳۸ میکروگرم در میلی‌لیتر از منطقه بهشهر بوده و سویه‌های MGCY489 *(Phormidium tenue)*، MGCY412 *(Microchaete geopretiana)* و MGCY352 *(Microchaete geopretiana)* به‌ترتیب از مناطق نکا، بهشهر و میانرود با میزان ۳/۱۸٤، ۲/۷۹۸ و ۲/۰٤٦ میکروگرم بر میلی‌لیتر در بالاترین جایگاه نسبت به سایر سویه‌ها بر خوردار بودند. کمترین میزان فیکوسیانین نیز مربوط به سویه *(Chrococcus* sp.) MGCY363 با میزان ۰/۳۳۷ میکروگرم بر میلی‌لیتر از منطقه میانکاله بود (شکل ۳). همچنین سه سویه MGCY463 *(Hapalosiphon flexuosus)*، MGCY420 *(Phormidium tenue)* و MGCY497 *(Nostoc ellipsosporum)* از مناطق نکا و میانکاله با میزان ۰/۳۷۳، ۰/۷٤۵ و ۰/۷۹۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر از میزان فیکو سیانین پایین‌تری نسبت به سایر سویه‌ها برخوردار بودند.



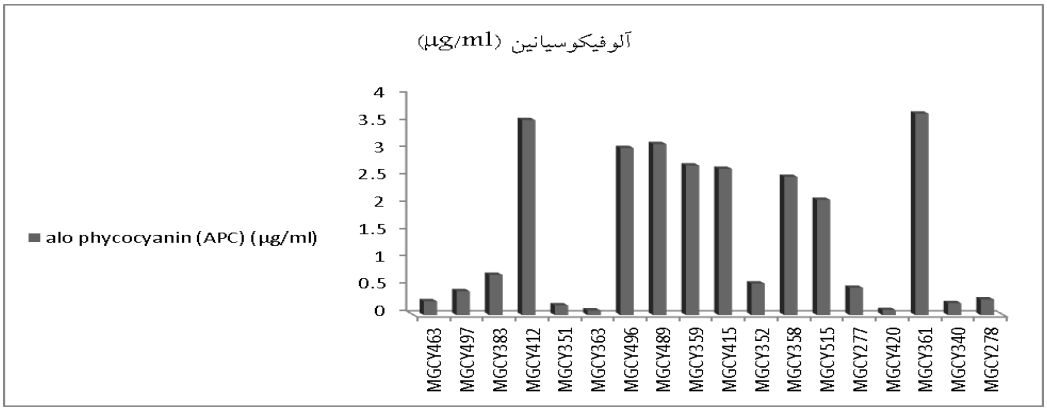
شکل ۳: میزان فیکوسیانین در ۱۸ سویه مورد بررسی از شالیزارهای شرق استان مازندران (بر حسب میکروگرم بر میلی‌لیتر)

بررسی‌های صورت گرفته بر روی میزان فیکوسیانین‌های موجود در ۱۸ سویه جدا شده نشان داد که با توجه به شکل ٤ در ۲۷/۷۷ درصد از سویه‌ها میزان فیکوسیانین بین ۰ تا ۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر می‌باشد. در ۵۵/۵۵ در صد از سویه‌ها میزان فیکو سیانین بین ۱ تا ۲ میکروگرم در میلی‌لیتر، در ۵/۵۵ درصد از سویه‌ها میزان فیکوسیانین بین ۲ تا ۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر و در ۵/۵۵ درصد سویه‌ها میزان فیکوسیانین بین ۳ تا ٤ میکروگرم و در ۵/۵۵ درصد سویه‌ها میزان فیکوسیانین بالاتر از ٤ میکروگرم بر میلی‌لیتر را دارا بودند.



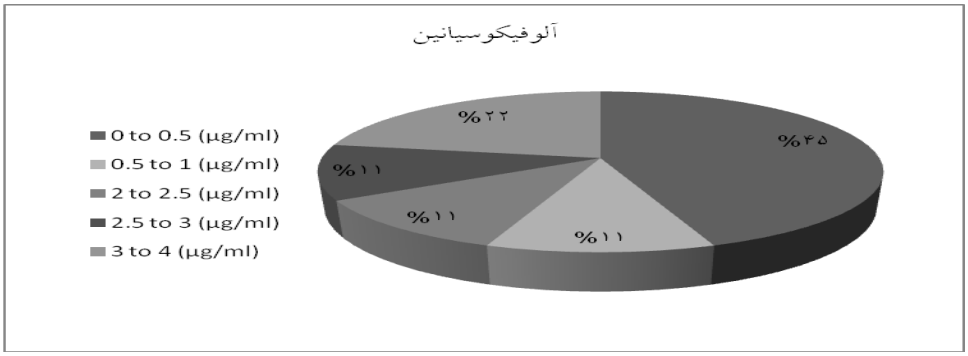
شکل ٤: تنوع میزان فیکوسیانین در ۱۸ سویه مورد بررسی از شالیزارهای شرق استان مازندران (بر حسب درصد)

ارزیابی میزان آلوفیکوسیانین در سیانوباکتری‌های مورد بررسی: بررسی میزان آلوفیکوسیانین در ۱۸ سویه مورد نظر در شکل ۵ قابل مشاهده است. با توجه به نتایج بدست آمده، بالاترین میزان آلوفیکوسیانین در سویه MGCY361 *(Phormidium minnesotense)* به میزان ۳/٦۷ میکروگرم در میلی‌لیتر از منطقه گلوگاه مشاهده شد. سه سویه MGCY412 *(Microchaete geopretiana)*، MGCY489 *(Phormidium tenue)* و MGCY496 *(Chrococcus minor)* به ترتیب از مناطق بهشهر، نکا و میانکاله با میزان ۳/۵٦، ۳/۱۲۲ و ۳/۰۵۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر در رتبه‌های بعدی قرار گرفتند. کمترین میزان آلوفیکوسیانین نیز در سویه MGCY363 (*Chrococcus sp.*) به میزان ۰/۰۸۳۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر از منطقه میانکاله بوده و سویه‌های MGCY420 *(Phormidium tenue)*، MGCY351 *(Stigonema turfaceum)* و MGCY340 *(Anabaena cylindrical)* به‌ترتیب از مناطق نکا، میانرود و میانرود با میزان ۰/۰۹۳، ۰/۱۷٦ و ۰/۲۱۷ میکروگرم بر میلی‌لیتر از میزان آلوفیکوسیانین کمتری نسبت به سایر سویه‌ها برخوردار بودند.



شکل ۵: میزان آلوفیکوسیانین در ۱۸ سویه مورد بررسی از شالیزارهای شرق استان مازندران (بر حسب میکروگرم بر میلی‌لیتر)

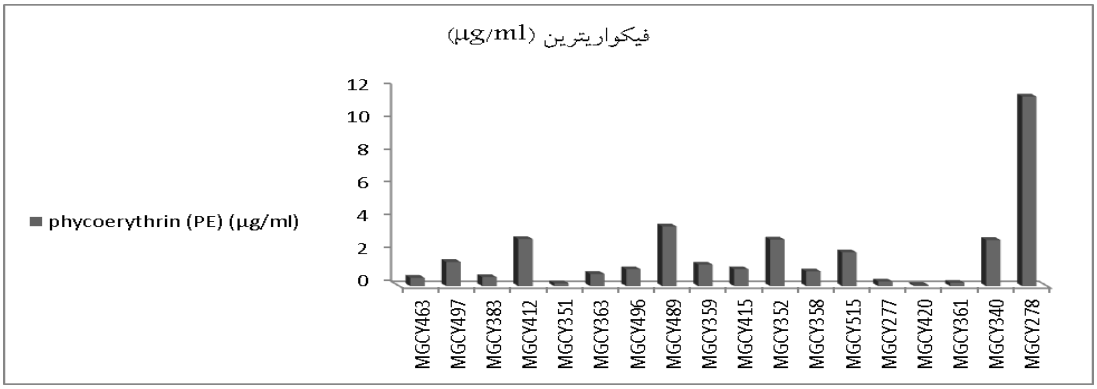
بررسی میزان آلوفیکوسیانین در ۱۸ سویه جدا شده نشان داد که با توجه به شکل ٦ در ٤٤/٤٤ درصد از سویه‌ها میزان آلوفیکوسیانین بین ۰ تا ۰/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود. در ۱۱/۱۱ درصد سویه‌ها میزان آلوفیکوسیانین در دامنه ۰/۵ تا ۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر، در ۱۱/۱۱ درصد از سویه‌ها میزان آلوفیکوسیانین در دامنه ۲ تا ۲/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر، در ۱۱/۱۱ درصد از سویه‌ها میزان آلوفیکوسیانین در دامنه۲/۵ تا ۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر مشاهده شد و تنها در ۲۲/۲۲ درصد از سویه‌ها میزان آلوفیکوسیانین در دامنه ۳ تا ٤ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود.



شکل ٦: تنوع میزان آلوفیکوسیانین در ۱۸ سویه مورد بررسی از شالیزارهای شرق استان مازندران (برحسب درصد)

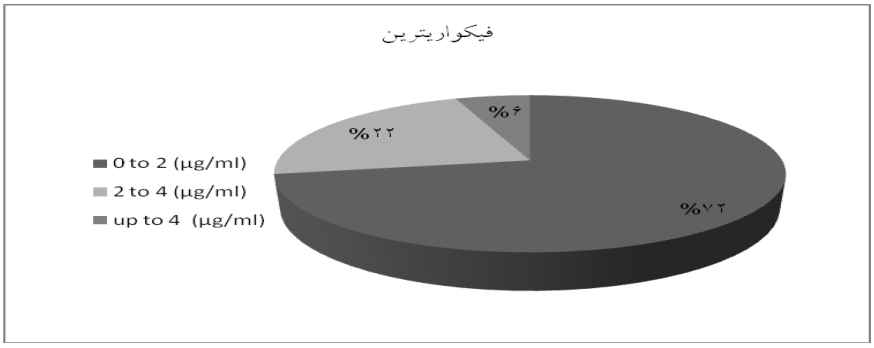
ارزیابی فیکواریترین موجود در سویه‌های سیانوباکتری مورد بررسی: بررسی میزان فیکواریترین در سویه‌های جدا شده (شکل ۷) نشان داد که سویه MGCY278 (unknown)از بهشهر به مقدار ۱۱/۵۳۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر بالاترین میزان فیکواریترین را نسبت به سایر سویه‌ها دارد و سه سویه *(Phormidium tenue)* MGCY489، *(Microchaete geopretiana)* MGCY352 و MGCY340 *(Anabaena cylindrica)* به‌ترتیب از مناطق نکا، میانرود و میاندورود با میزان ۳/٦۲۷، ۲/۸۳۲ و ۲/۸۰۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر از فیکواریترین بالاتری نسبت به سایر سویه‌ها برخوردار بودند. کمترین میزان فیکواریترین نیز در سویه MGCY420 *(Phormidium tenue)* از منطقه نکا به میزان ۰/۰۷۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود و دو سویه MGCY351 *(Stigonema turfaceum)* و MGCY361

minnesotense) (Phormidium از منـــاطق میـــانرود و گلوگاه با میزان ۰/۱۷۵ و ۰/۲۰٤ میکروگرم بر میلی‌لیتـر از فیکواریترین کمتری نسبت بـه سـایر سـویه‌ها برخـوردار بودند.



شکل ۷: میزان فیکواریترین در ۱۸ سویه مورد بررسی از شالیزارهای شرق استان مازندران (بر حسب میکروگرم بر میلی‌لیتر)

بررسی‌های انجام شده بر میزان فیکواریترین بـا توجـه بـه شـکل ۸ حـاکی از آن اسـت کـه ۷۲/۲۲ درصـد سویه‌های جدا شده دارای میزان فیکواریترین در دامنه ۰ تا ۲ میکرو گرم بر میلی‌لیتر و ۲۲/۲۲ درصد از آنهـا دارای میزان فیکواریترین در دامنـه ۲ تـا ٤ میکروگـرم بر میلی‌لیتر بود. تنهـا در ۵/۵۵ درصـد سـویه‌ها میـزان فیکواریترین در دامنه بالاتر از ٤ میکروگرم میکروگـرم بر میلی‌لیتر مشاهده شد.



شکل ۸. میزان فیکواریترین در ۱۸ سویه مورد بررسی از شالیزارهای شرق استان مازندران (بر حسب درصد)

بحث

به‌طورکلی نوع نگـرش بـه فیکـوبیلی پروتیین‌هـا، متفاوت است و هرگونه نگرش مکتب فکـری خـاص خـود را طلـب مـی‌کنـد. بررسـی‌های بیوتکنولـوژی، تغییرات فیکوبیلی پروتیین‌ها را از نظر میـزان تولیـد و تنوع تولید به عنوان یک محصول بررسی می‌کنـد. امـا نگرش‌های فیزیولوژیک و اکوفیزیولوژیک عمده توجه خود را بـه سیسـتم فتوسـنتزی و آنتن‌هـای گیرنـده و کمپلکس‌های جمع آوری کننده نور معطوف می دارد. در دو دهه اخیر، انتقال انرژی میان فتوسیستم‌های یک و دو و نقش فیکوبیلی پروتیین‌ها در حوزه فیزیولوژی مدرن و فیزیولوژی مولکولی مورد توجه جـدی قـرار 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 ارتبـاط آن‌هـا بـا کنتـرل انـرژی از طریـق انتقـال میـان سیسـتم‌های نـوری و

بخصوص فتوسیستم دو که حتی وارد حوزه‌های ریزتر مانند انتقال میان گیرنده‌های الکترون از فئوفیتین 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 می بایست به مراتب بیش از این توسعه یابد. در خصوص نمونه‌های بومی ایران به‌دلیل عدم اطلاعات پایه در استان مازندران، ورود به بحث‌های جزیی فعلا منطقی نیست کما اینکه در استان گلستان که از حوزه اطلاعات پایه غنی تری برخوردار است، تجاربی پراکنده در این زمینه وجود دارد. بهرحال به عنوان نتیجه گیری کلی اینکه اگر در این مقاله نگاه کل نگر و از بالا به وجود یا عدم فیکوبیلی پروتیین‌های کل در سویه‌هایی که نقش به نسبت غالب و یا با فراوانی بالا برخوردار هستند، به همین دلیل بوده است.

به‌طورکلی در شرق مازندران، فیکوبیلی پروتیین کل در سیانوباکتری‌های مطالعه شده در شرایط آزمایشگاهی وجود دارد ولی مقایسه با استان گلستان (جایی که اطلاعات پایه به صورت پراکنده) وجود دارد، محتوای آن کمتر می باشد. سویه‌های MGCY489 *(Phormidium tenue)*، MGCY412 *(Microchaete geopretiana)* و MGCY352 *(Microchaete geopretiana)* که در شرق مازندران از بالاترین میزان برخوردار بوده‌اند، از نظر مقایسه با همین نمونه‌ها در استان گلستان (گرگان، علی‌آباد و فاضل آباد)، از تراکم به مراتب کمتری برخوردار هستند. با توجه به اینکه در بررسی چکی گر و همکاران (۱۳۹۱)، میزان تولید فیکوبیلی پروتیین از *Microchaete geopretian* بیش از سه برابر این مقدار می باشد و باتوجه به اینکه مطابق شکروی و همکاران (۱۳۸۱)، برخی نمونه‌های استیگونماتال در استان گلستان از تراکم به مراتب بالاتر برخوردار بوده‌اند، مسئله محیط و تاثیر آن جدی است. در بررسی‌های مربوط به مناطق نفتی هردو گونه که از جنوب جمع آوری شده و در شمال (استان گلستان) نشان ویژه سازی گردیده اند، حتی در شرایط عدم هوادهی (محدودیت افراطی دی‌اکسید کربن) و محدودیت افراطی نور (دو میکرومول کوانتا بر متر مربع در ثانیه)، به مراتب از شرق مازنداران بیشتر بوده است. البته در این میان باید توجه داشت که چون نمونه‌های استان‌های جنوبی و نیز شرق مازندران از نظر نوری و دی‌اکسید کربن نشان ویژه سازی نگردیده‌اند، احتمال ضعیفی وجود دارد که شرایط محدودیت به‌دلیل سازگاری نمونه به‌صورت نسل اندر نسل به شرایط مذکور، عامل اصلی یا یکی از عوامل اصلی باشد. با توجه به اینکه وجود حالت‌های پوسته‌ای یا پشته‌ای در نمونه‌ها در جنوب کشور، و آلوده بودن با قشر نفت، شرایط را به سمت خوگیری یا سازگاری با محدودیت‌ها سوق می‌دهد، احتمال دارد که مسئله تکامل در میان باشد. شاید بر هم زدن شرایط عادی نمونه (از محیط طبیعی) و ورود در شرایط کشت آزمایشگاهی که برای عمده سیانوباکتری‌ها مناسب به نظر می رسد در مورد این نمونه‌ها بر عکس پاسخ داده است. این مسئله ای است که بررسی‌های آینده می بایست روشن کند. در حال حاضر می بایست به گزارش‌های کمی و احیانا مقایسه ای به صورت جوامع کوچک، در جغرافیای محدود بسنده کرد.

وجود ساختارهای تشکیل دهنده فیکوبیلی زومی، بخصوص فیکواریترین و آلوفیکوسیانین، در همه

سویه‌ها قابل توجه است. در بررسی‌های سلطانی و همکاران (۱۳۸٤)، آلو فیکوسیانین در گونه فیشرلای مورد بررسی تحت تاثیر اسیدیته و قلیاییت به همراه شدت نور، بوجود نیامدند. ساختمان پایه در فیکوبیلی زومی تحت شرایط آزمایشگاهی جدید، نشان از ثبات این بخش دارد. هرچند البته در حال حاضر به قطعیت نمی توان گفت که این ثبات تحت تاثیر تنش‌های محیطی همچنان حفظ می شود. اما در کنار آلوفیکوسیانین وجود فیکواریترین با میزان به نسبت بالا در بیست درصد از سیانوباکتری‌های جدا شده و تقریبا نود و پنج درصد از کل سیانوباکتری‌های جدا شده تایید دیگری بر ثبات سیستم فیکوبیلی زومی در نمونه‌های جمع‌آوری شده است.

در مورد فیکوسیانین، به قطعیت می توان گفت که مقادیر کلی فیکوسیانین در نمونه‌های جمع آوری شده به نسبت دیگر بررسی‌های انجام شده در گلستان (شکروی و همکاران، ۱۳۸۱ ;Safaie et al., 2015)، 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 بخصوص شوری مقاوم نشان می‌دهند، این کاهش فیکوسیانین جالب توجه است. با توجه به اینکه این سیانوباکتری در عمده پشته‌های میکروبی، نقش لایه فوقانی را دارد، کاهش مقدار آن (به صورت مقایسه‌ای)، 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.

به‌طورکلی آنچه از بررسی‌های انجام شده می توان نتیجه گرفت آن است که ثبات سیستم فیکوبیلی زومی در نمونه‌های سیانوباکتری مناطق شرقی استان مازندران دیده می شود اما هم اندازه و هم ساختار این سیستم، تحت شرایط محیطی به مراتب از مناطق همجوار کمتر می‌باشد. نتیجه دقیق در خصوص تاثیر عوامل محیطی یا به عبارت بهتر شرایط آزمایشگاهی، می‌بایست بعد از بررسی‌های ابزاری دقیق‌تر و نیز بهینه‌سازی شرایط کشت اعلام گردد. بررسی فلورستیک نشان می دهد 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 بالا کار می‌کند. شرایط آزمایشگاهی- شاید – عامل تغییر کمی و کیفی سیستم‌های فتوسنتزی باشد.

از نظر کاربردی در حال حاضر با توجه به عدم اطلاعات تنها می توان گفت که با توجه به بررسی میزان فیکوبیلی پروتئین‌های موجود در سویه‌های جدا شده این گونه استنباط می‌گردد که هر سویه پتانسیل رنگیزه‌ها را از نظر نوع و میزان آن 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 کرموفورها 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., 2012). همین امر زمینه تنوع گسترده ای را از حیث ظرفیت تولید رنگیزه ایجاد می‌نماید. به‌عنوان مثال در بررسی‌های انجام شده توسط Ojit و همکاران (۲۰۱۲) بالاترین میزان فیکواریترین، فیکوسیانین و آلوفیکوسیانین در سویه *Anabaena fuellebornii*، *Phormidium bohneri* و *Nostoc spongiaeforme* مشاهده گردید. بر طبق

نظر Wozniak (۲۰۱۱)، امروزه استفاده از تکنیک‌های سنجش از راه دور و تعیین ارزیابی مکان بلوم‌های جلبکی، امکان دسترسی به غلظت‌های دقیق رنگیزه‌های فیکوبیلین به‌منظور میزان تراکم جمعیتی میکرواورگانیسم‌ها از اهمیت زیادی بر خوردار است. اهمیت فیکوبیلی پروتیین به عنوان یک ترکیب ضدسرطانی به‌صورت رنگ خوراکی در صنایع غذایی و دارویی توسط بسیاری از محققین مورد توجه قرار گرفته است (Chaneva et al., 2007). از آنجایی که پتانسیل گونه‌های متنوع سیانوباکتری برای تولید تجاری فیکوبیلی پروتئین‌ها بسیار متفاوت می‌باشد نیاز به تحقیقات گسترده‌تری جهت ارزیابی و شناسایی این اورگانیسم‌های ارزشمند احساس می‌گردد.

نتیجه‌گیری نهایی

در شرق مازندران، سیستم فیکوبیلی زومی در نمونه‌های بررسی شده که عمدتا نمونه‌های غالب می باشند از ثبات برخوردار است. فیکوبیلی پروتیین کل در سیانوباکتری‌های مطالعه شده در شرایط آزمایشگاهی وجود دارد ولی مقایسه با استان گلستان (جایی که اطلاعات پایه به صورت پراکنده) وجود دارد، محتوای آن کمتر می باشد. سویه‌های *(Phormidium tenue)* MGCY489 *(Microchaete* MGCY412 و *(Microchaete geopretiana)* MGCY352 *geopretiana)* که در شرق مازندران از بالاترین میزان برخوردار بوده اند، از نظر مقایسه با همین نمونه‌ها در استان گلستان (گرگان، علی‌آباد و فاضل‌آباد)، از تراکم به مراتب کمتری برخوردار هستند . وجود ساختارهای تشکیل دهنده فیکوبیلی زومی، بخصوص فیکواریترین و آلوفیکوسیانین، در همه سویه‌ها قابل توجه است. بررسی فلورستیک نشان می دهد که نمونه‌های جمع آوری شده از تراکم بالا و حتی غالبیت برخوردار هستند و این در حال حاضر محکم‌ترین دلیلی است که عدم دشواری خوگیری نمونه با شرایط طبیعی را نشان می‌دهد. به نظر می‌رسد که سیستم فتوسنتزی در شرایط طبیعی با کارایی بالا کار می‌کند. شرایط آزمایشگاهی می‌تواند عامل تغییر کمی و کیفی سیستم‌های فتوسنتزی باشد.

بر طبق تحقیقات انجام شده، سویه‌های مختلف از خانواده سیانوباکتری‌های هتروسیست دار جمع آوری 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 به‌عنوان مکمل‌های غذایی در صنایع دامپروری و طیور نیز می‌توانند حائز اهمیت باشند که جای دارد در این راستا تحقیقات گسترده‌تری صورت گیرد.

منابع

سلطانی، ن.، خاوری‌نژاد، ر.، طباطبایی‌یزدی، م.، شکروی، ش. و فرناندرز والینته، ا. (۱۳۸٤). بررسی خواص آنتی‌میکروبیال و فیزیولوژی سیانوباکتری‌ها در محیط‌های افراطی، پایان نامه دکتری تخصصی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشکده تربیت معلم تهران.

چکی‌گر، ش. (۱۳۹۱). بررسی خوگیری سیانوباکتری خاکزی به تنش‌های شوری و توان تعدیل شوری در شرایط ازمایشگاهی. پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرگان.

شکروی، ش.، سلطانی، ن. و بافته‌چی، ل. (۱۳۸۱). تدوین تکنولوژی استفاده از سیانوباکتری‌ها به عنوان کود بیولوژیک در شالیزارها. طرح ملی شورای عالی تحقیقات نهاد ریاست جمهوری.مجری پژوهشکده علوم پایه کاربردی، جهاد دانشگاهی، دانشگاه شهید بهشتی.

Ojit singh, K., Gunapati, O. and Tiwari, O. (2012). New record of potential cyanobacteria from Indian region falling indo-burma biodiversity hotspotsnorth –east region of india and partial characterization for value addition. Philippine Journal of Scienc. 141(1):57-66.

Pandey, KD., Kashyap, AK. and Gupta, RK. (1995). Nutrient Status, algal and cyanobacterial flora of six streams of Schermacher Oasis, Antarctica. Hydrobiologia, 299: 83-91.

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., Remirez, 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, CA., Egeland, ES. and Johnsen, G. (2011). Phytoplankton pigments: characterization, chemotaxonomy and applications in oceanography. Cambridge University Press, Cambridge. 165-194.

Safaei katoli, M. Nejadsatari, T., Majd, A. and Shokravi, Sh. (2015). Physiological morphological and ultrastructural to combination responses of cyanobacterium *Fischerella* sp. FS18 effects of extreme conditions. Journal of Applied Environmental and Biological Sciences. 5(1):135-149.

Seppälä, J. (2009). Fluorescence properties of Baltic Sea phytoplankton. Monographs of the Boreal environment research (34). Edita Prima Ltd, Helsinki, p 83

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, AH., Perez- Fuentetaja, A. and Alben , K. (2010). Biomarkers 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.

Stanier, RY. and Cohen-Bazire, G. (1977). Phototrophic prokaryotes: the cyanobacteria. Annual Review of Microbiology. 31: 225-274.

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 *Arthronema 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 photohetrotrophic culture. Biotechnology Letters. 18: 603-608.

Grossman, AR., Schaefer, MR., Chiang, GG. and Collier, JL. (1994). The responses of cyanobacteria to environmental conditions: light and nutrients. In: The molecular biology of cyanobacteria, edited by Bryant DA (Kluwer Academic, Dordrecht) 641-675.

Horváth, H., Kovács, AW., 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, MN. (1986). The use of phycobiliproteins as fluorescent labels in immunoassay. Journal of Immunological Methods. 92: 1-13.

Lawrenz, E., Fedewa, EJ. and Richardson, TL. (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). Inhibitery 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.

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, CS. and Yentsch, CM. (1979). Fluorescence spectral signatures: the characterization of phytoplankton populations by the use of excitation and emission spectra. Journal of Marine Research. 37: 471–483.

Zhao, KH., Porra, RJ. and Scheer , H. (2011). Phycobiliproteins. In: Roy S, Llewellyn CA, Egeland ES, Johnsen G (eds) Phytoplankton pigments: characterization, chemotaxonomy and applications in oceanography. Cambridge University Press, Cambridge, pp: 375–411.

Zimba, PV. (2012). An improved phycobilin extraction method. Harmful Algae. 17: 35–39.

Steward, DE. and Farmer, FH. (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.