

جداسازی، خالص سازی و بهینه سازی شرایط رشد و نمو *Oscillatoria spp* از خورتیاب - خلیج فارس

مژگان امتیازجو: دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال
مهناز مظاهری اسدی: سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران، مرکز بیوتکنولوژی
شعبان علی نظامی بلوچی: وزارت جهادسازندگی، سازمان شیلات ایران

چکیده

سیانوباکترها گروه بزرگی از سلسله مونرا هستند که توان بالقوه فراوانی در تولید مواد غذایی، دارویی و غیره دارند. اسیلاتوریا یکی از سیانوباکتری های رشته ای است. این میکروارگانیسم در چهار فصل در خورتیاب مشاهده شد. محیط کشت بهینه برای رشد اولیه پس از برداشت از منطقه محیط کشت آب دریا^۱ است. برای خالص سازی، محیط کشت آب دریا و سیانوکوبالامین و Z8 نیمه جامد (۰/۷ درصد آگارز) استفاده شد. به منظور رشد انبوه نمونه های خالص سازی شده، محیط کشت و الانس به کار گرفته شد. در این محیط کشت بیشترین ضریب رشد ویژه μ به دست آمد. طی ۹ ماه خالص سازی انجام گرفت. این سیانوباکتر در پنج تیمار از دوره های نوری و شش تیمار حرارتی قرار گرفت. حداکثر ضریب رشد ویژه (μ) در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد به دست آمد که مقدار آن ۰/۶۰۲ است. بهترین شرایط نوری، ۱۴ ساعت روشنایی و ۱۰ ساعت تاریکی مشخص شد. میزان ضریب رشد ویژه در این حالت، برابر با ۰/۵۰۶ است. در این هنگام دما ۲۵ درجه سانتیگراد و شدت نور ۳۵۰۰ لوکس بود.

پیشینه پژوهش

اسیلاتوریا، از سیانوباکتری های چند سلولی رشته ای است که در آب های شیرین، شور و لب شور زیست می کند. این سیانوباکتری دارای پراکنش جهانی است [۱]، [۲]، [۳]، [۴]. از نظر زیست محیطی به واسطه مشارکت در تولید اولیه و هم چنین پدیده کشند قرمز حائز اهمیت فراوان است. ضمن این که قادر به تولید ترکیبات با ارزش دارویی گسترده نیز هست [۴]، [۵]. اسیلاتوریا دارای تریکوم های منظم و جدا جدا به قطر ۱ تا ۱۰۰ نانومتر است که به صورت مارپیچی، قابل انعطاف یا نیمه سخت مشاهده می شوند [۶] تریکوم ها معمولاً متحرک و با توجه به مسیر حرکتشان به سمت راست یا چپ می چرخند. مقدار حرکت از ۱-۱۱ سانتی متر در ثانیه تغییر می نماید [۴]، [۷].

واژه های کلیدی: سیانوباکتری، اسیلاتوریا، بهینه سازی

^۱-sea water medium

در محیط‌های کشت مایع بی حرکت و ساکن، غلاف‌ها بهتر رؤیت می‌شوند [۸] همچنین در این محیط‌های کشت تولید مواد ژله مانند افزایش می‌یابد. رنگ این گروه از سبز- آبی روشن تا قرمز پررنگ در نوسان است. چند گونه نیز انطباق کروماتیکی را نشان داده‌اند [۹]. در برخی از گونه‌ها فایکوسیانین و فایکواریترین فراوانی مشاهده می‌شود، که این امر سبب ایجاد رنگ سیاه در برخی از آن‌ها می‌گردد. اسیلاتورها دارای واریته‌های سمی و غیر سمی در اکوسیستم‌های آبی است [۵]، [۱۰] مانند سایر سیانوباکترها، چهار مرحله رشدی شامل سکون، نمایی، رکود و مرگ نیز در مراحل زندگی اوسیلاتورها مشاهده می‌شود [۱۱].

مشخصات منطقه‌ای

خورتیاب منطقه‌ای در موقعیت جغرافیایی (۵' و ۲۷° شمالی و ۵۰' و ۵۶° شرقی) است. مساحت آن حدود ۳۰۰ هکتار برآورد شده و دارای تالاب‌های ساحلی و مصبی است. حداکثر عمق این خور ۸ متر و دارای تپه‌های شنی متعدد است. این خور در ارتباط کامل با آب خلیج فارس و تحت تأثیر جزر و مد آن است. جنگل‌های مانگرو اطراف این خور و عمق نسبتاً کم آن سبب شده است که این منطقه حساس، دارای غنای ویژه‌ای از انواع سیانوباکتری‌ها باشد [۱۲].

روش کار

برای نمونه‌برداری ابتدا منطقه خورتیاب کاملاً بررسی شد و از ابتدا تا بخش مشرف به دریا در یکی از انشعابات اصلی، سه ایستگاه با سه عمق برای نمونه‌برداری انتخاب و مختصات ایستگاه‌ها با GPS مشخص شد که عبارتند از:

(۲۷°، ۰۵'، ۱۸" - ۵۶°، ۵۰'، ۰۴") (۲۷°، ۰۵'، ۰۸" - ۵۶°، ۴۹'، ۳۱") (۲۷°، ۰۴'، ۱۵" - ۵۶°، ۴۸'، ۰۲")

در پنج فصل متوالی، از طریق نمونه‌برداری نیسکین^۱، نمونه‌برداری انجام و از هر ایستگاه در هر عمق ۷ لیتر آب برای کشت و پرورش برداشت شد [۱۳]، [۱۴]. هر نمونه آب بر روی چهار صافی میلی پور ۰/۴۵ میکرومتری استریل فیلتر شد و در نهایت، کاغذهای صافی در چهار محیط کشت آب دریا مایع و جامد، Z8 و والانس کشت و در شرایط نوری مناسب قرار گرفت. به محیط‌های کشت مزبور سیکلوهگزامید و دی‌اکسید ژرمانیوم برای جلوگیری از رشد یوکاریوت‌ها و قارچ‌ها افزوده شد. در این مرحله، شدت نور ۳۵۰۰ لوکس و درجه حرارت ۳۰ درجه سانتی‌گراد انتخاب شد. سپس مراحل جداسازی به روش‌های زیر انجام شد:

استفاده از کشت‌های متوالی [۱۵]، قطعه قطعه نمودن تریاکوم، استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها، تلوریت پتاسیم ۱۰ میلی‌گرم در لیتر، پرتو فرابنفش، بهرگیری از تیمارهای مختلف حرارتی [۱]، استفاده از میکروسکوپ اینورت و

^۱-Nesskin

روش پبیپت پاستور [۷]، [۱۶]، [۱۷] پس از حدود ۹ ماه کار بر روی پروسه جداسازی، برای به دست آوردن شرایط بهینه رشد نمونه‌ها داخل دستگاه ژرمیناتور و تحت تیمارهای مختلف قرار گرفت.

این شرایط شامل شش تیمار حرارتی ۱۵، ۲۰، ۲۵، ۳۰، ۳۵، ۴۰ درجه سانتی‌گراد و پنج تیمار دوره نوری ۱۸/۶، ۱۶/۸، ۱۴/۱۰، ۱۲/۱۲، ۱۰/۱۴ ساعت روشنایی/ساعت تاریکی، برای آزمایش بود. در طول دوره زمانی که حرارت متغیر بود طول دوره نوری ۱۴/۸ (۱۴ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی) و در هنگام تغییر زمان نوری درجه حرارت ۲۵ درجه سانتی‌گراد انتخاب شد. پس از گذر از هر تیمار نمونه‌ها روی صافی‌های میلی‌پور ۰/۴۵ میکرومتری فیلتر شد. وزن قبل و پس از فیلتراسیون برای برآورد ضریب رشد ویژه محاسبه شد و سپس μ با استفاده از معادله- ۱ محاسبه شد:

$$\mu = \frac{(\ln x_t - \ln x_0)}{\Delta T}$$

در این فرمول:

μ = ضریب رشد ویژه ، x = وزن ماده خشک در زمان t ، N = وزن ماده خشک در زمان t

نتایج و بحث

مرحله نخست کشت به رشد اسیلاتورها از آب دریا اختصاص داشت. نمونه‌ها بر روی چهار محیط کشت، آب دریای غنی شده مایع و جامد، Z8 و محیط کشت والانس برده شد. از بین محیط‌های کشت مذکور آب غنی شده دریا با سیانوکوبالامین باعث رشد تعداد بی‌شماری از سیانوباکتری‌ها شد که به همراه این گروه، باکتری‌های هتروتروف نیز مشاهده شد.

در مرحله خالص‌سازی، محیط‌های کشت جامد آب غنی شده دریا و Z8 جامد، رشد اسیلاتورها را به صورت مطلوب‌تری نشان داد. برای جامد نمودن این محیط کشت از ۱/۵ درصد آگار استفاده شد. در اغلب نمونه‌ها، کروکوکال‌ها و باکتری‌های هتروتروف به خوبی رشد کردند؛ ولی اسیلاتورها رشد مناسبی نداشت. بدین لحاظ، آگارز مورد استفاده قرار گرفت.

البته نتایج آزمایش‌های متوالی بر روی نوع و میزان مواد ژل‌ساز حاکی از آن است که اگر محیط کشت به صورت نیمه جامد باشد (۰/۷ درصد آگارز)، رشد اسیلاتورها بهتر امکان‌پذیر می‌گردد. نکته قابل توجه این که در این حالت، محیط کشت باید ساکن باشد و به آرامی جابه‌جا شود تا کلنی‌های شکل گرفته در هم تداخل نداشته باشد. کشت تقریباً خالص اسیلاتورها، پس از چندین بار کشت متوالی و شستشو با آنتی‌بیوتیک کلرام فنیکل و آب استریل شده دریا، سیکلوهمگزامید و تلوریت پتاسیم، در محیط‌های کشت Z8 و والانس نیمه جامد به دست آمد.

وجود سیانوباکترها نظیر *Synechococcus* و *Phormidium*, *Lyngbya* در محیط‌های کشت اسیلاتوریا، مانع اصلی تهیه کشت خالص بود. در واقع رشته‌های این سیانوباکتری‌ها داخل هم رفته و با به دام انداختن سینوکوکوس مانع تهیه کشت خالص می‌شود.

بدین سبب، مجدداً از روش‌های یاد شده هم چنین پرتو فرابنفش، هوادهی، ایجاد حرکات دورانی در دورهای مختلف استفاده شد. هوادهی سبب رشد بهتر و گسترده‌تر لینگییا می‌شود که از سیانوباکتری‌های مزاحم است. از همین روی در تیمارهای بعدی هوادهی انجام شد. برای جداسازی اسیلاتوریا از لینگییا، همزن (شیکر) در دوره‌های مختلف ۸۰، ۱۶۰، ۱۴۰، ۱۲۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ دور در دقیقه استفاده گردید. با به‌کارگیری این تیمار مشخص گردید که اسیلاتوریا در ۱۶۰ دور در دقیقه رشد کرده است؛ ولی لینگییا آکنیت ایجاد می‌کند همچنین فرمیدیوم قطعه قطعه می‌شود. هنگام مشاهده این حالت که تقریباً ۳ روز پس از قرار دادن نمونه‌ها روی همزن با دور ۱۶۰ دور در دقیقه رخ می‌دهد، با پیپت پاستور و میکروسکوپ معکوس رشته‌های اسیلاتوریا را می‌توان به راحتی از لینگییا تشخیص داد و جدا کرد. همچنین شست و شوی این رشته‌ها با آب استریل شده دریا باعث می‌شود که از تعداد سینوکوکوس که یکی از مقاوم‌ترین انواع سیانوباکتری‌ها است، کاسته شود.

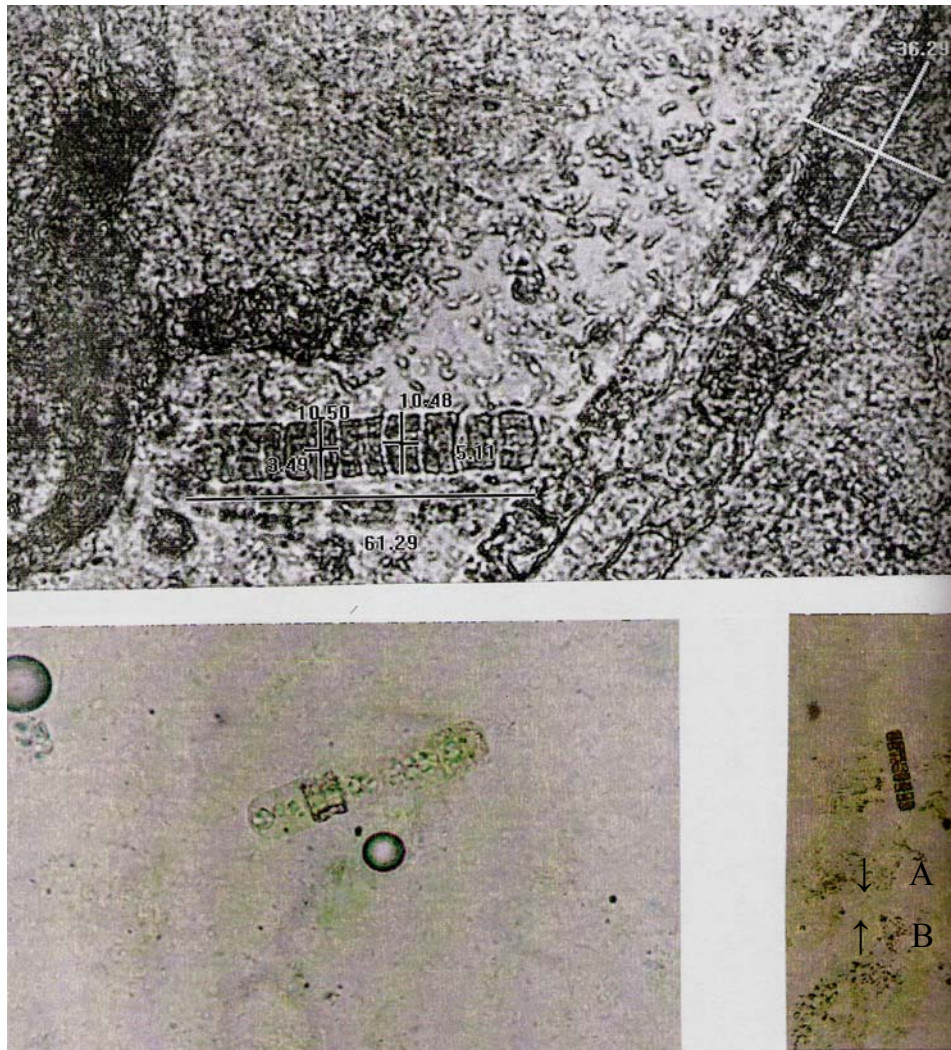
برای خالص‌سازی نهایی اسیلاتوریا، پس از ایجاد یک مخلوط همگن، با همزن محیط کشت حاوی این باکتری روی کاغذهای صافی ۰/۳ و ۱/۲ میکرون صاف شد و کشت خالص اسیلاتوریا به دست آمد (شکل ۱ و ۲). رشد بهتر اسیلاتوریا در محیط کشت والانس انجام پذیرفت. از همین روی، برای تیمارهای بعدی از این محیط کشت استفاده شد.

چرخه رشد این سیانوباکتری به طور میانگین در طول ۱۳ روز مشاهده شد. با به‌کارگیری تیمارهای مختلف حرارتی جدول ۱ مشاهده شد که در حرارت ۳۰ درجه سانتی‌گراد بهترین رشد (نمودار ۱) و یا به عبارتی بیش‌ترین ضریب رشد ویژه به دست می‌آید.

در زمینه اثر درجه حرارت بر روی رشد اسیلاتوریا تحقیقات زیادی انجام شد که این تحقیقات به طور عمده بر روی گونه‌های آب شیرین انجام گرفته است. از آن جمله بررسی‌های الزن^۱ که در سال ۱۹۸۵ ارائه گردیده است، قابل ذکر است.

در اغلب تحقیقات، درجه حرارت مناسب برای رشد اسیلاتوریا ۲۳-۲۵ درجه سانتی‌گراد گزارش شده است؛ در حالی که آن که در این پژوهش درجه حرارت مناسب ۳۰ درجه سانتی‌گراد به دست آمد [۱۷]، [۱۹].

با توجه به شرایط اکولوژیک زیستگاه این سیانوباکتر که در خلیج فارس و در عرض جغرافیایی حدود ۳۰ درجه شمالی است، بنا بر این طبیعی است که این سیانوباکتر در طول دوره حیاتی خود با این حرارت سازش یابد. و جایگاه اکولوژیک ویژه آن سبب این اختلاف باشد. از سوی دیگر واریته‌های گوناگون دارای بهینه حرارتی مختلف هستند [۱۹].



A- آنالیز تصویری اسیلاتوریا: در سمت چپ و پایین سلول های رویشی ترایکوم به ابعاد متوسط ۴/۳۰ ۱/۴۶ و هرموگونیا به ابعاد ۴/۳۰ ۶۱/۲۹ میکرون مشاهده می شود.

B- تصویر مربوط به Order: Oscillatoriales
Genus: Oscillatoria, $\gamma = 400x$

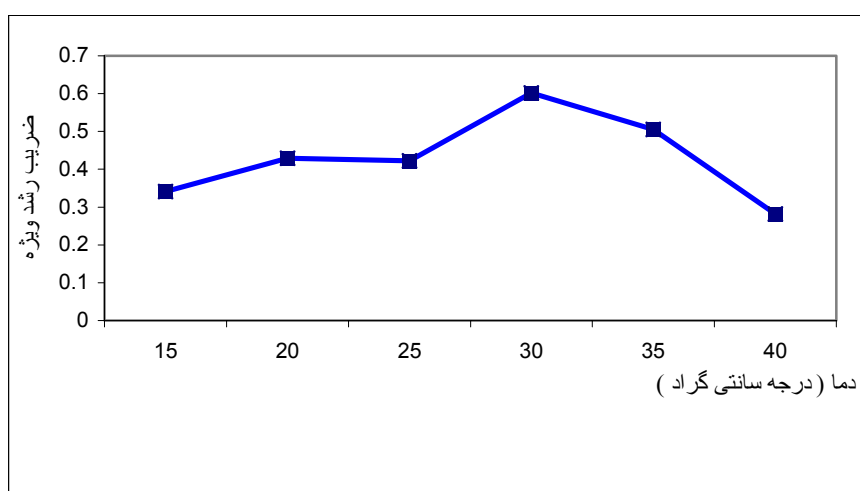
همچنین در این پروژه پنج تیمار مختلف از دوره های نوری جدول ۲ نیز به کار گرفته شد، که نتایج به دست آمده حاکی از آن است که در دوره نوری ۱۴ ساعت روشنایی و ۱۰ ساعت تاریکی ضریب رشد ویژه اسیلاتوریا، دارای حداکثر مقدار است (نمودار ۲) در این حالت دما ۲۵ درجه سانتی گراد انتخاب شد.

جدول ۱. میزان ضریب رشد ویژه (μ) در درجه حرارت های مختلف بر حسب سانتی گراد

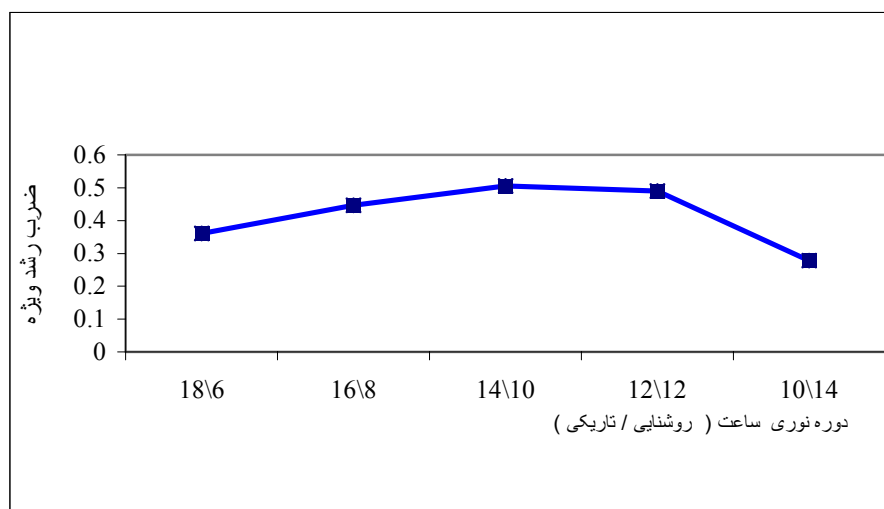
میانگین	گروه سوم	گروه دوم	گروه اول	دما °C
۰/۳۴۱	۰/۲۷۹	۰/۲۵۴	۰/۴۱۰	۱۵
۰/۴۲۹	۰/۳۷۷	۰/۲۹۹	۰/۶۱۱	۲۰
۰/۴۲۲	۰/۳۲۵	۰/۴۵۰	۰/۴۹۱	۲۵
۰/۶۰۲	۰/۶۱۱	۰/۶۰۱	۰/۵۹۶	۳۰
۰/۵۰۵	۰/۵۹۱	۰/۴۱۳	۰/۵۱۱	۳۵
۰/۲۸۲	۰/۳۱۶	۰/۲۷۷	۰/۲۵۴	۴۰

جدول ۲. میزان ضریب رشد ویژه (μ) در دوره های مختلف نوری بر حسب ساعت روشنایی / ساعت تاریکی

میانگین	گروه سوم	گروه دوم	گروه اول	دوره نوری روشنایی / تاریکی
۰/۳۶۱	۰/۳۴۵	۰/۴۱۷	۰/۳۲۳	۱۸/۶
۰/۴۴۶	۰/۴۱۲	۰/۴۳۹	۰/۴۸۹	۱۶/۸
۰/۵۰۶	۰/۵۵۵	۰/۵۱۱	۰/۴۵۳	۱۴/۱۰
۰/۴۹۰	۰/۴۹۷	۰/۵۰۱	۰/۴۷۳	۱۲/۱۲
۰/۲۷۸	۰/۳۱۰	۰/۳۱۵	۰/۲۱۱	۱۰/۱۴



نمودار ۱. تغییرات ضریب رشد ویژه اسیلتوریا در دماهای مختلف بر حسب درجه سانتی گراد



نمودار ۲. تغییرات ضریب رشد ویژه اسیتاتوریا در دوره های مختلف نوری
بر حسب ساعت (روشنایی / تاریکی)

منابع

1. R.W. Castenholz "Thermophilic blue-green algae and the thermal environment", Bacteriol, Rev. 33(1969) 476-504.
2. M. Namikoshi, K.L. Rinehart, Bioactive compounds produced by cyanobacteria, J. Ind. Microbiol, N: 17(1996) 373-384
3. M. Erhard, H. Von Dohern, P. Jungbult, Rapid typing and elucidation of new secondary metabolites of intact cyanobacteria using MALDT-TOF mass spectrometry. Nat. Biotechnol. N: 15 (1997) 906-909.
4. S. Mundt, S. Kreitlow, A. Nowotny, U. Effmert, Biomedical and pharmacological investigations of select cyanobacteria, Internatonal J., Hygiene and environmental helth, N: 203 (2001) 327-334.
5. S. Chrous, I. Ingrid J. Bartran. " Toxic cyanobacteria in water a guide to their public health consequences monitoring and management E & FNSpon (1999) 145.
6. R. Rippka, J.B. Deruelles, M. Waterbury, Herdman, R.Y. Stanier " Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobactreia, J. Gen. Microbiol (1979) 111: 161.

7. H.N. Halfen, R.W. Castenholz " Gliding motility in the blue-green algae *Oscillatoria princeps*, J. phycol. 7(1971) 133-145.
8. T.P. Chang, " Sheath formation in *Oscillatoria agardhii* " Gomont Schweiz, Hydrol, 39(1977) 178-181.
9. N. Tandeau de Marsac, " Occurrence and nature of chromatic adaptation in, cyanobacteria, j. Bacteriol BO. (1977)82-91.
10. A.M. Burja, B. Banaigs, E. Abou –Mansour, J.G. Burgess, Marine cyanobacteria a prolific source of natural products, Tetrahedron, N: 57(2001) 9347- 9377.
11. G.E. Fogg, " Algal culture and phytoplankton ecology 2nd., " university of wiscons in press, Madd so Milwaukee(1975).
۱۲. امتیازجو، م.، بررسی تنوع زیستی سیانو باکتری‌های خلیج فارس با تاکید بر استحصال موادی زیستی فعال از آنها ، پایان نامه دکتری ، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات(۱۳۷۹).
- 13.J.P. Zehr, M.T. Mellon and S. Zani. " New nitrogen fixing microorganisms detected in oligotrophic ocean by amination of nitrogenase (nifH) Gene, Applied and environmental microbiology(1998) 34444-3450.
14. ROPME., "Manual of oceanographic observation and pollutant analysis method", Kuwait(1999).
15. V.B.D. Skerman, " A new type of micromanipulator and microfroge: J. Gen. Microbiol, 54(1968) 287-297.
16. J.T. Staley, "Bergys manual of systematic bacteriology volume 3" William and Wilkins (1962, 1982) 2298.
17. P. Fay, and G.E. Fogg " Studies on nitrogen in *Cloroglea fristchii mitra* " Archl, Microbiol, 42(1962) 310-315.
18. N. Tandeau de Marsac, " Occurrence and nature of chromatic adaptation in, cyanobacteria, j. Bacteriol BO. (1977)82-91.
19. G. Ahlegm, " growth of *Oscillatoria agardhii* in chemostat culture 3 simultaneous limitation of nitrogen and phosphorus " Br. Phycolo. j 20(1985) 249-291.