جداسازی، خالص‌سازی و بهینه‌سازی شرایط رشد و نمو *Oscillatoria spp* از خورتیاب ـ خلیج فارس

مژگان امتیازجو: دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال
مهناز مظاهری اسدی: سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، مرکز بیوتکنولوژی
شعبان‌علی 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 سیانوباکتری‌های رشته‌ای 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[۲] است. برای خالص سازی، محیط کشت آب دریا و سیانوکوبالامین و Z8 نیمه جامد(۰/۷ درصد آگارز) استفاده شد. به منظور رشد انبوه نمونه‌های خالص‌سازی شده ، محیط کشت والانس به‌کار گرفته شد. در این محیط کشت بیش‌ترین ضریب رشد ویژه μ به دست آمد. طی ۹ ماه خالص‌سازی انجام گرفت. این سیانوباکتر در پنج تیمار از دوره‌های 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 سیانوباکتری‌های چند سلولی رشته‌ای است که در آب‌های شیرین، شور و لب‌شور زیست می‌کند. این سیانوباکتری دارای پراکنش جهانی است[۱]،[۲]،[۳]،[٤].

از نظر زیست‌محیطی به‌واسطه مشارکت در تولید اولیه و هم چنین پدیده کشند قرمز حائز اهمیت فراوان است. ضمن این‌که قادر به تولید ترکیبات با ارزش دارویی گسترده نیز هست[٤]،[٥].

اسیلاتوریا دارای تریکوم‌های منظم و جدا جدا به قطر ۱ تا ۱۰۰ نانومتر است که به صورت مارپیچی، قابل انعطاف یا نیمه‌سخت مشاهده می‌شوند[۶] تریکوم‌ها معمولاً متحرک و با توجه به مسیر حرکتشان به سمت راست یا چپ می‌چرخند. مقدار حرکت از ۱–۱۱ سانتی متر در ثانیه تغییر می‌نماید[٤]،[۷].

واژه‌های کلیدی: سیانوباکتری ، اسیلاتوریا ، بهینه سازی

۱-sea water medium

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2026-11-03]

در محیط‌های کشت مایع بی‌حرکت 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. اسیلاتوریا 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 اوسیلاتوریا مشاهده می‌شود[۱۱].

مشخصات منطقه‌ای

خورتیاب منطقه‌ای در موقعیت جغرافیایی(۵′ و۲۷° شمالی و(۵۰′و۵۶° 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°،۰۴′ ،۱۵″–۵۶° ،۴۸′ ،۰۲″)(۲۷°،۰۴′ ،۱۵″–۵۶° ،۴۹′ ،۳۱″)(۲۷°،۰۵′ ،۰۸″–۵۶° ،۵۰′ ،۰۴″)(۲۷°،۰۵′ ،۱۸″-۵۶°

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]،[۱٤]. هر نمونه آب بر روی چهار صافی میلی پور۰/۴۵ 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 ترایکوم، استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها، تلوریت پتاسیم ۱۰ میلی‌گرم درلیتر، پرتوفرابنفش، بهرمگیری از تیمارهای مختلف حرارتی[۱]، استفاده از میکروسکوپ اینورت و

۱-Nesskin

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2026-11-03]

روش پیپت 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(۱۴ساعت روشنایی و۸ ساعت تاریکی) و در هنگام تغییر زمان نوری درجه حرارت ۲۵ درجه سانتی‌گراد انتخاب شد. پس از گذر از هر تیمار نمونه‌ها روی صافی‌های میلی‌پور۰/۴۵ 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:

$$\mu = \frac{(Inx_{t} - Inx_{.})}{\Delta T}$$

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 اسیلاتوریا 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 اسیلاتوریا را به صورت مطلوب‌تری نشان داد. برای جامد نمودن این محیط کشت از۱/۵ درصد آگار استفاده شد. در اغلب نمونه‌ها، کروکوکال‌ها و باکتری‌های هتروتروف به خوبی رشد کردند؛ ولی اسیلانوریا 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 اسیلاتوریا 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 اسیلاتوریا، پس از چندین بار کشت متوالی و شستشو با آنتی‌بیوتیک کلرام فنیکل و آب استریل شده دریا، سیکلوهگزامید و تلوریت پتاسیم، در محیط‌های کشت Z8 و والانس نیمه جامد به دست آمد.

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2026-11-03]

وجود سیانوباکترها نظیر Phormidium, Lyngbya و Synechoccus 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 لینگبیا می‌شود که از سیانوباکتری‌های مزاحم است. از همین روی در تیمارهای بعدی هوادهی انجام شد. برای جداسازی اسیلاتوریا از لینگبیا، همزن(شیکر) در دورهای مختلف۸۰، ۱۶۰،۱۴۰،۱۲۰،۱۰۰و۲۰۰ دور در دقیقه استفاده گردید. با به‌کارگیری این تیمار مشخص گردید که اسیلاتوریا در۱۶۰ دور در دقیقه رشد کرده است؛ ولی لینگبیا 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 لینگبیا تشخیص داد و جدا کرد. همچنین شست وشوی 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 صافی۰/۳ و۱/۲ میکرون صاف شد و کشت خالص اسیلاتوریا به دست آمد(شکل۱و ۲). رشد بهتر اسیلاتوریا در محیط کشت والانس انجام پذیرفت. از همین ر.ی، برای تیمارهای بعدی از این محیط کشت استفاده شد.

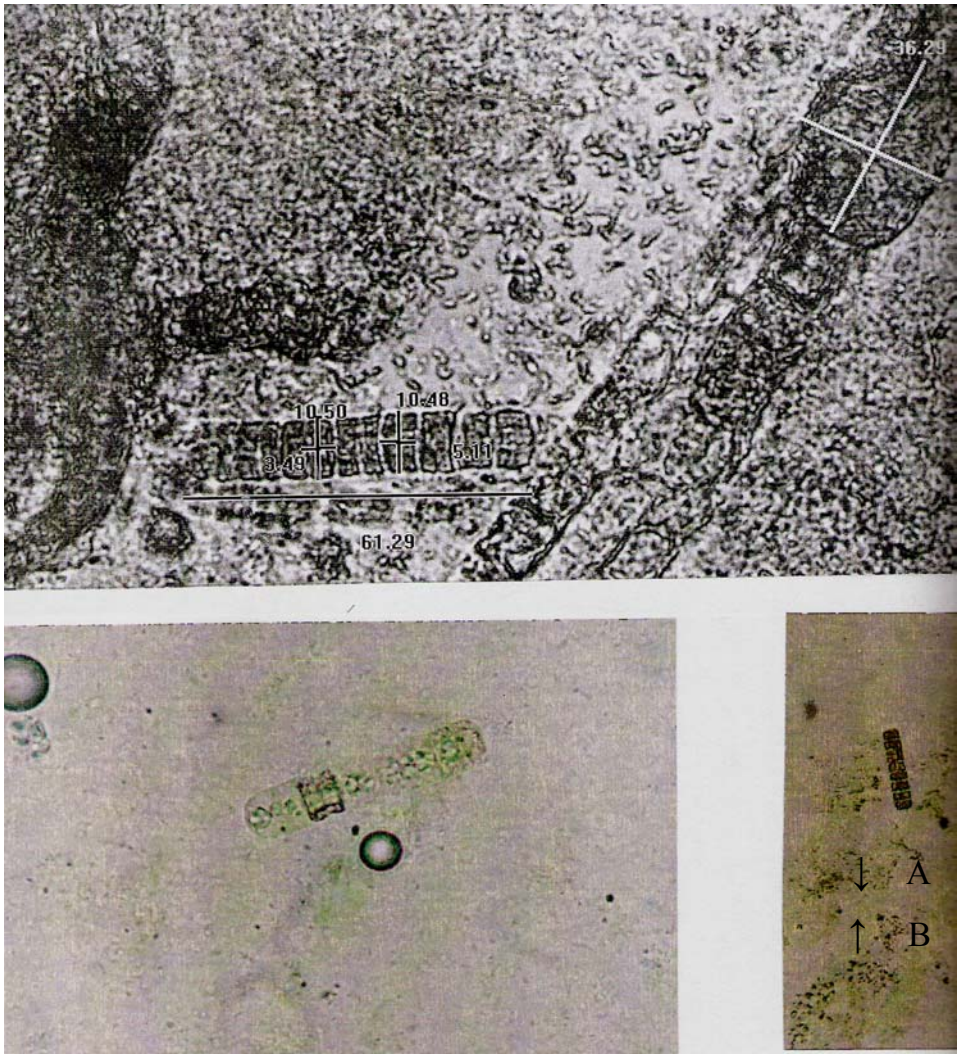
چرخه رشد این سیانوباکتری به طور میانگین در طول ۱۳ روز مشاهده شد. با به‌کارگیری تیمارهای مختلف حرارتی جدول۱ مشاهده شد که در حرارت ۳۰ درجه سانتی‌گراد بهترین رشد(نمودار۱) و یا به عبارتی بیش‌ترین ضریب رشد ویژه به دست می‌آید.

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 الژن[1] 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 براین 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].

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2026-11-03]



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

B- تصویر مربوط به Order: Oscillatoriales

Genus: Oscillatoria, γ = 400x

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

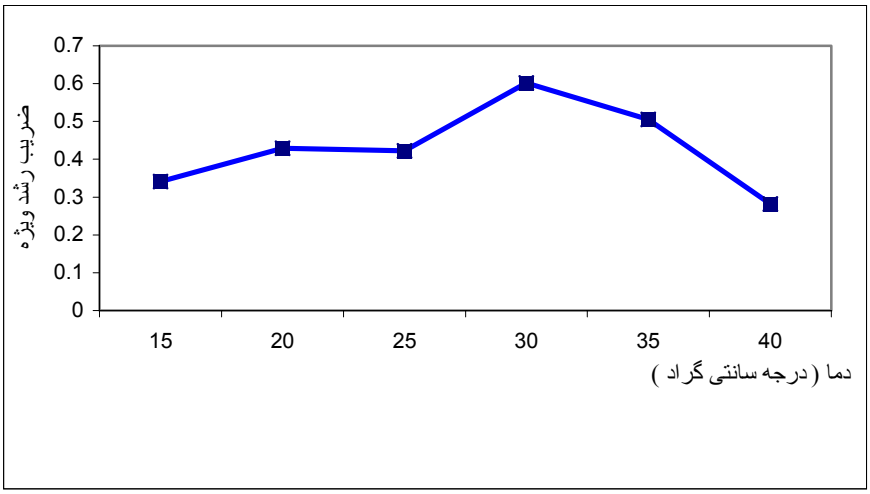
[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2026-11-03]

جدول ۱. میزان ضریب رشد ویژه(μ) در درجه حرارت‌های مختلف بر حسب سانتی‌گراد

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

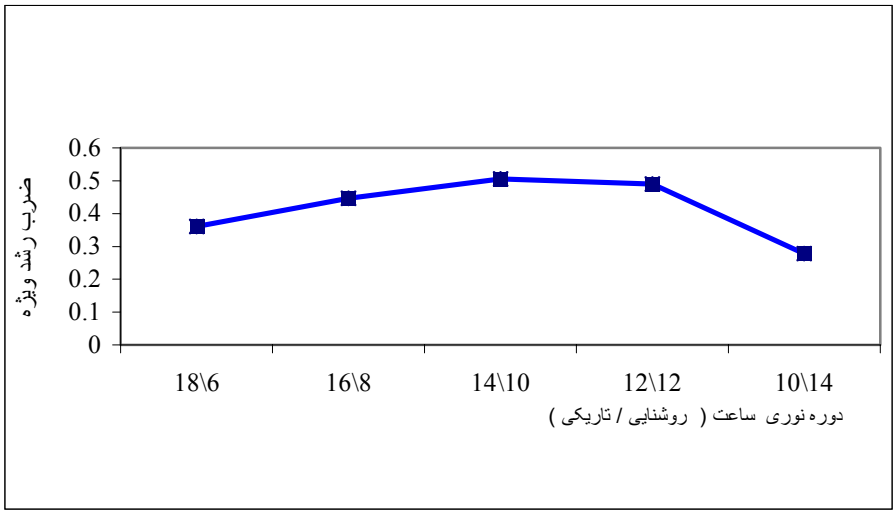
جدول ۲. میزان ضریب رشد ویژه(μ) در دوره‌های مختلف نوری بر حسب ساعت روشنایی / ساعت تاریکی

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



نمودار ۱. تغییرات ضریب رشد ویژه اسیلاتوریا در دماهای مختلف بر حسب درجه سانتی‌گراد

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2026-11-03]



نمودار ۲. تغییرات ضریب رشد ویژه اسیلاتوریا در دوره‌های مختلف نوری بر حسب ساعت(روشنایی / تاریکی)

منابع

1. R.W. Castenholz "Thermophilic blue-green algae and the thermalenvironment" , 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 spectromertry. 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 consequeneces 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.

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2026-11-03]

7. H.N. Halfen, R.W. Castenholz " Gliding motility in the blue-green algae Oscillatoria princes,. 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 موادزیستی 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 amonification 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. Ahlegrn, " growth of Oscillatoria agardhii in chemostat culture 3 simultaeous limitation of nitrogen and phosphorus " Br. Phycolo. j 20(1985) 249-291.

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2026-11-03]