تاریخ چاپ تابستان ۱۳۹۲

نشان ویژه‌سازی مقایسه‌ای فیزیولوژیکی میکروفلور سیانوباکتریایی مناطق آلوده و غیرآلودهٔ نفتی

*فرزانه زندی، رامین حسینی؛ دانشگاه بین‌المللی امام خمینی
ندا سلطانی؛ دانشگاه شهید بهشتی، پژوهشکده علوم پایه کاربردی جهاد دانشگاهی
رحیم حداد؛ دانشگاه بین‌المللی امام خمینی، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی
نبأ النجار؛ دانشگاه شهید بهشتی، پژوهشکده علوم پایه کاربردی جهاد دانشگاهی

چکیده

آلودگی‌های نفتی ناشی از مصرف روزافزون نفت در زندگی بشر، تأثیرات مختلفی را روی اکوسیستم‌های آبی و خاکی و نیز میکروفلور آن‌ها گذاشته است. در این تحقیق، تنوع فیزیولوژیکی سویه‌های فلور سیانوباکتریای جدا شده از مناطق آلوده و غیرآلوده به مواد نفتی با استفاده از عوامل میزان کلروفیل، فیکوبیلی پروتئین‌ها، میزان فتوسنتز و میزان رشد آزمایش شد. بدین‌منظور سویه‌های مختلف سیانوباکتریایی از مناطق آلوده و غیرآلوده جدا و خالص شدند. سویه‌های خالص شده در محیط مایع مناسب کشت شد و در فاز لگاریتمی آزمایش شدند. میزان کلروفیل و فیکوبیلی پروتئین‌ها از روش جذب نوری، مقدار فتوسنتز با کمک دستگاه اکسی‌ویو و مقدار رشد با محاسبهٔ وزن خشک سنجیده شد. مقدار کلروفیل و فتوسنتز در شرایط یکسان آزمایشگاهی در سویه‌های مناطق آلوده به‌طور معنی‌داری نسبت به سویه‌های مناطق غیرآلوده کم‌تر بود. با وجود این، سویه‌های مناطق آلوده میزان رشد بیش‌تری نسبت به سویه‌های غیرآلوده نشان دادند و این تفاوت معنی‌دار است. همچنین تفاوت معنی‌داری بین رنگیزه‌های فیکوبیلی پروتئینی در دو گروه مشاهده نشد. به‌طور کلی، نتایج نشان می‌دهد که سویه‌های سیانوباکتریایی جدا شده از مناطق آلوده به نفت با افزایش زیست تودهٔ خود، آسیب ناشی از کاهش مقدار فتوسنتز و کلروفیل ناشی از تنش نفت را جبران کرده و در مقابل این تنش مقاومت می‌کنند. این پاسخ منجر به تغییر فلورسیانوباکتریایی به‌سمت سویه‌های مقاوم و میکسوتروف است که علاوه بر فتوسنتز قادر به استفاده از هیدروکربن‌های نفتی به‌عنوان منبع انرژی است و در نتیجه با غلبه بر افت انرژی ناشی از کاهش فتوسنتز و حتی افزایش بهره‌وری کسب انرژی نسبت به گونه‌های مناطق غیرآلوده، انرژی لازم برای رشد و گسترش خود را فراهم سازند.

مقدمه

نفت خام مخلوط پیچیده‌ای است که عمدتاً از n-آلکان‌ها، هیدروکربن‌های آروماتیک، آسفالتن و ترکیبات غیر هیدروکربنی مانند اجزای قطبی حاوی اتم‌های نیتروژن، گوگرد و اکسیژن تشکیل شده است [۲۱]. در فعالیت‌های

واژه‌های کلیدی: سیانوباکتری‌ها، فتوسنتز، فیکوبیلی‌پروتئین، کلروفیل، میزان رشد، نفت خام.
دریافت ۹۰/۶/۵ پذیرش ۹۱/۱۲/۹
*نویسنده مسئول zand_fz@yahoo.com

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-03-28]

مرتبط با نفت خام مانند اکتشاف، استخراج، حمل و نقل و پالایش نفت، مقادیر زیادی از پسماندهای آلوده به ترکیبات هیدروکربنی تولید می‌گردند که این پسماندها تهدیدی بسیار جدی برای محیط زیست به‌حساب می‌آیند. روش‌های فیزیکوشیمیایی مقابله با این آلودگی‌ها نظیر جمع‌آوری مواد روغنی با لوله‌های لاستیکی شناور و یا جذب آن‌ها به مواد طبیعی و سنتزی، هرچند در کاهش تأثیرات سوء ترکیبات نفتی بر اکوسیستم‌ها سود می‌بخشند، ولی قادر به حذف کامل ترکیبات نفتی از محیط نیستند. در حال حاضر، تجزیهٔ زیستی آلاینده‌های نفتی با ریزسازواره‌ها به‌عنوان یکی از کارآمدترین و مقرون به صرفه‌ترین روش‌های رفع آلودگی‌های نفتی از محیط به‌حساب می‌آید [۸].

تاکنون گونه‌های مختلفی از باکتری‌ها، قارچ‌ها و سیانوباکتری‌های تجزیه‌کنندهٔ ترکیبات هیدروکربنی شناسایی شده‌اند [۷]، [۱۱]، [۲۵]. در مناطق نفت‌خیز، توده‌های سیانوباکتریایی اغلب در روی خاک‌های آلوده شده به نفت خام ایجاد می‌گردند. توده‌های سیانوباکتریایی اجتماعات میکروبی متشکل از سیانوباکتری‌ها و باکتری‌ها و قارچ‌های همزیست با این سیانوباکتری‌ها هستند. با قرار گرفتن توده‌های سیانوباکتریایی در معرض مواد نفتی، تنوع زیستی جمعیت‌های سیانوباکتریایی در آن‌ها دچار تغییرات عمده‌ای می‌گردد [۲۲]. از جمله به دنبال آلودگی نفتی خلیج فارس این توده‌ها که جمعیت غالب آن‌ها را سیانوباکتری‌ها تشکیل می‌دادند، در مناطق آلوده به نفت ساکن شده و نقش به‌سزایی را در رفع آلودگی نفتی بازی کرده‌اند [۴]. همچنین نشان داده شده است که سیانوباکتری‌های از قبیل میکروکلئوس کتونوپلاستس[۱] و پرومیدیم کوریم[۲] قادرند n-آلکان‌ها را جذب و تجزیه کنند [۵].

در طبیعت در پاسخ به تنش‌های محیطی معمولاً ارگانیسم‌ها تغییراتی را در متابولیسم خود به‌منظور سازگاری با تنش‌ها ایجاد می‌کنند [۲۹]. تنش‌ها می‌توانند تغییر مورفولوژی، فیزیولوژی و بیوشیمیایی را در سلول‌ها ایجاد کنند. این تغییرات در سیانوباکتری‌ها به‌ویژه در رنگیزه‌های سلولی مانند کلروفیل a، کاروتنوئیدها و فیکوبیلی‌پروتئین‌ها مشهود است [۱۷]. فیکوبیلی‌پروتئین‌ها گروهی از رنگیزه‌های فتوسنتزی هستند که به غشای تیلاکوئیدی سیانوباکتری‌ها و جلبک‌های قرمز متصل شده‌اند و در جذب نور و زنجیرهٔ انتقال الکترون با کارایی فراوان شرکت می کنند، که به سه گروه اصلی فیکوسیانین، فیکواریترین و آلوفیکوسیانین تقسیم می‌شوند [۲۴]. این ترکیبات به‌دلیل ماهیت پروتئینی، رنگ منحصر به‌فرد و خواص آنتی‌اکسیدانتی، کاربردهای گسترده‌ای در تشخیص‌های پزشکی و درمانی کسب کرده‌اند [۲۸]. همچنین تنش‌ها می‌توانند در شاخص‌های میزان رشد و وزن خشک تأثیرگذار باشند.

با وجود بررسی‌هایی که در زمینه سیانوباکتری‌ها و ارتباط آن‌ها با رفع آلودگی‌های نفتی در سطح بین‌المللی صورت گرفته است، تحقیقات داخلی سهم کمی از این بررسی‌ها را خصوصاً در بخش فیزیولوژی به خود اختصاص داده است [۱]. از همین رو، در این پژوهش به نشان ویژه‌سازی فیزیولوژیکی سیانوباکتری‌های جدا

۱. *Microcoleus chthonoplastes* ۲. *Phormidium corium*

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-03-28]

شده از مناطق آلوده و غیرآلوده نفتی با تأکید بر عواملی مانند کلروفیل، فیکوبیلی‌پروتئین‌ها، فتوسنتز، وزن خشک و میزان رشد پرداخته شده است.

مواد و روش‌ها

جداسازی نمونه‌ها

سویه‌های آزمایش شده از خاک‌های آلوده و غیرآلودهٔ نفتی با شرایط محیطی یک‌سان برداشت شد. عمل خالص‌سازی با روش پلیت آگار[۱] و با استفاده از محیط کشت BG11 انجام شد. کلنی‌های سیانوباکتریایی رشد یافته بر سطح پلیت‌ها با چندین بار کشت مجدد، خالص شدند. در هر دو گروه، سویه‌هایی که ۷۰% غالب میکروفلور سیانوباکتریایی خاک منطقه محل خود را تشکیل می‌دادند، انتخاب شده و شناسایی آن‌ها با استفاده از میکروسکوپ نوری و فلورسان و کلیدهای شناسایی معتبر انجام گرفت. این سویه‌ها برای مراحل بعدی، آماده‌سازی و آنالیز شد.

شرایط کشت

همهٔ مواد شیمیایی استفاده شده در این پژوهش از درجهٔ خلوص آنالیتیکی برخوردارند. ترکیب محیط کشت BG11 استفاده شده برای کشت سیانوباکتری‌ها شامل ۱/۵ $NaNO_3$ (g/l)، ۴۰ میلی‌گرم بر لیتر K_2HPO_4، ۷۵ میلی‌گرم بر لیتر $MgSO_4.7H_2O$ (mg/l)، ۳۶میلی‌گرم بر لیتر $CaCl_2.2H_2O$، ۶ میلی‌گرم بر لیتر اسید سیتریک[۲]، ۶ میلی‌گرم بر لیتر آمونیم فریک سیتریت[۳]، ۱ میلی‌گرم بر لیتر EDTA، ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر Na_2CO_3 و ۱ میلی‌لیتر تریس متال میکس[۴] بود. ترکیب تریس متال میکس (به‌صورت میلی‌گرم در لیتر) شامل ۲/۸۶ H_3BO_3، ۱/۸۱ $MnCl_2.4H_2O$، ۰/۲۲۲ $ZnSO_4.7H_2O$، ۰/۳۹ $Na_2MoO_4.2H_2O$، ۰/۰۷۹ $CuSO_4.5H_2O$ و ۰/۰۴۹۴ $Co(NO_3).6H_2O$ است.

سویه‌های سیانوباکتریایی در دمای ۳۰ درجهٔ سانتی‌گراد و تحت نوردهی دائم (۶۰ میکرومول فوتون[۵] $m^{-2}S^{-1}$) رشد داده شدند. برای نگه‌داری طولانی مدت سویه‌ها، به ۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون سیانوباکتری در محیط مایع در ویال‌های درپیچدار ۲ میلی‌لیتری، دی‌متیل سولفوکساید ۱۰% اضافه شد و ویال‌ها در فریزر ۷۰℃ نگه‌داری شدند.

بخش دیگری از این سویه‌ها به محیط کشت مایع منتقل شد و ازدیاد سویه در فاز آزمایشگاهی صورت گرفت [۶]. به‌منظور بررسی‌های فیزیولوژیک، سویه‌های سیانوباکتریایی در شرایط استریل در ارلن‌های ۱ لیتر حاوی ۵۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت پایه BG11 در دمای ۳۰ درجهٔ سانتی‌گراد با هوادهی ۲۰۰ میلی‌لیتر در دقیقه و تحت نوردهی دائم (۶۰ میکرومول فوتون $m^{-2}S^{-1}$) رشد داده شدند. در طول دورهٔ رشد، از کشت‌ها به شکل پیوسته نمونه‌گیری شد و شرایط رشد در زیر میکروسکوپ بررسی شد.

۱. Plate agar ۲. citric acid ۳. ammonium ferric citrate ۴. trace metal mix
۵. µmol photon

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-03-28]

سنجش‌های فیزیولوژیک

تعیین وزن خشک بر اساس روش لگانس[۱] و همکاران انجام شد [۲۰]. وزن خشک نمونه‌ها در طول دورهٔ رشد ۷ روزه برای محاسبه میزان رشد با اندازه‌گیری جذب نوری و قرار دادن در معادلهٔ منحنی استاندارد محاسبه شد. برای محاسبهٔ میزان رشد از فرمول ۱ استفاده شد که در آن Dw^{4th} , Dw^{2th} به‌ترتیب مقادیر وزن خشک در روز دوم و چهارم برحسب میلی‌گرم بر میلی‌لیتر است.

$$D= [\log(Dw_{4th}/Dw_{2th})] \times 3.322 \quad (۱)$$

روش مارکر[۲] برای سنجش کلروفیل استفاده شد [۲۳]. بدین‌منظور از ۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون سیانوباکتریایی با کمک متانول خالص عصاره‌گیری و جذب نوری آن با استفاده از اسپکتروفتومتر در طول موج ۶۶۵ نانومتر در مقابل شاهد متانول ثبت شد. غلظت کلروفیل با استفاده از فرمول ۲ بر حسب میکروگرم کلروفیل بر میلی گرم وزن خشک محاسبه شد که در آن A_{665} مقدار جذب نوری در طول موج ۶۶۵ نانومتر و Dw وزن خشک برحسب میکروگرم بر میلی‌لیتر است.

$$\mathrm{Chl}a = \frac{13.14 \times A_{665nm}}{Dw} \quad (۲)$$

فیکوبیلی‌پروتئین‌ها بر اساس روش وایمن[۳] سنجیده شدند [۳۱]. بدین‌منظور ۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون سیانوباکتریایی با کمک گلیسرول خالص تحت شوک اسمزی قرار گرفت و مقدار فیکوبیلی پروتئین به‌روش اسپکتروفتومتری در طول موج‌های ۵۶۲، ۶۱۵، ۶۵۲، ۷۵۰ نانومتر خوانده شد و با استفاده از فرمول ۳ محاسبه شد که در آن APC، PC و PE به‌ترتیب مقادیر آلوفیکوسیانین، فیکوسیانین و فیکواریترین برحسب میکروگرم بر میلی‌گرم وزن خشک، A_{562}، A_{615}، A_{652} و A_{750} به‌ترتیب جذب خوانده شده در طول موج‌های ۵۶۲، ۶۱۵، ۶۵۲، ۷۵۰ نانومتر و Dw وزن خشک بر حسب میلی‌گرم بر میلی‌لیتر است.

(۳)

$$\mathrm{APC} = \frac{[1000 \times (A_{652} - A_{750}) - 208 \times (A_{615} - A_{750})]/5.09}{Dw}$$

$$\mathrm{PC} = \frac{[1000 \times (A_{615} - A_{750}) - 474 \times (A_{652} - A_{750})]/5.34}{Dw}$$

$$\mathrm{PE} = \frac{[1000 \times (A_{652} - A_{750}) - 2.41 \times (\mathrm{PC}) - 0.949 \times (\mathrm{AP})]/5.09}{Dw}$$

به‌منظور اندازه‌گیری مقدار فتوسنتز سویه‌ها از دستگاه الکترود کلارک‌تایپ[۴] استفاده شد. با این دستگاه مقدار تصاعد گاز اکسیژن حاصل از فتوسنتز در ۲ میلی‌لیتر سوسپانسیون سیانوباکتریایی در طی ۱ دقیقه برای سویه‌ها در سه تکرار محاسبه شد. مقدار فتوسنتز با استفاده از فرمول ۴ ارائه شده در دستورالعمل دستگاه، برحسب نانومول اکسیژن متصاعد شده بر میلی‌گرم وزن خشک در دقیقه محاسبه شد که در آن O2 اکسیژن متصاعد شده بر حسب نانومول بر میلی‌لیتر و Dw وزن خشک بر حسب میلی‌گرم بر میلی‌لیتر است.

$$\mathrm{Pho} = \frac{126.7}{O_2 \times Dw} \quad (۴)$$

۱. Leganes ۲. Marker ۳. Wyman .4 ۴. Hansatech Instruments

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-03-28]

سنجش آلودگی نفتی

غلظت کل هیدروکربن‌های نفتی (TPH) نمونهٔ خاک مورد جداسازی سویه‌ها به روش گاز کروماتوگرافی اندازه‌گیری شد [۱۳]. برای این منظور ۳ گرم از نمونهٔ مورد آزمایش در ویال‌های درپیچ‌دار ۲۰ میلی‌لیتری با ۵ میلی‌لیتر n-هگزان به‌مدت ۲۴ ساعت در تاریکی و روی شیکر (۱۵۰ دور در دقیقه) عصاره‌گیری شد. عصاره‌های هیدروکربنی حاصل پس از صاف و خشک شدن، با دستگاه گاز کروماتوگراف هولت-پکارد[۱] مجهز به دتکتور فلیم یونیزیشن[۲] آنالیز شدند. ستون استفاده شده HP-5 و گاز حامل H_2 با فشار ۷/۵ psi و جریان ۱/۸ ml/min است. برنامهٔ دمایی دستگاه عبارت است از ۴۰ درجهٔ سانتی‌گراد به‌مدت ۳ دقیقه، سپس افزایش دما به مقدار ۳۰ ℃/min تا دمای ۳۰۰ ℃ و در این دما به‌مدت ۱۰ دقیقه نگه‌داری شد. مقدار TPH در نمونه‌ها با اندازه‌گیری سطح زیر پیک نمودار حاصل از دقیقه ۳ تا ۱۲ در مقایسه با منحنی کالیبراسیون استاندارد محاسبه شد.

آنالیزهای آماری

برای مقایسهٔ میانگین‌ها از آنالیز وان وی آنوا[۳] استفاده شد. آنالیزهای آماری با نرم‌افزارهای SPSS 18.0.0 و اکسل MS ۲۰۰۷ انجام گرفت.

نتایج

در این بررسی به‌ترتیب ۵ و ۶ نمونهٔ سیانوباکتریایی جدا شده از سویه‌های آلوده و غیرآلوده به مواد نفتی به صورت تصادفی انتخاب شدند. جدول ۱ مشخصات این سویه‌ها را به‌همراه غلظت کل هیدروکربن‌های نفتی (TPH) در نمونهٔ خاک مورد جداسازی، نشان می‌دهد. آنالیز آماری اختلاف معنی‌داری را ($p<۰/۰۵$) در مقدار TPH سویه‌های منطقهٔ آلوده به مواد نفتی و منطقهٔ غیرآلوده به مواد نفتی، نشان داد.

جدول ۱. سویه‌های سیانوباکتریایی مورد استفاده به تفکیک محل جداسازی

سویه‌های جدا شده از میکروفلور سیانوباکتریایی مناطق آلوده به مواد نفتی		سویه‌های جدا شده از میکروفلور سیانوباکتریایی مناطق غیرآلوده به مواد نفتی	
نام سویه	TPH در نمونه خاک Ppm	نام سویه	TPH در نمونه خاک Ppm
Phormidium tenue ISC24	516	*Fischerella ambigua* ISC4	7
Leptolyngbya sp. ISC25	516	*Calothrix* sp. ISC11	13
Nostoc sp. ISC62	2714	*Microchaete* sp. ISC13	13
Phormidium sp. ISC27	178	*Nostoc* sp. ISC17	4
Nostoc entophytum ISC32	178	*Chroococcus minutus* ISC35	16
		Leptolyngbya sp. ISC38	22

میزان رشد سویه‌های مختلف بررسی شده در جدول ۱ نشان داده شده است. چنان‌که در جدول دیده می‌شود، بالاترین میزان رشد در نمونه‌های غیرآلوده مربوط به نمونهٔ *نوستوک*[۱] sp. ISC17 و در نمونه‌های آلوده مربوط به نمونهٔ *نوستوک اینتوفیتیم*[۲] ISC32 است؛ ولی در کل میانگین میزان رشد در سویه‌های جدا شده از مناطق آلوده نسبت به سویه‌های جدا شده از مناطق غیرآلوده بیش‌تر است. در بررسی اثرات مقدار رشد سویه‌های منطقهٔ غیرآلوده و آلوده تفاوت معنی‌داری در سطح ۱ درصد مشاهده شد.

۱. Hewlett-Packard GC 5890 Series II ۲. flame ionization ۳. One Way ANOVA
۴. *Nostoc* ۵. *Nostoc entophytum*

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-03-28]

در بررسی مقدار کلروفیل سویه‌های جداشده از مناطق غیرآلوده و آلوده به نفت تفاوت معنی‌داری در سطح ۵ درصد دیده شد و بیش‌ترین مقدار کلروفیل مربوط به سویهٔ *کروکوس مینیتوس*[۳] ISC35 با ۱/۳۷ میکروگرم کلروفیل در میلی‌گرم وزن خشک از سویه‌های جدا شده از مناطق غیرآلوده بود. هم‌چنین کم‌ترین مقدار کلروفیل با ۰/۲۹ میکروگرم کلروفیل در میلی‌گرم وزن خشک مربوط به سویهٔ *نوستوک* sp. ISC62 از سویه‌های جدا شده از مناطق آلوده به نفت بود. در کل میانگین کلروفیل در سویه‌های جدا شده از مناطق غیرآلوده به نفت نسبت به سویه‌های جدا شده از مناطق آلوده بیش‌تر بود (جدول ۲).

آنالیز آماری تفاوت معنی‌داری را در سطح ۵ درصد در مقدار فتوسنتز حاصل از سویه‌های جداشده از مناطق آلوده و غیرآلوده به نفت نشان داد. بیش‌ترین مقدار فتوسنتز متعلق به سویه *لپتولیگبیا*[۴] sp. ISC38 با ۰/۴۱ نانومول اکسیژن متصاعد شده بر میلی‌گرم وزن خشک در دقیقه از سویه‌های مناطق غیرآلوده و کم‌ترین مقدار فتوسنتز متعلق به سویهٔ *نوستوک اینتوفیتیم ISC32* با ۰/۰۵ نانومول اکسیژن متصاعد شده بر میلی‌گرم وزن خشک در دقیقه از سویه‌های مناطق آلوده به نفت بود. هم‌چنین میانگین فتوسنتز در سویه‌های جداشده از مناطق غیرآلوده بیش‌تر از مناطق آلوده به نفت بود (جدول ۲).

در بررسی مقدار رنگیزه‌های فیکوبیلی‌پروتئینی تفاوت معنی‌داری در سطح ۵ درصد، در هیچ‌یک از رنگیزه‌های آلوفیکوسیانین، فیکواریترین و فیکوسیانین مشاهده نشد (جدول ۲). با وجود این در کل، میانگین رنگیزه‌ها سویه‌های جداشده از مناطق غیرآلوده بیش‌تر از سویه‌های جداشده از مناطق آلوده به نفت بود. بیش‌ترین مقدار رنگیزه آلوفیکوسیانین و فیکواریترین مربوط به نمونهٔ *میکروشیت*[۵] sp. ISC13 به‌ترتیب با مقادیر ۳/۲۱ و ۸/۸۵ میکروگرم بر میلی‌گرم وزن خشک و بیش‌ترین مقدار فیکوسیانین مربوط به نمونهٔ *کالوتریکس*[۶] sp. ISC11 با مقدار ۳/۹۷ میکروگرم بر میلی‌گرم وزن خشک، هر دو از سویه‌های جداشده از مناطق غیرآلوده به نفت است (جدول ۲).

بحث و نتیجه‌گیری

با توجه به اشراف جدیدی که نسبت به‌وجود سیانوباکتری‌ها در میکروفلور مناطق آلودهٔ نفتی در ایران پیدا شده است، سویه‌های سیانوباکتری استفاده شده در این پژوهش از خاک‌های این مناطق جدا گشته است [۲]. حضور این موجودات در مناطق آلودهٔ نفتی حکایت از مقاومت برخی از آن‌ها در مقابل تنش‌های افراطی محیطی دارد. چنان‌که نتایج این تحقیق نشان می‌دهد، سیانوباکتری‌ها با وجود مقدار بسیار زیاد هیدروکربن‌های نفتی حضور خود را در محیط حفظ کرده‌اند. این مشاهدات با تحقیقات سایر پژوهش‌گران مطابقت دارد [۴]، [۵]، [۱۲]. بر این اساس سازوکار بقای آن‌ها به این دلیل است که گرچه جلبک‌های سبز- آبی یا سیانوباکتری‌ها انرژی مورد نیاز خود را از طریق فتوسنتز کسب می‌کنند، با وجود این بسیاری از آن‌ها می‌توانند ترکیبات کربنی آلی را برای رشد هتروتروفی و یا رشد میکسوتروفی در نور استفاده کنند. تجزیهٔ ترکیبات هیدروکربنی نفتی نیز به‌وسیلهٔ سیانوباکتری‌ها در پژوهش‌های متعددی گزارش شده است. زندگی هتروتروفی با این سیانوباکتری‌ها با

۱. *Chroococcus minutus* ۲. *Leptolyngbya* ۳. *Microchaete* ۴. *Calothrix*

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-03-28]

کمک تجزیهٔ زیستی هیدروکربن‌های مختلف و استفاده از آن‌ها به‌عنوان منبع کربن، در طی نسل‌های تکاملی به‌صورت یک ویژگی ژنتیکی درآمده است. همچنین این موجودات قابلیت سازش زیادی نسبت به تغییرات محیطی دارند و به‌راحتی با عوض شدن شرایط می‌توانند سازوکارهای تغذیه‌ای خود را تغییر دهند. از سوی دیگر، آلودگی‌های نفتی ساختار جمعیت میکروبی را دستخوش تغییرات عمیقی می‌کند. در این راستا جمعیت‌های توانمند در هضم هیدروکربن‌ها غالبیت می‌یابند و از سویی سویه‌های حیات وابسته به اکسیژن حذف می‌شوند.

جدول ۲. میزان شاخص‌های فیزیولوژیک سنجش شده در سویه‌های جدا شده از مناطق غیرآلوده و آلودهٔ نفتی، (داده‌ها به شکل میانگین± SE و در سطح ۰/۰۵ > ارائه شده است)

	GR (d^{-1})	Chl (µg. mg dw^{-1})	Pho (nmol o_2. mg $dw^{-1}min^{-1}$)	PBP (µg.mgdw^{-1})			
				APC	PC	PE	T-PBP
Strain/Non-Polluted Regions							
Fischerella ambigua ISC4	۰/۰۴۶±۰/۰۰۳	۰/۸۲۷±۰/۰۷۱	۰/۱۲۰±۰/۰۰۵	۰/۸۵۸±۰/۰۴۶	۱/۹۰۵±۰/۱۷۴	۰/۲۱۹±۰/۰۶۱	۲/۹۸۳±۰/۲۱۲
Calothrix sp. ISC11	۰/۰۷۱±۰/۰۰۳	۰/۵۴۵±۰/۰۱۲	۰/۱۱۸±۰/۰۰۷	۲/۰۵۸±۰/۵۱۷	۳/۹۷۸±۰/۲۰۲	۵/۰۸۹±۰/۲۶۲	۱۱/۱۲۶±۱/۰۵۴
Microchaete sp. ISC13	۰/۰۳۹±۰/۰۰۶	۰/۹۹۵±۰/۰۲۰	۰/۲۵۴±۰/۰۰۵	۳/۲۱۲±۰/۳۹۴	۳/۱۱۳±۰/۴۶۵	۸/۸۴۹±۰/۳۶۳	۱۵/۱۷۵±۰/۱۴۴
Nostoc sp. ISC17	۰/۰۷۹±۰/۰۰۷	۰/۷۲۴±۰/۰۴۵	۰/۲۰۴±۰/۰۰۴	۱/۰۰۶±۰/۲۶۲	۳/۳۳۲±۰/۱۵۸	۴/۶۵۹±۰/۶۱۵	۷/۹۹۸±۰/۸۸۶
Chroococcus minutus ISC35	۰/۰۳۱±۰/۰۰۷	۱/۳۷۵±۰/۰۳۱	۰/۲۴۵±۰/۰۲۳	۰/۸۳۵±۰/۱۸۸	۰/۸۲۰±۰/۳۴۳	۰/۶۸۹±۰/۳۲۴	۲/۳۴۵±۰/۸۵۲
Leptolyngbya sp. ISC38	۰/۰۳۰±۰/۰۰۶	۰/۹۲۰±۰/۰۱۳	۰/۴۱۹±۰/۰۱۶	۰/۰۱۹±۰/۰۳۷	۰/۸۱۳±۰/۱۷۱	۰/۲۱۹±۰/۰۹۹	۱/۰۵۲±۰/۱۹۰
Strain/Polluted Regions							
Phormidium tenue ISC24	۰/۱۰۱±۰/۰۰۲	۰/۶۲۴±۰/۰۲۳	۰/۰۹۰±۰/۰۰۶	۱/۷۱۵±۰/۰۴۰	۳/۸۷۲±۰/۵۶۴	۰/۱۴۳±۰/۰۸۴	۵/۷۳۱±۰/۶۱۶
Leptolyngbya sp. ISC25	۰/۱۰۵±۰/۰۰۷	۰/۵۲۱±۰/۰۲۱	۰/۰۷۶±۰/۰۰۲	۱/۳۵۳±۰/۱۳۴	۳/۳۹۳±۰/۱۶۴	۰	۴/۷۴۷±۰/۱۵۴
Phormidium sp. ISC27	۰/۱۰۰±۰/۰۰۲	۰/۶۵۴±۰/۰۵۵	۰/۱۳۶±۰/۰۰۲	۰/۲۷۴±۰/۱۸۵	۱/۶۰۴±۰/۱۴۱	۰/۲۰۷±۰/۰۶۱	۲/۰۸۶±۰/۳۵۰
Nostoc entophytum ISC32	۰/۱۴۲±۰/۰۰۵	۰/۳۱۷±۰/۰۱۹	۰/۰۵۵±۰/۰۰۳	۰/۳۰۲±۰/۱۷۸	۰/۵۸۲±۰/۲۰۴	۰/۶۸۵±۰/۲۲۵	۱/۵۷۱±۰/۲۲۰
Nostoc sp. ISC62	۰/۱۰۹±۰/۰۰۷	۰/۳۲۹±۰/۰۱۸	۰/۰۷۳±۰/۰۰۲	۱/۴۸۶±۰/۲۶۴	۱/۳۲۴±۰/۲۱۹	۱/۲۸۷±۰/۰۵۹	۴/۰۹۸±۰/۳۲۶

علائم اختصاری:میزان رشد (GR)، مقدار کلروفیل (Chl)،میزان فتوسنتز (Pho)، مجموع فیکوبیلی پروتئین‌ها (PBP)، فیکوبیلی‌پروتئین‌های آلوفیکوسیانین (APC)، فیکوسیانین (PC) و فیکواریترین (PE)، مجموع کل فیکوبیلی پروتئین‌ها (T-PBP).

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-03-28]

در این میان جمعیت گونه‌های اصلی شکل دهندهٔ اکوسیستم مانند سیانوباکتری‌ها به‌عنوان تولیدکنندگان اکسیژن با فرآیند فوتوسنتز به‌شدت متأثر می‌گردند [۱۶]. در بررسی کنونی سویه‌های گزینش شده دارای بیش‌ترین غالبیت در هر یک از میکروفلورها بوده و فراوانی آن‌ها۷۰% ساختار جمعیتی هر یک از میکروفلورها را تشکیل می‌دهد. چنان‌که در گزارش‌های پیشین بیان شده است، جمعیت‌های سیانوباکتریای پویایی بسیاری دارند و غالبیت و فراوانی سویه‌ها بر اساس عمق، شرایط نوری و تغذیه‌ای تغییر می‌یابد. بر اساس بررسی‌های انجام شده مشخص شده است که انتقال میکروفلور سیانوباکتریایی از شرایط طبیعی به شرایط آزمایشگاهی و یا قرارگیری در معرض آلودگی‌های نفتی سبب ایجاد تغییرات شگرفی در جمعیت سیانوباکتریایی در راستای غالبیت سویه‌های رشته‌ای می‌شود. این سویه‌ها در شرایط بحرانی و اختلالات طبیعی زیست محیطی غالبیت یافته و ریایی ساختار جمعیتی سیانوباکتریایی را کاملاً دگرگون می‌سازند و از شرایط طبیعی به شرایط آزمایشگاهی و یا قرارگیری در معرض آلودگی‌های نفتی سبب ایجاد تغییرات شگرفی در جمعیت سیانوباکتریایی در راستای غالبیت نمونه‌های رشته‌ای می‌شود. ویژگی این سویه‌ها، رشد سریع وتولید جوانه‌های زایشی بسیار است [۳]. تفاوت گونه‌ای مشاهده شدهٔ حاضر نیز در راستای تغییر غالبیت سویه‌های حساس به سویه‌های مقاوم، اغلب رشته‌ای و دارای رشد سریع است. بر اساس بررسی انجام شده در شرایط طبیعی قرارگیری درغلظت‌های بیش از ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر نفت خام سبب حذف بسیاری از سویه‌ها و غالبیت سویه‌های مقاوم سیانوباکتریایی می‌شود. در این سویه‌ها نفت خام سبب تغییر زیادی در میزان رشد، فتوسنتز و تثبیت نیتروژن با این ارگانیسم‌ها می‌گردد [۱۴]. از سویی شواهد کنونی نیز مؤید تغییر غالبیت سویه‌های کاملاً اتوتروف به سویه‌های میکسوتروف در محیط آلودهٔ نفتی است. بر اساس گزارش‌های موجود، سیانوباکتری‌هایی که مقاوم به آلودگی‌های نفتی هستند می‌توانند تجزیهٔ ترکیبات نفتی را با اکسیداسیون آن به ترکیبات دارای وزن ملکولی کم‌تر آغاز و یا مولکول‌های غیرقطبی نفتی را به مولکول‌های قطبی با همان وزن مولکولی تبدیل کنند. بر اساس نتایج این گزارش‌ها رشد گونه‌های *لپتولینگبیا*[۱]، *آنابائنا*[۲] و *اوسیلاتوریا*[۳] در حضور ترکیبات نفتی افزایش یافته که بیانگر توانمندی این سیانوباکتری‌ها در مصرف ترکیبات نفتی است. چنین نتایجی در مورد دو نمونهٔ *پرومیدیم شتونوفلیاتس*[۴] نیز پیش از این، گزارش شده است [۵].

بر همین اساس در این پژوهش در شرایط فقدان ترکیبات نفتی در محیط کشت، میانگین میزان رشد در سویه‌های جدا شده از مناطق آلوده نسبت به سویه‌های جدا شده از مناطق غیرآلوده بیش‌تر بود و در بررسی آماری مقدار میزان رشد، تفاوت معنی‌داری در سطح ۵ درصد بین سویه‌های مقاوم و حساس مشاهده شد. میزان رشد مثبت در این تحقیق با نتایج تحقیقات سایر پژوهش‌گران مطابقت دارد [۲۹]. با توجه به یکسان بودن شرایط رشدی، این‌گونه به نظر می‌رسد که این میزان رشد بیش‌تر در سیانوباکتری‌های جدا شده از مناطق آلوده به نفت به‌صورت ویژگی ژنتیکی است.

یعنی سیانوباکتری‌ها به مرور زمان برای سازگاری با شرایط تنشی ایجاد شده، تغییر کرده و این سازگاری

۱. *Leptolyngbya* ۲. *Anabaena* ۳. *Oscillatoria* ۴. *Phormidium chthonoplastes*

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-03-28]

در فرایند تکاملی نیز تبدیل به ویژگی ژنتیکی در آن‌ها شده است. این یافته‌ها با نتایج سایر پژوهش‌گران تطابق دارد. در بررسی‌های موجود در این راستا دو سویهٔ سیانوباکتری *اوسیلاتوریا آگاردهی*[۱] و *آنابنا اسپاریکا*[۲] در معرض نفت خام، میزان رشد افزایش شایان توجهی پیدا کرده است [۱۴]؛ البته بقای ریزجلبک‌ها می‌تواند تا حدی از آلودگی‌ها ادامه یابد و در غلظت‌های بالا به‌علت تخریب سیستم غشایی اثر بازدارندگی نشان داده شده است [۱۵]. علاوه بر این، نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که مقدار رنگیزه کلروفیل در سویه‌های جدا شده از مناطق آلوده نفتی نسبت به مناطق غیرآلوده کاهش نشان می‌دهد، این نتایج نیز با آزمایش‌های سایر محققان مطابقت دارد. تحقیقات نشان داده است که آلایندهای محیطی شامل ترکیبات آلی از قبیل بنزن و تولوئن می‌توانند میزان رشد در سیانوباکتری‌هایی از قبیل *نوستوک ماسکروم*[۳]، *سینکوکوس*[۴] .sp، *آنابنا سیلیندریکا*[۵] و *اسپیرولینا پلانتنسیس*[۶] را در غلظت‌های زیاد کاهش دهند و همچنین سبب غیرفعال شدن فرایندهای حیاتی از قبیل جذب نیترات و فتوسنتز و نیز کاهش مقدار کلروفیل شوند [۱۸]، [۲۹]. در بررسی‌های جدید نیز مشخص شده است که نمونه‌هایی مانند *پورمیدیم*[۷] و *لپتولینگبیا* قابلیت سازگاری رنگیزه‌ای یا به‌عبارتی، (CCA)[۸] را دارا است. در این میان، مقدار کلروفیل a بسیار متغیر و کاملاً وابسته به شرایط فیزیولوژیک و درجهٔ سازگاری نوری نمونه است [۱۹]. ولی به شکل کلی در پژوهش‌های ارائه شده به‌صورت مروری بیان داشته شده است که با افزایش غلظت آلودگی، مقدار رنگیزه‌های فتوسنتزی کاهش می‌یابد. تیمار سویه‌های سیانوباکتریای با غلظت‌های بیش‌تر سبب اثر مهاری روی فتوسیستم II و زنجیره انتقال الکترون می‌شود [۳۰].

در بررسی مقدار رنگیزه‌های فیکوبیلی‌پروتئینی تفاوت معنی‌داری در سطح ۰/۰۵، در هیچ کدام از رنگیزه‌های مناطق آلوده و غیرآلوده مشاهده نشد. این در حالی است که در *پورومیدیم کوریم*[۹] و *میکروکلئوس کتونوپلاستس*[۱۰] دیده شد که مقادیر فیکوبیلی پروتئین‌ها تحت تیمارهای نفتی افزایش نشان می‌دهد [۵]. با توجه به نتایج پژوهش‌های انجام شده بر روی نمونه‌های *پورمیدیم و اوسیلاتوریا* که مقدار فیکواریترین و فیکوسیانین و آلوفیکوسیانین تحت تیمار نفتی بیش از مقدار آن در تیمار شاهد است و در این بررسی، این سویه‌ها جزء سویه‌های بسیار مقاوم به آلودگی‌های نفتی با توانمندی تجزیهٔ آن معرفی می‌گردند [۱۰]، نتایج بررسی کنونی نیز از مطابقت زیادی با بررسی‌های پیشین برخوردار است.

از طرف دیگر میزان فعالیت فتوسنتزی تحت شرایط یک‌سان آزمایشگاهی، در سویه‌های جدا شده از مناطق آلوده به نفت به‌طور معنی‌داری نسبت به سویه‌های جدا شده از مناطق غیرآلوده به نفت کم‌تر است که با نتایج سایر محققان سازگار است [۱۵]، [۱۸]، [۲۹]. تاثیر نفت خام برروی سیستم فتوسنتزی *آنابنا دولیولیم*[۱۱] که یک سیانوباکتری فتوسنتز کننده است نشان می‌دهد که نفت خام تأثیر سمی خود را در مرحله تثبیت CO2، متصاعدسازی O2 و سیستم زنجیره انتقال الکترونی نشان می‌دهد. این نتایج در مورد سایر سیانوباکتری‌های آزاد تثبیت کنندهٔ نیتروژن نیز مشاهده شده است [۱۵]، [۲۷].

۱. *Oscillatoria agardhii* ۲. *Anabaena spharica* ۳. *Nostoc muscorum* ۴. *Synechococcus*
۵. *Anabanea cylindrical* ۶. *Spirulina plantensis* ۷. *Phormidium* ۹. *Phormidium corium*
۱۰. *Microcoleus chthonoplastes* ۱۱. *Anabaena doliolum*

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-03-28]

به‌طور کلی، نتایج نشان می‌دهد که سویه‌های سیانوباکتریایی جدا شده از مناطق آلوده به نفت با افزایش زیست تودهٔ خود، آسیب ناشی از کاهش مقدار فتوسنتز و کلروفیل ناشی از تنش نفت را جبران می‌کنند و در مقابل این تنش مقاومت می‌کنند. این پاسخ منجر به تغییر فلورسیانوباکتریایی به سمت گونه‌های مقاوم و میکسوتروف است که علاوه بر فتوسنتز قادر به استفاده از هیدروکربن‌های نفتی به‌عنوان منبع انرژی است و در نتیجه با غلبه بر افت انرژی ناشی از کاهش فتوسنتز و حتی افزایش بهره‌وری کسب انرژی نسبت به‌گونه‌های مناطق غیرآلوده، انرژی لازم برای رشد و گسترش خود را فراهم سازند.

به‌طور خلاصه، تنوع سیانوباکتریایی مقایسه‌ای مشاهده شده در این منطقه و پویایی شاخص‌های فیزیولوژیک سویه‌ها بیان‌گر پتانسیل جمعیت سیانوباکتریایی درسازگاری زیستی، تغذیه‌ای و رنگیزه‌ای در کیفیت‌های متفاوت محیطی است که سبب تخصصی شدن ساختار جمعیتی و موفقیت در حفظ بقا و پایداری هر یک در شرایط خاص زیستی خود شده است.

تقدیر و تشکر

این پژوهش با حمایت گروه بیوتکنولوژی کشاورزی دانشگاه بین‌المللی امام خمینی و گروه میکروبیولوژی نفت پژوهشکدهٔ علوم پایه کاربردی جهاد دانشگاهی به انجام رسیده است که بدین‌وسیله مؤلفان تشکر و قدردانی خود را ابراز می‌دارند.

منابع

۱. ندا سلطانی، لادن بافته‌چی،شادمان شکروی، *تأثیر هیدروکربن‌های نفتی بر مقدار بقا و رنگیزه‌های سیانوباکتری جدا شده از آبادان*، فصل‌نامه پژوهش‌های علوم گیاهی، جلد ۱، شماره ۹، (۱۳۸۷) ۳۵-۲۹.

۲. ندا سلطانی، شادمان شکروی، م. دزفولیان، لادن بافته‌چی، شیما احسان، نبأ النجار، *بررسی تأثیر آلودگی‌های نفتی بر مقدار رشد و فراوانی ریزجلبک‌های مسجد سلیمان*، دومین همایش ملی میکروبیولوژی کاربردی ایران. دانشگاه تهران (۱۳۸۹).

3. R. M. M. Abed, N. M. D. Safi, J. Köster, D. De Beer, Y. El-Nahhal, J. Rullkötter, and F. Garcia-Pichel, "Microbial diversity of a heavily polluted microbial mat and its community changes following degradation of petroleum compounds", Applied Environment Microbiology, 68 (2002) 1674-1683.
4. R. H. Al-Hasan, D. A. Al-Bader, N. A. Sorkhoh and S. S. Radwan, "Evidence for n-alkane consumption and oxidation by filamentous cyanobacteria from oil-contaminated coasts of the Arabian Gulf", Marine Biology, 130 (1998) 521-27.
5. R. H. Al-Hasan, N. A. Sorkhoh, D. Bader and S. S. Radwan, "Utilization of hydrocarbons by cyanobacteria from microbial mats on oily coasts of the Gulf", Applied Microbiology and Biotechnology, 41 (1994) 615-619.
6. R. A. Andersen, "Algal culturing techniques Elsevier academic press" (2005).
7. P. Arulazhagan, N. Vasudevan and T. I. Yeom, "Biodegradation of polycyclic aromatic

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-03-28]

hydrocarbon by a halotolerant bacterial consortium isolated from marine environment", International Journal of Environmental Science and Technology, 7 (2010) 639-52.

8. R. M. Atlas, N. Bartha, "Microbial Ecology: Fundamental and Applicatipons 3rd Edition edn", Amsterdam: Addison Wesley Longman Publishers (1998).
9. F. Chaillan, M. Gugger, A. Saliot, A. Couté and J. Oudot, "Role of cyanobacteria in the biodegradation of crude oil by a tropical cyanobacterial mat", Chemosphere, 62 (2006) 1574-1582.
10. A. Chavan, S. Mukherji, "Algal-bacterial system for the treatment of hydrocarbon-rich wastewater", In: 3rd Biennial IWA Young Researchers Conference,Water and Environment Management Series, IWA Publishing, London, UK, (2006) 169-176.
11. N. Das, P. Chandran, "Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbon Contaminants: An Overview", Biotechnology Research International, 2011 (2011) 941810.
12. S. K. Dubey, J. Dubey, S. Mehra, P. Tiwari and A. J. Bishwas, "Potential use of cyanobacterial species in bioremediation of industrial effluents", African Journal of Biotechnology Vol. 10(7) (2011) 1125-1132.
13. M. Eriksson, J. O. Ka and W.W. Mohn, "Effects of Low Temperature and Freeze-Thaw Cycles on Hydrocarbon Biodegradation in Arctic Tundra Soil", Applied and Environmental Microbiology, 67 (2001) 5107-12.
14. H. A. Gamila, M. B. M. Ibrahim, And H. H. Abd El-Ghafar, "The role of cyanobacterial isolated Strains in the biodegradation of crude oil", International Journal of Environmental Studies, 60 (5) (2003) 435-444.
15. J.P. Gaur, A. K. Singh, Growth, "Photosynthesis and nitrogen fixation of *Anabaena dolilum* exposed to Assam crude extract", Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 44 (1990) 494-500.
16. M. S. Gogi-Urriza and R. Duran, "The gulf oil spill: We have been here before. Can we learn from the past", Journal of Cosmology, 8 (2010) 2026-2028.
17. R. W. Hunt, S. Chinnasamy and K. C. Das, "The effect of naphthalene-acetic acid on biomass productivity and chlorophyll content of green algae", coccolithophore, diatom, and cyanobacterium Cultures, Applied Biochemistry and Biotechnology, 164 (2011) 1350-65.
18. S. A. Kabli, "Effect of Crude Oil and Naphthalene on the Evolution of Oxygen by Three Species of Marine Algae, The Meteorology", Environment and Arid Land Agriculture, 9 (1998) 137-44.
19. P. Katarzyna, R. M. M. Abed, K. Wendt, L. Charpy, M. Łotocka and S. Golubic, "Opportunistic Cyanobacteria in benthic microbial mats of a tropical lagoon", Tikehau Atoll,

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-03-28]

Tuamotu Archipelago: minor in natural populations, major in Cultures, Fottea, 12(1) (2012) 127-140.

20. F. Leganes, M. E. Sanchez and V. E. Fernandez, "Effect of indoleacetic acid on growth and dinitrogen fixation in cyanobacteria", Plant Cell Physiology, *28* (1987) 529-33.
21. Y. Liang, J. D. V. Nostrand, J. Wang, X. Zhang, J. Zhou and G. Li, "Microarray-based functional gene analysis of soil microbial communities during ozonation and biodegradation of crude oil", Chemosphere, 75 (2009) 193-99.
22. M. Llirs, N. Gaju, T.G. de Oteyza, J.O. Grimalt, I. Esteve and M. Martínez-Alonso, "Microcosm experiments of oil degradation by microbial mats. II. The changes in microbial species", Science of The Total Environment, 393 (2008) 39-49.
23. A. F. H. Marker, "The use of actone and methanol in the estimation of chlorophyll in the presence of phaeophytin", Freshwater Biology, 2 (1972) 361-85.
24. k. Ranjitha, B. D. Kaushik, "Purification of phycobiliproteins from *Nostoc muscorum"*, Journal of Scientific and Industrial Research, 64 (2005) 372-75.
25. O. Sánchez, E. Diestra, I. Esteve and J. Mas, "Molecular Characterization of an Oil-Degrading Cyanobacterial Consortium", Microbial Ecology, 50 (2005) 580-88.
26. O. Sánchez, I. Ferrera, N. Vigués, T. G. d. Oteyza, J. Grimalt and J. Mas, "Role of cyanobacteria in oil biodegradation by microbial mats", International Biodeterioration & Biodegradation, 58 (2006) 186-95.
27. A. K. Singh and H. D. Kumar, "Inhibitory effect of petroleum oil on photosynthetic Electero transport system in the cyanobacterium *Anabaono doliolum"*, Bullton of Environment contamination toxicology, 47 (1991) 890-895.
28. B. Soni, B. Kalavadia, U. Trivedi and D. Madamwar, "Extraction, purification and characterization of phycocyanin from *Oscillatoria quadripunctulata* isolated from rocky shores of Bet-Dwarka", Gujarat, India, Process Biochemistry, 41 (2006) 2017-23.
29. S. Sundaram, K. K. Soumya, "Study of Physiological and Biochemical Alterations in Cyanobacterium under Organic Stress", American Journal of Plant Physiology, 6 (2011) 1-16.
30. S. Sundarman, K. K. Soumya, Ramgopal, J. K. Pandey and A. Rahman, "Impact of organic stress on growth, photosynthetic and physiological responses of some cyanobacterial isolates", Journal of environmental Science and technology, 4(3)(2011) 264-283.
31. M. Wyman, P. Fay, "Underwater light climate and the growth and pigmentation of planktonic blue-green algae (cyanobacteria). I. The influence of light quantity", Proc R Soc Lond [Biol] 227 (1986) 367-80.

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-03-28]