تاریخ چاپ: تابستان ۱۳۹۰

بررسی فلور و تغییرات جمعیت سیانوباکتریایی در طول دورهٔ کشت برنج در ارتباط با pH، EC و دما

محمود ذکایی: دانشگاه فردوسی
ندا سلطانی: پژوهشکدهٔ علوم پایهٔ کاربردی جهاد دانشگاهی
soltani6@yahoo.com
زهره معتمد شریعتی: دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد

چکیده

شناسایی فلور سیانوباکتریایی و بررسی تغییرات جمعیتی آن‌ها در شالیزاری نمونه در کلات از اردیبهشت تا شهریور ۱۳۸۶ در طول دورهٔ رشد برنج با نمونه‌برداری خاک در چهار مرحله صورت گرفت و همراه با آن عوامل فیزیکوشیمیایی مانند EC و pH و دما اندازه‌گیری شد. در مجموع، ۲۳ گونه مربوط به ۸ جنس از ۵ خانواده شناسایی شدند؛ از خانوادهٔ Chroococcaceae جنس‌های *Chroococcus* Nägeli, *Gloeothece* Nägeli, *Aphanothece* Nägeli و از خانوادهٔ Oscillatoriaceae جنس *Oscillatoria* Gomont و از خانوادهٔ Rivulariaceae جنس *Calothrix* C.Agardh و از خانوادهٔ Nostocaceae جنس‌های *Cylindrospermum* Kützing, *Nostoc* Vaucher, *Anabaena* Bory, و از خانوادهٔ Scytonemataceae جنس *Scytonema* C.Agardh . در خصوص نمونه‌های هتروسیست‌دار، فراوان‌ترین گونه‌ها متعلق به جنس*Nostoc* بود. تغییرات pH در ۴ مرحله نمونه‌برداری قلیایی بود و تغییرات معنی‌داری را نشان نداد. تعداد کلنی با pH رابطهٔ مستقیمی نداشت. برخلاف آن EC رابطهٔ مستقیمی با تعداد کلنی را نشان داد. در خصوص دما، بیش‌ترین تعداد کلنی در کم‌ترین دما مشاهده شد.

مقدمه

سیانوباکتری‌ها (جلبک‌های سبزآبی) متعلق به شاخهٔ سیانوفیتا[۱] هستند. در پژوهش‌های سال‌های اخیر، به جلبک‌های خاکزی توجه زیادی شده است [۱۹]. سیانوباکتری‌ها در مزارع برنج به وفور یافت می‌شوند و در حفظ حاصل‌خیزی مزارع برنج از طریق تثبیت نیتروژن حائز اهمیت هستند[۱۱]. نتایج بسیاری از پژوهش‌ها و بررسی‌ها نشان می‌دهد که شالیزار بهترین زیستگاه برای رشد و پرورش سیانوباکتری‌های هتروسیست‌دار است[۴]. تحقیقات تاکسونومیک و اکولوژیک فلور سیانوباکتریایی شالیزارها در کشورهای مختلف صورت

واژه‌های کلیدی: جلبک‌های سبزآبی، شالیزار، خراسان، *Nostoc*.
دریافت ۸۷/۳/۶ پذیرش ۸۸/۸/۲۷

۱. Cyanophyta

[Downloaded from jsci.khu.ac.ir on 2024-04-17]

گرفته است که سابقهٔ بعضی از آن‌ها به بیش از صد سال می‌رسد[۱۹]. با توجه به توان بالقوهٔ سیانوباکتری‌های هتروسیست‌دار در تثبیت ازت اتمسفری، اهمیت این موجودات در تأمین ازت شالیزارها و افزایش محصول برنج که غذای اصلی نیمی از جمعیت جهان است، آشکار می‌شود[۶]. امروزه بیش‌تر جنبه‌های کاربردی سیانوباکتری‌ها به عنوان کود بیولوژیک و تثبیت نیتروژن، موضوع تحقیق است. به این منظور، ابتدا باید سیانوباکتری‌های شالیزار با عناصر موجود در خاک و شرایط آب و هوایی بررسی شوند[۱۱]. فراوانی سیانوباکتری‌ها در مزارع برنج در کشورهای آسیایی که کشت برنج در آن‌ها انجام می‌گیرد، اهمیت زیادی دارد [۱۷]، [۲۱]. با توجه به این‌که عمل تثبیت ازت در سیانوباکتری‌های هتروسیست‌دار در شرایط عاری از اکسیژن انجام می‌شود، غرقابی بودن خاک‌های شالیزار و در نتیجه کاهش اکسیژن، باعث می‌شود تا آنزیم نیتروژناز فعال شود و فعالیت تثبیت نیتروژن در این شرایط به حداکثر برسد [۱۸]. تحقیقات نشان می‌دهد که تثبیت نیتروژن حاصل از سیانوباکتری‌ها پس از رشد و تجزیهٔ سلول‌ها در دسترس برنج قرار می‌گیرد و باعث افزایش محصول برنج می‌شود، به همین دلیل به سیانوباکتری‌ها، کود زنده نیز گفته می‌شود [۹و۸]. رشد و تثبیت سیانوباکتری‌ها در محلی معیّن به شدت تحت تأثیر عوامل فیزیکی و شیمیایی است [۸]. وجود سیانوباکتری‌ها در مناطق معتدل، به‌ویژه در خاک‌های قلیایی و آهکی مرسوم است. بعضی از گونه‌ها از قبیل نوستوک بر روی سطح خاک، قابل رؤیت هستند [۱۳]. نوستوک، کلنی‌های موفقی در تثبیت نیتروژن تشکیل می‌دهد [۱۴].

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری از خاک شالیزاری نمونه با مساحت پانصد مترمربع، از اردیبهشت تا شهریور ۱۳۸۶ (در چهار مرحله در طول دورهٔ کشت برنج) صورت گرفت. این شالیزار در روستای قاباخ حد فاصل مسیر کلات-درگز در۲۷ کیلومتری شمال‌غربی شهر تاریخی کلات نادری در استان خراسان‌شمالی و در فاصلهٔ ۱۴۰ کیلومتری مشهد واقع شده است.

به همین منظور، به طور مشخص ۹ ایستگاه در سه ردیف طولی و عرضی در زمین ایجاد شد. سطح نمونه‌برداری در هر ایستگاه شامل نیم سانتی‌متر فوقانی خاک شالیزار و به شعاع ۱/۲ سانتی‌متر در نظر گرفته شد. مرحلهٔ اول نمونه‌برداری قبل از کاشت نشاء برنج در زمین و مرحلهٔ دوم به هنگام غرقابی مزرعه و در زمان رشد برنج انجام شد. در مرحلهٔ سوم برنج به رشد کامل خود رسید، خوشه تشکیل شد و آماده برداشت بود. مرحلهٔ چهارم اندکی پس از برداشت محصول صورت گرفت.

در هر نمونه‌برداری، خاک در کیسه‌های پلاستیکی زیپ‌دار جمع‌آوری شد و پس از شماره‌گذاری در یخدان قرار گرفت و به آزمایشگاه منتقل شد. از هر نمونه رقت‌های 10^{-1} تا 10^{-6} گرم در لیتر تهیه گردید و از هر رقت

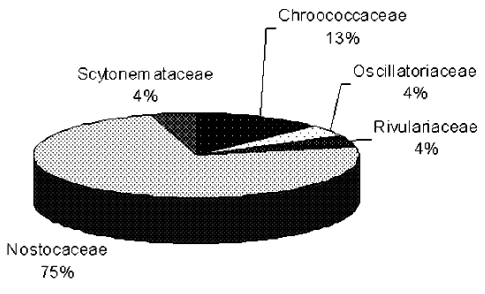
[Downloaded from jsci.khu.ac.ir on 2024-04-17]

یک میلی‌لیتر به پتری دیش حاوی محیط کشت جامد $BG11_0$ تزریق شد؛ پتری‌ها در نور ۳۰۰μ $E/m^2.s$ قرار گرفتند [۱]،[۲]. پس از گذشت یک ماه کلنی‌ها در شکل‌ها و اندازه‌ها و رنگ‌های متنوع مشاهده شدند. در تمامی مراحل نمونه‌برداری، دما و هدایت الکتریکی(EC) و pH با استفاده از ترمومتر جیوه‌ای و EC متر و pH متر هانا[۱] اندازه‌گیری شدند.

برای بررسی پراکنش و تنوع سیانوباکتری‌ها، شمارش کلنی‌های موجود در هر پتری انجام شد. سرانجام، میانگین کلنی‌های شمارش شده در مجموع تمامی ایستگاه‌ها در ۴ مرحله نمونه‌برداری میانگین گزارش شد. برای آنالیز نهایی و مقایسهٔ رابطهٔ بین پراکنش و فاکتورهای فیزیکوشیمیایی مورد بررسی از برنامهٔ کامپیوتری SPSS و از شاخص همبستگی پیرسون استفاده شد.

نتایج

شناسایی نمونه‌ها بر طبق کلیدهای شناسایی پرسکات[۱۵]، دسیکاچاری[۵]، آناند [۱] و استانیر[۲۰] انجام شد. در مجموع ۲۳ گونه مربوط به ۸ جنس از ۵ خانواده سیانوباکتری‌ها شناسایی شدند. خانواده‌های کروکوکوکاسه[۲] و نوستوکاسه[۳] هر کدام با سه جنس و هر کدام از خانواده‌های اوسیلاتوریاسه[۴] و ریولاریاسه[۵] و سایتونماتاسه[۶] با یک جنس معرفی شدند. بیش‌ترین گونه‌ها مربوط به جنس نوستوک[۷] بود (جدول ۱، نمودار ۱). نمودار ۱ درصد فراوانی خانواده‌های مختلف را نشان می‌دهد.



نمودار ۱. درصد فراوانی خانواده‌های مختلف

کم‌ترین و بیش‌ترین مقدار pH در مراحل مختلف نمونه‌برداری به ترتیب ۷/۱۶ و ۷/۸۰ متغیر اندازه‌گیری شد (جدول ۲، نمودار ۱). خاک مورد بررسی در تحقیق حاضر دارای pH قلیایی بوده و در بیش‌ترین pH، تعداد کلنی‌ها اندکی کم‌تر از کم‌ترین مقدار pH اندازه‌گیری شده است به عبارت دیگر، میانگین کلنی‌های شمارش شده در مراحل مختلف نمونه‌برداری حاکی از این است که بیش‌ترین تعداد کلنی با بیش‌ترین pH همخوانی نشان نمی‌دهد (شکل۱).

۱. Hanna مدل hi8428 ۲. Chroococcaceae ۳. Nostocaceae ۴. Oscillatoriaceae
۵. Rivulariaceae ۶. Scytonemataceae ۷. *Nostoc*

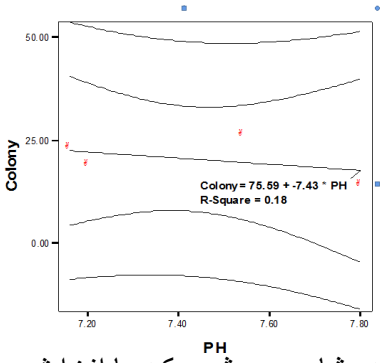
[Downloaded from jsci.khu.ac.ir on 2024-04-17]

جدول ۱. گونه‌های جنس‌های شناسایی شده

Cyanophyta		**Chroococcales**	Chroococcaceae	*Aphanothece* sp. *Gloeothece rupestris* *Chroococcus* sp.
	Hormogonales	Homocystineae	Oscillatoriaceae	*Oscillatoria* sp.
			Rivulariaceae	*Calothrix gloecola* *marchica*
			Scytonemataceae	*Scytonema* sp.
		Heterocystineae	Nostocaceae	*Cylindrospermum stagnale* *Anabaena variabilis* *khannae* *sphaerica* *subcylindrica* *oscillarioides* *gelatinicola* *spiroides* *Nostoc linckia* *verrucosum* *punctiforme* *muscorum* *calcicola* *spongiaeforme* *paludosum* *sphaericum*

جدول۲. pH خاک در مراحل نمونه‌برداری

زمان نمونه‌برداری	تعداد کلنی	pH
مرحله اول	۲۶/۲۲	۷/۵۴
مرحله دوم	۱۳/۸۸	۷/۸۰
مرحله سوم	۱۸/۶۶	۷/۲۰
مرحله چهارم	۲۲/۸۸	۷/۱۶



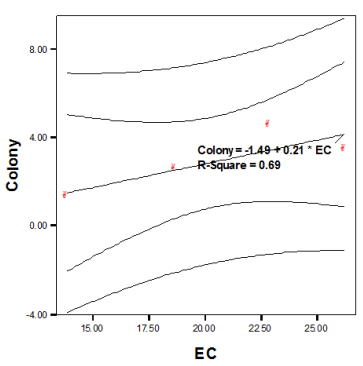
شکل ۱. ضریب هم‌بستگی بین تعداد کلنی‌ها و pH

در بررسی EC خاک نمونه‌برداری شده از مزرعه مشاهده می‌شود که با افزایش مقدار EC، تعداد کلنی‌ها بیش‌تر می‌شود. چنان که در جدول ۳ نشان داده شده است، بیش‌ترین و کم‌ترین مقدار EC به ترتیب ۴/۴۸ و ۱/۲۲ است. مقایسهٔ بیشینه و کمینهٔ تعداد کلنی در مراحل مختلف نمونه‌برداری نشان می‌دهد که مقدار EC با تعداد کلنی‌ها رابطهٔ مستقیم دارد. همچنین ضریب هم‌بستگی میان EC و تعداد کلنی‌ها r=0.828 است که هم‌بستگی قوی میان این دو را نشان می‌دهد (شکل ۲).

[Downloaded from jsci.khu.ac.ir on 2024-04-17]

جدول۳. تعداد کلنی ها و EC در مراحل نمونه‌برداری

زمان نمونه‌برداری	تعداد کلنی	EC(Ds/m)
مرحلهٔ اول	۲۶/۲۲	۳/۳۶
مرحلهٔ دوم	۱۳/۸۸	۱/۲۲
مرحلهٔ سوم	۱۸/۶۶	۲/۴۶
مرحلهٔ چهارم	۲۲/۸۸	۴/۴۸



شکل ۲. ضریب همبستگی بین تعداد کلنی‌ها و EC

دما در چهار مرحلهٔ بررسی، اندازه‌گیری شده و ضریب همبستگی ۰/۵۹۵ = r را با تعداد کلنی نشان می‌دهد (جدول ۴). به‌همین سبب در بیش‌ترین دما، کم‌ترین تعداد کلنی وجود دارد و این همان مرحله غرقابی است؛ ولی در مرحلهٔ بعدی که حدوداً دو ماه از زمان کشت می‌گذرد و سایه‌اندازی برنج در زمین به حداکثر رسیده است، تعداد کلنی‌ها افزایش می‌یابد [۱].

جدول۴. دمای محیط در دورهٔ بررسی

زمان نمونه‌برداری	تعداد کلنی	دما(^{0}C)
مرحلهٔ اول	۲۶/۲۲	۲۸
مرحلهٔ دوم	۱۳/۸۸	۳۵
مرحلهٔ سوم	۱۸/۶۶	۳۰
مرحلهٔ چهارم	۲۲/۸۸	۱۵

بحث

بر اساس نتایج این پژوهش که از اردیبهشت تا شهریور ۱۳۸۶ در شالیزار انتخابی در اطراف کلات انجام گرفت، ۲۳ گونه سیانوباکتری متعلق به ۸ جنس از شاخه سیانوباکتری‌ها شناسایی شد که جنس‌های *Nostoc* و *Anabaena* و *Calothrix* به ترتیب ۹،۷ و ۲ گونه و همچنین جنس‌های *Gloeothece* و *Cylindrospermum* هر کدام ۱ گونه و *Oscillatoria* و *Scytonema* و *Aphanothece* در حد جنس شناسایی شدند. درصد فراوانی خانواده‌های شناسایی شده حاکی از غالب بودن جمعیت Nostocaceae است.

تغییرات EC و جمعیت فلور سیانوباکتریایی ارتباط مستقیمی با هم دارند؛ به‌طوری که با افزایش EC جمعیت سیانوباکتری‌ها در این شالیزار افزایش می‌یابند.

[Downloaded from jsci.khu.ac.ir on 2024-04-17]

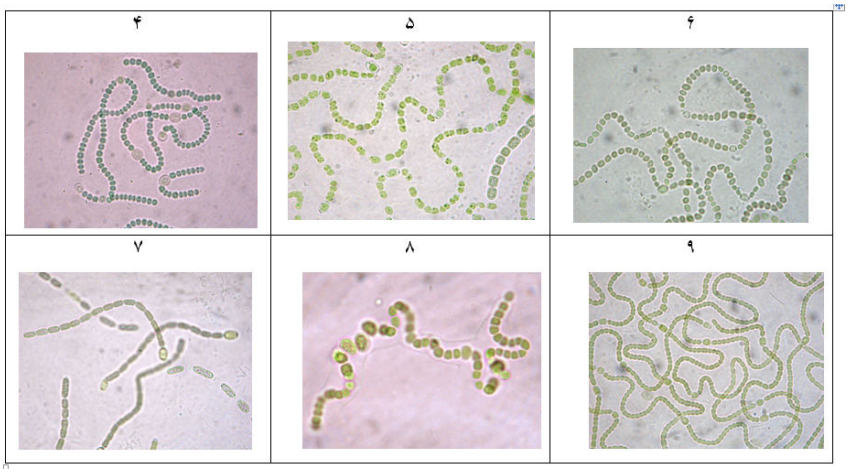
دما از جنبه‌های مختلفی بر حیات جلبک‌ها تأثیر می‌گذارد به‌طوری که دما بر اثر واکنش‌های شیمیایی در محیط مؤثر است و در نتیجه بر متابولیسم و رشد جلبک‌ها تأثیر می‌گذارد. نتایج نشان دادند که جمعیت سیانوباکتریایی با دما نسبت معکوس دارد. در ضمن در مرحلهٔ غرقابی قطر سایه حدود ۱۰ سانتی‌متر اندازه‌گیری شد. در حالی که در مرحلهٔ سوم نمونه‌برداری، تقریباً تمامی خاک در زیر سایه قرار داشت که در همین مرحله نسبت به مرحلهٔ قبلی (غرقابی) جمعیت سیانوباکتریایی افزایش نشان می‌دهد و این مهم تمایل سیانوباکتری‌ها به سایه را نشان می‌دهد.

تغییرات pH روی قابلیت نفوذ غشا با ورود و خروج یون‌ها به سلول‌ها تأثیر می‌گذارد. به این طریق بر قابلیت‌های فیزیولوژیک، از جمله رشد و تولید مثل مؤثر است [۱۰]. pH خاک نقش مهمی در پراکندگی و توزیع جلبک‌ها دارد؛ به طوری که خاک‌های کمی قلیایی و خنثی فلور سیانوباکتریایی غنی دارند. pH ایده‌آل برای رشد مطلوب سیانوباکتری‌ها بین ۶/۵ تا ۸/۵ است[۱۲]. pH شالیزار در تمام مراحل، قلیایی گزارش شد و میان pH و جمعیت سیانوباکتریایی رابطهٔ معنی‌داری به دست نیامد. هر چه مقدار pH از قلیایی به سمت خنثی متمایل می‌شود تعداد کلنی‌های موجود افزایش می‌یابد. غالبیت سیانوفیسه‌ها در خاک‌های قلیایی متمایل به خنثی را آنانتینی[۱] و مارات[۲] در ۱۹۷۲ نشان داده‌اند [۳]. در این تحقیق نیز به نتیجه‌ای مشابه با نظر آن‌ها دست یافتیم. با توجه به نتیجهٔ هم‌بستگی قوی میان EC و تعداد کلنی‌ها (r=0.828) و مقایسه و بررسی این نتیجه با سایر نتایج به‌دست آمده در تحقیقات گذشته، ازجمله هاشم[۳] در ۱۹۹۸[۸] بر روی شالیزارهای بنگلادش و همچنین نتایج آزاریا- تلورگابی[۴] [۷] در ۱۹۹۳ و نیز نتایج کار کواسادا[۵] و همکارانش [۱۶] مطابقت دارد.

به طور کلی، بیش‌ترین جمعیت سیانوباکتری در تحقیق حاضر به جنس‌های هتروسیست دار تعلق داشت که از میان آن‌ها جنس نوستوک سهم بیش‌تریی داشت. تغییرات pH در ۴ مرحلهٔ نمونه‌برداری قلیایی بود و تغییرات معنی‌داری را نشان نداد. تعداد کلنی با pH رابطهٔ مستقیمی نداشت. برخلاف آن EC رابطهٔ مستقیمی با تعداد کلنی را نشان داد. در خصوص دما، بیش‌ترین تعداد کلنی در کم‌ترین دما مشاهده شد.

۱. Ananthni ۲. Marathe ۳. Hashem ۴. Gabby Azaria&Tel-or ۵. Quesada

[Downloaded from jsci.khu.ac.ir on 2024-04-17]



شکل ۳. تصویر میکروسکوپ نوری گونه‌های نوستوک شناسایی شده (×۱۰۰)

1- *Nostoc linckia* (Roth) Bornet ex Born. et Flah., 2- *Nostoc verrucosum* Vaucher ex Born. et Flah., 3- *Nostoc punctiforme* (Kutz.) Harjot, 4- *Nostoc pruniforme* Ag. ex Born. et Flah., 5- *Nostoc muscorum* Ag. ex Born. et Flah., 6- *Nostoc calcicola* Brebisson ex Born. et Flah., 7- *Nostoc spongiaeforme* Agardh ex Born. et Flah., 8- *Nostoc paludosum* kutzing ex Born. et Flah., 9- *Nostoc sphaericum* Vaucher ex Born. et Flah.

منابع

1. N. Anand, Hand book of blue-green algae, Printed by Gajendra singh Gahlot at shiva offset press, India (1990) 173.

2. S. B. Angadi, Cyanobacteria culture media, Available on internet at: http://faculty.clintoncc.suny.edu (1990).

3.Y. S. Ananthni, K. V. Marathe, "Observations on algae of some arid and semi-arid soils of Rajastan", J. Uni. Bombay Sci, Vol. XLI (68) (1972) 88-93.

4. S. G. Bharati, "Floristic studies on soil Algae, A new concept based on physiochemical factors", Perspectives phycology, Today and tomorrows printers and publishers (1990) 411-415.

5. T. V. Desikhachary, Cyanophyta, Indian council of agricultural research publishers (1959) 185-565.

6. G. E. Fogg, W. D. P. Stewart, P. Fay, A. E. Walsby, "The Blue-green Algae", Academic press-London and New York. A subsidiary of Harcourt Brsce Jovanovich publishers (1973) 311-342.

7. R. Gabbay-Azaria, E. Tel-or, "Mechanisms of salt tolerance in cyanobacteria, In: Plant response to the environment", CRC Press, Boca raton (1993).

[Downloaded from jsci.khu.ac.ir on 2024-04-17]

8. M. A. Hashem, "Ecophysiological studies of Cyanobacteria in paddy soils of Bangladesh", Kluwer Academic Publishers, printed in great Britian, 39 (1998) 333-344.

9. G. R. Hegde, S. G. Malammanavar, "Some Noteworthy rice fields algae of Dharwad Karnataka state", Phykos, 27 (1988) 4-7.

10. J. M. Hellawell, "Biological indicators of freshwater pollution and environment management", Elsevier Applied Science, London, (1986) 545.

11. K. Jeong-Dong, L. Choul-Gyun, "Diversity of Heterocystous Filamentous Cyanobacteria (Blue-Green Algae) from Rice Paddy Fields and Their Differential Susceptibility to Ten Fungicides used in korea", J. Microbiol, 16 (2) (2006) 240-246.

12. R. E. Lee, Phycology, Cambridge University Press, NewYork (1989) 645.

13. U. Luttge, B. Budel, E. Ball, F. Strube, P. "Weber Phytosynthesis of terrestrial cyanobacteria under light and desiccation stress as expressed by chlorophyll fluorescence and gas exchange", Journal of Experimental Botany, 46 (3) (2005) 309-319.

14. M. Nilsson, J. Bhattacharya, A. N. Rai, B. Bergman, "Colonization of roots of rice (*Oryza sativa*) by symbiotic *Nostoc* strains", New Physiologist, 156 (2002) 517-525.

15. G. W. Prescott, Algae of western Great Lake area. W. M. C. Brown Company Pub. (1962) 521-550.

16. A. Quesada, E. Fernandez-Valiente, "Relationship between abundance of N_2 fixing cyanobacteria and environmental features of Spanish rice fields", Microb, Ecol. 32 (1996) 59-71.

17. P. A. Roger, S. A. Kulasooriya, Blue-green algae and rice, The international rice research inshtue, Los Banos Laguna, Philippines (1980).

18. S. C Santra, Biology of rice fields blue-green algae, Daya publishing House (1993) 184.

19- J. S. Sardeshpande, S. K. Goyal, "Distributional pattern of blue-green algae in rice fields of Konkan region of maharashtra state, Phykos", 20 (1&2) (1981) 102-106.

20- R. Y. Stanier, G. Cohen-Bazire, "Phototrophic Prokaryotes: The Cyanobacteria", Ann Rev. Microb (1977) 225-274.

21- G. S. Venkataraman, Blue-green algae for rice production food and agricultural organization of The United Nations (1981).

[Downloaded from jsci.khu.ac.ir on 2024-04-17]