فصلنامه علمی- پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها
سال پنجم، شماره ۱۸، تابستان ۱۳۹۵، صفحه ۱۲۸- ۱۱۷
تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۰۵/۱۸ – تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۰۶/۲۱

جداسازی و شناسایی میکروارگانیسم‌های فتوتروف قلعه‌رودخان به‌عنوان یکی از عوامل فرسودگی زیستی

پریسا محمدی *: دانشیار میکروبیولوژی، دانشگاه الزهراء(س)، تهران، ایران، p.mohammadi@alzahra.ac.ir
پریا غلامی‌نژاد: کارشناس ارشد میکروبیولوژی، دانشگاه الزهراء(س)، تهران، ایران، paryagholaminejad@yahoo.com
مرضیه متین‌فر: کارشناس ارشد میکروبیولوژی، دانشگاه الزهراء(س)، تهران، ایران، marzieh.matinfar@yahoo.com
مهناز قلی‌پور شهرکی: کارشناس ارشد میکروبیولوژی، دانشگاه الزهراء(س)، تهران، ایران، mahnaz.gholipour@gmail.com
عزت عسگرانی: دانشیار ژنتیک، دانشگاه الزهراء(س)، تهران، ایران، asgarani@gmail.com

چکیده

مقدمه: میکروارگانیسم‌های فتوتروف از جمله اولین ساکنان سطوح مختلف معدنی و دیوارهای خارجی بناهای باستانی هستند. این دسته از موجودات می‌توانند زمینه رشد را برای میکروارگانیسم‌های دیگر و همچنین تشکیل بیوفیلم‌های میکروبی فراهم کنند. بیوفیلم‌ها ضمن رشد و تولید اسیدها و متابولیت‌های مخرب، به داخل بستر فرو می‌روند و باعث فرسوده‌شدن چنین سطوحی می‌شوند. دژ تاریخی قلعه‌رودخان در استان گیلان در منطقه‌ای با آب و هوای مرطوب واقع شده است و بستر مناسبی برای رشد این دسته از میکروارگانیسم‌ها محسوب می‌شود.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه به شناسایی مورفولوژی جلبک‌ها و سیانوباکتری‌های جداشده از نواحی مختلف دیوارهای آجری قلعه پرداخته شده است. جدایه‌ها از ۲۴ ناحیه مختلف از روی دیوارهای قلعه برداشته و در محیط‌های Blue Green -11 (BG-11) و Bolds Basal Medium (BBM) کشت داده شدند. سپس با استفاده از میکروسکوپ نوری بررسی شدند.

نتایج: ارگانیسم‌های غالب، شامل جنس‌های *Cladophora*، *Trentepohlia*، *Klebsormidium*، *Trebouxia*، *Pleurastrum*، *Chlorococcum* از راسته کلروفیتا *Scytonema*، *Tolypothrix*، *Leptolyngbya*، *Plectolyngbya*، *Phormidium*، *Gloeocapsa*، *Microcoleus*، *Nostoc* از راسته سیانوباکتری‌ها بودند.

بحث و نتیجه‌گیری: همان‌گونه که انتظار می‌رفت تعداد زیاد سیانوباکتری‌ها و جلبک‌های جداشده، وجود تنوع بیوفیلم‌های فتوتروفی را روی سطوح آجری قلعه نشان می‌دهد. تنوع ارگانیسم‌های موجود بر سطح بناهای تاریخی به عوامل مختلفی بستگی دارد که از جمله شرایط آب وهوایی مانند میزان رطوبت، مقدار تابش نور جذب‌شده بر سطح، دمای منطقه و سطح بستر تاریخی، جنس مواد سازندهٔ بستر مطالعه‌شده، میزان پذیرش سطحی مواد تشکیل‌دهنده سطح بستر و تنوع ارگانیسم‌های موجود در خاک و هوای منطقه را می‌توان ذکر کرد. شناخت عوامل مخرب، اولین قدم به‌منظور حفاظت و مرمت آثار باستانی است.

واژه‌های کلیدی: فرسودگی زیستی، قلعه‌رودخان، فتوتروف

* نویسنده مسؤول مکاتبات

Copyright © 2016, University of Isfahan. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/BY-NC-ND/4.0/), which permits others to download this work and share it with others as long as they credit it, but they cannot change it in any way or use it commercially.

مقدمه

سیانوباکتری‌ها و ریزجلبک‌ها از جمله میگروارگانیسم‌های فتوتروف هستند که به دلیل نیازهای غذایی ساده یعنی آب، CO_2، نور و عناصر معدنی به‌عنوان اولین ساکنین انواع بسترهای سنگی، آجری، مرمری و غیره شناخته شده‌اند (۱). جلبک‌ها از نظر فیزیولوژی، ساختار سلولی و نحوه تولیدِمثل با سیانوباکتری‌ها متفاوت هستند؛ اما هردو تقریباً زیستگاه‌های نسبتاً مشابهی را در طبیعت اشغال می‌کنند. اولین تغییر حاصل از رشد میکروارگانیسم‌های فتوتروف روی سطوح، تغییر شکل و رنگ بستر است (۲). این موجودات همچنین زمینه رشد را برای میکروارگانیسم‌های دیگر و تشکیل بیوفیلم‌های میکروبی فراهم می‌کنند. بیوفیلم‌ها ضمن رشد و تولید اسید و متابولیت‌های مخرب، به داخل بستر فرو می‌روند و باعث فرسوده‌شدن این سطوح می‌شوند (۳).

قلعه‌رودخان بنایی تاریخی واقع در شهر فومن استان گیلان است که متعلق به دوره ساسانیان است و از آن زمان تاکنون در معرض آسیب‌های فیزیکی، شیمیایی و زیستی بوده است. شهر فومن دارای اقلیم معتدل و مرطوب، با میانگین دمای سالانه ۱۵/۷ درجه سانتی‌گراد (حداکثر مطلق درجه حرارت ۳۴/۵ درجه سانتی‌گراد و حداقل مطلق ۱- درجه سانتی‌گراد) و میزان بارندگی سالانه ۱۲۷۵ میلی‌متر است. حداکثر میزان رطوبت نسبی این شهر ۹۰درصد گزارش شده است و مقدار آن در هیچ زمانی به کمتر از ۷۰درصد نمی‌رسد (۴). از آنجا که این قلعه در منطقه‌ای با آب‌و هوای مرطوب قرار گرفته است، دیوارهای آن به بستر مناسبی برای رشد ارگانیسم‌های مختلف مانند گیاهان، قارچ‌ها، خزه‌ها و جلبک‌ها تبدیل شده است. از سوی دیگر قسمت اعظم قلعه از آجر ساخته شده و دارای سطوح متخلخل است که میکروارگانیسم‌ها می‌توانند به‌خوبی به درون بستر فرو روند؛ لذا این بنا نسبت به بناهای سنگی آسیب‌پذیرتر است.

شناسایی ارگانیسم‌های فرسوده‌کننده اولین قدم در حفاظت آثار باستانی از فرسودگی زیستی و مرمت است. در این مطالعه به بررسی و شناسایی مورفولوژی سیانوباکتری‌ها و ریزجلبک‌های جداشده از بنای ارزشمند آجری قلعه‌رودخان پرداخته شد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری: نمونه‌برداری در شهریورماه سال ۱۳۹۲ انجام شد. نمونه‌ها از ۲۴ ناحیه از بخش‌های شرقی، غربی و میانی در ارتفاع ۶۶۵ تا ۷۱۵متری سطح دریا و از روی سطح دیوارهای بنا برداشته شد. برای این منظور از تکنیک سوزن استریل استفاده شد تا آسیبی به سطح آجر نرسد. سپس جدایه‌ها به میکروتیوپ‌های استریل منتقل شد.

تکنیک‌های کشت و شناسایی: نمونه‌ها روی محیط‌های کشت جامد BGM-11 [حاوی ترکیبات $NaNO_3$ (1.5 g), $NaHCO_3$ (1.7 g) K_2HPO_4 (31 mg), $MgSO_4 \cdot 7H_20$ (75 mg), $CaCl_2 .H_20$ (36 mg), Na_2CO_3 (20 mg), Citric Acid (6 mg), Ferric Ammonium Citrate (6 mg), EDTA (1 mg) ,H_3BO_3 (2.86 mg) ,$Mn_2Cl_2.4H_20$ (1.81 mg), $ZnS0_4.H_20$ (220 ,ug), $Na_2MoO_4 \cdot 2H_20$ (390 ,g) ,$CUSO_4.H_20$ (80, ug), $CoCl_2.6H_20$ (40 g).

(مرک)] و محیط کشت جامد BBM [حاوی ترکیبات $NaNO_3$ (2.94 mg) ,$CaCl_2.2H_2O$ (0.17 mg) ,$MgSO_4.7H_2O$ (0.3 mg) ,K_2HPO_4 (0.431 mg) ,KH_2PO_4 (0.129 mg) ,NaCl (0.428 mg) ,EDTA (0.171 mg) ,KOH (0.553 mg) ,$FeSO_4.7H_2O$ (0.0179 mg), H_2SO_4 (1 mL) ,H_3BO_3 (0.185mg) ,$ZnSO_4.7H_2O$ (0.03mg) ,$MnCl_2.4H_2O$ (0.0014mg) ,MoO_3 (4.93 µg) ,$CuSO_4.5H_2O$ (6.29 µg) ,$Co(NO_3)_2.6H_2O$ (1.68 µg) (مرک)] تحت شرایط استریل کشت داده شد (۵) و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و تحت روشنایی ۳۵۰۰ لوکس در دوره‌های روشنایی/تاریکی ۸/۱۶ ساعت نگه‌داری شد. جهت جداسازی جدایه‌ها یک هفته گرماگذاری انجام شد. کلنی‌های قابل مشاهده واکشت شد. برخی از جدایه‌ها نیازمند گرماگذاری طولانی‌تری بودند. برای چنین جدایه‌هایی حداکثر به‌مدت ۲ ماه گرماگذاری ادامه یافت تا کلنی‌های قابلِ‌مشاهده تشکیل شود. کشت‌های خالص با استفاده از روش‌های مختلف مانند تهیه رقت‌های متوالی و با افزودن رقت‌های مختلفی از آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین (۰/۲ گرم بر لیتر) و استرپتومایسین (۰/۰۲۴ گرم بر لیتر) به محیط کشت جلبک‌ها و اضافه‌کردن آنتی‌بیوتیک‌های نیستاتین (۰/۱ گرم بر لیتر) و سیکلوهگزامید (۰/۱ گرم بر لیتر) به محیط‌های کشت سیانوباکتری‌ها از پلیت‌های اولیه به دست آمد. ویژگی‌های ریخت‌شناسی جدایه‌ها از قبیل کوکوئیدی یا رشته‌ای‌بودن، وجود انشعابات، نوع انشعاب، توانایی تشکیل هتروسیست و یا آکینت با کمک میکروسکوپ نوری بررسی و عکس‌برداری از جدایه‌ها انجام شد. شناسایی مبتنی بر ریخت‌شناسی جدایه‌ها با استفاده از کلیدهای شناسایی Prescott, et al.1970, Bellinger, et al.2010, Wehr, et al.2003 انجام شد.

نتایج

جنس‌های *Scytonema*، *Tolypothrix*، *Leptolyngbya*، *Phormidium*، *Gloeocapsa*، *Plectolyngbya*، *Microcoleus* و ۳ گونه متفاوت از جنس *Nostoc* متعلق به راسته سیانوباکتری‌ها و جنس‌های *Cladophora*، *Trentepohlia*، *Klebsormidium*، *Trebouxia*، *Pleurastrum*، *Chlorococcum* متعلق به راسته کلروفیتا با روش‌های مورفولوژی شناسایی شدند. برای شناسایی سایر جدایه‌ها نیاز به بررسی‌های مولکولی است. در ادامه ویژگی‌های مورفولوژی جدایه‌ها توصیف می‌شود.

***Tolypothrix*:** تال‌های این ارگانیسم توده‌های پشمی‌شکلی را به وجود می‌آورند و به رنگ سبز-آبی مایل به خاکستری تا زرد و یا قهوه‌ای تیره دیده می‌شوند. تریکوم‌های آن‌ها دارای غلاف محکمی هستند و رشته‌ها انشعاباتی دارند که در جهات مختلف و به‌صورت منفرد از غلاف خارج می‌شوند (اشکال 1-a و 2-a). معمولاً هتروسیست در پایه انشعاب قرار دارد و سلول انتهایی گرد است (۶). اندازه سلول‌ها حدود ۵ تا ۱۴ میکرون است (۷). به نظر می‌رسد که در این جنس هتروسیت منفذ نداشته باشد (۸).

***Plectolyngbya*:** رشته‌ها باریک و کمی خمیده‌اند و دارای انشعابات کاذب هستند. بررسی‌ها نشان می‌دهد که تنها یک تریکوم در غلاف وجود دارد و سلول انتهایی گرد است. در این جنس هورموگونیا مشاهده

می‌شود (اشکال 1-b و 2-b) و عرض تریکوم‌ها ۲/۵-۱ میکرون است (۹).

Scytonema: تال‌های این ارگانیسم توده‌های پشمی‌شکل و دسته‌های نامنظمی را به وجود می‌آورند و به‌رنگ زرد یا قهوه‌ای هستند. تریکوم‌ها دارای غلافی محکم هستند و هتروسیست‌ها منفرد و به‌صورت بینابینی در ردیف‌های تریکوم قرار دارند. رشته‌ها، انشعابات کاذبی تشکیل می‌دهند که به‌صورت جفت از غلاف خارج می‌شوند و به شکل حرف انگلیسی V و گاهی به شکل Y درمی‌آیند (اشکال 1-c و 2-c). رشته‌ها تا انتها به‌صورت استوانه‌ای هستند و سلول‌های انتهایی گرد هستند. هورموگونیا ممکن است در رأس تریکوم به وجود آید (۶ و ۱۰). اندازه سلول‌ها ۸-۶ میکرون است (۱۱).

Phormidium: در این جنس رشته‌ها کمی خمیده‌اند و انشعاب کاذب مشاهده نمی‌شود. غلاف‌ها تحت شرایط خاص محیطی، به‌طور محکم و نازک تشکیل می‌شوند. تریکوم‌ها استوانه‌ای هستند و عرض آن‌ها ۱۱-۲/۵ میکرون است. سلول‌های انتهایی نوک‌تیز و یا گرد، دارای کلاهک و یا بدون کلاهک هستند (اشکال 1-d و 2-d). این ارگانیسم هورموگونیا تشکیل می‌دهد (۶ و ۱۲).

Leptolyngbya: تریکوم ها، قطبی و دارای اندازه برابر[1] هستند و معمولاً بدون انشعاب‌اند. غلاف محکمی تریکوم‌ها را احاطه کرده است. هورموگونیا درآن مشاهده می‌شود. این نوع سیانوباکتری هتروسیست تشکیل نمی‌دهد (اشکال 1-e و 2-e). اندازه سلول‌ها بین ۳-۰/۵ میکرون است و سلول‌های انتهایی گرد هستند (۱۳ و ۱۴).

Nostoc: تال‌های میکروسکپی و ماکروسکوپی ژلاتینی در این ارگانیسم تشکیل می‌شود. تریکوم‌ها همه یک شکل‌اند و انشعاب کاذب در آن مشاهده نمی‌شود و به شکل یک کلنی مخاطی محکم با حاشیه مشخص دیده می‌شود (۱۵). غلاف موسیلاژی، محکم و پهن است و گاهی به‌رنگ زرد یا قهوه‌ای مشاهده می‌شود. سلول‌های این ارگانیسم کروی یا خمره‌ای‌شکل است و به‌رنگ سبز-آبی یا سبز-زیتونی دیده می‌شود. هتروسیست‌ها نیز کروی و یا خمره‌ای‌شکل هستند و در انتهای آن و یا در میان تریکوم‌ها قرار دارند. آکینت‌ها بیضی‌شکل و کمی از سلول‌های رویشی بزرگ‌تر هستند و در ردیف‌هایی بین هتروسیست‌ها به وجود می‌آیند. مورفولوژی کلنی در مراحل مختلف رشد تغییر می‌کند (شکل‌های 1-f,g,h و 2-f,g,h). طول و عرض سلول‌ها ۵-۲ میکرون است (۱۶ و ۱۷).

Microcoleus: رشته‌ها در این ارگانیسم داخل غلاف‌های محکم و بی‌رنگ به‌صورت متراکم و یا به‌موازات هم قرار دارند و در انتها نازک می‌شوند. در این ارگانیسم انشعاب کاذب مشاهده نمی‌شود (اشکال 1-i و 2-i). سلول‌ها، استوانه‌ای‌شکل و دارای محتوای گرانولی‌اند و تیلاکوئیدها، درون آن‌ها به‌صورت شعاعی قرار می‌گیرند (۶ و ۱۲).

Gloeocapsa: سلول‌های این ارگانیسم در بررسی‌های میکروسکوپی معمولاً کروی دیده می‌شوند و لایه‌های سلولی در یک بستر ماکروسکوپی ژلاتینی قرار دارند

(۱۸). سلول‌های کروی پس از تقسیم سلولی، به شکل نیم‌کره دیده می‌شوند و به‌رنگ سبز-آبی یا سبز-زیتونی دیده می‌شوند (اشکال j-1 و j-2) و قطری معادل ۶-۰/۷ میکرون دارند (۶).

***Cladophora*:** رشته‌ها دارای انشعاباتی هستند که بلافاصله از زیر دیواره عرضی منشأ می‌گیرند. سلول‌ها، استوانه‌ای یا خمره‌ای‌شکل‌اند و دارای کلروپلاست جانبی یا شبکه‌ای متشکل از تعداد زیادی هسته سلولی (اشکال k-1 و k-2) و پیرنوئید[۲] هستند (۱۱ و ۱۹).

***Klebsormidium*:** سلول‌ها از ابتدا تا انتهای رشته مشابه یکدیگر هستند و به‌صورت استوانه‌ای و یا دانه‌ای‌شکل دیده می‌شوند. دیواره‌ها نازک یا ضخیم‌اند و گاهی دیواره عرضی را قطعات H شکلی احاطه کرده است (۶). کلروپلاست‌های جانبی، دیسکی یا بیضی‌شکل‌اند و حدود ۵۰درصد حجم سلول را شامل می‌شود (اشکال l-1 و l-2) و معمولاً تنها یک پیرنوئید دارد. عرض رشته‌ها ۸-۶ و طول سلول‌ها ۱۵-۸ میکرون است (۲۰).

***Trentepohlia*:** رشته‌های این ارگانیسم دارای انشعابات کاذب هستند که انتهای انشعابات اغلب باریک می‌شود. گامتانژیوم‌ها همیشه در انتها قرار دارند. معمولاً سلول‌های محور اصلی، استوانه‌ای‌شکل و سلول‌های انشعابات آن به‌صورت گرد و متورم است. همچنین کلروپلاست‌ها نواری‌شکل یا دیسک‌مانند هستند (اشکال m-1و m-2). عرض سلول‌ها ۳۰-۱۰ و طول آن‌ها به ۴۰-۱۵ میکرون می‌رسد (۶ و ۲۱).

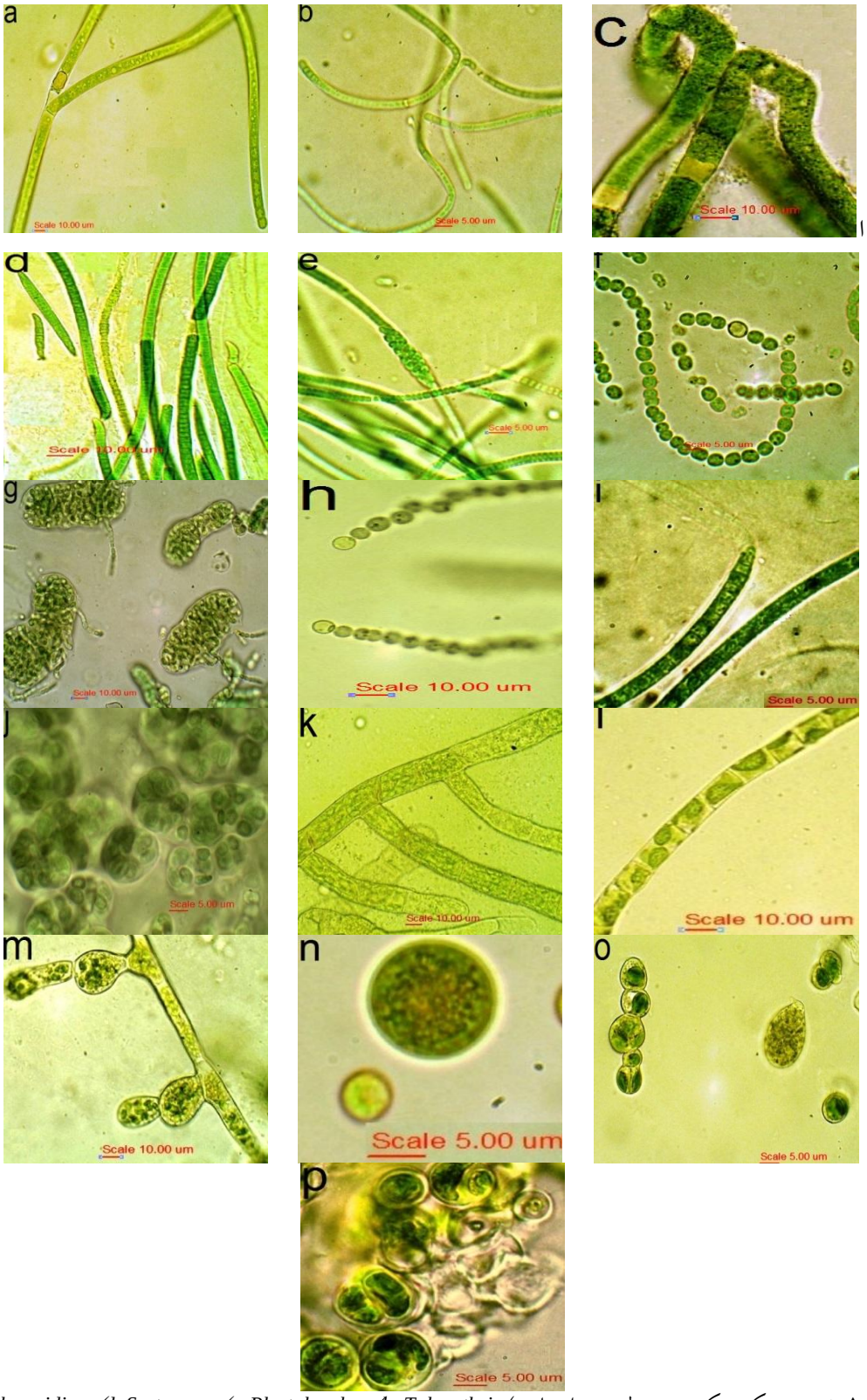
***Trebouxia*:** سلول‌های این ارگانیسم کروی یا بیضی‌شکل و تک‌هسته‌ای‌اند و اندازه آن‌ها ۱۶-۱۰ میکرون است. کلروپلاست‌ها ستاره‌ای‌شکل و یا شعاعی هستند وحاوی تعداد زیادی پیرنوئید هستند (اشکال n-1 و n-2). این ارگانیسم به شکل هم‌زیست با گلسنگ زندگی می‌کنند (۲۲ و ۲۳).

***Pleurastrum*:** سلول‌های این ارگانیسم اغلب کروی‌اند و دارای کلروپلاست جانبی هستند. سلول‌ها رشته‌های کوتاهی را تشکیل می‌دهند. تعداد زیادی آپلانوسپور کروی در داخل اسپورانژیوم‌ها قرار دارند. این جلبک‌ها از نظر بوم‌شناسی روی گیاهانی مانند خزه‌ها رشد می‌کنند (اشکال o-1 و o-2).

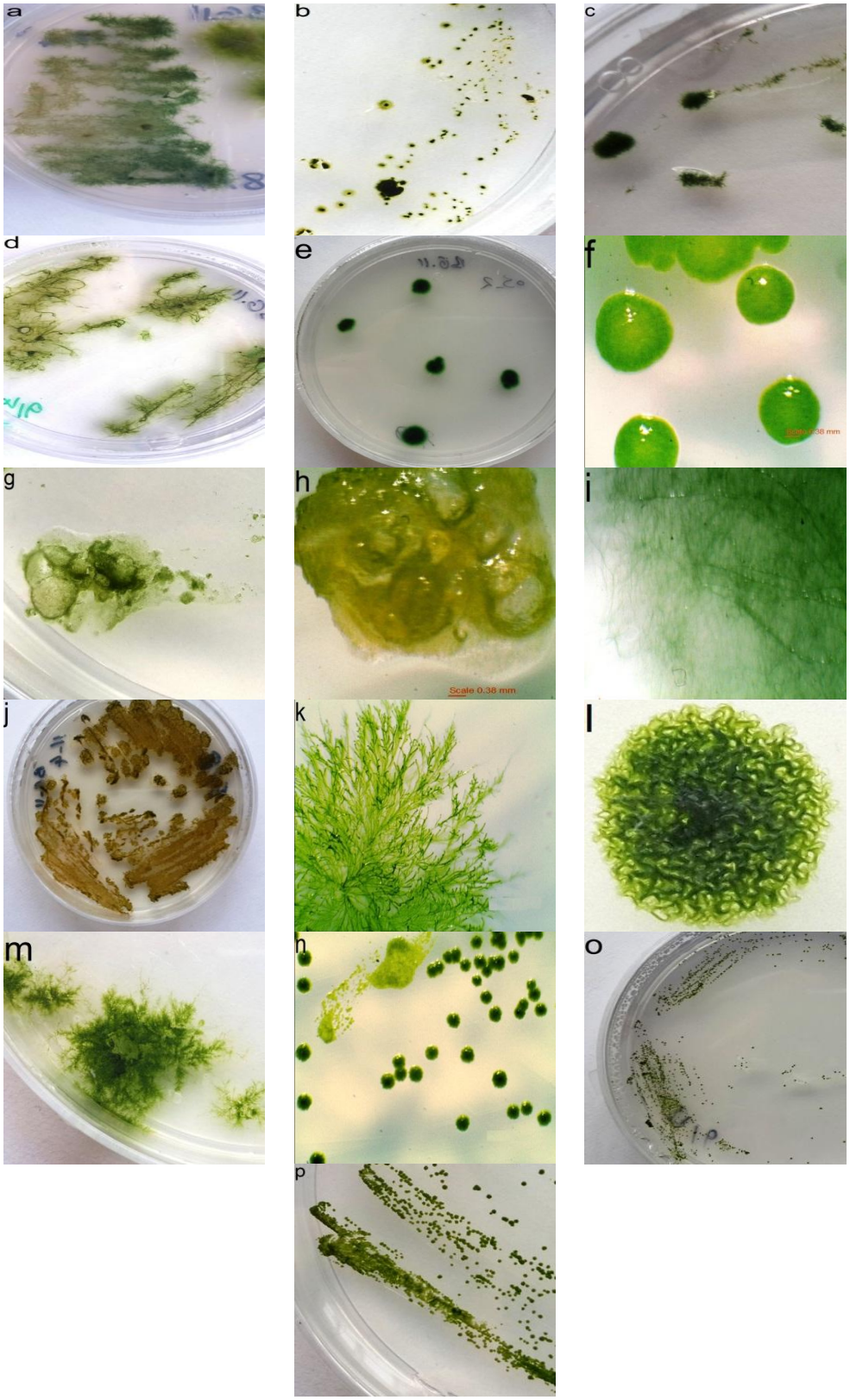
***Chlorococcum*:** سلول‌های این ارگانیسم‌ها گاهی به‌صورت گروهی دیده می‌شوند و کلنی‌های موسیلاژی تولید می‌کنند. کلروپلاست فنجانی‌شکل و جانبی هستند (اشکال p-1 و p-2) و هر سلول تنها یک پیرنوئید تشکیل می‌دهد (۶ و ۲۴). فراوانی جدایه‌های به‌دست‌آمده در این مطالعه به قرار زیر است:

۸/۳درصد *Scytonema*، ۵/۵درصد *Tolypothrix*، ۲۲/۲درصد *Leptolyngbya*، ۵/۵درصد *Phormidium*، ۲/۷درصد *Gloeocapsa*، ۲/۷درصد *Plectolyngbya*، ۲/۷درصد *Microcoleus*، ۸/۳درصد *Nostoc*، ۱۱/۱۱درصد *Cladophora*، ۲/۷درصد *Trentepohlia*، ۱۶/۶درصد *Klebsormidium*، ۲/۷درصد *Trebouxia*، ۲/۷درصد *Pleurastrum*، ۲/۷درصد *Chlorococcum*، ۲/۷درصد *Phormidium*.

رده بندی جدایه ها و ویژگی های مورفولوژی آن‌ها در جدول ۱ توضیح داده شده است.



شکل ۱- تصویر میکروسکوپی مربوط به جدایه‌ها- a) *Tolypothrix*؛ b) *Plectolyngbya*؛ c) *Scytonema*؛ d) *Phormidium*؛ e) *Leptolyngbya*؛ f,g,h) *Nostoc*؛ i) *Microcoleus*؛ j) *Gloeocapsa*؛ k) *Cladophora*؛ l) *Klebsormidium*؛ m) *Trentepohlia*؛ n) *Trebouxia*؛ o) *Pleurastrum*؛ p) *Chlorococcum*



شکل ۲- تصویر ماکروسکپی کلنی جدایه‌ها; a) *Tolypothrix*؛ b) *Plectolyngbya*؛ c) *Scytonema*؛ d) *Phormidium*؛ e) *Leptolyngbya*؛ f,g,h) *Nostoc*؛ i) *Microcoleus*؛ j) *Gloeocapsa*؛ k) *Cladophora*؛ l) *Klebsormidium*؛ m) *Trentepohlia*؛ n) *Trebouxia*؛ o) *Chlorococcum*؛ p) *Pleurastrum*

جدول ۱- رده‌بندی جدایه‌ها و مشخصات آن‌ها

جنس	خانواده	مشخصات
Tolypothrix	Tolypothrichaceae	سیانوباکتری رشته‌ای منشعب غلاف‌دار، تشکیل‌دهنده هتروسیست). اندازه سلول‌ها حدود ۱۴–۵ میکرون (شکل 1a و 2a)
Plectolyngbya	Leptolyngbyaceae	سیانوباکتری رشته‌ای منشعب غلاف‌دار، فاقد هتروسیست، عرض تریکوم‌ها ۲/۵-۱میکرون (شکل 1b و 2b)
Scytonema	Scytonemataceae	سیانوباکتری رشته‌ای منشعب غلاف‌دار، تشکیل‌دهنده هتروسیست، اندازه سلول‌ها حدود ۸-۶ میکرون (شکل 1c و 2c)
Phormidium	Oscillatoriaceae	سیانوباکتری رشته‌ای بدون انشعاب غلاف‌دار، فاقد هتروسیست، عرض تریکوم‌ها ۲/۵-۱۱میکرون، سلول انتهایی نوک‌تیز (شکل 1d و 2d)
Leptolyngbya	Leptolyngbyaceae	سیانوباکتری رشته‌ای بدون انشعاب، غلاف‌دار، فاقد هتروسیست، اندازه سلول‌ها حدود ۳-۰/۵ میکرون (شکل 1e و 2e)
Nostoc	Nostocaceae	سیانوباکتری رشته‌ای بدون انشعاب، دارای غلاف موسیلاژی، تشکیل‌دهنده هتروسیست، اندازه سلول‌ها حدود ۵-۲ میکرون (شکل‌های 1f,g,h و 2f,g,h).
Microcoleus	Microcoleaceae	سیانوباکتری رشته‌ای بدون انشعاب، غلاف‌دار، فاقد هتروسیست (شکل 1i و 2i)
Gloeocapsa	Microcystaceae	سیانوباکتری کوکوئیدی در یک بستر موسیلاژی، قطر سلول‌ها معادل ۶-۰/۷ میکرون (شکل 1j و 2j)
Cladophora	Cladophoraceae	جلبک سبز رشته‌ای منشعب، دارای کلروپلاست جانبی یا شبکه‌ای، دارای تعداد زیادی هسته سلولی و پیرنوئید (شکل 1k و 2k)
Klebsormidium	Klebsormidiaceae	جلبک سبز رشته‌ای بدون انشعاب، دارای کلروپلاست جانبی یا دیسکی‌شکل، دارای یک پیرنوئید در هر سلول (شکل 1l و 2l)
Trentepohlia	Trentepohliaceae	جلبک سبز رشته‌ای منشعب، دارای کلروپلاست نواری یا دیسک‌شکل، عرض سلول‌ها ۳۰-۱۰ و طول آن‌ها ۴۰-۱۵ میکرون (شکل 1mو 2m)
Trebouxia	Trebouxiaceae	جلبک سبز وکوکوئیدی، کلروپلاست ستاره‌ای یا شعاعی‌شکل، اندازه سلول‌ها ۱۶-۱۰ میکرون (شکل1n و 2n)
Pleurastrum	Pleurastrum	جلبک سبز، دارای سلول‌های کروی با کلروپلاست جانبی(شکل 1o و 2o)
Chlorococcum	Chlorococcaceae	جلبک سبز کوکوئیدی، دارای کلروپلاست فنجانی‌شکل، دارای کلنی موسیلاژی (شکل 1p و 2p)

بحث و نتیجه‌گیری

همان‌گونه که انتظار می‌رفت وجود تعداد زیاد سیانوباکتری‌ها و جلبک‌های جداشده، تنوع بیوفیلم‌های فتوتروفی را روی سطوح آجری قلعه نشان می‌دهد. در این میان جلبک‌ها و سیانوباکتری‌های رشته‌ای که می‌توانند به‌راحتی درون حفرات آجر فرو روند و باعث فرسودگی شوند بیشتر مشاهده شد. طبق مطالعات انجام‌شده جلبک‌های کوکوئیدیی مانند *Gloeocapsa* فعالیت‌های فرسوده‌کننده‌ای دارند و با تولید اسیدهای مختلف و متابولیت‌های ترشح‌شده موجب انحلال بستر می‌شوند. حضور غلاف مشخص در این ارگانیسم‌ها امکان اتصال این موجودات را بر بستر و تشکیل ساختارهای بیوفیلمی تشدید می‌کند.

فراوانی جدایه‌ها محاسبه شد. فراوانی بالای

جنس‌های *Leptolyngbya*، *Nostoc* و *Scytonema* می‌تواند به‌دلیل وجود غلاف ژلاتینی باشد که موجب چسبیدن بهتر این ارگانیسم‌ها به سطوح می‌شوند. بررسی‌ها نشان می‌دهد که جنس‌های *Cladophora* و *Klebsormidium* توانایی رشد بهتری در محیط‌های مرطوب دارند.

کریسپیم[3] و همکاران در سال ۲۰۰۲ تنوع فتوتروف‌های جداشده از بسترهای طبیعی را با بسترهای ساخته دست بشر مقایسه کردند. آن‌ها جدایه‌هایی را از کلیسای شهر پرتوآلگر[4] برزیل واقع در منطقه‌ای با آب‌وهوای مرطوب، جدا کردند. بسترهای طبیعی مربوطه از جنس سنگ آهک و بسترهای مصنوعی از جنس سیمان و ساروج بودند. آنان نشان دادند که تنوع چنین ارگانیسم‌هایی روی بسترهای مصنوعی بیشتر است و این می‌تواند به‌دلیل وجود حفرات و خلل و فرج بیشتر در بسترهای مصنوعی باشد که در نتیجه آن، آب بیشتری به‌درون بسترها نفوذ می‌کند و زمینه تثبیت بهتر میکروارگانیسم‌ها را فراهم می‌کند(۲۵).

ایشان همچنین در سال ۲۰۰۴ فتوتروف‌های *Klebsormidium*، *Gloeocapsa*، *Leptolyngbya*، *Trentepohlia*، *Nostoc*، *Scytonema*، *Synechocystis*، *Lyngbya*، *Plectonema*، *Mastigocladus*، *Pleurocapsales*، *Oscillatoria*، *Calothrix* را از بیوفیلم‌های سطوح آجری ۶ کلیسای این شهر جداسازی کردند (۳). طی بررسی انجام‌شده جنس‌های *Klebsormidium*، *Gloeocapsa*، *Leptolyngbya*، *Trentepohlia*، *Nostoc*، *Scytonema* از قلعه‌رودخان نیز جدا شد که دلالت بر شباهت شرایط آب‌وهوایی دو منطقه دارد.

کوماری[5] و همکاران نیز در سال ۲۰۰۸ جنس‌های مشابهی نظیر *Phormidium*، *Gloeocapsa*، *Leptolyngbya*، *Nostoc*، *Scytonema*، *Klebsormidium*، *Trebouxi*، *Chlorococcum* را از آثار باستانی متعدد ساخته‌شده از آجر و سنگ واقع در مناطق مختلفی از هند با آب‌وهوای گرم و مرطوب جدا کردند (۲۶). البته تنوع ارگانیسم‌های موجود بر سطح بناهای تاریخی به عوامل مختلفی بستگی دارد از جمله: شرایط آب‌هوایی مانند میزان رطوبت، مقدار تابش نور جذب‌شده بر سطح، دمای منطقه، جنس مواد سازندهٔ بستر مطالعه‌شده، میزان پذیرش سطحی مواد تشکیل‌دهنده سطح بستر و تنوع ارگانیسم‌های موجود در خاک و هوای منطقه. به نظر می‌رسد که اگرچه میکروارگانیسم‌ها به‌راحتی می‌توانند شهرها و سرزمین‌ها را درنوردند ولی خاک منطقه می‌تواند منشأ اصلی این موجودات در سطح بنا باشد. شناخت عوامل فرسودگی زیستی کمک خواهد کرد که روش‌های مناسب فیزیکوشیمیایی و یا زیستی را جهت حذف و یا کنترل این عوامل مخرب انتخاب کند.

تشکر و قدردانی

نویسندگان بر خود واجب می‌دانند از کارشناس آزمایشگاه سرکار خانم یوسفی به‌دلیل کمک‌های تکنیکی و همکاری‌های لازم در انجام آزمون‌ها تشکر کنند.همچنین از سرپرست وقت پژوهشکده باستان‌شناسی پژوهشگاه میراث، جناب آقای سیامک سرلک به‌دلیل انجام هماهنگی‌های لازم و مدیریت محترم سایت قلعه‌رودخان، جناب آقای شهرام رامین که امکان نمونه‌برداری و همیاری با همکاران را معمول داشته‌اند تقدیر می‌شود. این طرح با حمایت معاونت محترم پژوهشی دانشگاه الزهراء(س) و در آزمایشگاه ملی میکروبیولوژی صنعتی انجام شد.

References

(1) Albertano P., BrunoL., Ottavi DD., Moscone D., Palleschi G. Effect of photosynthesis on pH variation in cyanobacterial biofilms from Roman catacombs. *Journal of Applied Phycology* 2000; 12: 379- 84.

(2) Allsopp D., Seal KJ., Gaylarde CC. *Introduction to biodeterioration*. 2nd ed. Cambridge: Cambridge University Press; 2004.

(3) Gaylarde CC., Gaylarde PM. Biofilms on church walls in Porto Alegre, RS, Brazil, with special attention to cyanobacteria. *International Biodeterioration & Biodegradation* 2004; 54: 121- 4.

(4) http://www.fouman-city.ir

(5) Andersen RA. *Algal Culturing Techniques*. 1st ed. Amsterdam: Elsevier; 2005.

(6) Wehr JD., Armonk F. *Freshwater Algae of North America*. 1st ed. Amsterdam: Elsevier Science; 2003.

(7) Berrendero E., Perona E., Mateo P. Phenotypic variability and phylogenetic relationships of the genera Tolypothrix and Calothrix(Nostocales, Cyanobacteria) from running water. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2011; 61: 3039- 51

(8) Stein J R. Morphological variation of a Tolypothrix in culture. *British Phycological Bulletin, European Journal of Phycology* 1963; 2 (4): 206- 09.

(9) Taton A., Wilmotte A., Smarda J., Elste J., Komarek J. Plectolyngbyahodgsonii: a novel filamentous cyanobacterium from Antarctic lakes. *Polar Biology* 2010; 34 (2): 181- 91.

(10) Komarek J., Celia L., Anna S., Bohunicka M., Mares JG., Hentschke S. Phenotype diversity and phylogeny (Cyanoprokaryota) from SE Brazil of selected Scytonema- species. *Fottea Olomouc* 2013; 13 (2): 173- 200

(11) Bellinger EG., Sigee DC. *Freshwater Algae Identification and Use as Bioindicators.* 1st ed. Chichester: John Wiley & Sons; 2010.

(12) Petr D., Jeffrey R J., Miloslav K., Aloisie., P. Morphological and molecular study of epipelic filamentous genera *Phormidium*, *Microcoleus* and *Geitlerinema* (*Oscillatoriales*, *Cyanophyta*/ Cyanobacteria). *Fottea Olomouc* 2012; 12 (2): 341- 56.

(13) Li Z., Brand J. Leptolyngbyanodulosasp (Oscillatoriaceae) a subtropical marine cyanobacterium that produces a unique multicellular structure. *Phycologia* 2007; 46 (4): 396- 401

(14) Genua D B. Morphological and molecular characterization of cyanobacteria from a Brazilian facultative wastewater stabilization pond and evaluation of microcystin production. *Hydrobiologia* 2009; 62 (7): 195- 209

(15) Oinam G., Singh K O., Tiwari O N. An account of morphological and biochemical characterization of some heterocystous cyanobacteria (nostocalean) of NE region of India falling under Indo-Burma biodiversity hotspots. *Biosience Biotechnology Research Communication* 2010; 3 (1): 26- 32.

(16) Rehakova K., Johansen J., Casamatta D., Xuesong L., Vincent J. Morphological and molecular characterization of selected desert soil cyanobacteria : three species new to science including Mojaviapulchragen. *Phycologia* 2007; 46 (5): 481- 502.

(17) StateS P., Leite C., Anna S., Teresa M., Azevedo D P., Henrique L., Komárek J. New aerophyticmorphospecies of *Nostoc* (*Cyanobacteria*). *Hoehnea* 2007; 34 (1): 95- 10.

(18) Mitra DC., PandeyA. On the Morphology and Life-history of a Form of *Gloeocapsa* Showing Some New Stages. *Hydrobioligia* 1964; 27: 379- 84.

(19) Leliaert F., Coppejans E. The marine species of Cladophora (Chlorophyta) from the, South Eastern Coast. *Nova Hedwigia* 2003; 76: 45- 82.

(20) Novis P M. Taxonomy of Klebsormidium (Klebsormidiales, Charophyceae) in New Zealand streams and the significance of low- pH habitats. *Phycologia* 2006; 45 (3): 293- 301

(21) Rindi F., Guiry MD., MartiusL.Diversity.life story and ecology of trentepohlia and preintzina were found to occur in urban habitats in western Ireland. *Phycology* 2002; 54: 39- 54.

(22) Angelika T., Elisabeth I., Andreas H., Georg G. Phycobionts of some species of *Evernia* and *Ramalina Herzogia*; 2007, 20: 53- 60.

(23) Skaloud P., PeksaO. Comparative study of chloroplast morphology and ontogeny in Asterochloris (*Trebouxiophyceae*, *Chlorophyta*). *Biologia* 2008; 63 (6): 873- 880.

(24) Prescott, G W. *Algae of the western great lakes area.* 1rd ed. Michigan*:* Brown company publishers; 1970.

(25) Crispim CA., Gaylarde PM., Gaylarde CC. Algal and Cyanobacterial Biofilms on Calcareous Historic Buildings. *Current Microbiology* 2003; 46: 79- 82.

(26) KumariLS., Prada SA. Diversity of Micro-algae and Cyanobacteria on Building Facades and Monuments in India. *Algae* 2008; 23 (2): 91- 114.

---

[1]- Isopolar

[2]- درون هرکلروپلاست اجسام پروتئینی وجود دارد که پیرنوئید نامیده می‌شود. پیرنوئیدها محل تولید نشاسته هستند.

[3]- Crispim

[4]- Porto Alegre

[5]- Kumari

Isolation and Identification of Phototrophic Microorganisms from Rudkhan Castle as a Biodeteriorating Agent

Parisa Mohammadi *
Associate Professor of Microbiology, Alzahra University, Tehran, Iran, p.mohammadi@alzahra.ac.ir
Paria Gholami Nejad
MSc. of Microbiology, Alzahra University, Tehran, Iran, paryagholaminejad@yahoo.com
Marzieh Matinfar
MSc. of Microbiology, Alzahra University, Tehran, I.R.Iran, marzieh.matinfar@yahoo.com
Mahnaz Gholipoor-Shahraki
MSc. of Microbiology, Alzahra University, Tehran, Iran, mahnaz.gholipour@gmail.com
Ezat Asgarani
Associate Professor of Genetics, Alzahra University, Tehran, Iran, asgarani@gmail.com

Abstract

Introduction: Phototrophic microorganisms are the first residents of different surfaces of ancient buildings' walls. These organisms can expand to provide the colonization of other microorganisms and to form microbial biofilms. During biofilm growth, acids and metabolites production bore the substratum and cause surfaces damages. Rudkan Castle, the historic monument located in Gilan province, an area with a humid climate has an appropriate surfaces to grow these microorganisms.

Materials and methods: In this study, morphological identification of algae and cyanobacteria which was isolated from different areas of the brick walls of Castle has been investigated. Samples were taken from 24 different areas of Castle walls and were aseptically cultured into Blue Green Medium (BGM) and Bolds Basal Medium (BBM), and colonies were observed using light microscopy.

Results: The dominant organisms which were isolated and identified, were *Cladophora*, *Trentepohlia*, *Klebsormidium*, *Trebouxia*, *Pleurastrum*, *Chlorococcum* as chlorophyta order and *Scytonema*, *Tolypothrix*, *Leptolyngbya*, *Plectolyngbya*, *Phormidium*, *Gloeocapsa*, *Microcoleus*, *Nostoc* as a cyanobacteria order.

Discussion and conclusion: As expected, diversity of a large number of cyanobacteria and algae phototrophs was isolated. Diversity of organisms on the surface of monuments depends on many factors, including the weather condition such as moisture, the amount of radiation absorbed by the surface, temperature of area, the materials used in the monuments, the biological acceptance of surface and presence of variety of organisms in the soil surface and the air on. Study of destructive factors is the first step toward the protection and restoration of ancient monuments.

Key words: Biodeterioration, Rudkhan Castle, Phototroph

* Corresponding author
Received: August 9, 2014 / **Accepted:** September 12, 2015