جداسازی، خالص‌سازی و شناسایی ریختی و مولکولی دو گونه ریزجلبک نمک‌دوست از کشندان پشت سدی لیپار (سواحل دریای عمان، چابهار)

زهرا امینی خوئی*[1]، مهسا نادری سامانی[2]، سعیده طاهرپناه[3]، قاسم رحیمی قره میرشاملو[1]

[1]مرکز تحقیقات شیلاتی آب‌های دور، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، چابهار، ایران.

[2]سازمان شیلات ایران، ایران، تهران.

[3]مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران، بانک میکروارگانیسم‌ها، جهاد دانشگاهی، تهران، ایران.

*نویسنده مسئول zamini.41@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۰/۲۶ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۲/۱۹

چکیده

جداسازی و شناسایی میکروارگانیسم‌های ناشناخته بومی کشورمان و حفظ و نگهداری از آن‌ها در کلکسیون‌های ذخایر ژنتیکی به‌منظور بهره‌برداری از ظرفیت‌های زیستی آن‌ها از اهمیت و ضرورت ویژه‌ای برخوردار است. این مطالعه با هدف شناخت ریزجلبک‌های نمک‌دوست ساکن در کشندان پشت سدی لیپار واقع در سواحل دریای عمان در استان سیستان و بلوچستان انجام شد. نمونه‌برداری از آب و فیتوپلانکتون‌های کشندان پشت سدی در سال‌های ۱۳۹۹-۱۳۹۸ صورت گرفت. جداسازی و خالص‌سازی ریزجلبک‌های جمع آوری شده با روش تهیه رقت‌های سریالی و کشت در محیط‌های کشت آگار و محیط کشت مایع F2 به صورت متوالی صورت گرفته و در نهایت تک کلونی‌های خالص به دست آمد. شناسایی اولیه جدایه‌ها از طریق مشاهدات میکروسکوپی و مقایسه با کلیدهای طبقه‌بندی معتبر از لحاظ ریخت‌شناسی انجام شد. برای تایید و صحت بیشتر از شناسایی با روش مولکولی و توالی یابی ژن 18S rRNA و 16S rRNA استفاده شد. آنالیز داده‌های ریخت‌شناسی و توالی‌یابی مولکولی نشان داد که دو جدایه خالص شده ریزجلبک سبز *Dunaliella salina* و ریزجلبک سبز-آبی *Cyanothece* sp. می‌باشند که برای نخستین بار از کشندان پشت سدی شناسایی شدند. این دو ریزجلبک از نظر ظرفیت زیستی و تجاری جزء گونه‌های مناسب برای تولید انبوه و بسیار پرکاربرد در صنعت شناخته شده‌اند. سویه‌های خالص شده جهت نگهداری به بانک ملی ذخایر ژنتیک ایران اهدا شده تا جهت استفاده در تحقیقات و یا بهره‌برداری در مقیاس صنعتی در آینده به کار گرفته شوند.

واژگان کلیدی: ریزجلبک، کشندان پشت سدی لیپار، توالی‌یابی، ریخت‌شناسی، *Cyanothece* sp.، *Dunaliella salina*

مقدمه

ریزجلبک‌ها، میکروارگانیسم‌های فتوسنتزکننده میکروسکوپی هستند که به دلیل داشتن ترکیبات ارزشمند و سودمند در صنایع غذایی، خوراک دام، لوازم آرایشی، داروسازی و تولید سوخت زیستی (بیودیزل، بیواتانول، بیوگاز) قابل استفاده می‌باشند (Bharadvaja and Kumar, 2021; Doan *et al.*, 2012). از طرفی مطالعات گسترده‌ای در مورد امکان بهره‌برداری از ریزجلبک‌ها به عنوان تصفیه-گرهای بیولوژیکی فاضلاب‌ها صورت گرفته است (Chai *et al.*, 2020). با افزایش جمعیت و کمبود منابع انرژی و همچنین چالش‌های زیست‌محیطی تولید انبوه ریزجلبک‌ها به عنوان جایگزین منابع انرژی کنونی بیشتر در کانون توجه قرار گرفته است (Amorim *et al.*, 2021).

ریزجلبک‌ها تنوع بسیار زیادی داشته و در اکوسیستم‌های مختلف قابل مشاهده می‌باشند. در این میان اکوسیستم‌های آب شور و تالاب‌های فوق شور اغلب زیستگاه گونه‌های زیستی ویژه و منحصر به فرد هستند، زیرا میکرو ارگانیسم‌های ساکن در این مناطق برای مقابله با شرایط تنش شوری، نور شدید محیطی و دمای بالا مقادیر بیشتر و متنوع تری از متابولیت‌های ثانویه تولید می‌کنند (Shadrin *et al.*, 2021). سازگاری میکرو ارگانیسم‌های ساکن در این

اکوسیستم‌ها برای کنار آمدن با تنش‌های موجود منعکس کننده ظرفیت و تکامل زیستی فوق‌العاده آن‌هاست (Cakmak *et al*., 2014). سیانوباکترها و ریزجلبک‌های سبز، سهم اصلی را در تولید اولیه در این محیط‌ها ایفا می‌کنند (Vinogradova and Darienko, 2008). گونه‌های مختلف سیانوباکترها در شرایط متنوع خشکی و آبی رشد می‌کنند که نشانگر تنوع متابولیکی، بیوشیمیایی و مورفولوژیکی آن‌ها است. برخی از آرایه‌های معروف می‌توانند باعث شکوفایی دریاچه‌ها شوند، برخی از آن‌ها می‌توانند سم تولید کنند که برای پلانکتون‌ها، ماهی‌ها و حتی انسان‌ها کشنده باشند (Wang *et al*., 2018). یکی از سویه‌های سیانوباکتری که در اکوسیستم متفاوت از آب شیرین تا آب‌های فوق شور مشاهده شده است، سیانوباکتری از جنس *Cyanothece* است که از نظر طبقه‌بندی در گروه (Cyanobacteria, Cyanothecaceae) جای دارد. در اعضای این جنس سلول‌ها به شکل منفرد و در زیر میکروسکوپ نوری به شکل دانه‌دار و بیضی شکل قابل مشاهده هستند. سویه‌های نمک دوست این جنس سیانوباکتر در منابع آب شیرین، آب شور یا فوق شور گزارش شده‌اند. علاوه بر آن مقادیر زیادی از پلیمرهای پلی ساکارید خارج سلولی چسبناک دارد که به عنوان متابولیت مفید کاربرد زیادی در صنایع غذایی و آرایشی بهداشتی دارد. شناسایی این سویه تا سطح گونه حتی با شواهد ریخت‌شناسی، فراساختاری و حتی مولکولی دشوار است (Zhang *et al*., 2018). یکی دیگر از ریزجلبک‌های آب‌های فوق شور گونه *Dunaliella salina*است که پتانسیل اقتصادی بسیار بالایی دارد و به دلیل تولید ترکیبات بتاکاروتن، گلیسرول و فیتواسترول‌ها قابل توجه است Ben-Amotz and (Avron, 1990). سلول‌های *Dunaliella* در شرایط مختلف به صورت تخم‌مرغی، کروی، بیضی، دوکی یا گلابی شکل متغیر بوده و فاقد دیواره سخت و دارای یک غشای سلولی انعطاف‌پذیر است که قادر به تغییر سریع شکل در پاسخ به استرس اسمزی است. اندازه سلول بسیار متغیر و وابسته به متغیرهای محیط رشد آن است (Borowitzka and Brown, 1974). در معرض تنش تابش یا شوری از رنگ سبز که به دلیل وجود کلروفیل‌ها است به رنگ قرمز و نارنجی به دلیل افزایش تولید رنگیزه‌های کارتنوئیدی مانند بتاکاروتن، آلفاکاروتن، زاگزانتین، کریپتوگزانتین و لوتیین تبدیل می‌شود (Goldberg and Hasler, 1996).

اگرچه ویژگی‌های ریخت‌شناسی اساس طبقه‌بندی جلبک‌ها محسوب می‌شوند، اما این ویژگی‌ها ممکن است در شرایط محیطی تغییر کنند. بنابراین تکنیک‌های مولکولی به عنوان ابزار بسیار مهم در شناسایی ریز جلبک‌ها می‌توانند مورد استفاده قرار بگیرند. توالی‌یابی در ریز جلبک‌ها با استفاده از ژن RNA ریبوزومی 18S یوکاریوتی و 16S ریبوزومی پروکاریوتی برای شناسایی مولکولی مورد استفاده قرار می‌گیرد. این ژن‌ها شامل بسیاری از توالی‌های حفاظت شده می‌باشند که دارای توالی‌های متغیر در گونه‌های متفاوت نیز می‌باشند که جهت شناسایی در سطح گونه مورد استفاده قرار می‌گیرند (Bellinger and Sigee, 2012).

نخستین گام برای بهره‌برداری از ریزجلبک‌ها، جداسازی، خالص‌سازی و شناسایی سویه‌های پربازده است. به همین دلیل محققان در دنیا به دنبال غربال‌گری و یافتن سویه‌های مناسب بومی برای پیشنهاد به صنعت و کشت انبوه می‌باشند. در کشور ما دریاچه‌ها و تالاب‌های شور متنوعی در نقاط مختلف از بیابان‌های مرکزی ایران تا سواحل جنوبی وجود دارند که این اکوسیستم‌ها میزبان میکروارگانیسم‌های متنوعی می‌باشند. در بسیاری از موارد هیچ گونه غربال‌گری در جهت شناسایی ظرفیت‌های بومی صورت نگرفته است. یکی از مناطق کمتر شناخته شده که بسیار اندک مورد بررسی و تحقیق قرار گرفته است اکوسیستم‌های ویژه نمکی ساحلی دریای عمان در استان سیستان و بلوچستان در شرق چابهار است که در اصطلاح تخصصی اکولوژیکی به آن‌ها کشندان پشت سدی (Back-barrier) گفته می‌شود، میزبان

جدول ۱- خصوصیات فیزیکی و شیمیایی آب کشندان پشت سدی لیپار.

شوری (گرم در لیتر)	pH	نیترات (میلی گرم در لیتر)	فسفات (میلی گرم در لیتر)
۳۰۰ ±۲۰ ppt	۷/۸±۰/۵	۲۶±۵	۰/۱۶ ۰±/۰۴

میکروارگانیسم‌های منحصر به فرد هستند که توان سازگاری زیادی با شرایط محیطی را دارند (Vinogradova and Darienko, 2008). با توجه به کمبود اطلاعات در مورد زیست‌مندان بومی اکوسیستم‌های فوق شور کشندان پشت سدی این منطقه، این مطالعه به‌منظور بررسی و شناسایی ریخت‌شناسی و مولکولی دو سویه ریزجلبک سبز و سبز آبی نمک‌دوست ساکن در این اکوسیستم به اجرا درآمد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری: کشندان پشت سدی نسبتا کوچک لیپار یک اکوسیستم آبی فوق شور است که در سواحل دریای عمان در استان سیستان و بلوچستان و در ۱۹ کیلومتری شرق چابهار واقع شده است. این کشندان پشت سدی طول تقریبی ۵۰۰ متر و عرض ۱۵۰ متر دارد و در فاصله حدود ۱۰۰ متری از سواحل مکران قرار گرفته و تحت تأثیر جذرومد و بارش‌های فصلی می‌باشد. رنگ این کشندان پشت سدی در بیشتر فصول سال صورتی بوده و به همین دلیل به آن تالاب صورتی نیز اطلاق می‌گردد. نمونه‌برداری از کشندان پشت سدی فوق شور لیپار واقع در طول جغرافیایی "۱۳ '۴۵ °۶۰ و عرض جغرافیایی "۲۱ '۱۶ °۲۵ در تابستان سال ۱۳۹۹-۱۳۹۸ صورت گرفت. نمونه‌ها از نقاط مختلف کشندان پشت سدی عمق کمتر از ۰/۵ متر در بطری‌های پلاستیکی استریل جمع‌آوری و به آزمایشگاه مرکز تحقیقات شیلاتی آب‌های دور چابهار انتقال داده شدند. برخی از فاکتورهای فیزیکی و شیمیایی کشندان پشت سدی لیپار شامل شوری و پی‌اچ اندازه‌گیری و ثبت شدند. اندازه‌گیری شوری با دستگاه شوری‌سنج چشمی (S/MIL-E, ATAGO) پس از رقیق‌سازی به میزان ۱۰ برابر با استفاده از آب مقطر دوبار تقطیر انجام گرفت. پی‌اچ نمونه‌ها با دستگاه پی‌اچ سنج (WTW, 330i) و غلظت مواد مغذی آب شامل نیترات و فسفات با روش رنگ‌سنجی و با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (U-2000, HITACHI) سنجش شد (جدول ۱).

جداسازی و کشت ریزجلبک‌ها: جداسازی و خالص‌سازی با روش‌های تهیه رقت‌های سریالی کشت مایع، گرادیان یا شیب شوری و کشت تک کلونی روی محیط جامد صورت گرفت (Andersen, 2005). در مواردی که فراوانی سلول‌ها در نمونه‌های جمع‌آوری شده کم بود برای تجمع بیشتر سلول‌ها ۱۰ میلی‌لیتر از نمونه‌ها با دور rpm ۲۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد و درنهایت تعداد سلول‌های بیشتری در لوله آزمایش تجمع یافت. نمونه‌ها در محیط کشت F2 با گرادیان شوری ۳۷ تا ۲۰۰ گرم در لیتر جهت خالص‌سازی کشت داده شدند. پس از رشد ریزجلبک-ها به‌منظور اطمینان از خلوص، سویه‌ها در زیر میکروسکوپ نوری (مدل: Olympus CX31) مشاهده شدند. برای نگه داشتن جلبک به صورت تک گونه و فاز فعال رشد در شرایط استریل در یخچال روی محیط جامد نگهداری شد (Guillard and Sieracki, 2005). کشت‌های مایع و جامد تحت شرایط دمایی ۲۸ درجه سانتی‌گراد، چرخه نوری ۱۶ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و در معرض نور فلورسنت با شدت ۳۰۰۰ لوکس قرار داده شدند (Andersen, 2005).

شناسایی مورفولوژیکی و مولکولی: بعد از جداسازی، کشت و تکثیر ریزجلبک‌ها جهت شناسایی مورفولوژیکی، ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون محیط کشت جلبک زیر میکروسکوپ اینورت مجهز به دوربین (مدل نیکون TF100) با بزرگنمایی ۱۰۰× مورد بررسی قرار گرفت. خصوصیات ظاهری شامل اندازه، رفتار و ضمائم ریزجلبک‌ها با استفاده از کلیدهای شناسایی و طبقه‌بندی معتبر مقایسه شدند

جدول ۲- آغازگرهای مورد استفاده برای تکثیر قطعه‌ای از ژنوم 18SrRAN و 16SrRNA در شناسایی ریز جلبک دو سویه یوکاریوت و پروکاریوت، و برخی ویژگی‌های آن ها و نام ژن.

	آغازگر مورد استفاده ('3 → '5)		تعداد نوکلئوتید	GC (٪)	دمای اتصال (°C)	اندازه قطعه مورد انتظار
18S rRNA	رو به جلو (18S F)	GGGGAATYTTCCGCAATGGG	۲۰	۵۵	۵۲	۱۸۰۰ bp
	رو به عقب (18S R)	ACGGGCGGTGTGTAC	۱۵	۶۷	۵۲	
16S rRNA	رو به جلو (16S F)	AACCTGGTTGATCCTGCCAGT	۲۱	۵۲	۵۲	۱۰۰۰ bp
	رو به عقب (16S R)	CCTTGTTACGACTTGACCTTCC	۲۲	۵۰	۵۲	

جدول ۳- برنامه دمایی و شرایط واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز برای تکثیر ژن های 18srRNA و 16SrRNA.

مراحل	دما	زمان	تعداد
واسرشتگی اولیه	۹۴	۳/۵min	۱
واسرشتگی ثانویه	۹۴	s۵۰	۳۶
اتصال	۵۲	s۵۰	۳۶
طویل شدن اولیه	۷۲	s۵۰	۳۶
طویل شدن ثانویه	۷۲	min۱۵	۱

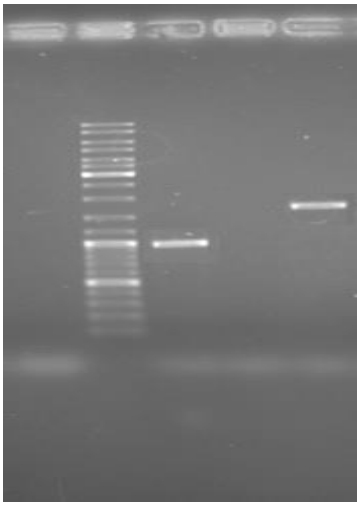
(Garcia-Pichel *et al*., 2001). استخراج DNA از جدایه‌های خالص کشت شده با استفاده از روش استخراج سریع با گلوله‌های شیشه‌ای برای شکستن دیواره سلولی انجام شد (Liu *et al*., 2000).

جهت شناسایی سویه یوکاریوتی ریزجلبک‌ها و سویه پروکاریوتی سیانوباکترها به ترتیب از تکثیر قطعه مورد نظر از ژنوم نشانگر 18S rRNA و نشانگر 16S rRNA با استفاده از آغازگرهای اختصاصی طبق جدول ۲ استفاده شد (Amann *et al*., 1995; Apt and Gibor, 1989). شرایط و برنامه دمایی واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز نیز برای هر دو قطعه ژنی 18S rRNA و 16S rRNA در جدول ۳ ارایه شده است. جهت کنترل صحت انجام فرایند واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز، محصولات حاصل از واکنش برای هر ژن برای بررسی کیفیت بر اساس الکتروفورز روی ژل آگارز ۱٪ مورد استفاده قرار گرفت.

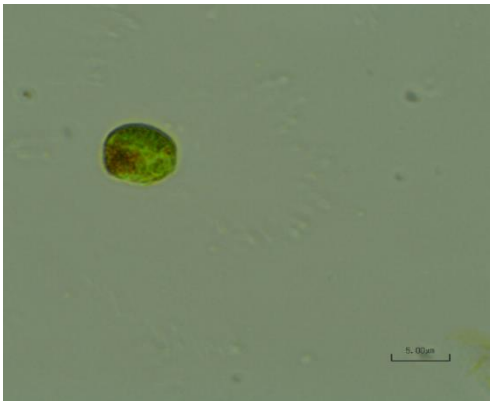
محصول واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز، برای خوانش دو طرفه (مستقیم و معکوس) توالی ژن‌های موردنظر به شرکت پیشگام (ایران) ارسال شد. سپس کیفیت توالی‌های خوانش شده توسط برنامه Chromas pro بررسی شدند. با استفاده از ابزارجستجو Blast در پایگاه ملی اطلاعات بیوتکنولوژی (NCBI) توالی نمونه‌ها با سایر نمونه‌های موجود مقایسه شدند. سویه‌های با مقاربت ژنتیکی نزدیک و استاندارد از طریق این سایت و با استفاده از نرم‌افزار Aliview هم‌تراز شدند و سپس توسط نرم‌افزار Mega6 و روش Neighbor joining با تعداد تکرار ۱۰۰ بار در الگوریتم (bootstrap) درخت فیلوژنی سویه‌های جداسازی شده ترسیم گردید تا جایگاه تاکسون مورد نظر با تاکسون‌های استاندارد بررسی شود.

نتایج

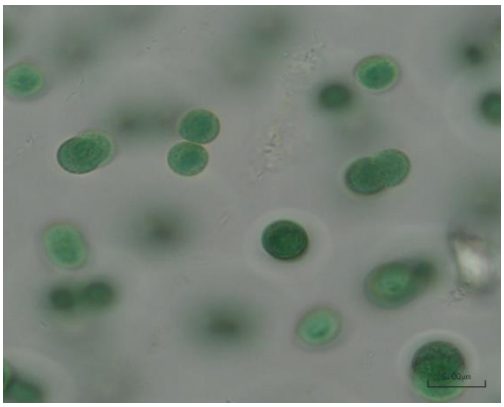
در این مطالعه دو جدایه با ویژگی‌های ساختاری متفاوت از کشندان پشت سدی لیپار جداسازی شدند که هر دو سویه در محیط کشت F_2 بدون سیلیس و شوری حدود ۹۰ گرم در لیتر رشد مناسبی از خود نشان دادند. بررسی‌های ریخت‌شناختی و ساختاری، طبقه‌بندی این دو سویه متعلق به شاخه‌های جدا تشخیص داده شد. یکی از این سویه‌ها متعلق به شاخه‌ی یوکاریوتی کلروفیتا (شکل ۲) تشخیص داده شد که قطر سلول‌ها در حالت رویشی بین ۳ تا ۶ میکرومتر اندازه‌گیری شد. سویه دیگر متعلق به



شکل ۱- مشاهده باندهای تکثیر شده ژن 18S rRNA در محدوده ۱۸۰۰ جفت باز و ژن 16S rRNA در محدوده ۱۰۰۰ جفت باز روی ژل الکتروفورز با آگارز ۱٪



شکل ۲- سویه‌ی *D. salina*.

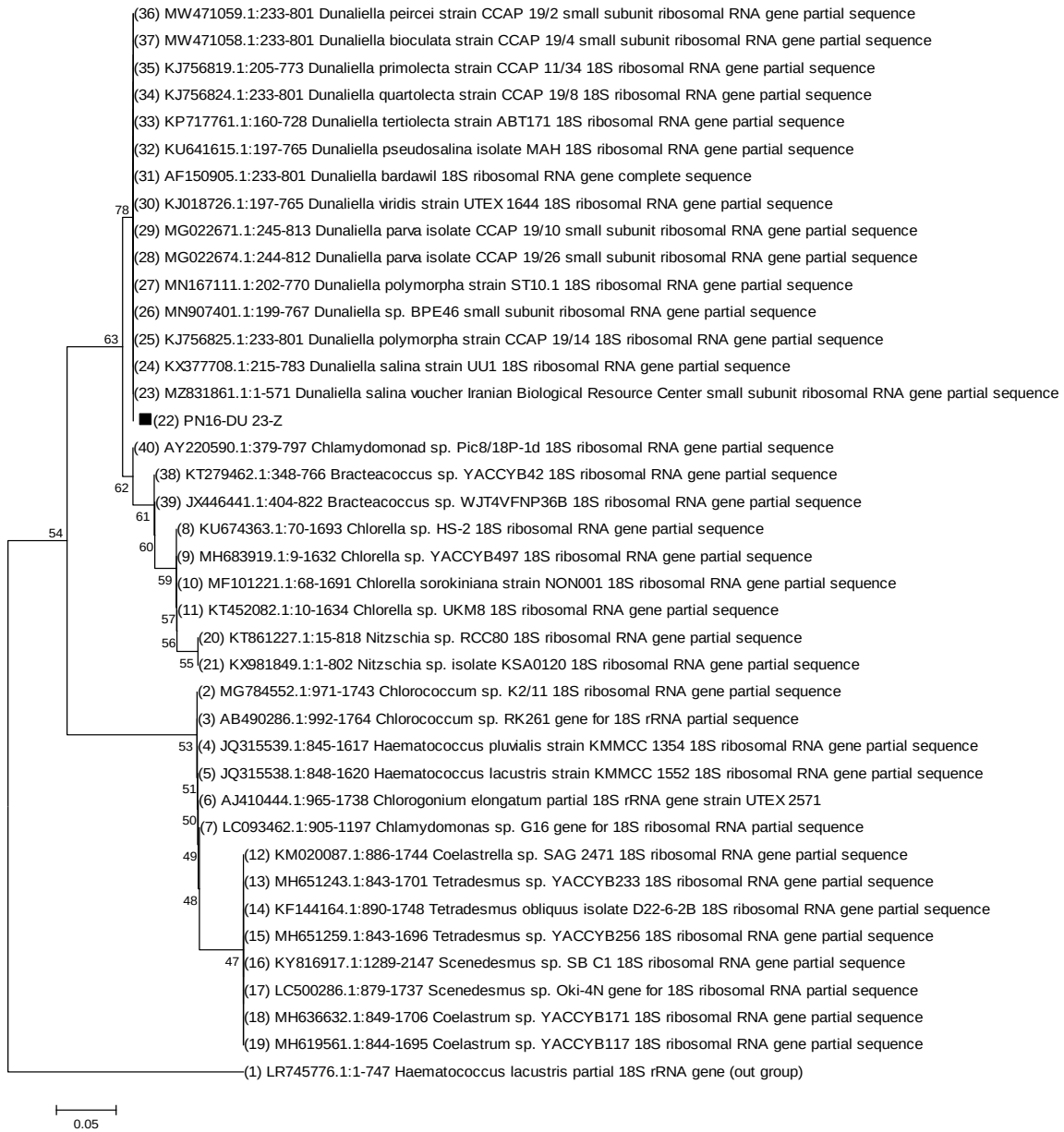


شکل۳- سویه‌ی *Cyanothece* sp.

شاخه‌ی پروکاریوتی شاخه سیانوفیتا (شکل ۳) تشخیص داده شد که طول آن بین ۲ تا ۶ و عرض آن بین ۲ تا ۵ میکرومتر در حالت رویشی اندازه‌گیری شد. داده‌های مولکولی شباهت ژنتیکی حدود ۹۸٪ سویه یوکاریوتی به گونه *Dunaliella salina* و شباهت ۹۹٪ سویه پروکاریوتی به جنس *Cyanothece* sp. را نشان دادند. درخت فیلوژنی مربوط به این دو جنس به ترتیب در شکل‌های ۴ و ۵ نشان داده شده است که قرابت ژنتیکی سویه‌های جداسازی شده را به این جنس‌ها تایید می‌کند.

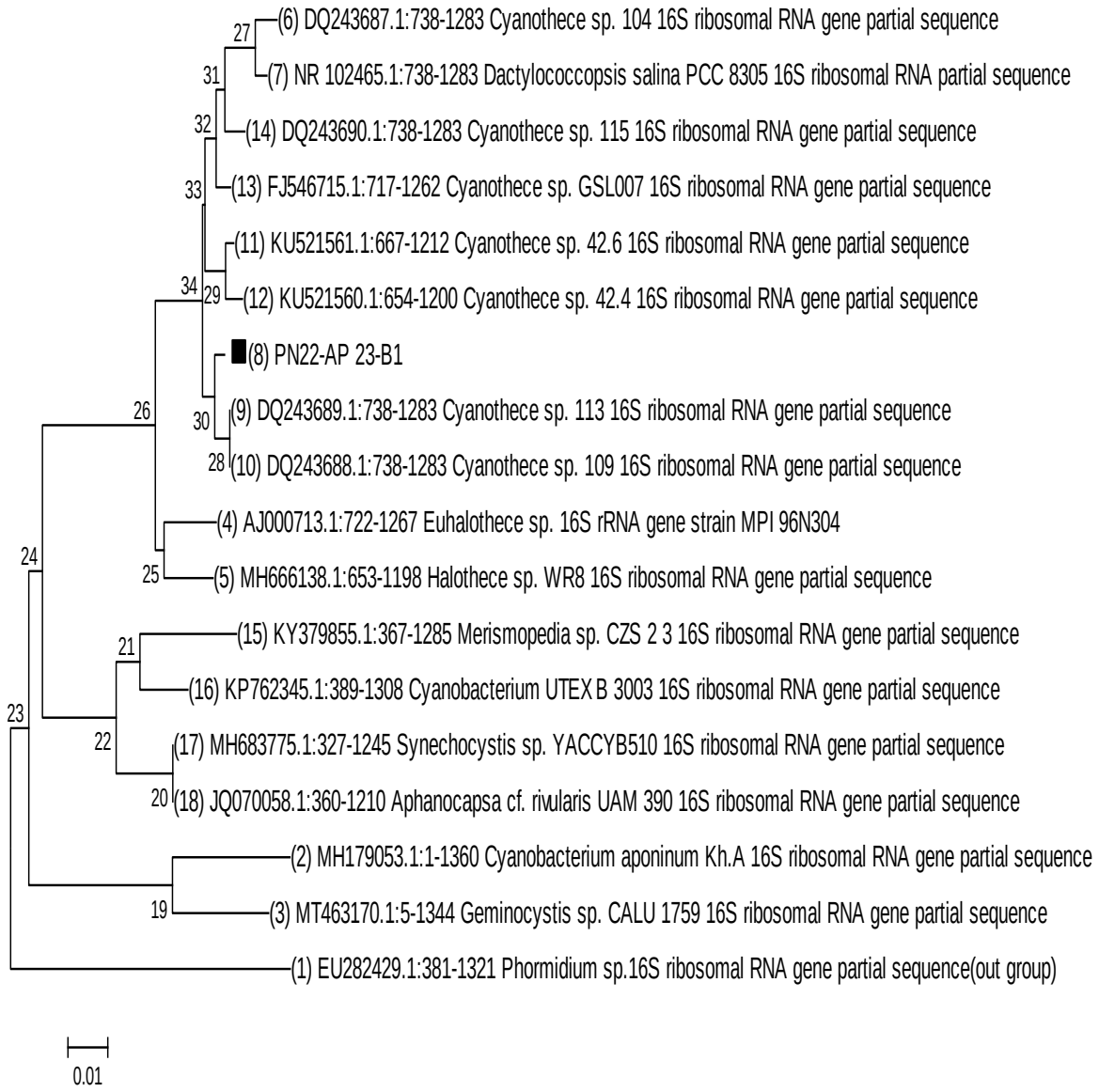
بحث و نتیجه‌گیری

اکوسیستم‌های ویژه کشندان پشت سدی در نوار مرزی استان سیستان و بلوچستان به‌عنوان یکی از مناطق فوق اشباع نمک به حساب می‌آیند که از از لحاظ اکولوژیکی ارزش بالایی دارند. در این اکوسیتم‌ها معمولاً میکروارگانیسم‌های نمک دوست منحصر به فرد رشد می‌کند که ارزش زیستی و اقتصادی بسیار بالایی دارند (امینی خوئی و همکاران، ۱۴۰۰). از طرفی تهیه بانک ژنی و بررسی ظرفیت اقتصادی میکروارگانیسم‌ها ارزش قابل توجهی دارد. جمع‌آوری، ذخیره‌سازی و نگهداری از میکروارگانیسم‌ها از نظر حفظ و گسترش تنوع زیستی اهمیت دارد. میکروارگانیسم‌های بومی موجود در بانک‌های زیستی می‌توانند به راحتی در حوزه تحقیقات پایه، پزشکی و صنعتی به کار گرفته شوند. در مطالعه حاضر، یک سویه از ریزجلبک جنس دونالیلا جداسازی شد که از نظر ریخت‌شناسی تک سلولی گلابی شکل با کلروپلاست مرکزی بزرگ فنجانی شکل و رنگ متمایل به زرد تشخیص داده شد.



شکل ۴- درخت فیلوژنی سویه *D. salina* (درخت فیلوژنتیکی ترسیم شده ژن 18srRNAبا روش Neighbor joining با تعداد تکرار ۱۰۰ بار در الگوریتم برای گونه *D. salina* در مقایسه با سایر گونه‌های جلبکی (نمونه مورد مطالعه در درخت با نام مربع مشکی مشخص شده است).

این سویه دارای دو تاژک بلند و مساوی بوده که مقایسه آن با سایر سویه‌های داخلی و کلیدهای شناسایی بین‌المللی نشان داد این ریز جلبک می‌تواند گونه *D. salina* باشد. این سویه در دو فاز سبز و نارنجی مطالعه شد. نمونه‌های در فاز سبز رنگ به شکل نسبتاً کشیده، دارای تحرک بالا، اندازه سلول ۲۰-۱۵ میکرون و کلروپلاست نسبتاً کوچک مشاهده شدند. شرایط رشد مطلوب در فاز سبز رنگ در شوری ۱۲۰ گرم در لیتر مشاهده شد. از دیگر خصوصیات ظاهری این سویه بومی دو تاژک بلند کاملاً مشخص، گلابی شکل و کلروپلاست نعل اسبی شکل آن است. این سویه در شرایط استرس محیطی در شوری ۲۱۰ گرم در لیتر به بالا و با کمبود نیتروژن (کمتر از ۰/۰۷۵ گرم در لیتر) به فاز نارنجی- قرمز رنگ وارد شد و تولید رنگدانه بتاکارون در آن تشدید شد. در این فاز همچنین اندازه سلول بزرگ ۲۵-۲۰ میکرون شده و تحرک آن کم شد (اربابی و همکاران، ۱۳۹۹). با توجه به ناکافی بودن دقت ابزارهای ریخت‌شناختی در شناسایی میکروارگانسیم‌ها مخصوصاً ریز جلبک‌های تک سلولی، به کارگیری تکنیک‌های توالی یابی



شکل۶- درخت فیلوژنی سویه *Cyanothece sp.* (درخت فیلوژنتیکی ترسیم شده ژن 16srRNAبا روش Neighbor joining با تعداد تکرار ۱۰۰ بار در الگوریتم برای سویه *Cyanothece sp.* در مقایسه با سایر گونه‌های سیانوباکتر (نمونه مورد مطالعه در درخت با نام مربع مشکی مشخص شده است).

مولکولی امکان مطالعه دقیق تر را فراهم می‌کند (Olmes *et al*., 2000). بنابراین در ادامه این مطالعه شناسایی مولکولی و توالی‌یابی نمونه مورد نظر صورت گرفت. مشاهده باندهای تکثیر شده ژن 18S rRNA در محدوده ۱۸۰۰ جفت باز و توالی یابی ژن تکثیر شده تاییدی بر ریز جلبک *D. salina* بود. این ریز جلبک سبز تک سلولی که فاقد دیواره سلولی است در شرایط سخت محیطی، مقاوم به شوری بوده و توانایی فتوسنتز را دار می‌باشد. همچنین مواد ارزشمندی مانند گلیسرول و بتاکاروتن را در سلول‌های خود ذخیره می‌کند (Hejazi *et al*., 2010). سویه‌های مختلف این ریزجلبک نمک‌دوست از مناطق مختلف ایران جداسازی شده‌اند که دو گونه از آن در دریاچه‌های شور حوض سلطان و آران و بیدگل توسط صدقی و همکاران (۱۳۹۵) گزارش شد.

نتایج PCR ناحیه 18S rRNA با استفاده از جفت آغازگر اختصاصی ITS1DR وSSU1 با وزن مولکولی حدود bp ۳۱۰۵ حاکی از شناسایی *D. parva* و *D. virids* بود. همچنین چهار گونه از آن از دریاچه ارومیه جداسازی شدند (قربانی و همکاران

۱۳۹۲) که از ژن سیتوکروم اکسیداز میتوکندریایی به عنوان یک نشانگر در بررسی رابطه فیلوژنتیکی در جنس *Dunaliella* استفاده کردند. در مطالعه‌ای Hejazi و همکاران، (۲۰۱۰) که به جمع‌آوری جلبک *Dunaliella* بومی و بررسی تنوع ژنتیکی داخل گونه *D. salina* در نقاط مختلف آب‌های شور ایران شامل دریاچه‌های ارومیه، قم، گاوخونی و مهارلو با استفاده از جفت آغازگرهای حفاظت شده در قطعه 18S rRNA جنس *Dunaliella* و روش AFLP پرداختند. Yaiche-Achour و همکاران (۲۰۱۸) شناسایی دو سویه از دریاچه شور در تونس را انجام دادند و سویه‌ها تحت شناسایی ریخت‌شناختی و مولکولی با تعیین توالی ژن های ITS و rbcL قرار گرفتند. هر دو سویه عضوی از جنس *Dunaliella* و در یک کلاسه به عنوان سویه‌های مختلف *Dunaliella viridis* گروه‌بندی شدند (۹۶/۹ تا ۹۸/۷ درصد شباهت برای ژن ITS و ۹۶/۴ تا ۹۸/۱ درصد برای ژن rbcL). این گونه در تولید سوخت‌های زیستی کاربرد فراوان دارد و به عنوان یک منبع غذایی مهم برای موجودات آبزی در نظر گرفته می‌شود.

در این مطالعه علاوه بر ریزجلبک سبز دونالیلا یک سویه سیانوباکتر نمک‌دوست دیگری جداسازی و خالص‌سازی شد. بررسی‌ها و مشاهدات میکروسکوپی ریخت‌شناسی نشان داد این ریزجلبک از نظر اندازه دارای طول ۶-۵ میکرومتر و عرض حدود ۴-۳ میکرومتر می‌باشد. نتایج توالی یابی ژن تکثیر شده 16S rRNA در محدوده ۱۰۰۰ جفت باز تائید کرد سویه جداسازی شده از کشندان پشت سدی لیپار متعلق به جنس *Cyanothece* sp. است. مشاهدات میکروسکوپ نوری نشان داد که سویه *Cyanothece* sp. به صورت اشکال متنوع (کروی، میله‌ای و باسیلی) با تحرک نسبتاً کم قابل مشاهده است. مطالعات در زمینه سیانوباکترهای نمک‌دوست محدود بوده و ظرفیت تولید این منابع تا حدود زیادی مبهم باقی مانده است. این درحالی است که سیانوباکترهای دریایی از نظر هزینه‌های محیط کشت نسبت به سایر باکتری‌های رایج ارجحیت دارند.

Komarek (۱۹۷۶) اولین گزارش از شناسایی بر پایه شکل سلول، ساختار محتوی سلول و ویژگی های بیولوژیکی ریز جلبک *Cyanothece* را منتشر کرد. Rippka و Cohen-Bazire (۱۹۸۳)، دو جنس دیگر *Cyanobacterium* و *Cyanobiom* را از هم جدا کردند. ارتباط نزدیک آن‌ها با *Cyanothece* را بر پایه معیارهای بیوشیمیایی مورد بررسی قرار دادند و بعدها بر اساس آنالیزهای سیتولوژیکی و مولکولی طبقه‌بندی انجام شد. اگرچه بسیاری از نشانگرهای ژنی از جمله توالی‌های 16s rRNA و برخی از ژن‌های عملکردی مانند ژن rpoC1 و ژن nifH در تجزیه فیلوژنتیکی سیانوباکتری‌ها در بانک ژن استفاده شد، اما هنوز توالی‌های مربوط به این ژن در بانک ژن محدود هستند (Mogany *et al*., 2018).

Zhang و همکاران (۲۰۱۸) پس از آنالیز فیلوژنتیکی ژن 16s rRNA و ژن nifH نمونه جدا شده از اقیانوس هند حضور *Cyanothece* sp. را تایید و بررسی ترکیب رنگدانه این ریزجلبک پروکاریوتی را عنوان کردند. در پژوهشی دیگر امینی خوئی و همکاران (۱۴۰۰) میزان رنگدانه بتاکاروتن، کلروفیل a و فیکوسیانین این ریز جلبک را در شوری‌های مختلف مورد مطالعه قرار دادند که نتایج، رشد مطلوب و تجمع رنگدانه‌های ارزشمند در ریزجلبک *Cyanothece* sp. در شوری ppt ۱۲۰-۹۰ را نشان داد و آن به عنوان شوری مناسب برای تولید انبوه این ریزجلبک پیشنهاد کردند.

بر اساس نتایج این مطالعه برای نخستین بار دو سویه نمک دوست جداسازی و خالص‌سازی شده از اکوسیستم ویژه فوق شور کشندان پشت سدی لیپار از سواحل دریای عمان صورت گرفت. ریزجلبک‌های شناسایی شده شامل ریزجلبک سبز و با ارزش اقتصادی *D. salina* و همچنین سیانوباکتر جنس *Cyanothece* sp. بودند. با توجه به ارزش اقتصادی و میزان رشد مطلوب سویه‌های خالص‌سازی شده در سواحل چابهار این دو سویه به‌منظور تولید انبوه

زیست‌توده در استخرهای روباز آب شور در این منطقه پیشنهاد می‌شود.

منابع

اربابی س.، اکبری پ.، امینی خوئی ز. ۱۳۹۹. بررسی تاثیر روش لخته سازی بر راندمان برداشت زی‌توده و محتوی اسیدهای چرب ریزجلبک *Dunaliella salina*، جداسازی شده از تالاب لیپار، چابهار. مجله علمی شیلات ایران، (۶): ۱۲۰-۱۰۹.

امینی خوئی ز.، عرفانی فر ا.، اژدری ا.، ابیر س. ۱۴۰۰. بررسی اثرات شوری‌های مختلف بر میزان رنگدانه‌های ارزشمند ریزجلبک *نمکدوست* .*Cyanothece* sp شناسایی شده از کشندان پشت سدی لیپار (چابهار) در شرایط آزمایشگاهی. مجله علمی شیلات ایران، ۵: ۱۳۳-۱۲۱.

صدقی م.، فرخنده ص.، نوروزی م.، آموزگار م.، شاهزاده فاضلی ا. ۱۳۹۵. جداسازی و شناسایی ریخت شناسی و مولکولی گونه‌های جلبک *Dunaliella* از دریاچه‌های شور حوض سلطان و آران و بیدگل. رستنی‌ها، ۱۷(۱): ۷۷-۷۰.

قربانی س.، مناف‌فر ر.، رامین طاعی ا.، ملک‌زاده ر. ۱۳۹۲. بررسی تنوع مولکولی گونه‌های جلبک Dunaliella در تعدادی از ایستگاه‌های دریاچه ارومیه. زیست‌شناسی گیاهی ایران، ۵(۱۷): ۹۸-۸۹.

Amann R.I., Ludwig W., Schleifer K.H. 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Reviews* 59(1), 143-169.

Amorim M.L., Soares J., Coimbra J.S.D.R., Leite M.D.O., Albino L.F.T., Martins M.A. 2021. Microalgae proteins: Production, separation, isolation, quantification, and application in food and feed. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 61(12), 1976-2002.

Andersen R.A., Kawachi M. 2005. *Traditional Microalgae Isolation Techniques*. In: Andersen R.A. (Ed) Algal Culturing Techniques. Elsevier, *Amsterdam* 83-100

Apt K., Gibor A. 1989. Development and induction of bacteria-associated galls on *Prionitis lanceolate* (Rhodophyta). *Diseases of Aquatic Organisms* 6(2), 151-156.

Bellinger E.G., & Sigee D.C. 2010. *Freshwater Algae: Identification and Use as Bioindicators*, 6th Edn. Hoboken.

Ben-Amotz A., Avron M. 1990. The biotechnology of cultivating the halotolerant alga *Dunaliella*. *Trends in Biotechnology* 8, 121-126.

Bharadvaja N., Kumar L. 2021. Algal Biorefinery for the Extraction of Bioactive Compounds. *Current Bioactive Compounds* 17(4), 280-288.

Borowitzka L.J., & Brown A.D. (1974). The salt relations of marine and halophilic species of the unicellular green alga, *Dunaliella*. *Archives of Microbiology* 96(1), 37-52.

Cakmak Y.S., Kaya M., Asan-Ozusaglam M. 2014. Biochemical composition and bioactivity screening of various extracts from *Dunaliella salina*, a green microalga. *EXCLI Journal* 13, 679.

Chai W.S., Tan W.G., Munawaroh H.S.H., Gupta V.K., Ho S.H., Show P.L. 2020. Multifaceted roles of microalgae in the application of wastewater biotreatment: A review. *Environmental Pollution* 269, 116-236.

Doan Q.C., Moheimani N.R., Mastrangelo A.J., Lewis D.M. 2012. Microalgal biomass for bioethanol fermentation: implications for hypersaline systems with an industrial focus. *Biomass and Bioenergy* 46, 79-88.

Garcia-Pichel F., López-Cortés A., Nübel U. 2001. Phylogenetic and Morphological Diversity of Cyanobacteria in Soil Desert Crusts from the Colorado Plateau. *Applied and Environmental Microbiology* 67(4), 1902-1910.

Goldberg I., & Hasler C.M. 1996. Functional Foods--Designer Foods, Pharmafoods, Nutraceuticals. *American Journal of Clinical Nutrition* 64(2), 255-255.

Guillard R.R.L., Sieracki M.S. 2005. Counting Cells in Cultures with the Light Microscope. In: Andersen R.A. (Ed) Algal culturing techniques. Elsevier Academic Press, London, 239-252.

Hejazi M.A., Barzegari A., Gharajeh N.H., Hejazi M.S. 2010. Introduction of a novel 18S rDNA gene arrangement along with distinct ITS region in the saline water microalga Dunaliella. *Saline Systems 6*(1), 1-11.

Komárek J. 1976. Taxonomic review of the

genera *Synechocystis* Sauv. 1892, *Synechococcus* Nag. 1849, and *Cyanothece* gen. nov. (Cyanophyceae). *Archiv fur Protistenkunde*.

Mogany T., Swalaha F.M., Kumari S., Bux, F. 2018. Elucidating the role of nutrients in C-phycocyanin production by the halophilic cyanobacterium *Euhalothece* sp. *Journal of Applied Phycology* 30(4), 2259-2271.

Olmos J., Paniagua J., Contreras R. 2000. Molecular identification of *Dunaliella* sp. utilizing the 18S rDNA gene. *Letters in Applied Microbiology* 30(1), 80-84.

Rippka R., & Cohen-Bazire G. 1983. The Cyanobacteriales: a legitimate order based on the type strain Cyanobacterium stanieri?. In *Annales de l'Institut Pasteur/Microbiologie*, 134, 121-36.

Shadrin N., Balycheva D., Anufriieva E. 2021. Microphytobenthos in the Hypersaline Water Bodies, the Case of Bay Sivash (Crimea): Is Salinity the Main Determinant of Species Composition?. *Water* 13(11), 1542.

Vinogradova O., & Darienko T. 2008. Terrestrial algae of hypersaline environments of the Central Syvash islands (Kherson Region, Ukraine). *Biologia* 63(6), 813-823.

Wang J., Zhang G., Ding C. 2018. Morphology, ultrastructure and phylogeny of *Cyanothece* sp. (Cyanobacteriaceae: Cyanophyceae) isolated from the eastern Indian Ocean. *Acta Oceanologica Sinica* 37(10), 4 -10.

Yaiche-Achour H., Doumandji A., Bouras N., Sabaou N., Assunção P. 2018. Isolation, molecular identification and the carotenogenesis process of the microalgae *Dunaliella salina* strain Duna DZ1 isolated from an Algerian Salt Lake. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 19(5), 399-407.

Zhang X., Yang S., Sun J., Wu C., Wang J., Zhang G. & Ding C. 2018. Morphology, ultrastructure and phylogeny of *Cyanothece* sp. (Cyanobacteriaceae: Cyanophyceae) isolated from the eastern Indian Ocean. *Acta Oceanologica Sinica* 37(10), 4–10.

Isolation, purification and morphological and molecular identification of two halophyte microalgae species from Lipar back barrier (Oman Sea, Chabahar)

Zahra Aminikhoei[*1], Mahsa Naderi Samani[2], Saaedeh Taherpanah[3], Ghasem Rahimi Gharemirshamloo[1]

[1]Off-shore Fisheries Research Center-Chabahar, Iranian Fisheries Science Research, Institute (IFSRI), Agricultural Research Educations and Extension Organization (AREEO), Chabahar, Iran.
[2]Iran Fisheries Organization, Tehran, Iran.
[3]Iranian Biological Resource Center, Tehran, Iran.
*Corresponding author: zamini.41@gmail.com
Received: 2022/1/16 Accepted: 2022/5/9

Abstract

Isolation and identification of unknown microorganisms native to our country and their preservation in the collections of genetic resources in order to exploit their biological capacity are of special importance and necessity. This study aimed to identify halophyte microalgae living in the back-barrier Lipar located on the shores of the Oman Sea in Sistan and Baluchestan Province. Water and phytoplankton sampling was carried out from the back-barrier in 2019-2020. Isolation and purification of the collected microalgae were performed by serial dilution and F2 medium culture in agar and liquid media, and finally, pure single colonies were obtained. Then, the initial identification of isolates was done through microscopic observations and comparison with morphologically valid classification keys. In the next step, 18S rRNA and 16S rRNA genes were used for further verification and identification by molecular method and sequencing. Analysis of morphological data and molecular sequencing showed that two purified isolates were green microalgae *Dunaliella salina* and green-blue microalgae *Cyanothece* sp., which was identified for the first time from the back-barrier. In terms of biological and commercial capacity, these two microalgae are suitable species for mass production and are widely used in industry. The purified strains have been donated to the National Bank of Iran Genetic Resources for future research or industrial-scale exploitation.

Keywords: Microalgae, Lipar back barrier, Sequencing, Morphology, *Cyanothece* sp., *Dunaliella salina*.