

مقاله علمی - پژوهشی:

بررسی اثرات شوری‌های مختلف بر میزان رنگدانه‌های ارزشمند ریز جلبک نمک‌دوست *Cyanothece* sp. شناسایی شده از کشتان پشت سدی لیپار (چابهار) در شرایط آزمایشگاهی

زهرا امینی خوئی^{۱*}، الناز عرفانی‌فر^۱، اشکان اژدری^۱، سیما ابیر^۱

*zamini.41@gmail.com

۱- مرکز تحقیقات شیلاتی آبهای دور، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، چابهار، ایران

تاریخ پذیرش: آبان ۱۴۰۰

تاریخ دریافت: خرداد ۱۴۰۰

چکیده

یکی از پیش‌نیازهای اصلی برای موفقیت در صنعت تولید ریزجلبک و استحصال رنگدانه‌های طبیعی از آنها، انتخاب سویه ریزجلبک مناسب برای پرورش است. در این مطالعه برای نخستین بار جداسازی، خالص‌سازی و شناسایی سویه بومی *Cyanothece* sp. از آبهای کشتان پشت سدی لیپار (شوری تا ۴۰۰ قسمت در هزار) چابهار صورت گرفت. سپس این ریزجلبک در پنج سطح مختلف شوری (۳۷، ۶۰، ۹۰، ۱۲۰ و ۱۸۰ قسمت در هزار) کشت داده شد و میزان رشد، تولید زی‌توده، محتوی رنگدانه کلروفیل a و b، کارتنوئید کل، بتاکاروتن و فیکوسیانیین مورد سنجش قرار گرفتند. روند رشد با شمارش سلولی و سنجش رنگدانه‌ها با استفاده از دستگاه اسپکتوفتومتر اندازه‌گیری شد. نتایج آنالیز داده‌ها نشان داد که با افزایش شوری در دامنه ۹۰-۳۷ قسمت در هزار، تعداد سلول‌ها و زی‌توده ریزجلبک به طور معنی‌داری ($p < 0.05$) افزایش یافت و به بیشینه $10^6 \times 5/0$ سلول بر میلی‌لیتر و $1/4$ گرم در لیتر در شوری ۹۰ ppt در روز هشتم کشت رسید. حداکثر محتوی کلروفیل a، کلروفیل b و فیکوسیانیین به ترتیب ۳۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر، ۱۷ میکروگرم بر میلی‌لیتر و $2/47$ میکروگرم بر میلی‌لیتر و در شوری ۹۰ ppt به دست آمد. با افزایش شوری محیط کشت از ۹۰-۳۷ و ۱۲۰ ppt، میزان کارتنوئید کل نیز به طور معنی‌داری افزایش یافت به طوری که از $0/8$ به $4/67$ میکروگرم بر میلی‌لیتر رسید. بتاکاروتن نیز از $0/03$ الی $0/17$ میکروگرم بر میلی‌لیتر افزایش یافت. بر اساس نتایج به دست آمده، به نظر می‌رسد رشد مطلوب و بیشینه میزان رنگدانه‌های ارزشمند در ریزجلبک *Cyanothece* sp. در شوری ۹۰-۱۲۰ قسمت در هزار، قابل دستیابی است.

لغات کلیدی: ریزجلبک *Cyanothece* sp.، شوری، رشد، بتاکاروتن، فیکوسیانیین

*نویسنده مسئول

مقدمه

یکی از مخاطرات جدی که امروزه سلامت جوامع بشری را مورد تهدید قرار داده است، استفاده از ترکیبات شیمیایی و مصنوعی در طیف زیادی از محصولات غذایی، بهداشتی و آرایشی است. بسیاری از بیمارهای کبدی، کلیوی و حتی سرطان‌ها ناشی از مصرف رنگدانه‌های شیمیایی مضر در غذا و نوشیدنی‌ها یا آب‌های شرب است (Dufossé et al., 2005). بنابراین، استفاده از ترکیبات طبیعی مشابه آنچه بشر در گذشته از آن بهره می‌برد، می‌تواند راهگشا باشد. اما چالش امروزی بشر عدم دسترسی به منابع آب شیرین کافی و خاک مناسب برای کشت گیاهانی است که در سالیان پیش برای مصارف مختلف غذایی و تهیه رنگ مورد استفاده قرار می‌گرفتند. برای غلبه بر این چالش، تولید میکروارگانیسم‌هایی مانند باکتری و ریزجلبک‌ها به عنوان جایگزین گیاهان خشکی برای تولید رنگدانه‌ها گزینه بسیار مناسبی است و در حال حاضر، در بسیاری از کشورهای جهان در حال گسترش است.

میکروارگانیسم‌ها به‌ویژه ریزجلبک‌ها یک کارخانه طبیعی و خارق‌العاده برای تولید رنگدانه‌های طبیعی هستند و استفاده از ظرفیت آنها راه مناسبی برای رهایی از چالش‌های ناشی از مصرف ترکیبات مصنوعی و شیمیایی است (Matos, 2017). یکی از رایج‌ترین محصولات تجاری مشتق از ریزجلبک‌ها رنگدانه‌های کلروفیل، کارتنوئیدها و فیکوسیانیین است که به صورت پودر خشک یا محلول در روغن به فروش می‌رسد (Andersen and Kawachi, 2005). بنابراین، با توجه به تقاضای روزافزون کشورهای مختلف برای مصرف این ترکیبات، محققان و تولیدکنندگان به دنبال دستیابی به دانش فنی تولید انبوه گونه‌های بیشتری از ریزجلبک‌ها برای استحصال رنگدانه‌های طبیعی از آنها می‌باشند (Pagels et al., 2021). در حال حاضر، متداول‌ترین رنگدانه موجود در بازار جهانی فیکوبیلی پروتئین استحصالی از سیانوباکتری *Arthrospira* sp. و *Nostoc* sp. بتاکاروتن مشتق از ریزجلبک نمک‌دوست *Dunaliella salina* و آستازانتین از *Haematococcus* می‌باشند (Sommer et al., 1992; Melis et al., 1999; Hejazi et al.,

2002). مطالعات متعدد نشان داده است که این رنگدانه‌های طبیعی فعالیت زیستی آنتی اکسیدانی، ضد سرطانی، ضد التهاب از خود نشان داده‌اند و از سلول‌های عصبی و کبدی محافظت می‌کنند (Roy and Pal, 2015; Lauritano et al., 2016; Martínez Andrade et al., 2018). علاوه بر این گونه‌ها، سایر ریزجلبک‌ها به‌ویژه ریزجلبک‌های ساکن در مناطق فوق شور نیز می‌توانند برای تولید انبوه مورد استفاده قرار گیرند، زیرا این سویه‌ها حاوی طیف گسترده‌ای از رنگدانه‌های محافظتی مانند کارتنوئید و فیکوسیانیین برای مقابله با شرایط نامساعد محیطی می‌باشند. از میان گونه‌های نمک‌دوست، اغلب مطالعات تحقیقاتی و تجاری صورت گرفته است که تاکنون محدود به ریزجلبک سبز نمک‌دوست *D. salina* بوده است که از تالاب‌های فوق شور جدا سازی شده‌اند (Ben-Amotz, 2004).

در مطالعه حاضر، سویه ریزجلبک سبز آبی نمک‌دوست *Cyanothece* sp. برای تحقیق انتخاب شد. این سویه را نخستین بار زهرا امینی خوئی (سال ۱۳۹۹) از کشتان پشت سدی لپار در چابهار از سواحل دریای عمان جداسازی نمود و پس از شناسایی مورفولوژیک و توالی‌یابی مولکولی به بانک میکروارگانیسم‌های مرکز ملی ذخایر ژنتیک ایران با کد IBRC-M50155 برای حفظ ذخیره و نگهداری طولانی مدت اهداء نمود. مطالعات نشان داده‌اند که از دیدگاه ارزش زیستی، این ریزجلبک حاوی ترکیبات زیستی با ارزشی است که دارای قابلیت استفاده به عنوان غذای فراسودمند می‌باشد. آنالیز ترکیبات بیوشیمیایی سویه *Cyanothece* sp. ATCC 51142 نشان داد که این سویه حاوی ۶۰-۵۰٪ پروتئین و ۳۴-۲۵٪ درصد کربوهیدرات در وزن خشک خود می‌باشد. همچنین پروفایل اسید آمینه متعادل و اسید چرب غیر اشباع ۳-۱۸:۳n نسبتاً بالایی دارد (Schneegurt et al., 1995). اخیراً Mota و همکاران (۲۰۲۰) یک پلیمر کربوهیدرات با نام cyanoflan را از سویه *Cyanothece* sp. CCY 0110 تخلیص کرده‌اند که می‌تواند به عنوان عامل امولسیون کننده/غلیظ کننده در صنایع غذایی یا لوازم آرایشی استفاده شود (Mota et al., 2020).

کشندان پشت سدی لیپار واقع در طول جغرافیایی شرقی (۱۳° ۴۵' ۶۰°)، عرض جغرافیایی شمالی (۲۱° ۱۶' ۲۵°) در ۱۹ کیلومتری شرق چابهار، سواحل دریای عمان در استان سیستان و بلوچستان صورت گرفت. به منظور شناخت خصوصیات محیطی زیستگاه ریزجلیک *Cyanothece* sp. فاکتورهای فیزیکی و شیمیایی آب محل نمونه برداری (کشندان پشت سدی لیپار) شامل شوری، pH و هدایت الکتریکی اندازه گیری و ثبت شد. اندازه گیری شوری با دستگاه شوری سنج چشمی (S/MIL-E, ATAGO) پس از رقیق نمودن به میزان ۱۰ برابر با استفاده از آب مقطر دوبار تقطیر انجام گرفت. pH نمونه ها با استفاده از دستگاه pH متر (WTW, 330i) و غلظت مواد مغذی آب شامل نیترات و فسفات با روش رنگ سنجی و با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر (U-2000, HITACHI) سنجش شد. خصوصیات غیر زیستی شامل میزان pH و شوری و میزان مواد مغذی شامل نیترات و فسفات نمونه های آب کشندان پشت سدی لیپار در در جدول ۱ ارائه شده است.

جدول ۱: خصوصیات فیزیکی و شیمیایی آب کشندان پشت سدی لیپار

Table 1: Physical and chemical properties of back barrier Lipar

شوری (گرم در لیتر)	pH	نیترات (میلی گرم در لیتر)	فسفات (میلی گرم در لیتر)
۱۰۰-۳۰۰ ppt	۷/۸±۰/۵	۲۶±۵	۰/۱۶±۰/۰۴

میکروسکوپی، ابتدا سلول ها با گلو تار آلدئید ۲/۵٪ تثبیت شدند (Wilde and Fliermans, 1979). کشت سلول ها در دمای محدوده ۲۵±۲ درجه سانتی گراد، شدت نور ۱۰۰±۳۰ میکرومول بر متر مربع بر ثانیه و pH: ۷/۸±۰/۳ صورت گرفت. از محیط کشت F2 تغییر یافته (بدون سلیس) برای رشد ریزجلیک *Cyanothece* sp. استفاده شد. مراحل رشد و افزایش مقیاس تولید جلبک به ترتیب زیر، مرحله به مرحله صورت پذیرفت. در ابتدا جلبک ها از کلنی های خالص شده بر آگار جامد به لوله های آزمایش با حجم ۱۰ میلی لیتر انتقال داده شدند تا تراکم مناسب سلول حاصل شود. سپس به ظروف بزرگتر (ارلن های

یکی از مهم ترین عوامل تاثیر گذار بر روند رشد و ترکیبات بیوشیمیایی ریزجلیک ها به ویژه سویه های نمک دوست، میزان شوری محیط کشت آنهاست. برای دستیابی به بالاترین تراکم سلولی، زی توده مناسب یا تولید رنگدانه های ارزشمند، بهتر است هر سویه در مطلوب ترین سطح شوری مخصوص آن پرورش یابد (Azachi et al., 2002). اگر ریزجلیک های نمک دوست در معرض شوری های پایین تر از حد مطلوب قرار گیرند، روند تکثیر و رشد آنها کند یا متوقف خواهد شد. در شوری های بالاتر نیز بیشتر انرژی متابولیک صرف تنظیم اسمزی و مقابله با تنش شوری می شود و تکثیر سلولی روندی بسیار کند و آرام خواهد داشت (Hejazi et al., 2002).

لذا، تحقیق حاضر به منظور شناخت شوری مطلوب کشت و تولید بیشینه زی توده و رنگدانه های ارزشمند در سویه بومی *Cyanothece* sp. طراحی و اجرا شد.

مواد و روش کار

در گام نخست اجرای این تحقیق، به منظور کار بر سویه *Cyanothece* sp. نمونه برداری با سه بار تکرار از آب

خالص سازی، شناسایی مورفولوژیک و توالی یابی مولکولی ریزجلیک *Cyanothece* sp.

در ابتدا، خالص سازی نمونه جمع آوری شده از کشندان پشت سدی به روش سریال رقت مایع و کشت با آگار ۱/۵٪ در پتری دیش صورت گرفت (Kaushik, 1987). شناسایی ریخت شناسی با مشاهده میکروسکوپ نوری و اینورت مجهز به دوربین (مدل، نیکون TF100) و مقایسه با کلیدهای شناسایی صورت گرفت (Komárek et al., 2014). شناسایی مولکولی از طریق تعیین توالی (ژن S 16rRNA) تأیید نمود که نام علمی سویه جداسازی شده *Cyanothece* sp. می باشد. برای مشاهده دقیق

شد و در دمای ۱۰۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ ساعت قرار داده شد تا کاملاً خشک گردد. فیلتر حاوی زی‌توده خشک شد. پس از خروج از آن در دسیکاتور قرار داده شده و در نهایت با ترازوی دیجیتالی (مدل، HR-200) وزن شد (Mota et al., 2013).

سنجش محتوی رنگدانه‌های کلروفیل a و b، کارتنوئید کل، بتاکاروتن و فیکوسیانیین

به منظور استخراج و سنجش محتوی رنگدانه‌های کلروفیل a و b، کارتنوئید کل، بتاکاروتن و فیکوسیانیین ریزجلبک مورد آزمایش *Cyanotheca* sp. در ابتدا ۵ میلی لیتر از سوسپانسیون جلبک در بالاترین فاز نمایی رشد (روز هشتم لغایت چهاردهم در تیمارهای مختلف)، برداشت شد و به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۵۰۰۰ سانتریفیوژ گردید. مایع روی دور ریخته شد و به رسوب موجود در ته فالكون ۵ میلی لیتر استون ۸۰٪ اضافه و به خوبی مخلوط و همگن شد و به مدت یک شبانه روز در دمای ۴ درجه یخچال در تاریکی نگهداری شد. سپس به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۵۰۰۰ سانتریفیوژ گردید (Mota et al., 2015). محتویات کلروفیل a، کلروفیل b و کارتنوئید کل در مایع رویی با اندازه‌گیری میزان جذب در طول موج ۴۴۰، ۴۶۶ و ۶۶۳ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر (Evolution™ 300 UV-Vis) تعیین گردید. غلظت‌ها با توجه به معادلات ذیل محاسبه شدند (Jeffrey and Humphrey, 1975):

$$\text{Chlorophyll a } (\mu\text{g/ mL}) = 12.25 (A663) - 2.55 (A646)$$

$$\text{Chlorophyll b } (\mu\text{g/ mL}) = 20.13 (A646) - 4.91 (A663)$$

$$\text{Chlorophyll a + b } (\mu\text{g/ mL}) = 17.76 (A646) + 7.34 (A663)$$

$$\text{Carotenoids } (\mu\text{g/ mL}) = 4.69(A440) - 0.267 \text{ Chl (a + b)}$$

$$\beta\text{- carotene } (\mu\text{g/ mL}) = -0.430(A412) + 0.251(A431) - 4.376A(460) + 13.216A(480)$$

دستگاه هموژنایزر مخلوط و یک سوسپانسیون همگن تهیه گردید. سپس حلال حاوی جلبک به مدت ۱۰ دقیقه و با فرکانس ۲۰ کیلو هرتز در دستگاه در معرض امواج فراصوت قرار گرفت و پس از آن نمونه‌ها در دمای ۳۷

(۵۰-۱۰۰ میلی‌لیتر) منتقل شدند و در ادامه در ظروف بزرگتر (ارلن‌های شیشه‌ای ۱ و ۲ لیتری) کشت داده شدند. هوادهی با ایجاد تلاطم مناسب جهت ممانعت از رسوب جلبک بر جداره ظروف فراهم گردید. در این آزمایش به منظور تعیین تاثیر سطوح مختلف شوری بر روند رشد و محتوی رنگدانه‌های کلروفیل a و b، کارتنوئید کل، بتاکاروتن و فیکوسیانیین ریزجلبک بومی *Cyanotheca* sp. پنج سطح مختلف شوری ۳۷، ۶۰، ۹۰، ۱۲۰ و ۱۸۰ ppt انتخاب شد و ریزجلبک مورد مطالعه در آنها کشت داده شد.

اندازه‌گیری روند رشد ریزجلبک *Cyanotheca* sp.

به منظور بررسی روند رشد، شمارش سلولی هر دو رور یکبار صورت گرفت. یک میلی‌لیتر از هر تیمار ریزجلبک‌ها در زیر میکروسکوپ نوری قرار داده شده و با استفاده از لام هموسیتومتر و شمارشگر (کانتر) دستی تعداد سلول‌ها شمارش شد. تراکم سلولی ریزجلبک‌ها با واحد تعداد سلول در یک میلی لیتر تعیین گردید (Andersen and Kawachi, 2005).

اندازه‌گیری غلظت زی‌توده

به منظور اندازه‌گیری زی‌توده در بالاترین فاز نمایی رشد (روز هشتم لغایت چهاردهم در تیمارهای مختلف)، حجم ۱۰ میلی‌لیتر از سوسپانسیون جلبک را از کاغذ صافی واتمن GF/C، ۰/۴۵ میکرون تحت شرایط خلاء عبور داده

استخراج و اندازه‌گیری فیکوسیانیین

به منظور استخراج فیکوسیانیین ابتدا ۰/۲ گرم از توده خشک ریزجلبک *Cyanotheca* sp. به ۴ میلی لیتر از بافر فسفات سدیم ۰/۱ مولار اضافه شد و با استفاده از

فیکوسیانین، جذب نوری محلول در طول موج‌های ۶۲۰ و ۶۵۲ نانومتر قرائت شد و غلظت فیکوسیانین (میکروگرم بر میلی لیتر) طبق فرمول ذیل محاسبه گردید (Silveira et al., 2007):

$$\text{غلظت فیکوسیانین (میکروگرم بر میلی لیتر)} = (\mu\text{g/mL}) = A_{620} - 0.474 \times A_{652} / 5.34$$

و شوری ۹۰ ppt در مدت دو هفته، کلنی‌هایی به شکل میله‌ای تا گرد و مدور و به رنگ سبز مایل به آبی مشاهده شد (شکل ۱). تصویر میکروسکوپی سویه خالص شده *Cyanothece* sp. در شکل ۲ نشان داده شده است. سلول‌ها به شکل کروی، میله‌ای با تحرک نسبتاً کم و با یک ماده ژلاتینی احاطه شده‌اند. اندازه سلول با طول ۵-۶ میکرومتر و عرض ۳-۴ میکرومتر با شکاف عرضی در صفحه قابل مشاهده است. سلول‌ها با یک لایه مخاطی احاطه شده‌اند. علاوه بر این، شناسایی مولکولی با استخراج DNA و تکثیر آن از طریق واکنش PCR و توالی‌یابی مولکولی انجام شد. نتایج حاصل از توالی‌یابی ژن 16S RNA صحت نتایج مورفولوژیک را تأیید کرد و مقایسه توالی ژنی نمونه بررسی شده با توالی ژن‌های ثبت شده در بانک جهانی ژنی NCBI نشان‌دهنده وجود بالاترین سطح تشابه با جنس *Cyanothece* sp. به میزان ۹۹٪ بود.

درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ ساعت کاملاً مخلوط شدند. سپس نمونه‌ها در دور ۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند و مایع رویی برای اندازه‌گیری فیکوسیانین جمع‌آوری گردید. برای تعیین میزان

A620: جذب در طول موج ۶۱۱ نانومتر، A652: جذب در طول موج ۶۵۱ نانومتر، ۵/۴۳: فاکتور ثابت

روش تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS ویرایش ۱۶ و ترسیم نمودارها در نرم افزار اکسل ویرایش ۲۰۱۰ انجام شد. برای بررسی اثر شوری‌های مختلف بر زی‌توده جلبک و محتوای رنگدانه‌ها از آزمون واریانس یک طرفه (ANOVA) استفاده شد. برای مقایسه بین تیمارهای مختلف شوری از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح معنی‌داری ۰/۰۵ استفاده شد.

نتایج

خالص‌سازی و شناسایی ریزجلبک *Cyanothece* sp.
با کشت نمونه بر پلیت آگار در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد

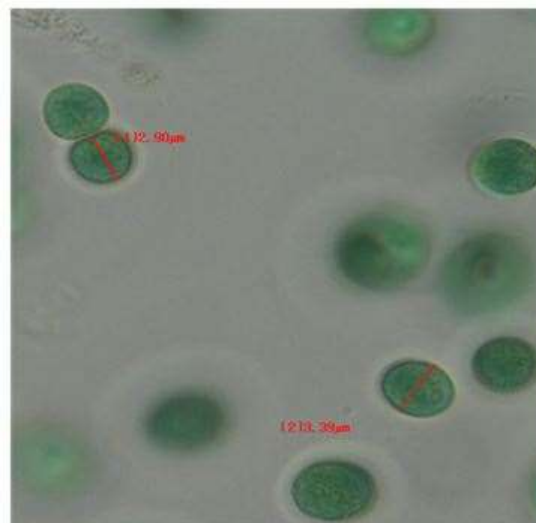


شکل ۱: کشت ریزجلبک *Cyanothece* sp. در محیط کشت آگار

Figure 1: *Cyanothece* sp. Culture in agar medium

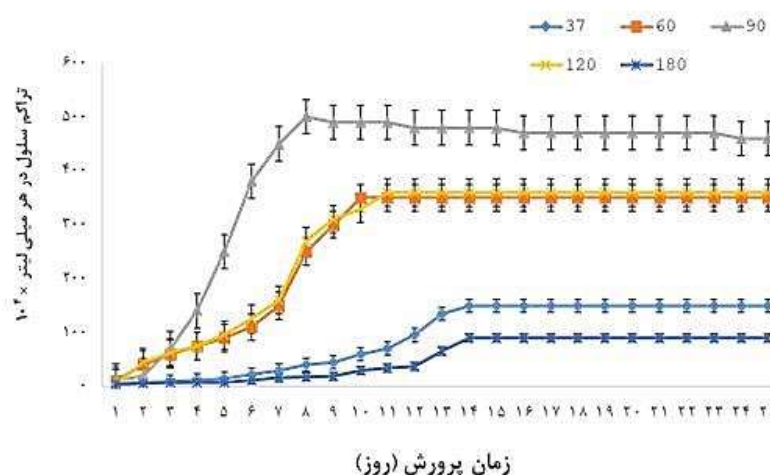
میزان رشد در پنج سطح شوری (۳۷، ۶۰، ۹۰، ۱۲۰ و ۱۸۰ ppt)

در شکل ۳، روند تغییرات تعداد سلول‌های ریزجلبک *Cyanothecce* sp. در پنج سطح مختلف شوری نشان داده شده است. آنالیز داده‌های شمارش سلولی این تحقیق نشان داد که میزان رشد و ازدیاد سلولی در تیمارهای مختلف شوری (۳۷، ۶۰، ۹۰، ۱۲۰ و ۱۸۰ ppt) اختلاف معنی‌داری با یکدیگر داشته‌اند ($p < 0.05$). بالاترین تعداد سلول تا روز ۸ کشت به میزان (5×10^6) سلول در میلی‌لیتر در شوری ۹۰ ppt و کمترین تعداد سلول تا روز ۱۴ پس از تلقیح در شوری ۱۸۰ ppt به میزان (0.9×10^6) سلول در میلی‌لیتر مشاهده شد. روند ازدیاد سلولی در شوری‌های ۶۰ و ۹۰ ppt مشابه و به صورت یکسان و حداکثر تعداد سلول در روز ۱۱ به ترتیب به تعداد $(3/5 \times 10^6)$ سلول در میلی‌لیتر و $(3/6 \times 10^6)$ سلول در میلی‌لیتر مشاهده شد.



شکل ۲: تصویر میکروسکوپی سویه خالص شده *Cyanothecce* sp.

Figure 2: Microscopic image of the purified strain *Cyanothecce* sp.



شکل ۳: منحنی رشد جلبک *Cyanothecce* sp. در شوری‌های مختلف

Figure 3: Growth curve of microalgae *Cyanothecce* sp. at different salinities
*داده‌ها میانگین سه تکرار می‌باشند.

*حروف متفاوت در هر ستون به معنای وجود اختلاف معنی‌دار بین داده‌هاست ($p < 0.05$).

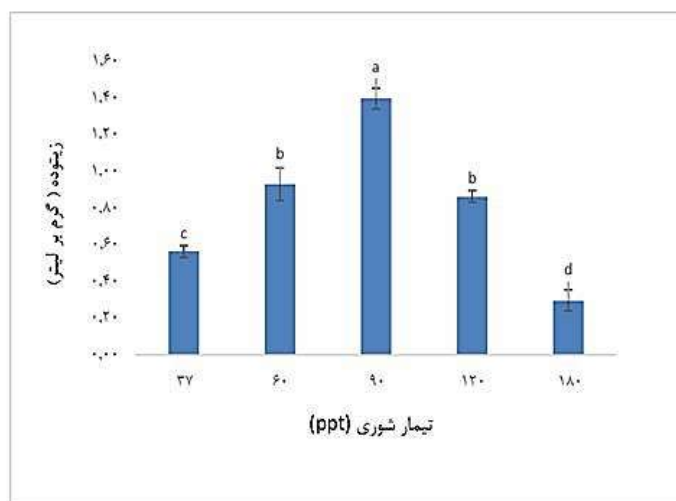
نشان داده شده است. نتایج آنالیز آماری در بررسی تاثیر شوری محیط کشت بر تولید زیتوده ریزجلبک *Cyanothecce* sp. نشان داد که اختلاف معنی‌داری در تولید زیتوده در بین تیمارهای مورد

میزان زیتوده در پنج سطح شوری (۳۷، ۶۰، ۹۰، ۱۲۰ و ۱۸۰ ppt)

در شکل ۴، مقایسه میزان تولید زیتوده ریزجلبک *Cyanothecce* sp. در پنج سطح مختلف شوری

مربوط به شوری ۱۸۰ ppt به میزان 0.3 ± 0.06 گرم در لیتر) مشاهده شد. تولید زیتوده در شوریهایی (۳۷، ۶۰ و ۱۲۰ ppt) به ترتیب به میزان 0.57 ± 0.03 ، 0.93 ± 0.09 و 0.87 ± 0.09 ثبت شد.

آزمایش از ۳۷، ۶۰، ۹۰، ۱۲۰ تا ۱۸۰ ppt وجود داشته است ($p < 0.05$). نتایج آنالیزها نشان داد که بالاترین میزان تولید زیتوده و وزن خشک مربوط به شوری ۹۰ ppt به میزان 1.4 ± 0.06 گرم در لیتر) و کمترین زیتوده



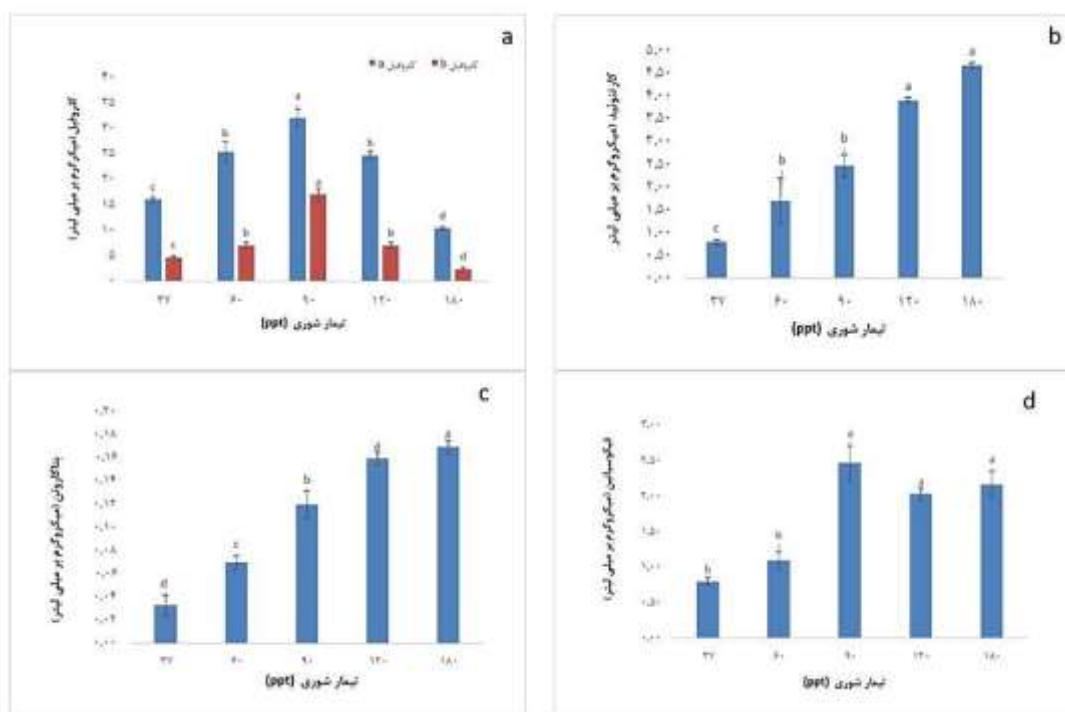
شکل ۴: زی توده ریز جلبک *Cyanothecce sp.* در شوریهایی مختلف
Figure 4: Microalgae biomass of *Cyanothecce sp.* at different salinities
*داده‌ها میانگین سه تکرار می باشند.

*حروف متفاوت در هر ستون به معنای وجود اختلاف معنی دار بین داده‌هاست ($p < 0.05$).

۱۸۰-۱۲۰ ppt به میزان $3/9$ میکروگرم بر میلی لیتر و $4/6$ میکروگرم بر میلی لیتر به دست آمد. در تیمارها با شوری ۳۷-۹۰ ppt میزان کارتنوئید روند کاهشی در دامنه $0.8-2/4$ میکروگرم بر میلی لیتر نشان داد. تولید بتاکاروتن نیز روند مشابه کارتنوئید کل داشت و افزایش شوری در ۱۲۰ و ۱۸۰ ppt سبب افزایش میزان بتاکاروتن در این تیمارها به ترتیب تا $0/16$ و $0/17$ میکروگرم بر میلی لیتر شد. میزان فیکوسیانیین از شوری ۳۷-۹۰ ppt افزایش معنی داری از $0.8-2/47$ میکروگرم بر میلی لیتر نشان داد ($p < 0.05$). میزان فیکوسیانیین در تیمارهای ۱۲۰ و ۱۸۰ ppt با کاهش زیتوده تا $1/60$ و $0/82$ میکروگرم بر میلی لیتر کاهش یافت.

میزان رنگدانه ها در پنج سطح مختلف شوری (۳۷، ۶۰، ۹۰، ۱۲۰ و ۱۸۰ ppt)

در شکل ۵، مقایسه محتوای رنگدانه‌های مختلف شامل کلروفیل a, b، کارتنوئید، بتاکاروتن و فیکوسیانیین در سطوح مختلف شوری در نشان داده شده است. آنالیز داده‌ها نشان داد که که شوری محیط کشت تاثیر معنی داری بر محتوای رنگدانه‌های کلروفیل a, b، کارتنوئید، بتاکاروتن و فیکوسیانیین ریز جلبک *Cyanothecce sp.* داشته است ($p < 0.05$) به طوری که با افزایش شوری در دامنه ۳۷-۹۰ ppt میزان کلروفیل a, b افزایش داشته است، اما در تیمارهای با شوری بیشتر شامل ۱۲۰-۱۸۰ ppt از میزان کلروفیل a, b ریز جلبک کاهش یافته است. روند تغییرات کارتنوئید در



شکل ۵: کلروفیل a, b (a), کارتنوئید کل (b)، بتاکاروتن (c) و فیکوسیانی (d) ریزجلبک *Cyanothece sp.*، در شوری‌های مختلف

Figure 5: Chlorophyll a, b (a) Total Carotenoid (b), Beta-carotene (c) and Phycocyanin (d) of microalgae *Cyanothece sp.* at different salinities

*داده ها میانگین سه تکرار می باشند.

*حروف متفاوت در هر ستون به معنای وجود اختلاف معنی‌دار بین داده‌هاست ($p < 0.05$)

بحث

ریزجلبک‌های ساکن در اکوسیستم‌های فوق اشباع نمک از دیدگاه زیستی و زیست فناوری ارزش بسیار بالایی دارند. زیرا همواره تصور می‌شود این میکروارگانیسم‌های به دلیل داشتن توانمندی‌های ویژه قادر به بقا و سازگاری با شرایط بسیار سخت محیط زندگی خود (نوسانات شوری و شدت نور زیاد) می‌باشند. نتایج این تحقیق نشان داد که ریزجلبک سبز آبی نمک‌دوست *Cyanothece sp.* جداسازی شده از کشندان پشت سدی لیپار نیز از این قاعده مستثنی نیست و این ریزجلبک از توان تحمل شوری محیط کشت و زنده ماندن در دامنه ۳۷-۱۸۰ ppt برخوردار است. اما میزان تکثیر و ازدیاد سلولی در شوری‌های مختلف متفاوت از یکدیگر بود به‌طوری‌که بیشترین تعداد سلول به میزان 5×10^6 سلول در میلی‌لیتر

در روز هشتم در حداکثر فاز نمایی رشد در شوری ۹۰ ppt و کمترین تعداد سلول تا روز ۱۴ در شوری ۱۸۰ ppt به میزان 0.9×10^6 سلول در میلی‌لیتر در شوری ۱۸۰ ppt مشاهده شد. میزان زی‌توده تولیدی نیز روند مشابه داشت و بالاترین وزن خشک ریزجلبک در شوری ۹۰ ppt به میزان ۱/۴ گرم در هر لیتر مشاهده شد. مطالعات سایر محققین در اغلب میکروارگانیسم‌های ساکن در زیستگاه های فوق شور نیز نشان داده است که توانایی تحمل نوسانات شوری در آنها وجود داشته است (El Semary and Fouda, 2015; Krishnakumar et al., 2015). سازگاری و دامنه تحمل بالای شوری در ریزجلبک *salina* کشندان پشت سدی لیپار نیز تأیید داده است (اربابی و همکاران، ۱۳۹۹). بالاترین تعداد سلولی و زی‌توده در ریزجلبک *D. salina* کشندان پشت سدی

تجمع یون‌های غیر آلی برای حفظ هموستاز اسمزی قابل مشاهده است (Zhang et al., 2018).

میکرو جلبک‌ها و سیانوباکتری‌ها موجودات فتوسنتز کننده‌ای هستند که انواع رنگدانه‌ها را برای برداشت نور تولید می‌کنند. رنگدانه‌های آنها معمولاً در سه دسته اصلی کلروفیل‌ها، کارتنوئیدها و فیکوبیلی‌پروتئین‌ها دسته‌بندی می‌شوند. در تحقیق حاضر نتایج آنالیز رنگدانه‌های ریز جلبک *Cyanothece* sp. نشان داد که افزایش شوری در دامنه ppt ۳۷-۹۰ باعث افزایش میزان کلروفیل a, b و فیکوسیانیین زی‌توده شده است، اما افزایش بیشتر شوری تا ۱۲۰ و ppt ۱۸۰ سبب کاهش معنی دار این رنگدانه‌ها شد. به طور معکوس تولید کارتنوئید و بتاکاروتن در شوری‌های پایین از ppt ۳۷-۹۰ کمتر از شوری ۱۲۰ و ppt ۱۸۰ مشاهده شد. کلروفیل ماده اصلی و اولیه فعالیت فتوسنتزی است در حالی که کارتنوئیدها رنگدانه‌های ثانویه می‌باشند و در گونه‌ها مختلف و در شرایط مختلف رشد تغییر می‌کنند. فیکوسیانیین‌ها نیز کلاس خاصی از رنگدانه‌ها هستند که فقط در سیانوباکتری‌ها و جلبک‌های قرمز وجود دارند و می‌توانند جاذب اصلی نور در این موجودات باشند (Novoveská et al., 2019). در این تحقیق افزایش میزان بتاکاروتن در ریز جلبک *Cyanothece* sp. در شوری ppt ۱۸۰ می‌تواند مربوط به توان سازگاری این سویه در مقابله با تنش شوری باشد. مطالعات Hejazi و همکاران (۲۰۰۲) نیز تغییر در کمیت رنگدانه‌های کلروفیل و کارتنوئید در نوسانات شوری را در ریز جلبک *D. salina* مشاهده کردند. در مطالعه El Baz و همکاران (۲۰۰۲) مشخص شد که در غلظت ppt ۳۰۰، تجمع قابل توجهی از بتاکاروتن در سلول‌های *D. salina* رخ داد. یک مکانیسم احتمالی می‌تواند مربوط به جدا شدن فیکوبیلیزوم‌ها از غشاء تیلاکوئید و ورود سریع یون‌های سدیم باشد که منجر به کاهش فتوسنتز می‌شود (Rafiqul et al., 2003). بر اساس نتایج این تحقیق، رشد مطلوب و تجمع رنگدانه‌های ارزشمند در ریز جلبک *Cyanothece* sp. در شوری ۹۰-۱۲۰ ppt قابل دستیابی است و به عنوان شوری مناسب برای تولید انبوه این ریز جلبک پیشنهاد می‌شود.

لیپار در شوری‌های ۹۰-۱۲۰ ppt به دست آمد (عنایتی، ۱۳۸۹).

با توجه به این‌که سویه‌های مختلف ریز جلبک جنس *Cyanothece* sp. دارای پراکنش گسترده هستند و در زیستگاه‌ها و اکوسیستم‌های متنوع از تالاب‌ها و باتلاق‌ها تا دریاچه‌های زلال، خاک کوهستان‌ها، ماسه‌های ساحلی و حتی مزارع برنج گزارش شده‌اند (Dechatiwongse et al., 2014; Ohki et al., 2014)، شوری مطلوب برای کشت آنها کاملاً متفاوت گزارش شده است. برای مثال، سویه *Cyanothece* sp. Viet Nam 01 در آب شیرین رشد مناسب داشته است (Ohki et al., 2014). سویه *Cyanothece* sp. 113 که از سواحل چین گزارش شده، در شوری ppt ۷۰ رشد مطلوب داشته است (Chi et al., 2007). در مطالعه De Philippis و همکاران (۱۹۹۳) بر سویه *Cyanothece* sp. جداسازی شده از یک اکوسیستم نمکی در سومالی، توان تحمل شوری در دامنه ۱۲۰-۳۰ ppt گزارش شده است.

رفتار و خصوصیات ظاهری ریز جلبک *Cyanothece* sp. در شوری‌های مختلف بررسی شد. مشاهدات میکروسکوپ نوری نشان داد سویه *Cyanothece* sp. به صورت اشکال متنوع و به صورت کروی، میله‌ای و باسیلی با تحرک نسبتاً کم قابل مشاهده است. از نظر اندازه عرض این سویه در حدود ۳-۴ میکرومتر و طول آن در حدود ۶-۵ میکرومتر متغیر بود. سایر مطالعات نیز تنوع در شکل ظاهری در گونه‌های نمک‌دوست را گزارش کرده‌اند (Sinetova et al., 2012; Saito et al., 2018). تغییر در شکل و ساختار ظاهری سویه‌های نمک‌دوست می‌تواند مربوط به انعطاف‌پذیری دیواره سلولی آنها در مواجهه با نوسانات شوری باشد که تنظیم اسمزی را برای آنها آسان‌تر کرده است. به طور کلی، سلول‌های تحت تنش شوری در مقایسه با سلول‌های عادی دچار تغییراتی در ریخت‌شناسی و ساختارهای مولکولی می‌گردند که از جمله می‌توان به سرعت رشد پایین‌تر و اندازه سلولی کوچک‌تر اشاره نمود. همچنین در بعضی سویه‌ها، تحرک سلولی کم می‌شود یا از دست خواهد رفت. از نظر مولکولی نیز تغییر در تنظیم اسمزی از طریق تولید املاح آلی و

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله بر خود لازم می‌دانند مراتب تشکر صمیمانه خود را از کارشناسان تحقیقاتی و پشتیبانی مرکز تحقیقات شیلاتی آبهای دور-چابهار که ما را در انجام این تحقیق یاری کردند، اعلام کنند.

منابع

- اربابی، س.، اکبری، پ. و 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.
- عنایتی، ش.، ۱۳۸۹. تاثیر شوری بر رشد، غلظت کلروفیل و بتاکاروتن در جلبک *Dunaliella* sp. جداسازی شده از خلیج چابهار. پایان نامه، گروه شیلات و محیط زیست، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران.
- Andersen, R.A. and Kawachi, M., 2005. Algal culturing techniques. Elsevier/Academic Press, New York, 205–218.
- Azachi, M., Sadka, A., Fisher, M., Goldshlag, P., Gokhman, I. and Zamir, A., 2002. Salt induction of fatty acid elongase and membrane lipid modifications in the extreme halotolerant alga *Dunaliella salina*. *Plant Physiology*, 129:1320–1329. DOI:10.1104/pp.001909.
- Ben-Amotz, A., 2004. Industrial production of microalgal cell-mass and secondary products major industrial species: *Dunaliella*. In: Richmond A (ed) Microalgal culture: biotechnology and applied phycology. Blackwell Science Oxford. pp. 273–280. DOI:10.1007/s00253-007-0844-9.
- Chi, Z., Su, C.D. and Lu, W.D., 2007. A new exopolysaccharide produced by marine *Cyanothece* sp.. *Bioresource Technology*, 98(6): 1329-1332. DOI:10.1016/j.biortech.2006.05.001.
- De Philippis, R., Margheri, M.C., Pelosi, E. and Ventura, S., 1993. Exopolysaccharide production by a unicellular cyanobacterium isolated from a hypersaline habitat. *Journal of Applied Phycology*, 5(4): 387-394. DOI:10.1007/BF02182731.
- Dechatiwongse, P., Srisamai, S., Maitland, G. and Hellgardt, K., 2014. Effects of light and temperature on the photoautotrophic growth and photoinhibition of nitrogen-fixing cyanobacterium *Cyanothece* sp. ATCC 51142. *Algal Research*, 5: 103-111. DOI:10.1016/j.algal.2014.06.004.
- Dufossé, L., Galaup, P., Yaron, A., Arad, S.M., Blanc, P., Murthy, K.N.C. and Ravishankar, G.A., 2005. Microorganisms and microalgae as sources of pigments for food use: a scientific oddity or an industrial reality? *Trends in Food Science & Technology*, 16(9): 389-406. DOI:10.1016/j.tifs.2005.02.006.
- El Baz, F.K., Aboul-Enein, A.M., El-Baroty, G.S., Youssef, A.M. and Abdel-Baky, H.H., 2002. Accumulation of Antioxidant Vitamins in *Dunaliella salina*; F.A.O.: Rome, Italy.

- El Semary, N.A. and Fouda, M., 2015.** Anticancer activity of *Cyanothece* sp. strain extracts from Egypt: First record. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 5(12): 992-995. DOI:10.1016/j.apjtb.2015.09.004.
- Hejazi, M.A., De Lamarliere, C., Rocha, J.M.S., Vermue, M., Tramper, J. and Wijffels, R.H., 2002.** Selective extraction of carotenoids from the microalga *Dunaliella salina* with retention of viability. *Biotechnology and Bioengineering*, 79(1): 29-36. DOI:10.1002/bit.10270.
- Jeffrey, S.T. and Humphrey, G., 1975.** New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c1 and c2 in higher plants, algae and natural phytoplankton. *Biochimie und Physiologie der Pflanzen*, 167: 191-194. DOI:10.1016/S0015-3796(17)30778-3.
- Kaushik, B.D., 1987.** Laboratory methods for blue –green algae, Associated Publishing Company. DOI:10.22092/BOTANY.2016.105984
- Komárek, J., Kaštovský, J., Mareš, J. and Johansen, J., 2014.** Taxonomic classification of cyanoprokaryotes (cyanobacterial genera), using a polyphasic approach. *European Journal of Phycology*, 86(4): 295-335.
- Krishnakumar, S., Gaudana, S.B., Digmurti, M.G., Viswanathan, G.A., Chetty, M. and Wangikar, P.P., 2015.** Influence of mixotrophic growth on rhythmic oscillations in expression of metabolic pathways in diazotrophic cyanobacterium *Cyanothece* sp. ATCC 51142. *Bioresource Technology*, 188: 145-152. DOI:10.1016/j.biortech.2015.02.016.
- Lauritano, C., Andersen, J.H., Hansen, E., Albrightsen, M., Escalera, L., Esposito, F., Helland, K., Hanssen, K.Ø., Romano, G. and Ianora, A., 2016.** Bioactivity screening of microalgae for antioxidant, anti-inflammatory, anticancer, anti-diabetes and antibacterial activities. *Frontiers in Marine Science*, 3: 1–12. DOI:10.3389/fmars.2016.00068.
- Martínez Andrade, K.A., Lauritano, C., Romano, G. and Ianora, A., 2018.** Marine microalgae with anti-cancer properties. *Marine Drugs*, 16(5): 165-185. DOI:10.3390/md16050165.
- Matos, Â.P., 2017.** The impact of microalgae in food science and technology. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 94(11): 1333-1350. DOI:10.1007/s11746-017-3050-7.
- Melis, A., Neidhardt, J. and Benemann, J., 1999.** *Dunaliella salina* (Chlorophyta) with small chlorophyll antenna sizes exhibit higher photosynthetic productivities and photon use efficiencies than normally pigmented cells. *Journal of Applied Phycology*, 10: 515–525. https://org/10.1023/A:1008076231267.
- Mota, R., Pereira, S.B., Meazzini, M., Fernandes, R., Santos, A., Evans, C.A., De Philippis, R., Wright, P.C. and Tamagnini, P., 2015.** Effects of heavy metals on *Cyanothece* sp. CCY 0110

- growth, extracellular polymeric substances (EPS) production, ultrastructure and protein profiles. *Journal of Proteomics*, 120: 75-94. DOI:10.1016/j.jprot.2015.03.004.
- Mota, R., Guimarães, R., Büttel, Z., Rossi, F., Colica, G., Silva, C.J., Santos, C., Gales, L., Zille, A., De Philippis, R. and Pereira, S.B., 2013.** Production and characterization of extracellular carbohydrate polymer from *Cyanothece* sp. CCY 0110. *Carbohydrate Polymers*, 92(2): 1408-1415. DOI:10.1016/j.carbpol.2012.10.070.
- Mota, R., Vidal, R., Pandeirada, C., Flores, C., Adessi, A., De Philippis, R., Nunes, C., Coimbra, M.A. and Tamagnini, P., 2020.** Cyanoflan: A cyanobacterial sulfated carbohydrate polymer with emulsifying properties. *Carbohydrate Polymers*, 229: 115-525. DOI:10.1016/j.carbpol.2019.115525.
- Novoveská, L., Ross, M.E., Stanley, M.S., Pradelles, R., Wasiolek, V. and Sassi, J.F., 2019.** Microalgal carotenoids: A review of production, current markets, regulations, and future direction. *Marine Drugs*, 17(11): 640. DOI:10.3390/md17110640.
- Ohki, K., Le, N.Q.T., Yoshikawa, S., Kanesaki, Y., Okajima, M., Kaneko, T. and Thi, T.H., 2014.** Exopolysaccharide production by a unicellular freshwater cyanobacterium *Cyanothece* sp. isolated from a rice field in Vietnam. *Journal of Applied Phycology*, 26(1): 265-272. DOI:10.1007/s10811-013-0094-4.
- Pagels, F., Pereira, R.N., Vicente, A.A. and Guedes, A., 2021.** Extraction of Pigments from Microalgae and Cyanobacteria—A Review on Current Methodologies. *Applied Sciences*, 11(11): 51-87. DOI:10.3390/app11115187.
- Rafiqul, I. M., Hassan, A., Sulebele, G., Orosco, C. A., Roustaian, P. and Jalal, K. C. A. 2003.** Salt stress culture of blue green algae *Spirulina fusiformis*. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 6: 648–650.
- Roy, S.S. and Pal, R., 2015, June.** Microalgae in aquaculture: a review with special references to nutritional value and fish dietetics. In *Proceedings of the Zoological Society*, 68: 1-8. DOI:10.1007/s12595-013-0089-9.
- Saito, M., Endo, K., Kobayashi, K., Watanabe, M., Ikeuchi, M., Murakami, A., Murata, N. and Wada, H., 2018.** High myristic acid content in the cyanobacterium *Cyanothece* sp. PCC 8801 results from substrate specificity of lysophosphatidic acid acyltransferase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1863(9): 939-947. DOI:10.1016/j.bbalip.2018.05.011.
- Schneegurt, M.A., Arieli, B., McKeehen, J.D., Stephens, S.D., Nielsen, S.S., Saha, P.R., Trumbo, P.R. and Sherman, L.A., 1995.** Compositional and toxicological evaluation of the diazotrophic cyanobacterium, *Cyanothece* sp. strain ATCC 51142. *Aquaculture*, 134(3-4): 339-349. DOI:10.1016/0044-8486(95)00054-6.

- Silveira, S.T., Burkert, J.D.M., Costa, J.A.V., Burkert, C.A.V. and Kalil, S.J., 2007.** Optimization of phycocyanin extraction from *Spirulina platensis* using factorial design. *Bioresource Technology*, 98(8): 1629-1634. DOI:10.1016/j.biortech.2006.05.050.
- Sinetova, M.A., Červený, J., Zavřel, T. and Nedbal, L., 2012.** On the dynamics and constraints of batch culture growth of the cyanobacterium *Cyanothece* sp. ATCC 51142. *Journal of Biotechnology*, 162(1): 148-155. DOI:10.1016/j.jbiotec.2012.04.009.
- Sommer, T.R., D'Souza F.M.L. and Morrissy, N.M., 1992.** Pigmentation of adult rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, using the green alga *Haematococcus pluvialis*. *Aquaculture*, 106: 63-74. DOI:10.1016/0044-8486(92)90250-O.
- Wilde, E.W. and Fliermans, C.B., 1979.** Fluorescence microscopy for algal studies. *Transactions of the American Microscopical Society*, 98: 96-102. DOI:10.2307/3225943.
- Zhang, X., Yang, S., Sun, J., Wu, C., Wang, J., Zhang, G. and 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. DOI:10.1007/s13131-018-1297-y.

Investigation the effects of different salinities on valuable pigments of halophyte microalgae *Cyanothece* sp. isolated from back barrier Lipar (Chabahar) in laboratory conditions

Aminikhoie Z.^{1*}; Erfanifar E.¹; Ajdari A.¹; Abir S.¹

*zamini.41@gmail.com

1- Off-shore Fisheries Research Center- Chabahar, Iranian Fisheries Science Research, Institute (IFMRI), Agricultural Research Educations and Extension Organization (AREEO), Chabahar, Iran

Abstract

One of the main prerequisites for success in the microalgae production industry and the extraction of natural pigments from them is the selection of a suitable microalgae strain for culture. In this study, for the first time, isolation, purification and identification of native strain of *Cyanothece* sp. Chabahar was taken from Lipar back barrier (salinity up to 400 part per thousand, ppt). In the next step, to find suitable conditions for growing, this microalga was cultured in five different salinity levels (37, 60, 90, 120, 180 ppt) and growth rate, biomass production, chlorophyll a and b pigment content, total carotenoids and phycocyanin were assayed. The growth performance was performed by cell counting and measuring pigments using a spectrophotometer method. The analysis of data showed that increasing salinity from 37 to 90 ppt increased the number of microalgae cells and biomass and the maximum number of cells was 5×10^6 cells per ml and biomass 1.4 g/L was obtained at a salinity of 90 ppt. The maximum contents of chlorophyll a, chlorophyll b and phycocyanin were obtained (32 µg/ml), (17 µg/ml) and (2.47 µg/ml) at 90 ppt salinity, respectively. By increasing the salinity from 37 to 120 ppt, the total carotenoids production and beta-carotene also increased significantly, so that the amount of carotenoids reached from 0.8 to 4.67 µg/ml. Beta-carotene also increased from 0.03 to 0.17 mg/ml. Based on this information, optimal growth and accumulation of economic pigments in microalgae *Cyanothece* sp. can be obtained at salinity 90 to 120 ppt.

Keywords: Microalgae, *Cyanothece* sp., Salinity, Growth, Beta-carotene, Phycocyanin

*Corresponding author