

**مقاله علمی - پژوهشی:**

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

زهرا امینی خوئی<sup>\*</sup><sup>۱</sup>، الناز عرفانی فر<sup>۱</sup>، اشکان اژدری<sup>۱</sup>، سیما ابیر<sup>۱</sup>

<sup>\*</sup>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 محتوی رنگدانه کلروفیل a و b، کارتونیوئید کل، بتاکاروتن و فیکوسیانین مورد سنجش قرار گرفتند. روند رشد با شمارش سلولی و سنجش رنگدانه‌ها با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر اندازه‌گیری شد. نتایج آنالیز داده‌ها نشان داد که با افزایش شوری در دامنه ۳۷-۹۰٪ قسمت در هزار، تعداد سلول‌ها و زی توده ریزجلبک به طور معنی‌داری ( $p < 0.05$ ) افزایش یافت و به بیشینه  $\times 10^6$  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 فیکوسیانین به ترتیب  $32$  میکروگرم بر میلی‌لیتر،  $17$  میکروگرم بر میلی‌لیتر و  $2/47$  میکروگرم بر میلی‌لیتر و در شوری ppt ۹۰ به دست آمد. با افزایش شوری محیط کشت از  $37-90$  و  $120$  ppt، میزان کارتونیوئید کل نیز به طور معنی‌داری افزایش یافت به طوری که از  $0/8$  به  $4/67$  میکروگرم بر میلی‌لیتر رسید. بتاکاروتن نیز از  $0/03$  الى  $0/17$  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  $90-120$  ppt در هزار، قابل دستیابی است.

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

\*نویسنده مسئول

#### ۴۵ 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.

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 کشنдан پشت سدی لیپار در چابهار از سواحل دریای عمان جداسازی نمود و پس از شناسایی موروفولوژیک و توالی‌یابی مولکولی به بانک میکروارگانیسم‌های مرکز ملی ذخایر ژنتیک ایران با کد IBRC-M50155 برای حفظ ذخیره و نگهداری طولانی‌مدت 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  $\text{C}_{18:\text{n}-3}$  نسبتاً بالای دارد (*Schneegurt et al.*, 1995). کربوهیدراتات با نام Mota (Mota and Hejazi, 2020) یک پلیمر *Cyanothece cyanoflan* را از سویه *CCY 0110* sp. تخلیص کرده‌اند که می‌تواند به عنوان عامل امولسیون کننده/غليظ کننده در صنایع غذایی یا لوازم آرایشی استفاده شود (Mota *et al.*, 2020).

کشنдан پشت سدی لیپار واقع در طول جغرافیایی شرقی (۱۳° ۴۵' ۴۵°، عرض جغرافیایی شمالی ۲۱° ۲۵°) در ۱۹ کیلومتری شرق چابهار، سواحل دریای عمان در استان سیستان و بلوچستان صورت گرفت. به منظور شناخت خصوصیات محیطی زیستگاه ریزجلبک *Cyanothece* sp.، فاکتورهای فیزیک و شیمیایی آب محل نمونهبرداری (کشندان پشت سدی لیپار) شامل شوری، pH و هدایت الکتریکی اندازه‌گیری و ثبت شد. اندازه‌گیری شوری با دستگاه شوری‌سنج چشمی (S/MIL-E, ATAGO) پس از رقیق نمودن به میزان ۱۰ pH نمونه‌ها با استفاده از آب مقطر دوبار تقطیر انجام گرفت. (WTW) pH ۳.۳ و غلظت مواد مغذی آب شامل نیترات و فسفات با روش رنگ‌سنجی 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 نمونه‌های آب کشنдан پشت سدی لیپار در جدول ۱ آرائه شده است.

یکی از مهم‌ترین عوامل تاثیرگذار بر روند رشد و ترکیبات بیوشیمیایی ریزجلبک‌ها به‌ویژه سویه‌های نمکدوست، میزان شوری محیط کشت آنهاست. برای دستیابی به بالاترین تراکم سلولی، زیستوده مناسب یا تولید رنگدانه‌های ارزشمند، بهتر است هر سویه در مطلوب‌ترین سطح شوری مخصوص آن پرورش یابد (Azachi *et al.*, 2002). اگر ریزجلبک‌های نمکدوست در معرض شوری‌های پایین‌تر از حد مطلوب قرار گیرند، روند تکثیر و رشد آنها کند یا متوقف خواهد شد. در شوری‌های بالاتر نیز بیشتر انرژی متابولیک صرف تنظیم اسمزی و مقابله با تنش شوری می‌شود 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 زیستوده و رنگدانه‌های 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 نمونهبرداری با سه بار تکرار از آب

جدول ۱: خصوصیات فیزیکی و شیمیایی آب کشندان پشت سدی لیپار  
Table 1: Physical and chemical properties of back barrier Lipar

فسفات (میلی گرم در لیتر)	نیترات (میلی گرم در لیتر)	pH	شوری (گرم در لیتر)
۰/۱۶ ± ۰/۴	۲۶ ± ۵	۷/۸ ± ۰/۵	۱۰۰-۳۰۰ ppt

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

خالص‌سازی، شناسایی مورفولوژیک و توالی‌بایی مولکولی ریزجلبک *Cyanothece* sp. در ابتدا، خالص‌سازی نمونه جمع‌آوری شده از کشندان پشت سدی به روش سریال رقت مایع و کشت با آگار ۱۵٪ در پتری دیش صورت گرفت (Kaushik, 1987). شناسایی ریخت‌شناسی با مشاهده میکروسکوپ نوری و اینورت مجهر به دوربین (مدل، نیکون TF100) و مقایسه با کلیدهای شناسایی صورت گرفت (Komárek *et al.*, 2014). شناسایی مولکولی از طریق تعیین توالی S ۱۶tRNA (۱۶S rRNA) تأیید نمود که نام علمی سویه جداسازی شده *Cyanothece* sp. می‌باشد. 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 آون در دسیکاتور قرار داده شده و در نهایت با ترازوی دیجیتالی (مدل، HR-200 (Mota *et al.*, 2013).

**سنجدش محتوى رنگدانه‌های کلروفیل a و b، کارتونویید کل، بتاکاروتون و فیکوسیانین** به منظور استخراج و سنجدش محتوى رنگدانه‌های کلروفیل a و b، کارتونویید کل، بتاکاروتون و فیکوسیانین ریزجلبک مورد آزمایش *Cyanothece 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 فالکون ۵ میلی لیتر استون ۸٪ اضافه و به خوبی مخلوط و همگن شد و به مدت یک شبانه روز در دمای ۴ درجه بیچال در تاریکی نگهداری شد. سپس به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۵۰۰۰ سانتریفیوژ گردید (Mota *et al.*, 2015).

محتويات کلروفیل a، کلروفیل b و کارتونویید کل در مایع رویی با اندازه‌گیری میزان جذب در طول موج ۶۴۶، ۴۴۰ 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:

$$\text{Chlorophyll a } (\mu\text{g/mL}) = 12.25 (\text{A}663) - 2.55 (\text{A}646)$$

$$\text{Chlorophyll b } (\mu\text{g/mL}) = 20.13 (\text{A}646) - 4.91 (\text{A}663)$$

$$\text{Chlorophyll a + b } (\mu\text{g/mL}) = 17.76 (\text{A}646) + 7.34 (\text{A}663)$$

$$\text{Carotenoids } (\mu\text{g/mL}) = 4.69(\text{A}440) - 0.267 \text{ Chl (a + b)}$$

$$\beta\text{-carotene } (\mu\text{g/mL}) = -0.430(\text{A}412) + 0.251(\text{A}431) - 4.376\text{A} (460) + 13.216\text{A} (480)$$

دستگاه هموژنایزر مخلوط و یک سوسپانسیون همگن تهیه گردید. سپس حلال حاوی جلبک به مدت ۱۰ دقیقه و با فرکанс ۲۰ کیلو هرتز در دستگاه در معرض امواج فرماصوت 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. هواهی 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 محتوى رنگدانه‌های کلروفیل a و b، کارتونویید کل، بتاکاروتون و فیکوسیانین ریزجلبک يومی *Cyanothece sp.*، پنج سطح مختلف شوری ۳۷، ۳۶، ۹۰ و ۱۲۰ ppt انتخاب شد و ریزجلبک مورد مطالعه در آنها کشت داده شد.

**اندازه‌گیری روند رشد ریزجلبک *Cyanothece 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 سلول ها شمارش شد. تراکم سلولی ریزجلبک‌ها با واحد تعداد Andersen and سلول در یک میلی‌لیتر تعیین گردید (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، ۴۵/۰۰ میکرون تحت شرایط خلاء عبور داده

#### استخراج و اندازه‌گیری فیکوسیانین

به منظور استخراج فیکوسیانین ابتدا ۰/۲ گرم از توده خشک ریزجلبک *Cyanothece sp.* به ۴ میلی‌لیتر از بافر فسفات سدیم ۱/۰ 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):

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

$$\text{غلظت فیکوسیانین (میکروگرم بر میلی لیتر)} = \frac{A620 - 0.474 \times A652}{5.34}$$

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 حرکت 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 *PCR* و تکثیر آن از طریق واکنش *RT-PCR* و توالی یابی *16S rRNA* 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.

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 ۲۰ انجام شد. برای بررسی اثر شوری‌های مختلف بر زی‌توده جلبک و محتواهای 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

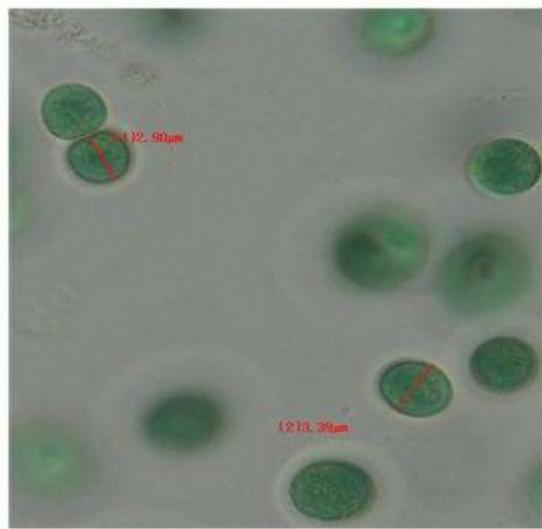


شکل ۱: کشت ریزجلبک *Cyanothece* sp. در محیط کشت آگار

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

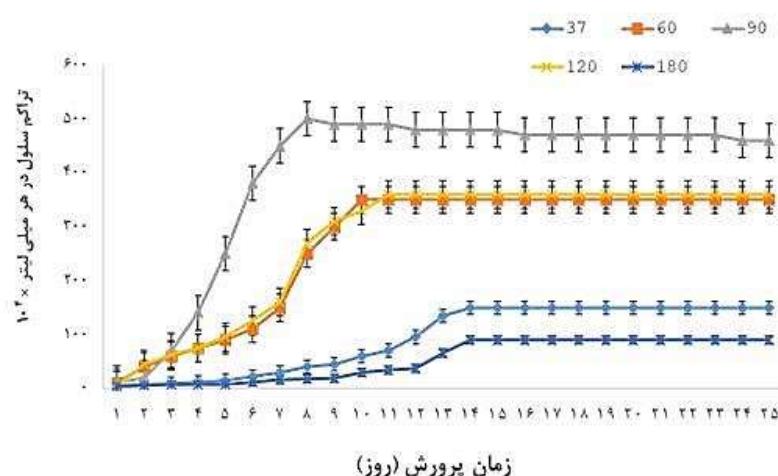
### میزان رشد در پنج سطح شوری (۳۷، ۶۰، ۹۰، ۱۲۰ و ppt ۱۸۰)

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

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



شکل ۳: منحنی رشد جلبک *Cyanothece* sp. در شوری‌های مختلف  
Figure 3: Growth curve of microalgae *Cyanothece* sp. at different salinities

\*داده‌ها میانگین سه تکرار می‌باشند.

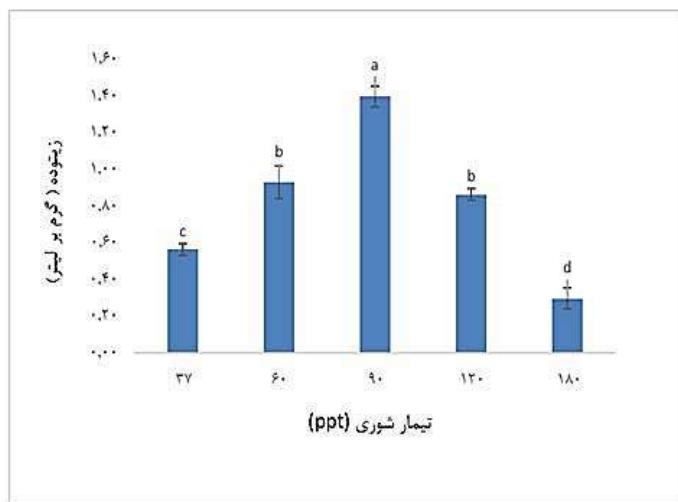
\*حروف متفاوت در هر ستون به معنای وجود اختلاف معنی‌دار بین داده‌های است ( $p < 0.05$ ).

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

میزان زیستوده در پنج سطح شوری (۳۷، ۶۰، ۹۰، ۱۲۰ و ppt ۱۸۰) در شکل ۴، مقایسه میزان تولید زیستوده ریزجلبک *Cyanothece* sp. در پنج سطح مختلف شوری

مربوط به شوری ppt ۱۸۰ به میزان  $۳\pm ۰.۶$  گرم در لیتر) مشاهده شد. تولید زیستوده در شوری‌های (۳۷، ۶۰ و ۹۰ ppt) به ترتیب به میزان  $۳\pm ۰.۹$ ،  $۰.۵۷\pm ۰.۰۹$  و  $۰.۸۷\pm ۰.۰۹$  گرم در لیتر ثبت شد.

آزمایش از ۳۷، ۶۰، ۹۰ و ۱۲۰ ppt وجود داشته است ( $p<0.05$ ). نتایج آنالیزها نشان داد که بالاترین میزان تولید زیستوده و وزن خشک مربوط به شوری ۹۰ ppt به میزان ( $۱.۴\pm ۰.۶$  گرم در لیتر) و کمترین زیستوده



شکل ۴: زیستوده ریزجلبک *Cyanothecace* sp. در شوری‌های مختلف

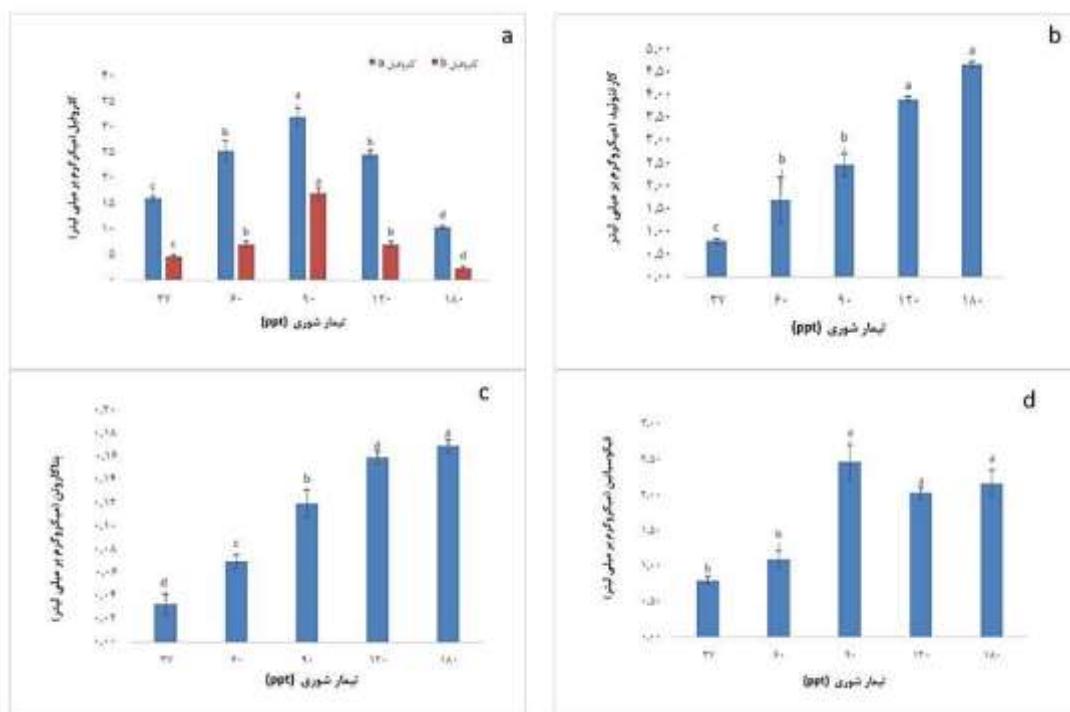
Figure 4: Microalgae biomass of *Cyanothecace* sp. at different salinities

\*داده‌ها میانگین سه تکرار می‌باشند.

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

میزان رنگدانه‌ها در پنج سطح مختلف شوری (۳۷، ۶۰، ۹۰ و ۱۲۰ ppt) به میزان  $۳\pm ۰.۹$  میکروگرم بر میلی‌لیتر و ۴/۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر به دست آمد. در تیمارها با شوری ۳۷-۹۰ ppt میزان کارتنوئید روند کاهشی در دامنه ۸-۲/۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر نشان داد. تولید بتاکاروتون نیز روند مشابه کارتنوئید کل داشت و افزایش شوری در ۱۲۰ و ۱۸۰ ppt سبب افزایش میزان بتاکاروتون در این تیمارها به ترتیب تا  $۰.۱۶$  و  $۰.۱۷$  میکروگرم بر میلی‌لیتر شد. میزان فیکوسیانین از شوری ۳۷-۹۰ ppt میزان فیکوسیانین از شوری ۰-۶ ppt معنی‌داری از  $۰.۰۵$  ( $p<0.05$ ). میزان فیکوسیانین در تیمارهای ۱۲۰ و ۱۸۰ ppt با کاهش زیستوده تا  $۰.۱۶$  و  $۰.۱۷$  میکروگرم بر میلی‌لیتر کاهش یافت.

میزان رنگدانه‌ها در پنج سطح مختلف شوری (۳۷، ۶۰، ۹۰ و ۱۲۰ ppt) به میزان  $۳\pm ۰.۹$  میکروگرم بر میلی‌لیتر در شکل ۵، مقایسه محتوای رنگدانه‌های مختلف شامل کلروفیل a, b, کارتنوئید، بتاکاروتون و فیکوسیانین در سطوح مختلف شوری در نشان داده شده است. آنالیز داده‌ها نشان داد که شوری محیط کشت تاثیر معنی‌داری بر محتوی رنگدانه‌های کلروفیل a, b, کارتنوئید، بتاکاروتون و فیکوسیانین ریزجلبک *Cyanothecace* 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 ppt ۱۲۰-۱۸۰ از میزان کلروفیل a, b ریزجلبک کاهش یافته است. روند تغییرات کارتنوئید در



شکل ۵: کلروفیل a (a)، کارتوئید کل (b)، بتاکاروتن (c) و فیکوسيانین (d) 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

\*داده‌ها میانگین سه تکرار می‌باشند.

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

در روز هشتم در حداکثر فاز نمایی رشد در شوری ppt ۹۰ و کمترین تعداد سلول تا روز ۱۴ در شوری ppt ۱۸۰ به میزان  $1 \times 10^6$  سلول در میلی‌لیتر در شوری ppt ۱۸۰ مشاهده شد. میزان زی‌توده تولیدی نیز روند مشابه داشت و بالاترین وزن خشک ریزجلبک در شوری ppt ۹۰ به میزان  $1/4$  گرم در هر لیتر مشاهده شد. مطالعات سایر محققین در اغلب میکرووارگانیسم‌های 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).

D. salina کشنдан پشت سدی لیپار نیز تأثیر داده است (اربابی و همکاران، ۱۳۹۹). بالاترین تعداد سلولی و زی‌توده در ریزجلبک D. salina کشنдан پشت سدی

## بحث

ریزجلبک‌های ساکن در اکوسیستم‌های فوق اشباع نمک از دیدگاه زیستی و زیست فناوری ارزش بسیار بالایی دارند. زیرا همواره تصور می‌شود این میکرووارگانیسم‌های به دلیل داشتن توانمندی‌های ویژه قادر به بقاء 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 است *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 مانی در دامنه ppt ۳۷-۱۸۰ برعهود است. اما میزان تکثیر و ازدیاد سلولی در شوری‌های مختلف متفاوت از یکدیگر بود به طوری که بیشترین تعداد سلول به میزان  $1 \times 10^6$  سلول در میلی‌لیتر

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

میکروجلبک‌ها و سیانوباکتری‌ها موجودات فتوسنتر کننده‌ای هستند که انواع رنگدانه‌ها را برای برداشت نور تولید می‌کنند. رنگدانه‌های آنها معمولاً در سه دسته اصلی کلروفیل‌ها، کارتوئیدها و فیکوبیلیپروتین‌ها دسته‌بندی می‌شوند. در تحقیق حاضر نتایج آنالیز رنگدانه‌های ریزجلبک *Cyanothece* sp. نشان داد که افزایش شوری در دامنه ۳۷–۹۰ ppt باعث افزایش میزان کلروفیل a, b و فیکوسیانین زیستوده شده است، اما افزایش بیشتر شوری تا ۱۲۰ و ۱۸۰ ppt سبب کاهش معنی دار این رنگدانه‌ها شد. به طور معکوس تولید کارتوئید و بتاکاروتون در شوری‌های پایین از ۳۷–۹۰ ppt کمتر از شوری ۱۲۰ و ۱۸۰ ppt مشاهده شد. کلروفیل ماده اصلی و اولیه فعالیت فتوسنتری است درحالی که کارتوئیدها رنگدانه‌های ثانویه می‌باشند و در گونه‌ها مختلف و در شرایط مختلف رشد تغییر می‌کنند. فیکوسیانین‌ها 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 بتاکاروتون در ریزجلبک *Cyanothece* sp. در شوری ۱۸۰ ppt می‌تواند باشد. مطالعات Hejazi و همکاران (۲۰۰۲) نیز مربوط به توان سازگاری این سویه در مقابله با تنفس شوری باشد. مطالعات El Baz و همکاران (۲۰۰۲) مشخص کردند. در مطالعه El Baz و همکاران (۲۰۰۲) مخصوصاً در سلول‌های *D. salina* مشاهده شد که در غلظت ۳۰۰ ppt، تجمع قابل توجهی از بتاکاروتون 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 فتوسنتر می‌شود (Rafiqul et al., 2003). بر اساس نتایج این تحقیق، رشد مطلوب و تجمع رنگدانه‌های ارزشمند در ریزجلبک *Cyanothece* sp. در شوری ۹۰–۱۲۰ ppt قابل دستیابی است و به عنوان شوری مناسب برای تولید انبوه این ریزجلبک پیشنهاد می‌شود.

۱۲۹

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

با توجه به این‌که سویه‌های مختلف ریزجلبک جنس *Cyanothece* sp. دارای پراکنش گسترده هستند و در زیستگاه‌ها و اکوسیستم‌های متنوع از تالاب‌ها و باتلاق‌ها تا دریاچه‌های زلال، خاک کوهستان‌ها، ماسه‌های ساحلی (Dechatiwongse et al., 2014; Ohki et al., 2014) و حتی مزارع برنج گزارش شده‌اند (Ohki et al., 2014) کشت آنها کاملاً متفاوت گزارش شده است. برای مثال، سویه ۰۱ *Cyanothece* sp. Viet Nam در آب شیرین رشد مناسب داشته است (Ohki et al., 2014). سویه ۱۱۳ *Cyanothece* sp. ۱۱۳ در شوری ۷۰ ppt 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 ۳۰–۱۲۰ ppt گزارش شده است.

رفار 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 تنفس 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

**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.

### تشکر و قدردانی

نویسنده‌گان 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 زی توده و محتوی اسیدهای چرب ریزجلبک *Dunaliella salina* جداسازی شده از تلاب لیپار. چابهار، مجله علمی شیلات ایران، ۶(۶): ۱۲۰-۱۰۹.

عنایتی، ش.، ۱۳۸۹. تاثیر شوری بر رشد، غلظت کلروفیل و بتاکاروتون 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.

- 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. *Biochemie 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 Publixing Company. DOI:.org/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., Albrigtsen, 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**

Aminikhoei Z.<sup>1\*</sup>; Erfanifar E.<sup>1</sup>; Ajdari A.<sup>1</sup>; Abir S.<sup>1</sup>

\*zamini.41@gmail.com

1- Off-shore Fisheries Research Center- Chabahar, Iranian Fisheries Science Research, Institute (IFSRI), 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  $5 \times 10^6$  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