

شناسایی چهار گونه جلبک سبز *Dunaliella* جدا شده از آب های منطقه جزر و مدی

جزیره قشم

بی بی مریم حسینی^{(۱)*}؛ محمدرضا هادی^(۲)؛ سعید افشارزاده^(۲)؛ فاطمه قادر^(۳)

Bbm_hosseini@yahoo.com

۱- دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات فارس گروه زیست شناسی علوم گیاهی

۲- دانشگاه اصفهان گروه زیست شناسی

۳- پارک زیست فناوری خلیج فارس قشم

تاریخ پذیرش: خرداد ۱۳۹۲

تاریخ دریافت: فروردین ۱۳۹۲

چکیده

به منظور شناسایی گونه های جلبک سبز *Dunaliella*، نمونه برداری از آب های منطقه جزرومدی جزیره قشم صورت گرفت و تحت شرایط استریل با استفاده از محیط کشت جانسون رشد داده شد. خالص سازی جلبک های مذکور به وسیله کشت نمونه های جلبکی روی محیط کشت جامد حاوی آگار و انتقال تک کلنی به محیط کشت مایع و تکثیر آن انجام شد. جهت شناسایی جنس و گونه های *Dunaliella*، با در نظر گرفتن برخی خصوصیات ریخت شناسی از جمله وجود یا عدم وجود دیواره سلولی، شکل و اندازه سلول ها، و نیز وجود یا عدم وجود تاژک و تعداد و نوع آن و همچنین وجود و یا عدم وجود لکه چشمی (Eye spot) با استفاده از کلید شناسایی جنس و گونه انجام شد. برای مشاهده عکس العمل این جلبک ها به غلظت های مختلف نمک، نمونه های جلبکی را در معرض میزان شوری های مختلف نمک (NaCl)، قرار داده و میزان گلیسرول تولید شده و همچنین میزان رشد سلول ها اندازه گیری گردید. در این مطالعه چهار گونه از جنس *Dunaliella* شامل *D. maritima*، *D. minutissima*، *D. quartoclecta* و *D. viridis* بر اساس خصوصیات مورفولوژیک و همچنین خصوصیات فیزیولوژیک از جمله تولید گلیسرول تحت شرایط شوری (۱ تا ۴ مولار نمک)، رشد بهینه در غلظت یک یا دو مولار نمک (NaCl)، قابلیت تغییر رنگ جلبک از سبز به نارنجی - قرمز و یا عدم قابلیت تغییر رنگ در غلظت های بالای نمک (۴ مولار)، شناسایی گردیدند.

کلمات کلیدی: *Dunaliella*، جزیره قشم، شناسایی.

۱. مقدمه

جلبک سبز تک سلولی *Dunaliella* مقاومترین یوکاریوتیک نسبت به نمک (NaCl) شناخته می‌شود و در شاخه جلبک‌های سبز (*Chlorophyta*)، راسته *Volvocales* و خانواده کلامیدوموناداسه (*Chlamydomonadaceae*) قرار دارد (۷). جنس جلبک *Dunaliella* دارای ۲۸ گونه است و بعضی از گونه‌های آن نیز دارای فرم‌های مختلفی می‌باشند. این جلبک‌ها از نظر مورفولوژی شبیه جلبک‌های کلامیدوموناس هستند ولی دیواره سلولی ندارند. گرچه این جلبک فاقد دیواره سلولی است ولی می‌تواند دامنه وسیعی از غلظت نمک محیط از ۰/۰۵ تا ۵ مولار NaCl را به وسیله تولید گلیسرول در سلول، تحمل نماید (۱۹). گونه‌های *Dunaliella* معمولاً در همه نقاط دنیا مخصوصاً دریاچه‌های آب شور و دریاها از نواحی گرمسیری تا قطبی دیده می‌شوند. این جلبک می‌تواند در مقابله با تنش‌های محیطی مقادیر قابل توجهی مواد شیمیایی ارزشمند مختلف مانند گلیسرول (۱۱)، کاروتنوئیدها (۱۳) ویتامین‌ها و پروتئین‌ها (۱۳) تولید نماید. توانایی رشد در غلظت‌های بسیار بالای نمک و محتوای زیاد ترکیبات کارتنوئید، گلیسرول یا پروتئین، این جلبک را داوطلب مناسبی برای تولیدات صنعتی بویژه برای تولید بتا کاروتن ساخته است (۲۰، ۸). بتا کاروتن در صنایع غذایی (۱۳)، رنگ‌سازی (۱۵، ۴)، آرایشی و دارویی به عنوان آنتی اکسیدانت قوی (۹)، آنتی تومور، محافظ در برابر بیماری‌های قلبی عروقی (۲۱) و پیش‌ساز ویتامین A کاربرد دارد. به علاوه، امروزه کاربرد این جلبک به دلیل تولید چربی (۱۱) برای تولید سوخت زیستی نیز به اثبات رسیده است (۲۲). از سوی دیگر این جلبک‌ها شاخص خوبی برای تعیین آلودگی‌های اکولوژیک می‌باشند، زیرا از حساسیت بالایی نسبت به اثرات عوامل شهری و صنعتی برخوردارند. اولین توضیح از یک جلبک تک سلولی قرمز با دو تاژک موجود در آب‌های شور غلیظ شده در سال

۱۸۳۸ بوسیله Dunal ارائه شد. طی قرن نوزدهم جلبک تاژکدار قرمز Dunal بوسیله زیست‌شناسان دیگر بخوبی در دریاچه‌های نمکی و مکان‌های اشباع از نمک دیگر در Crimea, Algeria, Lorraine, فرانسه و رومانی مشاهده شد و بوسیله هر محقق نام‌های مختلفی به این ارگانیزم داده شد. Teodoresco دو گونه را توضیح داد: *D. salina* و *D. viridis* (۱۷). Lerche در سال ۱۹۳۷ توضیح داد که گونه‌های تشکیل دهنده *D. viridis* یکنواخت نیستند و باید به چندین گونه جدید مشعب شوند. بنابراین گونه‌های *D. media*, *D. minuta*, *D. euchlora* و *D. parva* ایجاد شدند. Massjuk در سال ۱۹۷۳ جنس‌ها را به دو زیر جنس *Dunaliella* و *Pascheria* تقسیم کرد. جنس اخیر شامل گونه‌های آب شیرین است که شامل ۵ گونه می‌باشد (۱۷). یکی از گونه‌های جالب *D. acidophila* است که توسط Kalina در سال ۱۹۶۵ و Albertano در سال ۱۹۸۱ از آب‌ها و خاک‌های اسیدی در جمهوری چکسلواکی و ایتالیا جداسازی شدند. این گونه هالوفیت واقعی نیست، اما یک جلبک اسیدوفیل است که به طور بهینه در pH بین ۰/۵ و ۲ رشد می‌کند. ۲۳ گونه از جنس دونالیلا تاژکدار و فاقد دیواره سلولی می‌باشند (۱۷). اولین مشاهداتی که گلیسرول به وسیله دونالیلا برای بهبود تعادل اسمزی تجمع پیدا می‌کند در سال ۱۹۶۴ به وسیله Craigie و Lachlan ارائه شد این جلبک‌های یوکاریوت در محیط‌های شوریافت می‌شوند و بهینه رشد را در غلظت‌های مختلف نمک، با توانایی‌های مختلف برای ایجاد رنگ نارنجی - قرمز تحت وضعیت‌های محیط کشت خاص نشان می‌دهند (۱۶). Bass و Beching در سال ۱۹۳۱ مشاهده کرد که *D. viridis* در همه دامنه‌های ۴-۱ مولار NaCl و pH ۹-۶ به خوبی رشد می‌کند (۱۷). وجود این جلبک در بسیاری از مناطق دنیا و همچنین در ایران در مناطقی چون حوضچه‌های تبخیر نمک در تالاب گاوخونی در منطقه اصفهان (۲) دریاچه ارومیه (۶) به اثبات

احتمالی با کتریائی حداقل پنج مرتبه تکرار گردید (۱). پس از آن جلبک‌های ته نشین شده در لوله سانتریفوژ را توسط لوپ تلقیح در شرایط کاملاً استریل جهت جداسازی و خالص‌سازی تک کلنی به محیط کشت های اصلاح شده جانسون جامد حاوی Penicillin G (۱۵۰ واحد در میلی‌لیتر) در ظرف پتری انتقال و کشت داده شد (۱). پس از اینکه کلنی های جلبک *Dunaliella* بر روی محیط کشت جامد با مولاریته‌های مختلف نمک (۰، ۱، ۲، ۳ و ۴ مولار NaCl) ظاهر گردید، هر تک کلنی با استفاده از لوپ تلقیح تحت شرایط استریل به ارلن‌های ۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۱۰ میلی‌لیتر از محیط‌های کشت مایع استریل (با همان مولاریته نمک محیط کشت جامد) به صورت جداگانه انتقال و سپس جهت رشد در اطاق کشت قرار داده شدند. پس از یک تا دو هفته یکسری سوسپانسیون‌های خالص جلبکی بدست آمد که با میکروسکوپ نوری مورد مطالعه قرار گرفت. نمونه‌هایی که به صورت جلبک‌های *Dunaliella* تشخیص داده شدند در ارلن‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۱۰۰ میلی‌لیتر از محیط کشت مایع جانسون جهت مطالعات بعدی کشت داده شدند.

برای بررسی ریخت شناسی گونه‌های مختلف جلبک *Dunaliella* که به علت تاژک‌دار بودن متحرک می‌باشند، از قراردادن یک سرسوزن بلورید روی لام مورد بررسی برای بی‌حرکت و ثابت نمودن استفاده گردید (۱۱). شناسائی جنس *Dunaliella* با استفاده از خصوصیات ریخت شناسی و فیزیولوژیک و کلید شناسائی جنس رحیمیان (۱۳۵۷) صورت گرفت (۱). شناسائی گونه‌های *Dunaliella* نیز مطابق کلید شناسائی Massjuk (۱۶) در دانشگاه اصفهان انجام شد.

شمارش سلول‌های *Dunaliella* با استفاده از لام Hemocytometer یا لام شمارش سلولی با بزرگنمایی ۱۰ عدسی شیئی انجام شده و بر حسب تعداد سلول در میلی‌لیتر با استفاده از فرمول

رسیده است. احتمال وجود این جلبک در مناطق دیگری که دارای شرایط اکولوژیک مشابه باشند نیز فراوان است و آنجایی که گونه‌های مختلف این جلبک دارای پتانسیل‌های متفاوتی هستند از اینرو، جداسازی، خالص‌سازی و شناسائی آن در آب‌های ساحلی در منطقه قشم نیز انجام گردید.

۲. مواد و روش‌ها

نمونه‌های جلبک سبز *Dunaliella* در تیرماه سال ۱۳۹۰ از سواحل جنوبی جزیره قشم، با فاصله ۱۰ کیلومتر از خروجی شهر قشم، از آب‌های موجود در حوضچه‌های حاصل از جزر و مد دریا صورت گرفت. نمونه‌های جلبکی، توسط ارلن‌های ۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۱۰ میلی‌لیتر از محیط کشت مایع کشت و تکثیر گردید.

برای کشت و تکثیر نمونه‌های خالص‌سازی شده جلبک‌های *Dunaliella* از محیط کشت جانسون (۱۹۶۸) که توسط Shariati and Lilley (۱۹۹۴) اصلاح شده است استفاده گردید (۱۸). pH محیط کشت در حدود ۷ الی ۷/۵ تنظیم و برای تهیه محیط کشت جامد از ۱/۵٪ آگار استفاده گردید. نمونه‌های جلبکی در اطاق کشت تحت تابش نور لامپ‌های فلوروسنت (مهتابی) و جابایی با شدت نور ۶۰ میکرومول فوتون بر مترمربع بر ثانیه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد بر روی شیکر (Shaker) با ۸۰ دور در دقیقه به همراه دوره نوری ۱۶ ساعت روشنائی و ۸ ساعت تاریکی کشت داده شدند.

جداسازی و خالص‌سازی جلبک‌های *Dunaliella* مطابق روش استفاده شده توسط شریعتی و هادی (۱۳۷۹) صورت گرفت (۲). در این روش، پس از رشد جلبک‌ها در محیط کشت اصلاح شده جانسون، ۱۰ میلی‌لیتر از سوسپانسیون جلبکی جمع‌آوری شده را به مدت ۵ دقیقه در ۱۶۱g سانتریفوژ نموده و محلول فوقانی خارج گردید. به رسوب جلبکی، محلول ۱۰٪ نمک اضافه نموده و به آرامی رسوب جلبکی را در آن حل کرده و مجدداً سانتریفوژ گردید. این عمل جهت از بین بردن آلودگی

تعداد سلول در میلی لیتر = میانگین تعداد سلول در ۱۰ مربع ×
 10^6 × ضریب رقت) محاسبه گردید (۵).

اندازه طول و عرض جلبک‌های سبز تک سلولی *Dunaliella* خالص‌سازی شده پس از ثابت نمودن آن به کمک بلورید از طریق لام مدرج و عدسی اکولر مدرج میکروسکوپ نوری که قبلاً کالیبره شده بودند صورت گرفت و میانگین اندازه طول و عرض سلول در ۱۰ اندازه گیری (۱۰ سلول جلبکی به صورت تصادفی) گزارش گردید.

جهت تعیین مولاریته لازم نمک برای بهینه رشد هر گونه که برای شناسایی نوع گونه مورد استفاده قرار می‌گیرد، سوسپانسیون‌های جلبکی خالص‌سازی شده را در غلظت‌های مختلف نمک کشت داده و تعداد سلول‌ها در زمان‌های صفر الی ۱۵ روز پس از کشت هر دو روز یک بار مشخص گردید. پس از تحلیل آماری، منحنی رشد جلبک‌ها بر اساس تعداد سلول در میلی لیتر برای غلظت‌های مختلف نمک رسم گردید که بدین ترتیب تعیین گردید که هر گونه جلبکی در چه مولاریته از نمک بهترین رشد را از خود نشان می‌دهد.

برای بررسی رفتارهای فیزیولوژیک گونه‌های مختلف *Dunaliella*، نمونه‌های جلبکی را در مولاریته‌های مختلف نمک کشت داده و میزان تولید گلیسرول آن‌ها در مولاریته‌های مختلف نمک اندازه گیری گردید. به این ترتیب میزان تولید گلیسرول توسط هر گونه در غلظت‌های مختلف نمک تعیین گردید که از رفتارهای این نوع جلبک در پاسخ به تنش شوری است و برای شناسایی گونه‌های آن مورد استفاده قرار گرفت.

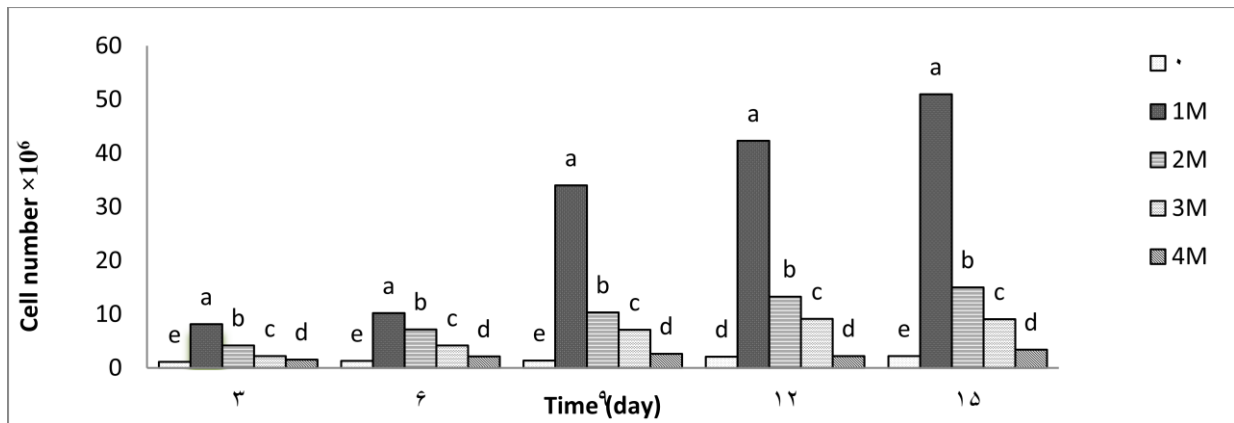
مقدار گلیسرول در جلبک‌های رشد یافته در غلظت‌های مختلف نمک (۱، ۲، ۳ و ۴ مولار NaCl) اندازه گیری شد. در این روش مقدار ۲۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون جلبکی مورد نظر را برداشته و به آن مقدار یک میلی لیتر معرف پرپودات (۶۵ میلی گرم سدیم متا پرپودات + ۱۰۰ میلی لیتر اسید استیک ۶٪ + ۷/۷ گرم آمونیوم استات) و ۲/۵ میلی لیتر معرف استیل استن

(۲/۵ میلی لیتر استیل استن + ۲۴۷/۵ میلی لیتر ایزوپروپانول) افزوده و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴۵ درجه سانتی گراد قرار داده شد. در مرحله بعد با روش اسپکتروفتومتری، میزان جذب نور در طول موج ۴۱۰ نانومتر اندازه گیری و توسط منحنی استاندارد، غلظت گلیسرول بر حسب میلی گرم گلیسرول در میلی لیتر سوسپانسیون جلبکی (دارای بهینه رشد)، محاسبه گردید (۱۴). داده‌های حاصل از اندازه گیری میزان رشد و میزان تولید گلیسرول در مولاریته‌های مختلف نمک مورد تحلیل آماری قرار گرفت و مقایسه میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح (P ≤ ۰/۰۵) انجام و نمودارهای مربوطه با نرم افزار اکسل رسم گردید.

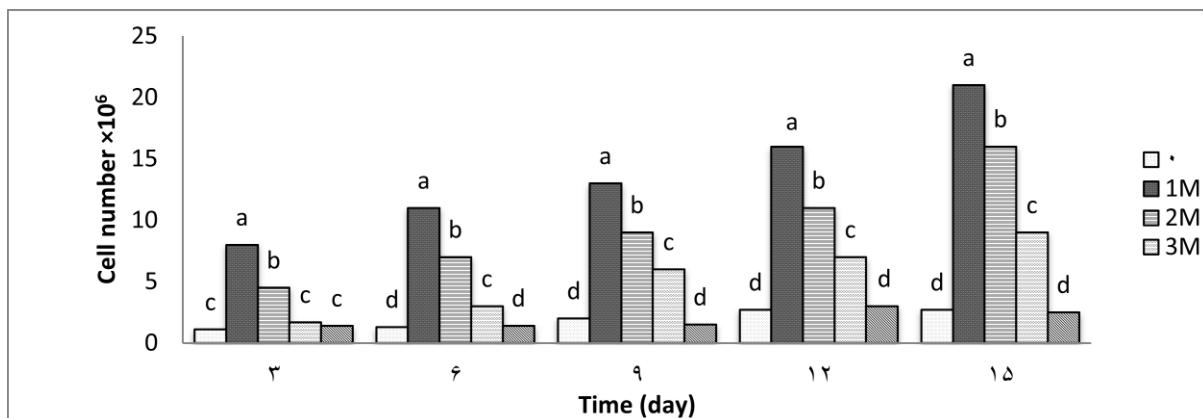
۳. نتایج

چهار گونه جلبک خالص شده با توجه به صفات ریخت شناسی و توانایی تولید گلیسرول و رشد در غلظت‌های بالای نمک (۴ مولار) به عنوان جنس *Dunaliella* شناسایی گردید. با توجه به این که تعداد زیادی از گونه‌های *Dunaliella* در مقادیر بالای نمک قادر به رشد هستند (۷)، این جلبک‌های سبز تک سلولی تاژک‌دار و متحرکی که در بررسی میکروسکوپی، سلول‌های جلبکی مورد نظر از لحاظ شکل سلول که به صورت سلول‌های گرد یا گلابی شکل، دارای دو تاژک یکسان و کلروپلاست فنجانی شکل و یک پیرونوئید در مرکز کلروپلاست مشاهده گردید و همچنین در بعضی از آن‌ها یک لکه چشمی در کنار قسمت قدامی (قسمت تاژکی) سلول مشاهده شد که با مشخصات ریخت شناسی برخی از گونه‌های *Dunaliella* مطابقت نشان می‌داد.

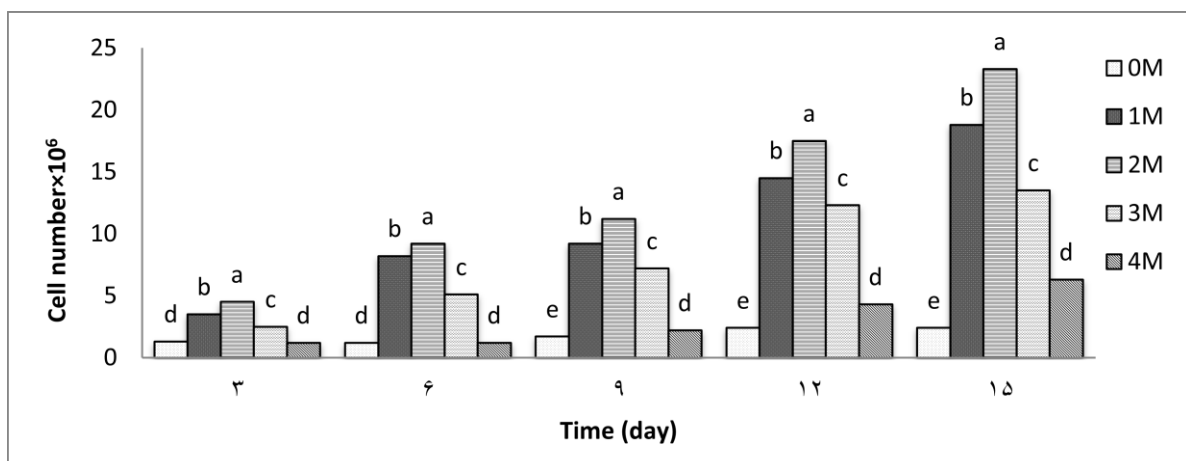
اختلاف میزان رشد سلول‌های جلبکی در تیمارهای ۴ تا ۰ مولار نمک به صورت نمودار در شکل‌های ۱ تا ۴ نشان داده شده است. حروف لاتین متفاوت روی ستون‌ها (a, b, c, d, e) نشان دهنده معنی دار بودن تفاوت بین تیمارها (P ≤ ۰/۰۵) می‌باشد.



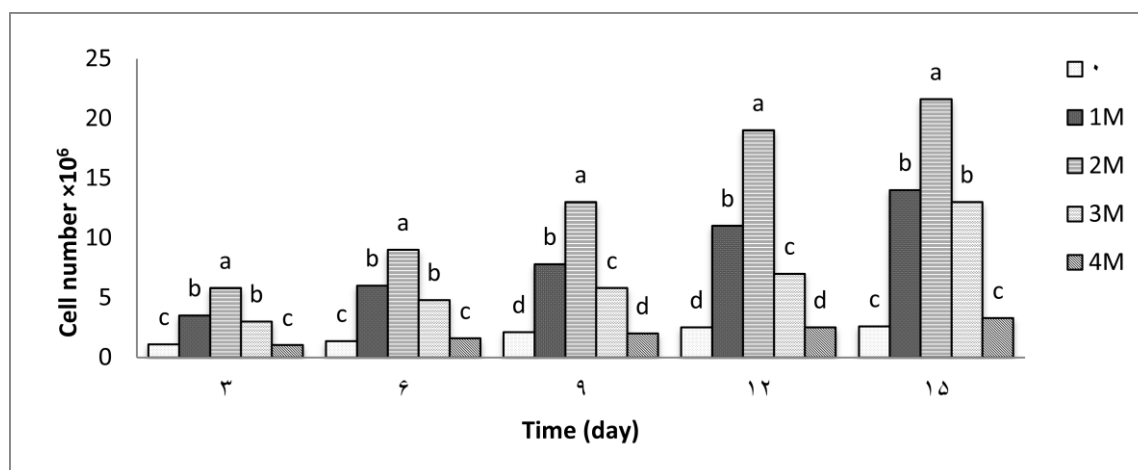
شکل ۱: میزان رشد *D. maritima* در محیط کشت حاوی غلظت‌های مختلف نمک از ۰ تا ۴ مولار NaCl طی ۱۵ روز. (خطای استاندارد \pm میانگین)



شکل ۲: میزان رشد *D. quattolecta* در محیط کشت حاوی غلظت‌های مختلف نمک از ۰ تا ۴ مولار NaCl طی ۱۵ روز. (خطای استاندارد \pm میانگین)



شکل ۳: میزان رشد *D. minutissima* در محیط کشت حاوی غلظت‌های مختلف نمک از ۰ تا ۴ مولار NaCl طی ۱۵ روز. (خطای استاندارد \pm میانگین)



شکل ۴: میزان رشد *D. viridis* در محیط کشت حاوی غلظت‌های مختلف نمک از ۰ تا ۴ مولار NaCl طی ۱۵ روز. (خطای استاندارد \pm میانگین)

جدول ۱: آنالیز واریانس تاثیر غلظت‌های ۴ مولار نمک بر میزان تولید گلیسرول در ۴ گونه جلبک دونالیلا

| فاکتور | نوع گونه | منبع تغییرات | مجموع مجذورات | درجه آزادی | میانگین مجذورات | میزان F | سطح معنی داری |
|---------------|-----------------------|--------------|---------------|------------|-----------------|---------|---------------|
| | <i>D. maritima</i> | بین گروهی | ۲۶۶۰/۴۰۲ | ۳ | ۶۴۳/۳۱۵ | | |
| | | درون گروهی | ۱/۰۲۱ | ۸ | ۱/۰۰۰ | ۳/۴۴۴E۵ | $P < ۰/۰۰۱$ |
| | | کل | ۲۶۶۰/۴۲۳ | ۱۱ | | | |
| میزان گلیسرول | <i>D. minutissima</i> | بین گروهی | ۳۵۸۴/۴۴۶ | ۳ | ۱۱۹۴/۸۱۵ | | |
| | | درون گروهی | ۱/۰۰۱ | ۸ | ۱/۰۰۰ | ۱/۱۹۵E۷ | $P < ۰/۰۰۱$ |
| | | کل | ۳۵۸۴/۴۴۷ | ۱۱ | | | |
| | <i>D. quartolecta</i> | بین گروهی | ۱۰۸۶/۰۵۵ | ۳ | ۳۶۲/۰۱۸ | | |
| | | درون گروهی | ۱/۴۳۶ | ۸ | ۱/۰۵۵ | ۶/۶۴۲E۳ | $P < ۰/۰۰۱$ |
| | | کل | ۱۰۸۶/۴۹۱ | ۱۱ | | | |
| | <i>D. viridis</i> | بین گروهی | ۶۰۹۹/۴۸۵ | ۳ | ۲۰۳۳/۱۶۲ | | |
| | | درون گروهی | ۱/۰۲۱ | ۸ | ۱/۰۰۳ | ۷/۸۹۶E۵ | $P < ۰/۰۰۱$ |
| | | کل | ۶۰۹۹/۵۰۵ | ۱۱ | | | |

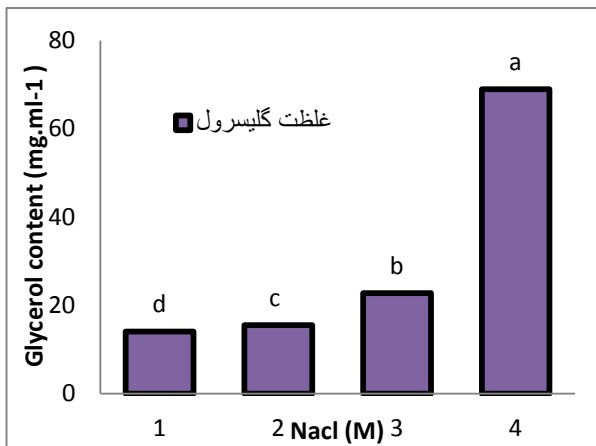
نمودار در شکل‌های ۸ تا ۱۵ نشان داده شده است. حروف لاتین متفاوت روی ستون‌ها (a, b, c, d, e) نشان دهنده معنی دار بودن تفاوت بین تیمارها ($P \leq ۰/۰۵$) می‌باشد.

۴. بحث

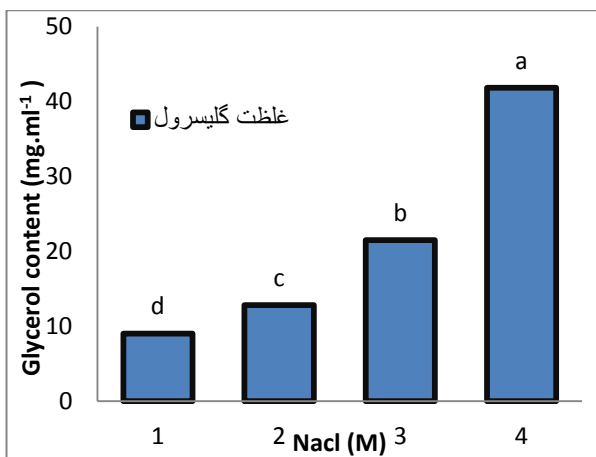
یکی از ویژگی‌های جنس *Dunaliella* پاسخ به شوری از طریق تولید گلیسرول می‌باشد که می‌تواند در شناسایی آن موثر

نتایج آنالیز واریانس در جدول ۱ نشان می‌دهد که تاثیر تیمارهای مختلف نمک (۱-۲-۳ و ۴ مولار) بر شاخص غلظت گلیسرول سلولی در ۴ گونه جلبک دونالیلا در سطح $P \leq ۰/۰۱$ معنی دار است.

با استفاده از نتایج جدول ۱، تفاوت میزان غلظت گلیسرول در سلول‌های جلبکی در تیمارهای ۴ تا ۱ مولار نمک به صورت



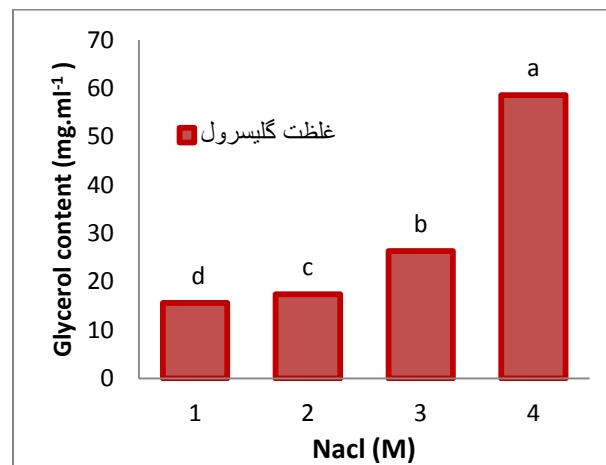
شکل ۷: مقایسه میزان گلیسرول تولیدشده توسط گونه *D. quartolecta* در غلظت‌های مختلف نمک (NaCl) از ۱ تا ۴ مولار



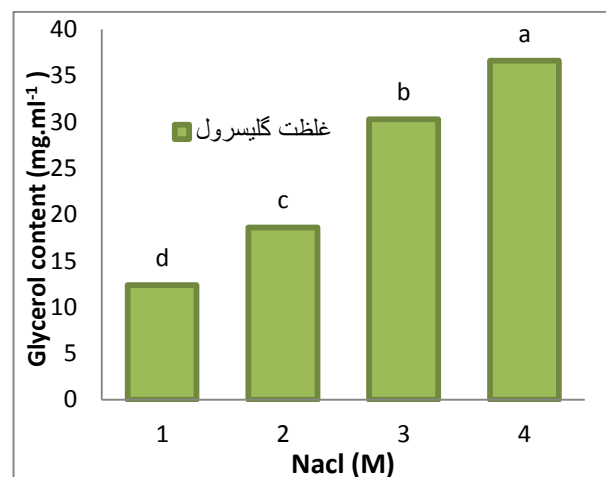
شکل ۸: مقایسه میزان گلیسرول تولیدشده توسط گونه *D. viridis* در غلظت‌های مختلف نمک (NaCl) از ۱ تا ۴ مولار

شناسایی گونه‌های مختلف *Dunaliella*: سوسپانسیون‌های جلبکی حاصل از خالص‌سازی از لحاظ برخی خصوصیات ریخت‌شناسی و فیزیولوژیک از جمله غلظت نمک لازم برای بهینه رشد، شکل، اندازه و ابعاد سلول، توانایی تغییر رنگ از سبز به نارنجی-قرمز، داشتن یا نداشتن لکه چشمی و تعداد آن، تعداد و نوع پیرنوئید، تعداد و طول تاژک و مقایسه آن با کلید شناسایی Massjuk (۱۹۷۳)، گونه‌های مختلف *Dunaliella* شناسایی گردید (شکل ۹). در رابطه با شناسایی گونه‌های *Dunaliella* در کشور ایران تاکنون مطالعات اندکی صورت گرفته است. به

باشد (۵). با افزایش مقدار نمک در محیط کشت، مقدار گلیسرول نیز متناسب با آن افزایش نشان می‌دهد. این نتایج با مقادیر گلیسرول *Dunaliella* رشد یافته در غلظت‌های مختلف NaCl که توسط شریعتی و هادی (۱۳۷۹) (۳) و همچنین توسط Avron (۱۹۸۸) گزارش شده است (۷)، مطابقت می‌کند و نشان می‌دهد که جلبک‌های مذکور همانند گونه‌های *Dunaliella* با افزایش گلیسرول نسبت به شوری واکنش نشان می‌دهند.



شکل ۵: مقایسه میزان گلیسرول تولیدشده توسط گونه *D. maritima* در غلظت‌های مختلف نمک (NaCl) از ۱ تا ۴ مولار

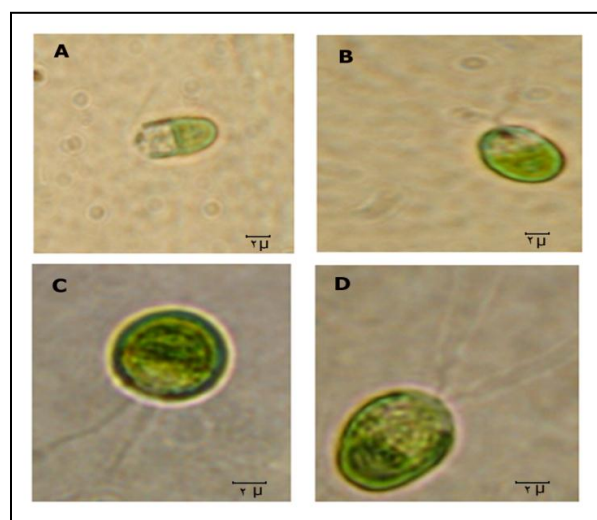


شکل ۶: مقایسه میزان گلیسرول تولیدشده توسط گونه *D. minutissima* در غلظت‌های مختلف نمک (NaCl) از ۱ تا ۴ مولار

شناسایی گونه *D. maritima*: سوسپانسیون جلبکی خالصی که قابلیت تغییر رنگ را از سبز (در غلظت ۱ مولار نمک) به نارنجی - قرمز (در غلظت ۴ مولار نمک) دارا نبود، مورد بررسی میکروسکوپی قرار گرفت و مشاهده گردید که سلول‌ها در شرایط رشد بهینه (در غلظت ۱ مولار نمک) به صورت بیضی شکل و در دو انتها کمی کشیده، سبز رنگ، دارای دو تاژک بلند بدون دیواره ضخیم می‌باشند. همچنین مشاهده شده که سلول‌ها فاقد گرانول و کلروپلاست در کناره جلویی سلول تقسیم شده است. به علاوه، میانگین اندازه طول (۱۰ عدد جلبک به صورت تصادفی) جلبک‌ها ۸ میکرون و عرض آن‌ها ۵ میکرون بود. در مجموع با توجه به این که جلبک‌های مذکور در ۱ مولار نمک حداکثر رشد را دارند (شکل ۱) و از طرفی در غلظت‌های بالای نمک قابلیت تغییر رنگ از سبز به قرمز - نارنجی را ندارند (جدول ۲) و با توجه به این که سلول‌های رویشی در آن‌ها بدون واکوئل‌های انقباضی بوده و همچنین سلول‌ها فاقد گرانول بوده و کلروپلاست در کناره جلویی سلول تقسیم شده بود، لذا طبق کلید شناسایی گونه‌های مختلف *Dunaliella* مربوط به Massjuk (۱۹۷۳) به عنوان گونه *D. maritima* شناسایی گردید (شکل ۹ بخش A).

شناسایی گونه *D. quartolecta*: سوسپانسیون جلبکی خالصی که قابلیت تغییر رنگ را از سبز (در غلظت ۱ مولار نمک) به نارنجی - قرمز (در غلظت ۴ مولار نمک) دارا نبود، مورد بررسی میکروسکوپی قرار گرفت و مشاهده گردید که سلول‌ها در شرایط رشد بهینه (در غلظت ۱ مولار نمک) به

طوری که Ginzburg در سال ۱۹۸۵ جلبک‌های *Dunaliella* را از آب‌های اطراف شیراز جدا کرده و بدون شناسایی، جداسازی، و خالص‌سازی آن‌ها را به طور کلی تحت نام Iran 6 نام گذاری کرده است و به بررسی غلظت‌های مختلف یون و گلیسرول در آن‌ها پرداخته است (۳). هادی در سال ۱۳۷۵ چهار گونه *D. salina*, *D. psuedosalina*, *D. parva* و *D. viridis* را پس از جداسازی و خالص‌سازی براساس چندین فاکتور از جمله رشد بهینه در محیط کشت دارای غلظت ۲ مولار نمک، همچنین شکل و حجم سلول‌ها با کلید شناسایی Massjuk (۱۹۷۳) از حوضچه‌های تبخیر نمک در چند نقطه از مرداب گاوخونی در منطقه اصفهان شناسایی و گزارش کرده است (۳).



شکل (۹): تصاویر چهار گونه از جلبک‌های سبز تک سلولی دونالیلا (*Dunaliella*) شناسایی شده از آب‌های ساحلی جزیره قشم : A: *D. maritima*، B: *D. quartolecta*، C: *D. minutisima*، D: *D. viridis*.

جدول (۲): مقایسه خصوصیات ریخت شناسی گونه‌های *Dunaliella* شناسایی شده از آب‌های ساحلی جزیره قشم.

| ردیف | گونه‌های شناسایی شده جلبک‌های <i>Dunaliella</i> | اندازه طول سلول (میکرون) | اندازه عرض سلول (میکرون) | غلظت نمک (NaCl) لازم برای رشد بهینه (مولار) | توانایی تغییر رنگ سوسپانسیون جلبکی از سبز به نارنجی در غلظت ۴ مولار NaCl |
|------|---|--------------------------|--------------------------|---|--|
| ۱ | <i>D. maritima</i> | ۸ | ۵ | ۱ | ندارد |
| ۲ | <i>D. quartolecta</i> | ۸ | ۶ | ۱ | ندارد |
| ۳ | <i>D. minutisima</i> | ۸ | ۸ | ۲ | ندارد |
| ۴ | <i>D. viridis</i> | ۱۱ | ۹ | ۲ | ندارد |

کمتر از ۲۰ میکرومتر بود، به علاوه چون کلروپلاست در آن‌ها بدون سوراخ و بدون گرانول در کنار جلویی بود و شکل تیبیک سلول‌ها به صورت کروی بود، لذا طبق کلید شناسائی گونه‌های مختلف *Dunaliella* مربوط به *Massjuk* (۱۹۷۳) به عنوان گونه *D. minutissima* شناسائی گردید (شکل ۹ بخش C).

شناسایی گونه *D. viridis*: سوسپانسیون جلبکی خالصی که قابلیت تغییر رنگ را از سبز (در غلظت ۲ مولار نمک) به نارنجی - قرمز (در غلظت ۴ مولار نمک) دارا نبود، مورد بررسی میکروسکوپی قرار گرفت و مشاهده گردید که سلول‌ها در شرایط رشد بهینه (در غلظت ۲ مولار نمک) به صورت بیضی، سبز رنگ، دارای دو تاژک بلند (باطول یکسان) و بدون دیواره ضخیم هستند. همچنین مشاهده گردید که سلول‌ها در انتهای عقبی پهن‌تر، کلروپلاست غیرمنفذدار و بدون گرانول است. میانگین اندازه طول (۱۰ عدد جلبک به صورت تصادفی) سلول‌ها ۱۱ میکرون و عرض آن‌ها نیز ۹ میکرون بود. در مجموع با توجه به این که جلبک‌های مذکور در ۲ مولار نمک حداکثر رشد را دارند (شکل ۴) و از طرفی در غلظت‌های بالای نمک قابلیت تغییر رنگ از سبز به قرمز - نارنجی را ندارند (جدول ۲) و با توجه به این که سلول‌های رویشی در آن‌ها بدون واکوئل‌های انقباضی و دارای تقارن شعاعی بوده و همچنین طول سلول‌ها کمتر از ۲۰ میکرومتر بود، به علاوه چون کلروپلاست در آن‌ها بدون سوراخ و بدون گرانول در کنار جلویی بود و شکل تیبیک سلول‌ها به صورت بیضی یا گلابی بود، لذا طبق کلید شناسائی گونه‌های مختلف *Dunaliella* مربوط به *Massjuk* (۱۹۷۳) به عنوان گونه *D. viridis* شناسائی گردید (شکل ۹ بخش D). در این رابطه، *Ilknur* و همکاران در سال ۲۰۰۸ میلادی گزارش کرده‌اند که حداکثر رشد گونه *D. viridis* در غلظت ۲ مولار نمک (NaCl) و دمای ۲۸ درجه سانتی گراد است که با نتایج این تحقیق در خصوص رشد بهینه *D. viridis* جداسازی و شناسائی شده از آب‌های سواحل جزیره قشم در غلظت ۲ مولار نمک

صورت تخم مرغی، سبز رنگ، دارای دو تاژک بلند و بدون دیواره ضخیم هستند که در انتهای جلویی کمی کشیده‌اند. همچنین مشاهده گردید که هر سلول دارای چند گرانول کوچک در بخش جلویی سلول هستند. میانگین اندازه طول (۱۰ عدد جلبک به صورت تصادفی) سلول‌ها ۸ میکرون و عرض آن‌ها ۵/۶ میکرون بود. در مجموع با توجه به این که جلبک‌های مذکور در غلظت ۱ مولار نمک حداکثر رشد را دارند (شکل ۲) و از طرفی در غلظت‌های بالای نمک قابلیت تغییر رنگ از سبز به قرمز - نارنجی را ندارند (جدول ۲) و با توجه به این که سلول‌های رویشی در آن‌ها بدون واکوئل‌های انقباضی بوده و هر سلول دارای ۳ تا ۱۰ گرانول کوچک انکساری در بخش قدامی (جلویی) سلول بدون یک باند خیلی مشخص بودند، لذا طبق کلید شناسائی گونه‌های مختلف *Dunaliella* مربوط به *Massjuk* (۱۹۷۳) به عنوان گونه *D. quartolecta* شناسائی گردید (شکل ۹ بخش B).

شناسایی گونه *D. minutissima*: سوسپانسیون جلبکی خالصی که قابلیت تغییر رنگ را از سبز (در غلظت ۲ مولار نمک) به نارنجی - قرمز (در غلظت ۴ مولار نمک) دارا نبود، مورد بررسی میکروسکوپی قرار گرفت و مشاهده گردید که سلول‌ها در شرایط رشد بهینه (در غلظت ۲ مولار نمک) به صورت تقریباً کروی، سبز رنگ، دارای دو تاژک بلند و بدون دیواره ضخیم می‌باشند و کلروپلاست آن‌ها غیرمنفذدار، سلول‌ها بدون گرانول و دارای یک لکه چشمی (eye spot) می‌باشند. میانگین اندازه طول (۱۰ عدد جلبک به صورت تصادفی) سلول‌ها ۸ میکرون و عرض آن‌ها نیز ۸ میکرون بود. در مجموع با توجه به این که جلبک‌های مذکور در ۲ مولار نمک حداکثر رشد را دارند (شکل ۳) و از طرفی در غلظت‌های بالای نمک قابلیت تغییر رنگ از سبز به قرمز - نارنجی را ندارند (جدول ۲) و با توجه به این که سلول‌های رویشی در آن‌ها بدون واکوئل‌های انقباضی و دارای تقارن شعاعی بوده و همچنین طول سلول‌ها

تقی‌پور که در بخشی از کارهای علمی این تحقیق همکاری داشته‌اند، تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع

- ۱- رحیمیان، ح. ۱۳۵۷. جلبک شناسی، انتشارات دانشگاه شهید بهشتی، صفحه ۲۶۵-۲۷۳.
- ۲- شریعتی، م.، هادی، م.ر. ۱۳۷۹. جداسازی، خالص سازی و شناسایی جلبک سبز تک سلولی گونه های دونالیلا از حوضچه های تبخیر نمک در مرداب گاوخونی اصفهان، مجله زیست شناسی ایران جلد ۹ صفحه ۴-۱.
- ۳- هادی، م. ر. ۱۳۷۵. شناسایی، جدا سازی و خالص سازی گونه های مختلف جلبک سبز تک سلولی *Dunaliella* از حوضچه های تبخیر نمک در مرداب گاوخونی. پایان نامه کارشناسی ارشد- گروه زیست شناسی - دانشگاه اصفهان.
- 4- Abd El-Baky, H., El-Baroty, G. 2010. Enhancement of carotenoids in *Dunaliella salina* for use as dietary supplements and in the preservation foods, Food Chemistry Toxicol, 59-65.
- 5- Al-Hasan, R.H., Ghannoum, M.A., Sallal, A.K., Abu- Elteen, K.H., Radwan, S.S. 1987. Correlative changes of growth, pigmentation and lipid composition of *Dunaliella salina* in response to halostress, Journal General Microbiology, 133, 2607-2616.
- 6- Arash Rad, F., Aksoz, N., Hejazi, M.A. 2011. Effect of salinity on cell growth and β -carotene production in *Dunaliella* sp. isolates from Urmia Lake in northwest of Iran, Africa Journal of Biotechnology, 10 (12), 2282-2289.
- 7- Avron, M., Ben-Amotz, A. 1992. *Dunaliella*: Physiology, Biochemistry, and Biotechnology, CRC Press, Boca Raton.
- 8- Celekli, A., Donmez, G., 2006. Effect of pH, light intensity, salt and nitrogen concentrations on growth and beta-carotene accumulation by a new isolate of *Dunaliella* sp, World Journal Microbiology. Biotechnology. 22, 183-189.

(NaCl) همخوانی دارد (۱۴). همچنین در این رابطه، هادی در سال ۱۳۷۵ و همچنین Hadi و همکاران در سال ۲۰۰۸ میلادی گزارش کرده‌اند که در گونه‌های جداسازی و خالص سازی شده از حوضچه‌های تبخیر نمک در مرداب گاوخونی در منطقه اصفهان، گونه *D. viridis* در غلظت ۱ تا ۲ مولار نمک (NaCl) حداکثر رشد را دارد ولی بهینه رشد آن در ۱ مولار نمک است و در غلظت‌های بالای نمک (۳ تا ۴ مولار نمک) قابلیت تغییر رنگ از سبز به قرمز- نارنجی را ندارند که با نتایج این تحقیق همخوانی نشان می‌دهد (۲،۳). هرچند که گونه *D. viridis* جداسازی و شناسایی شده از آب‌های سواحل جزیره قشم در غلظت ۱ مولار نمک نیز رشد مطلوبی دارد (شکل ۴) ولی این احتمال نیز وجود دارد که این گونه از نظر فرم و یا واریته با گونه *D. viridis* از مرداب گاوخونی متفاوت باشد و به همین دلیل حداکثر رشد گونه *D. viridis* از آب‌های سواحل جزیره قشم با گونه *D. viridis* از آب‌های مرداب گاوخونی کمی متفاوت است. همچنین مشاهدات و نتایج این تحقیق با خصوصیات گونه *D. viridis* (اندازه ۶-۷ میکرون در عرض و ۱۰-۱۲ میکرون در طول، شکل تخم مرغی و نداشتن هماتوکرم، Hematochrome) مطابقت می‌کند. به علاوه، هادی در سال ۱۳۷۵ میانگین ابعاد سلول‌های گونه *D. viridis* از آب‌های مرداب گاوخونی را $2/92 \pm 11/67$ میکرون در طول و $7/83 \pm 1/47$ میکرون در عرض گزارش کرده است که با نتایج این تحقیق در خصوص اندازه گونه *D. viridis* (۱۱ میکرون در طول ۹ میکرون در عرض) از آب‌های ساحلی جزیره قشم همخوانی نشان می‌دهد (۳).

سپاسگزاری

بدین وسیله از ریاست محترم پارک زیست فناوری جزیره قشم جناب آقای دکتر آقامیری و کلیه پرسنل آن مرکز به جهت همکاری بیدریغ‌شان و همچنین از جناب آقای سیدرضا حسینی، مهندس حمید عبد‌الهی، سرکار خانم ام‌السلمه عبد‌الهی و مرضیه

- 9-Chidambara Murthy, K.N., Vanitha, A., Rajesha, J., Mahadeva Swamy, M., Sowmya, P.R. and Ravishankar, G.A., 2005, In vivo antioxidant activity of carotenoids from *Dunaliella salina* – a green microalga, Life Science, 76, 1381–1390.
- 10-Chitlaru. E., Pick. U. 1991. Regulation of glycerol synthesis in response to osmotic changes in *Dunaliella*, Plant Physiology, 96, 50–60.
- 11-Hadi, M. R., Shariati, M., Afsharzadeh. S. 2008. Microalgal biotechnology: carotenoid and glycerol production by *Dunaliella* sp. algae isolated from the Gave khooni salt marsh, Iran, Biotechnology Bioprocess Engineering, 13(5), 540-544.
- 12-Hosseini Tafreshi, A., Shariati, M. 2006. Pilot culture of three strains of *Dunaliella salina* for b-carotene production in open ponds in the central region of Iran, World Journal of Microbiology and Biotechnology, 22, 2-28.
- 13-Ghoshal. D., Mach. D., Agarwal .M., Goyal .A., Goyal. A. 2002. Osmoregulatory Isoform of Dihydroxyacetone Phosphate Reductase from *Dunaliella tertiolecta*, Purification and Characterization Protein, Expression and Purification 24, 404–411.
- 14-Ilknur, AK., Semra, Cirik., Tolga, Gogksan. 2008. Effect of Light Intensity, Salinity and Temperature on Growth in Camalt1 Strain of *Dunaliella viridis* Teodoresco from Turkey, Jurnal of Biological Sciences 8(8), 1356-1359.
- 15-Lamers, P., Janssen, M., De Vos, R., Bino, R., Wijffels, R., 2008 .Exploring and exploiting carotenoid accumulation in *Dunaliella salina* for cell-factory applications, Trends Biotechnology, 26 , 631–638.
- 16-Massjuk. 1973., Morphology, taxonomy, ecology and geographic distribution of the genus *Dunaliella* Teod. and prospects for its potential utilization, Kiev: Naukova Dumka. Massjuk., 312
- 17-Oren, A. 2005. A Hundred years of *Dunaliella* Research: 1905–2005, Saline Systems, 35-42.
- 18-Shariati, M., Lilley, R. M., 1994, Loss of intracellular glycerol from *Dunaliella* by electroporation at constant osmotic pressure: Subsequent restoration of glycerol content and associated volume changes, Plant Cell Environmental, 17, 1295-1304.
- 19-Shariati, M., Hadi, M. R. 2010. Microalgal Biotechnology and Bioenergy in *Dunaliella*, Carpi, Angelo, Progress in Molecular and Environmental Bioengineering From Analysis and Modeling to Technology Applications, 483-506.
- 20-Takagi, M., Karseno , Yoshida, T. 2006. Effect of salt concentration on intracellular accumulation of lipids and triacylglyceride in marine microalgae *Dunaliella* cells, Journal Bioscience Bioengineering, 101, 223–226.
- 21-Tornwall, M. E., Virtamo, J., Korhonen, P. A., Virtanen, M. J., Taylor, P. R., Albanes, D., Huttunen, J. K. 2004. Effect of α -tocopherol and β -carotene supplementation on coronary heart disease during the 6-year post-trial follow-up in the ATBC study. Europ Heart Journal, 25, 1171–1178.
- 22-Wijffels, R. 2008. Potential of sponges and microalgae for marine biotechnology, Trends Biotechnology, 26 , 26–31.

Identification of four species green algae *Dunaliella* isolated from coastal waters in Qeshm Island-Iran

Hosseini B.B.M.^{(1)*}; Hadi M.R.⁽²⁾; Afshar zadeh S.⁽¹⁾; Ghaderi F.⁽¹⁾

Bbm_hosseini@yahoo.com

Received: April 2013

Accepted: June 2013

Abstract

In order to identify the species of green algae *Dunaliella*, the sampling from coastal waters in Qeshm Island was carried out and algal samples were grown in Johnson medium under sterile conditions. Algal samples were purified via cultivation as single colony on the solid medium containing agar and then single colonies transferred to liquid medium. To identify the genus and species of *Dunaliella*, taking some morphological characteristics, including the presence or absence of cell wall, flagella, eye spot and shape and cell size, and algae were identified by identification keys of genus and species. For study of the algae response to salinity, algal samples exposed to different concentrations NaCl, and the amount of glycerol produced and the growth rate of the cells was measured. Finally in this study, four species of *Dunaliella maritima*, *D. Minutissima*, *D. quartolecta* and *D. Viridis* based on morphological characteristics (above mented) and also physiological characteristics, such as glycerol production under salinity (1 to 4 M salt), the optimal growth on the 1 or 2 molar NaCl, the color changes of algae from green to orange- red or did not change color of algae at high salt concentrations (4 mM NaCl), were identified.

Keywords: *Dunaliella*, Identification, Qeshm Island.

*Corresponding author