

زیست‌شناسی گیاهی، سال چهارم، شماره یازدهم، بهار ۱۳۹۱، صفحه ۶۱-۷۲

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۰/۰۲/۱۸

تاریخ بررسی مجدد: ۱۳۹۰/۰۸/۱۴

تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۰/۰۸/۲۲

شناسایی و بررسی ارزش غذایی دو گونه جلبک تک سلولی

Desmodesmus cuneatus و *Scenedesmus obliquus*

تولیدکننده اسیدهای چرب جداسازی شده از دریاچه سد مهاباد، آذربایجان غربی

زهرا عسل‌پیشه^۱، رضا حیدری^۲ و رامین مناف‌فر^{۱*}

^۱ پژوهشکده آرتیمیا و جانوران آبزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

^۲ گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

چکیده

جلبک‌های تک‌سلولی به عنوان منبع سرشار اسیدهای چرب غیراشباع، رنگیزه‌هایی چون بتاکاروتن و دیگر متابولیت‌های غذایی و دارویی سال‌هاست که مورد توجه محققان علوم زیستی هستند. این جلبک‌ها به عنوان غذای زنده نیز اهمیت بسیار زیادی در پرورش انواع زئوپلانکتون‌ها، نرم‌تنان و لارو آبزیان دارند. تا کنون گونه‌های زیادی از خانواده و جنس‌های مختلفی از این جلبک‌ها برای پرورش انواع آبزیان معرفی شده است. خانواده *Scenedesmaceae* از جلبک‌های مهم تک سلولی متعلق به رده *Chlorophyceae* هستند. این خانواده دارای چندین جنس بوده، کاربرد زیادی در صنعت آبزی‌پروری داشته و به عنوان غذا برای پرورش انواع آرتیمیا، روتیفر و دافنی استفاده می‌شوند. در این پروژه تحقیقاتی و در راستای تأمین نیازهای آزمایشگاهی به جلبک‌های تک‌سلولی فوق، یکی از تالاب‌های دایمی و مهم آب شیرین استان به نام تالاب سد مهاباد بررسی شد. این تحقیق شامل بررسی ریخت‌شناسی، مولکولی و ارزش غذایی نمونه‌های جدا شده بود که در نهایت موفق به شناسایی دو گونه *Desmodesmus cuneatus*, Hegewald 2002 و *Scenedesmus obliquus*, Kützing 1833 از دو جنس مختلف از این خانواده در منبع آبی فوق شد. جداسازی، کشت انبوه این جلبک‌ها در سیستم پرورش بسته و بررسی اسیدهای چرب نشان داد که این دو گونه پتانسیل رشد مناسبی برای استفاده در صنعت داشته، با دارا بودن ارزش غذایی مناسب می‌توانند کاربرد خوبی در این صنعت داشته باشند. با وجود ویژگی‌های مورفولوژیک و فیزیولوژیک نزدیک این دو گونه نیز مشاهده شد که ارزش غذایی آنها بسیار متفاوت بوده، در کل میانگین ترکیب اسیدهای چرب بهتری برای گونه *Desmodesmus cuneatus* مشاهده شد ($P < 0.05$).

واژه‌های کلیدی: آذربایجان غربی، *Scenedesmus*، *Desmodesmus*، سد مهاباد، جلبک تک‌سلولی

مقدمه

هم ناقص است (Brown *et al.*, 1997; Chomrung, 2000).

منبع اصلی این جلبک‌ها منابع آبی طبیعی است که تحقیقات متنوعی برای شناسایی تنوع جلبک‌های تک‌سلولی آنها انجام گرفته است. بررسی تنوع گونه‌ای جلبک‌های (تک‌سلولی) بومی منطقه و ارزیابی پتانسیل پرورش انبوه، ارزش غذایی و یافتن کاربرد آنها می‌تواند بنیادی‌ترین تحقیق در آغاز صنعتی‌سازی پرورش و استفاده از جلبک‌ها باشد. بر اساس مطالعات انجام شده، منابع آب‌های داخلی منبع بسیار مهم و سرشار انواع جلبک‌های تک‌سلولی هستند (سلطانی و همکاران، ۱۳۷۳؛ شعاع حسنی، ۱۳۷۵). از میان انواع جلبک‌های تک‌سلولی گزارش شده در آب‌های منطقه، جلبک‌های تک‌سلولی رده *Chlorophyceae* با دارا بودن تنوع نسبی بهتر، اهمیت و جایگاه خاصی نیز در صنعت آبی‌پروری دارند. در این تحقیق، به منظور تأمین نیاز بخش‌های داخلی و به منظور شناسایی جلبک‌های تک‌سلولی آب‌های داخلی استان آذربایجان غربی، یکی از تالاب‌های آب شیرین استان به نام دریاچه سد مهاباد بررسی شد. با توجه به تنوع بالای جلبک‌های تک‌سلولی در منبع آبی مذکور، در بخش اول فقط خانواده *Scenedesmaceae* تحقیق شد و جنس‌ها و گونه‌های موجود این خانواده، به روش‌های مورفولوژیک و مولکولی شناسایی، پس از جداسازی روی محیط‌های کشت جامد، به صورت انبوه در سیستم پرورش بسته کشت داده شد.

جلبک‌های تک‌سلولی به عنوان تولید کنندگان نخستین، نقش بسیار مهمی در اکوسیستم‌های آبی داشته، با دارا بودن قدرت فتوسنتز قادر به تثبیت دی‌اکسید کربن هستند. همچنین، این جلبک‌ها به عنوان منبع غذایی نخستین برای انواع زئوپلانکتون‌ها و لارو آبیان جایگاه خاصی در صنعت آبی‌پروری یافته‌اند (Volkman *et al.*, 1989). لذا در بسیاری از کشورهای جهان نظیر چین، مالزی و ویتنام، مزارع چند صد هکتاری به این صنعت اختصاص داده شده است. هم‌اکنون انواع مختلفی از جلبک‌های تک‌سلولی در سالن‌های سرپوشیده و در سیستم‌های مدار بسته و باز و حتی در مزارع خاکی بزرگ برای استفاده در آبی‌پروری پرورش داده می‌شوند (Lavens and Sorgeloos, 1996).

هدف از پرورش این نوع از جلبک‌ها، عمدتاً به عنوان منبع استحصال رنگیزه‌هایی از جمله انواع کارتنوئیدها مانند بتاکارتن (Grung *et al.*, 1992) و اسیدهای چرب آلی بوده، یا اینکه هدف تولید غذای زنده برای آبیان است (Lavens and Sorgeloos, 1996). همچنین، این جلبک‌ها در صنایع دارویی، غذایی و ساخت لوازم آرایشی کاربرد فراوانی یافته‌اند (Ben Amotz *et al.*, 1982). در حال حاضر، جلبک‌های تک‌سلولی به عنوان منبع سوخت حیاتی (Biofuel) و حتی منبع تولید و استخراج انواع آنتی‌بیوتیک‌ها نیز کاربردهای فراوانی یافته‌اند (Mutanda *et al.*, 2011; Katircioglu *et al.*, 2006). با این وجود، تحقیقات در زمینه بررسی ارزش غذایی، خصوصاً اسیدهای چرب، در این جلبک‌ها هنوز

Scenedesmus quadricauda نشان داد که رشد روتیفر تغذیه شده با جلبک *Scenedesmus* به طور معنی داری بهتر از دیگر انواع جلبک‌های تک‌سلولی است (Ajah, 2010). لازم به ذکر است، تا کنون ۱۷۱ گونه از جلبک‌های تک‌سلولی جنس *Scenedesmus* و ۴۵ گونه از جلبک‌های تک‌سلولی *Desmodesmus* شناسایی شده است. رده‌بندی این دو جنس در جدول ۱ خلاصه شده است.

جدول ۱- رده‌بندی و جایگاه دو جنس *Scenedesmus* و *Desmodesmus* (Hegewald and Hanagata, 2002)

رده‌بندی	<i>Scenedesmus</i>	<i>Desmodesmus</i>
دامنه	Eukaryota	Eukaryota
سلسله	Plantae	Plantae
زیرسلسله	Viridiaeplantae	Viridiaeplantae
شاخه	Chlorophyta	Chlorophyta
رده	Chlorophyceae	Chlorophyceae
راسته	Sphaeropleales	Sphaeropleales
خانواده	Scenedesmaceae	Scenedesmaceae
زیرخانواده	-	Desmodesmoideae
جنس	<i>Scenedesmus</i>	<i>Desmodesmus</i>

مواد و روش‌ها

به منظور جداسازی جلبک‌های تک‌سلولی خانواده *Scenedesmaceae* از سه نقطه مختلف دریاچه سد مهاباد در فصل‌های مختلف نمونه‌برداری صورت گرفت. نمونه‌برداری، در چهار فصل مختلف، از پاییز سال ۱۳۸۸ تا تابستان ۱۳۸۹، از سه ایستگاه نمونه‌برداری از سد مهاباد انجام شد. بدین ترتیب حدود ۲ لیتر از آب هر ایستگاه حتی‌الامکان در حوالی ظهر توسط ظروف مخصوص نمونه‌برداری پلی‌اتیلنی برداشت شد. مختصات جغرافیایی سایت‌های نمونه‌برداری در شکل ۱ خلاصه شده است.

رده‌بندی و خصوصیات مورفولوژیک و ارزش اقتصادی خانواده *Scenedesmaceae*

خانواده *Scenedesmaceae* دارای دو جنس شناخته شده است؛ لیکن به علت اینکه جنس *Desmodesmus* سال‌ها پس از جلبک‌های تک‌سلولی جنس *Scenedesmus* شناسایی شد و همچنین، به علت شباهت زیاد مورفولوژیک، این دو جنس اغلب به عنوان جنس *Scenedesmus* شناخته می‌شوند. جنس *Scenedesmus* در زمینه‌های مختلف لیمنولوژی معادل موش‌های رت آزمایشگاهی مطرح بوده، کاربرد فراوانی در علوم تحقیقاتی دارند. این جلبک‌ها معمولاً به عنوان میکروارگانسیم‌های استاندارد در بسیاری از تحقیقات آبی، تکنولوژی و مدیریت آب‌ها مطرح هستند (Zachleder et al., 1986). این جنس از جلبک‌ها، یکی از پر طرفدارترین منابع غذایی در آزمایش‌ها و کشت زئوپلانکتون‌های گیاهخوار هستند (Boersma and Vijverberg, 1995; Trainor, 1995).

گونه *Scenedesmus obliquus*, Kützing 1833 به عنوان یک گونه تجاری مهم برای حذف برخی کاتیون‌های سمی مثل کادمیوم از منابع آبی کاربرد خوبی در صنعت دارد (Monteiro et al., 2009). همچنین، این جنس از جلبک‌های تک‌سلولی به علت اینکه دارای مقادیر بالای اسیدهای چرب است، برای تولید سوخت طبیعی مطرح بوده و حتی در تغذیه زئوپلانکتون‌هایی چون روتیفرها و دافنی‌ها استفاده می‌شود، برای مثال، در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۰ روی تغذیه روتیفر *Brachionus quadridentatus*, Hermann & Müller, 1783 انجام شد استفاده از انواع جلبک‌های تک‌سلولی به همراه از ۳ نوع جلبک

در داخل ارلن‌های یک لیتری و با استفاده از محیط‌های کشت عمومی جلبک‌های آب شیرین *f/2* (Guillard) تغییر یافته (کشت داده شد، Guillard and Ryther, 1962). خانواده جلبک یاد شده پس از چندین مرحله کشت روی محیط کشت آگار (کشت سریالی) و طی کردن مراحل خالص‌سازی با استفاده از میکروسکوپ نوری به صورت جدا شده به محیط جدید مایع در حجم‌های بالاتر ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌لیتری انتقال داده شدند. در این مرحله از محیط‌های کشت اختصاصی بهینه شده برای کشت جلبک‌های خانواده *Scenedesmaceae* استفاده شده، در سیستم کشت بسته تا حجم ۵ لیتری ادامه یافت. مشخصات محیط کشت بهینه شده برای کشت این خانواده در جدول ۲ نشان داده شده است.

شناسایی نمونه‌های جلبک

ابتدا خانواده *Scenedesmaceae* در نمونه‌های آبی کشت داده شده شناسایی و با استفاده از روش‌های جداسازی در چندین نمونه تهیه، خالص‌سازی شد. تفاوت‌های نخستین مشاهده شده میان جمعیت‌های جدا شده در برخی عوامل مورفولوژیک و فیزیولوژیک، احتمال وجود دو جنس مختلف از این خانواده را مطرح نمود. جداسازی نخستین جنس‌های احتمالی این خانواده به روش مستقیم زیر میکروسکوپ نوری و همچنین، با کشت سریالی بر محیط کشت جامد و مایع انجام گرفت. به علت شباهت‌های مورفولوژیک و فیزیولوژیک بسیار زیاد جنس‌های خانواده *Scenedesmaceae*، شناسایی دقیق جنس و گونه به روش مولکولی مقدور شد.



شکل ۱- عکس هوایی و سایت‌های نمونه‌برداری دریاچه سد مهاباد

دریاچه سد مهاباد یکی از آبگیرهای دائمی و مهم استان آذربایجان غربی است که در یک کیلومتری جنوب غربی شهر مهاباد قرار دارد و تفرجگاهی زیبا و مهم در استان بوده، زیستگاه تعداد زیادی از گونه‌های فیتوپلانکتون، زئوپلانکتون و بیش از ۱۳ گونه ماهی شامل سیاه‌ماهی، کپورماهی، آمورغلفخوار، اسبله‌ماهی، فیتوفاک، کاراس و کپور معمولی است. سد مهاباد دارای ۷۰۰ متر طول تاج بوده، ارتفاع آن ۴۶/۵ متر است. دریاچه پشت این سد ۳۶۰ هکتار وسعت دارد و روی رودخانه مهاباد بسته شده است. سد مهاباد جزو ده سد پُر آب کشور بوده، در حالت کلی مجموع حجم کل ورودی سالیانه آن معادل ۳۳۹/۳۰۴ میلیون متر مکعب است (میرهاشمی و پازوکی، ۱۳۸۱).

در این تحقیق، میزان شوری آب توسط دستگاه شوری‌سنج (Refracto-meter model ATAGO)، دما توسط دماسنج دیجیتال، pH توسط دستگاه pH-meter model HANA و شفافیت آب توسط Secchi disk در محل نمونه‌برداری تعیین شد. نمونه‌های آب بلافاصله به آزمایشگاه جلبک‌شناسی پژوهشکده آرتیمیا و جانوران آبی دانشگاه ارومیه انتقال داده شد. ابتدا پس از جدا نمودن اجرام خارجی، نمونه آب در تکرار کافی

بودند. برنامه استفاده شده برای تکثیر ناحیه مورد نظر به این ترتیب بود: دمای دناتورده کننده اولیه 97°C به مدت ۳ دقیقه، ۳۶ سیکل شامل دمای دناتورده کننده 97°C به مدت ۱ دقیقه، دمای اتصال 49°C به مدت یک دقیقه، دمای گسترش 72°C به مدت ۴۵ ثانیه و در نهایت دمای گسترش نهایی 72°C به مدت ۷ دقیقه. محصول PCR بر روی ژل الکتروفورز ۲ درصد بررسی شد. قطعه bp ۶۸۰ پس از خالص سازی اولیه برای تعیین توالی به شرکت سیناژن-ایران ارسال شد.

بررسی اسیدهای چرب نمونه‌های جلبک

برای بررسی اسیدهای چرب، ابتدا نمونه‌های جدا شده جلبک در داخل محیط‌های کشت مایع تا مرحله کشت انبوه (۵ لیتری) کشت داده شد. نمونه‌های فوق، پس از رسیدن به حداکثر تراکم و در مرحله رشد تصاعدی، سانتریفیوژ و بیومس جلبک‌های تک‌سلولی از محیط کشت جدا شدند. بیومس فوق، سپس در لوله‌های شیشه‌ای درب‌دار مخصوص ریخته، به هر کدام از آنها حدود ۵ میلی‌لیتر محلول متانول/تولون (۲:۳ V/V) و ۰/۱ میلی‌لیتر محلول استاندارد داخلی (حاوی اسید چرب (n-6):22:2 حل شده در ایزواکتان) اضافه گردید. سپس ۵ میلی‌لیتر مخلوط تازه تهیه شده استیل کلراید/متانول (۱:۲۰ V/V) به عنوان عامل استریفیکاسیون (استری کننده) اضافه شد. درب ظروف محکم بسته، مواد مخلوط شدند و در حمام آبی 100°C به مدت یک ساعت جوشانده، هر ۱۰ دقیقه یک‌بار تکان داده شدند. پس از سرد شدن لوله‌ها، به هر یک ۵ میلی‌لیتر آب دیونیزه و ۵ میلی‌لیتر هگزان اضافه گردید. لوله‌ها به مدت ۵ دقیقه با دور ۳۰۰۰g سانتریفیوژ، فاز بالایی به لوله‌های جدید منتقل گردید.

جدول ۲- مشخصات محیط کشت اختصاصی خانواده *Scenedesmaceae*. پس از تهیه هریک از محلول‌ها به طور جداگانه و استریل نمودن آنها، به یک لیتر از محلول نهایی کشت جلبک، ۱۰ میلی‌لیتر از محلول A و ۱۰ میلی‌لیتر از محلول B افزوده شد.

Solution A	
NH ₄ NO ₃	25 g/l
KH ₂ PO ₄	7 g/l
MgSO ₄	4.5 g/l
Solution B	
H ₃ BO ₃	715 mg/l
ZnSO ₄ .7H ₂ O	55 mg/l
CuSO ₄ .5H ₂ O	19 mg/l
MnSO ₄ .7H ₂ O	635 mg/l
Co(NO ₃) ₂ .6H ₂ O	15 mg/l
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ .4H ₂ O	4 mg/l
CaCl ₂ .6H ₂ O	1075 mg/l
C ₆ H ₈ O ₇ .7H ₂ O	1325 mg/l
FeC ₆ H ₅ O ₇	1325 mg/l

بررسی مولکولی

روش استخراج DNA و شرایط PCR

استخراج DNA از نمونه‌های جدا شده در محیط کشت جامد به روش CTAB انجام شد. بدین ترتیب که ۱۰ میلی‌گرم از استوک خالص شده در داخل محیط کشت جامد به داخل میکروتیوب‌های ۱/۵ میلی‌لیتری انتقال داده شد. برای تکثیر ناحیه جفت آغازگر معرفتی شده توسط Baldwin (۱۹۹۲) استفاده شد. عنوان و توالی این آغازگر بدین شرح بود:
آغازگر پیشرو:

ITS₄: 5'-tcc-tcc-gct-tat-tga-tat-gc-3'

آغازگر معکوس:

ITS₅: 5'-gga-agt-aaa-agt-cgt-aac-agg-3'

این جفت آغازگرها با موفقیت قبلاً برای شناسایی چندین گونه از جنس *Scenedesmus* استفاده شده

نتایج

شاخص‌های فیزیکوشیمیایی سایت نمونه برداری

نتایج بررسی برخی از شاخص‌های فیزیکوشیمیایی آب محل نمونه برداری در جدول ۳ نشان داده شده است.

نتایج نشان داد که غیر از افزایش تدریجی دمای آب (با گرم‌تر شدن هوا) و تغییرات جزئی در اسیدیته آب در آذرماه، هیچ تفاوت در خور توجهی میان شاخص‌های فیزیکوشیمیایی و مشاهده‌ای سایت‌های نمونه برداری وجود ندارد. با بررسی دقیق با استفاده از میکروسکوپ و کشت در محیط‌های کشت اختصاصی دو جنس مختلف از خانواده جلبک *Scenedesmaeae* شناسایی شد (شکل ۲).

در نهایت از طریق فیلتر سولفات سدیم آگیری و به بالن‌های گلابی شکل انتقال داده شدند و توسط روتاتور در دمای 35°C تغلیظ گردیدند. سپس در $0/5$ میلی لیتر ایزواکتان حل و به شیشه‌های کوچکی انتقال داده شدند و تا زمان تزریق در فریزر نگهداری شدند. نمونه‌ها برای تزریق به دستگاه گاز کروماتوگرافی آماده شدند. برای این منظور نمونه‌ها با ایزواکتان رقیق شدند. پس از تهیه محلول نهایی، مقدار $0/4$ میکرولیتر از آن به دستگاه گاز کروماتوگرافی تزریق گردید. در نهایت درصد هر اسید چرب نسبت به کل اسیدهای چرب هر نمونه با مقایسه طول منحنی‌های هر اسید چرب با طول منحنی استاندارد داخلی محاسبه شدند (Lepage and Roy, 1984).

جدول ۳- شاخص‌های فیزیکوشیمیایی آب ناحیه مورد بررسی

ساعت	رنگ آب	شفافیت (cm)	اسیدیته	شوری (pp)	دما ($^{\circ}\text{C}$)	ایستگاه
۱۳	سبز-سبز آبی	۵۰	۷/۷	۲	۱۲/۴	۱
۱۳/۲۰	سبز-سبز آبی	۵۰	۷/۷	۲	۱۱/۵	۲
۱۳/۴۵	سبز-سبز آبی	۵۰	۷/۶	۲	۱۱/۹	۳
۱۳/۲۰	سبز روشن	۴۰-۵۰	۸	۳	۱۱	۱
۱۳/۴۰	سبز روشن	۴۰	۸/۴	۳	۱۲	۲
۱۴	سبز روشن	۴۰-۵۰	۸/۵	۳	۱۳/۱	۳
۱۲/۳۰	سبز-سبز آبی	۴۰-۵۰	۸/۲	۲	۲۰/۵	۱
۱۳	سبز-سبز آبی	۵۰	۸/۵	۲	۲۰/۴	۲
۱۳/۲۰	سبز-سبز آبی	۵۰	۸/۴	۲	۲۱	۳
۱۶	سبز روشن-سبز آبی	۷۰	۸/۲	۲	۲۸/۳	۱
۱۶/۲۰	سبز روشن-سبز آبی	۷۰	۸/۳	۲	۲۷/۸	۲
۱۶/۴۰	سبز روشن-سبز آبی	۵۰	۸/۲	۲	۳۰/۴	۳

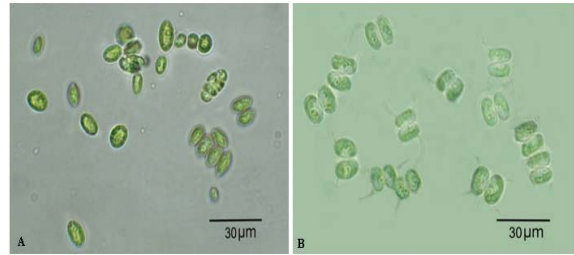
توالی‌های به دست آمده با استفاده از نرم‌افزار جستجوی اینترنتی در منابع اطلاعاتی (Blast) بررسی و گونه‌های پیشنهادی با ۹۹ درصد تشابه و همپوشانی شناسایی شدند (شکل ۴). بدین ترتیب دو گونه متفاوت از این دو جنس شناسایی شد.

نتایج آنالیز ترکیب اسیدهای چرب

میزان اسیدهای چرب دو گونه (از دو جنس متفاوت) از یکدیگر به صورت معنی‌داری متفاوت بوده، اغلب اسیدهای چرب گونه *Desmodesmus cuneatus* دارای ارزش غذایی بالاتری نسبت به گونه دیگر است ($P < 0.05$) (جدول ۴). این آنالیز نشان داد که غیر از اسیدهای چرب C18:1n7 و C20:5n3 این تفاوت در اغلب موارد معنی‌داری است.

بحث

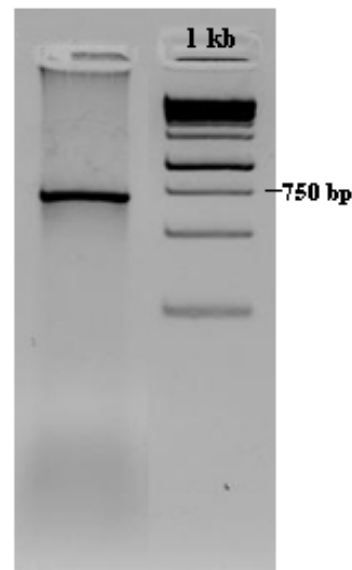
در سال‌های اخیر مطالعات محدودی بر فلور جلبکی تالاب‌ها و دریاچه‌های آب‌های شیرین و لب شور ایران انجام گرفته است. در بررسی فیتوپلانکتون‌های تالاب گندمان، چراغپور (۱۳۸۶) موفق به معرفی مجموعاً ۹۵ گونه فیتوپلانکتون متعلق به ۵۴ جنس از ۶ شاخه مختلف شد. همچنین، این تحقیق نشان داد که تراکم فیتوپلانکتون‌ها در فصل‌های مختلف تفاوت معنی‌داری داشته، این تالاب در زمره آب‌های اولیگو-مزوتروف معرفی شد. تحقیق روی جلبک‌های اپی فیت تالاب امیر کلایه مشخص کرد که رده *Bacillariophyceae* دارای بیشترین تراکم و رده‌های *Chlorophyceae*، *Cyanophyceae* و *Euglenophyceae* در مراتب بعدی تراکم و غالبیت قرار دارند (رمضان‌زاده، ۱۳۸۲). اما در منطقه آذربایجان غربی و در راستای شناسایی فلور جلبکی دریاچه ارومیه (اکوسیستم آب شور)



شکل ۲- عکس تهیه شده توسط میکروسکوپ نوری از خانواده *Scenedesmaceae* پس از جداسازی. بررسی دقیق توسط میکروسکوپ بر تفاوت‌های مورفولوژیک و احتمال متفاوت بودن این دو گونه تأیید دارد. (A) *Scenedesmus obliquus*، (B) *Scenedesmus cuneatus*.

محصول PCR و تعیین توالی

تکثیر ناحیه هدف با استفاده از جفت آغازگرهای فوق موجب شد که یک قطعه مشابه با وزن حدوداً ۶۸۰ جفت نوکلئوتید در هر دو نمونه A و B تولید شود (شکل ۳). با توجه به حصول باند یکسان در هر دو نمونه، برای شناسایی دقیق مولکولی نمونه‌ها، نسبت به تعیین توالی اقدام شد. بدین ترتیب محصول PCR برای تعیین توالی توسط کیت خالص‌سازی Roche خالص‌سازی شد.



شکل ۳- ژل الکتروفورز محصول PCR در آگاروز ۲ درصد

خانواده (Pratoomyot *et al.*, Bacillariophyceae (2005)، در کل ارزش غذایی مناسبی برای استفاده با هدف تغذیه زئوپلانکتونی را دارند (Lavens and Sorgeloos, 1996). همچنین، این تحقیق برای نخستین بار ارزش غذایی بالاتری را برای گونه *Desmodesmus cuneatus* نسبت به جنس دیگر گزارش نمود. لازم به ذکر است، ارزش غذایی (به خصوص اسیدهای چرب) جلبک‌های تک‌سلولی به شدت تابع محیط کشت و همچنین، فاز رشد تصاعدی است (Pratoomyot *et al.*, 2005). با توجه به اینکه مرحله کشت این جلبک‌ها در محیط بهینه‌سازی شده اختصاصی انجام شد و همچنین، برداشت آنها در مرحله رشد تصاعدی صورت گرفت، نتایج مربوط به ارزش غذایی آنها قابل استناد و حصول مجدد است.

در ارتباط با مقایسه فلور جلبکی دریاچه سد مهاباد هیچ اطلاعاتی در مورد تنوع فیتوپلانکتونی این تالاب یافت نشده، لیکن امکان بررسی نتایج و مقایسه آنها با تحقیقات قبلی مهیا نشد. به علت تنوع بالای جلبک‌های تک‌سلولی مشاهده شده در ناحیه فوق و به علت گستردگی این تحقیق نتایج فوق در گزارش حاضر نشان داده نشد. این تحقیق نشان داد که در فصل‌های مختلف تنوع جلبکی این ناحیه به شدت تابع شرایط اکولوژیک منطقه است (نتایج در این گزارش آورده نشده است). با توجه به اینکه دریاچه سد مهاباد زیستگاه بزرگی برای گونه‌های متنوعی از آبزیان محسوب شده، حتی در سال‌های پیش نسبت به رهاسازی انواع مختلفی از ماهیان به این دریاچه مبادرت شده است، بررسی دقیق ترکیب فلور جلبکی این ناحیه ضروری تشخیص داده می‌شود.

نمونه‌برداری انجام شده در ساحل بندر گلخانه موجب شناسایی ۶ جلبک از Cyanophyceae و ۴ جلبک از Chlorophyceae و ۲ جلبک از Bacillariophyceae شد (سلطانی و همکاران، ۱۳۷۳).

اما به تحقیقاتی از این دست در خارج از ایران توجه بیشتری شده است. به طور مثال Orlova و همکاران (۲۰۰۹) با شناسایی میکروجلبک‌های دریای Amursky Bay در ژاپن (۱۹۹۱-۲۰۰۶) ۳۵۷ گونه از میکروجلبک‌های پلانکتونی را شناسایی کردند. تحقیقات در ارتباط با شناسایی جلبک‌های تک‌سلولی تا جایی ادامه یافته که محیط‌های کشت مختلفی برای کشت بهینه و با تراکم بالای انواع جلبک به ویژه جلبک‌های آب شیرین ابداع و به کار برده شده است. در این ارتباط Kilham و همکاران (۱۹۹۸) محیط کشت جدیدی به نام COMBO برای کشت همزمان زئوپلانکتون و جلبک آب شیرین ابداع کردند (Christin and Karlsson, 2009).

به علت کاربرد بسیار وسیع و ارزش اقتصادی، شناسایی و جدا نمودن جلبک‌های تک‌سلولی اهمیت زیادی یافته است. با توجه به قدمت خانواده Scenedesmaceae که به بیش از ۱۰۰ میلیون سال قبل نسبت داده می‌شود (Girard, 2009) و همچنین، ارزش غذایی و اهمیت این خانواده تا کنون تحقیقات زیادی برای شناسایی و رده‌بندی گونه‌های جنس و خانواده Scenedesmaceae انجام گرفته است (Baldwin, 1992; Lewis and Flechtner, 2004; Haq *et al.*, 2008). بررسی ارزش غذایی این خانواده با نمونه‌های یافت شده در این تحقیق نشان داد که این خانواده با وجود دارا بودن ارزش غذایی کمتری نسبت به جلبک‌های تک‌سلولی

Sample A:

```

1 gtc gag ttt aga cat gca aag cat gtt tcc tgc ttg gcc tct agc aaa gtc cac aag cca
61 caa ctt cgt gta gtc ggc aga agc cgg tgc tac cta tcc agt tga agc cca tat cgg gtc
121 ctt gct taa gcc tct aag ctt cag cca acc caa tgg gag tga acc aat tgg gaa agc cag
181 atc cac ccc tga ggc caa cta gaa gct gac cag ccc tcc aaa agg aga gag ggg tga ggg
241 tat aaa ccg acg ctg agg cag aca tgc tct tgc ccg agg gct cga gcg caa tat gcg ttc
301 aaa gat tgg atg gtt cac gga att ctg caa ttc aca cta cgt atc gca ttt cgc tgc gtt
361 ctt cat cgt tgc gag agc caa gat atc cgt tgt tga gag ttg tct ttg gtt aag att gcc
421 agt taa tag caa tca aag ctt cag agt ttg gtt ttg aca tgc gtt agc act ggt gta taa
481 gca tgc caa agc gcc act gat gca agt aat caa att att tgc acc agc ttg caa gta caa
541 ttg ggc aag cca att gcc ttg ctg gca gct aag gca cgg aac aga tag gtt cgc att gtc
601 gtt tta ata att caa tga tcc ttc cgc agg ttc acc tac gga aac ctt gtt acg act ttt
661 act

```

Sample B:

```

1 gtc gat acg aga tac atg caa tga agc atg ttt cct gct tgg ctc cta acc agg tcc tca
61 gac aca act tgg tgt agg cac cca aag ggt gtt gct acc tat cca gtt gag ccc tta cgg
121 gtc cca gtt taa gcc tct gty ctt cag cca acc caa tca act tgc att gat tgg gag ggc
181 cag atc cac ccc tga tgc cgg ttt gag caa aca cgg caa gct tac tca atg aag agt aag
241 agg gat gat ggg tgt aaa ccg acg ctg agg cag aca tgc tct tct ccg agg agt cga gcg
301 caa tat gcg ttc aaa gat tgg atg gtt cac gga att ctg caa ttc aca cta cgt atc gca
361 ttt cgc tgc gtt ctt cat cgt tgc gag agc caa gat atc cgt tgt tga gag ttg ttt tgg
421 ttg gag act gcc ggt taa cgg cag cca aag ctt cag agt ttg gtt tac tca ttg gtt ggt
481 caa tgg tgt gta ggt aag tag gcc gga cac gct tgc gcg gtt cga cct aac gtc ggt aca
541 caa ata gag agt gcg tgt tgt ggt ttg cat att caa tga tcc ttc cgc agg ttc acc tac
601 gga aac ctt gtt acg act ttt act

```

شکل ۴- توالی ناحیه ITS1 در گونه‌های جدا شده از خانواده Scenedesmeaceae. توالی A به گونه *Scenedesmus obliquus* و توالی B به گونه *Desmodesmus cuneatus*, Hegewald 2002 مربوط است.

جدول ۴- درصد کل اسیدهای چرب جلبک‌های تک‌سلولی *Desmodesmus cuneatus* و *Scenedesmus obliquus*. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار است ($P>0.05$).

نام عمومی	<i>Desmodesmus cuneatus</i>	<i>Scenedesmus obliquus</i>
Saturated		
C14:0	Myristic 0.154 ^a	0.2894 ^b
C16:0	Palmitic 19.2421 ^a	17.0224 ^b
C18:0	Stearic 3.9820 ^a	2.2359 ^b
C20:0	Arachidic 1.8626 ^a	1.1440 ^b
C22:0	Behenic 0.3597 ^a	0.0477 ^b
Monounsaturated		
C14:1n5	Myristoleic 0.1221 ^a	0.0552 ^b
C16:1n7	Palmitoleic 0.4624 ^a	0.3575 ^b
C18:1n9	Oleic 17.9576 ^a	25.4679 ^b
C18:1n7	Vaccenic 4.0077 ^a	1.0128 ^b
Polyunsaturated		
C18:2n6	Linoleic 15.4528 ^a	4.8955 ^b
C18:3n3	α -Linolenic 16.4033 ^a	9.2719 ^b
C18:3n6	γ -linolenic 0.1285 ^a	0.1799 ^b
C18:4n3	Stearidonic 0.3339 ^a	0.3654 ^a
C20:4n6	Arachidonic 0.5395 ^a	0.1387 ^b
C20:5n3	Eicosapentaenoic 0.1542 ^a	0.1696 ^a
C22:5n6	Docosapentaenoic NC	1.0083 ^b
C22:6n3	Docosahexaenoic 0.5588 ^a	0.2223 ^b

به جنس‌های مختلف این خانواده امکان استفاده از تکنیک RFLP نیز مفید به نظر می‌رسد.

تشکر و قدردانی

این پروژه با حمایت مالی و تجهیزاتی گروه زیست‌شناسی دانشگاه ارومیه و پژوهشکده آرتیمیا و جانوران آبزی دانشگاه ارومیه به انجام رسید. بدین وسیله از همه کارشناسان این دو مرکز که ما را در اجرای این پروژه یاری نمودند، تشکر و قدردانی می‌شود.

سازندگی ۷: ۲۳-۲۵.

شعاع حسنی، ا. (۱۳۷۵) پایان‌نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان، لاهیجان، ایران.

میرهاشمی نسب، ف. و پازوکی، ج. (۱۳۸۱) شناسایی انگل‌های سخت‌پوست برخی از ماهیان دریاچه سد مخزنی مهاباد، مجله علمی شیلات ایران ۱۱(۴): ۱۳۳-۱۴۸.

Ajah, P. O. (2010) Mass culture of Rotifera (*Brachionus quadridentatus* [Hermann, 1783]) using three different algal species. *African Journal of Food Science* 4(3): 80-85.

Baldwin, B. G. (1992) Phylogenetic utility of the internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA in plants: an example from the Compositae. *Molecular Phylogenetic* 1: 3-16.

Ben Amotz, A., Katz, A. and Auron, M. (1982) Accumulation of β -carotene in falotolerant Algae: purification and characterization of

در این تحقیق، شباهت‌های مورفولوژیک بسیار نزدیک و تنوع بسیار زیاد خانواده Scenedesmaceae، بررسی مولکولی آنها را لازم و ضروری نمود. تکنیک مولکولی مؤثر به کار رفته در این تحقیق، پیش از این کارایی خود را در رده‌بندی جلبک‌های این خانواده با استفاده از توالی ناحیه ITS و 18S rDNA به اثبات رسانده بود (Baldwin, 1992; Lewis and Flechtner, 2004). با توجه به اهمیت شناسایی سریع و دقیق گونه‌های خانواده Scenedesmaceae و با اشاره به تفاوت‌های توالی مشاهده شده در بین گونه‌های مربوط

منابع

چراغپور، ج. (۱۳۸۶) مطالعه فیتوپلانکتون‌های تالاب گندمان. پایان‌نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران.

رمضان‌زاده، ح. (۱۳۸۲) بررسی جلبک‌های اپی‌فیت تالاب امیر کلاویه و مقایسه جوامع جلبکی روی بسترهای مختلف، پایان‌نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه تهران، تهران، ایران.

سلطانی، ن.، ریاحی، ح. و شکروی، ش. (۱۳۷۳) مطالعه فلور جلبکی دریاچه ارومیه، مجله پژوهش و

β -carotene rich globules from *Dunaliella bardawil* (chlorophyceae). *Journal of Phycology* 18: 529-557.

Boersma, M. and Vijverberg, J. (1995) Synergistic effects of different food species on life-history traits of *Daphnia galeata*. *Hydrobiologia* 307: 109-115.

Brown, M. R., Jeffrey, S. W., Volkman, J. K. and Dunstan, G. A. (1997) Nutritional properties of microalgae for mariculture. *Aquaculture* 151: 315-331.

Chomrung, A. (2000) Nutritive value of diatoms two species as food for juvenile,

- Haliotis asinina* Linnaeus. M.Sc. Thesis. Burapha University, Chomburi.
- Christin, S. and Karlsson, J. (2009) Zooplankton feeding on algae and bacteria under ice in Lake Druzhby. East Antarctica Polar Biology 32: 1195-1202.
- Girard V. (2009) Evidence of Scenedesmaceae (Chlorophyta) from 100 million-year-old amber. Geodiversitas 31(1): 145-151.
- Grung, M., D'Souza, F. M. L. Borowitzka, M., and Liaaen-Jensen, S. (1992) Algal carotenoids 51. Secondary carotenoids 2. *Haematococcus pluvialis* aplanospores as a source of (3S, 3'S)-astaxanthin esters. Journal of Applied Phycology 4: 165-171.
- Guillard, R. R. L. and Ryther, J. H. (1962) Studies on marine plankton diatoms I. *Cyclotella nana* Hustedt, and *Detonula confervacea* (Cleve). Canadian Journal of Microbiology 8: 229-239.
- Haq, W., Zarina, A., Masud-ul-Hasan, M. and Shameel, M. (2008) Taxonomic study of the family Scenedesmaceae (Volvocophyta shameel) in certain North-Eastern area of Pakistan. Proceedings of the Pakistan Academy Science 45(1): 23-30.
- Hegewald, E. and Hanagata, N. (2002) Validation of the new combinations of *Coelastrella* and *Neodesmus* and the description of the new subfamily Desmodesmoideae of the Scenedesmaceae (Chlorophyta). Archiv für Hydrobiologie, Supplement 143 [Algological Studies 105]: 7-9.
- Katircioglu, H., Beyatli, Y., Aslim, B., Yüsekdağ, Z. and Atici, T. (2006) Screening for antimicrobial agent production of some freshwater. The Internet Journal of Microbiology 2(2).
- Kilham, S. S., Kreeger, D. A., Lynn, S. G., Goulden, C. E. and Herrera, L. (1998) COMBO: a defined freshwater culture medium for algae and zooplankton. Hydrobiologia 377: 147-159.
- Lavens, P. and Sorgeloos, P. (1996) Manual on the production and use of live food for aquaculture. FAO Fisheries Technical Paper.
- Lepage, G. and Roy, C. C. (1984) Improved recovery of fatty acid through direct transesterification without prior extraction or purification. Journal of Lipid Research 25: 1391-1396.
- Lewis, L. A. and Flechtner, V. R. (2004) Cryptic species of *Scenedesmus* (Chlorophyta) from desert soil communities of western North America. Journal of Phycology 40: 1127-1137.
- Monteiro, C. M., Castro, P. M. L. and Xavier, F. X. (2009) Use of the microalga *Scenedesmus obliquus* to remove cadmium cations from aqueous solutions. World Journal of Microbiol Biotechnol 25: 1573-1577.
- Mutanda, T., Ramesh, D., Karthikeyan, S., Kumari, S., Anandraj, A. and Bux, F. (2011) Bioprospecting for hyper-lipid producing microalgal strains for sustainable biofuel production. Bioresource Technology 102: 57-70.
- Orlova, T. Y., Stonik, I. V. and Shevchenko, O. G. (2009) Flora of planktonic microalgae of Amursky Bay, Sea of Japan. Russian Journal of Marine Biology 35(1): 60-78.
- Pratoomyot, J., Srivilas, P. and Noiraksar, T. (2005) Fatty acids composition of 10 microalgal species. Songklanakarin Journal of Science Technology 27(6): 1179-1187.
- Trainor, F. R. (1995) The sequence of ecomorph formation in a phenotypically plastic, multispired *Scenedesmus* species (Chlorophyceae). Archiv für Hydrobiologie 133: 161-171.
- Volkman, J. K., Jeffrey, S. W., Nichols, P. D., Rogers, G. I. and Garland, C. D. (1989) Fatty acids and lipid classes of ten species of microalgae used in mariculture. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 128: 219-240.
- Zachleder, V., Wittenburg, E. and Abarzua, S. (1986) Factors controlling the inhibitory effects of 3, 4-benzo (a) pyrene on the

chlorococcal alga *Scenedesmus quadricauda*.
Algological Studies/Archiv für
Hydrobiologie, Algological Studies/Archiv
für Hydrobiologie, Supplement Volumes 43:
281-296.

Characterization of two unicellular Algae species *Scenedesmus obliquus* and *Desmodesmus cuneatus* from Mahabad dam lake, west Azerbaijan

Zahra Asal Pische ¹, Reza Heydari ² and Ramin Manaffar ^{1*}

¹ *Artemia* and Aquatic Animals Research Institute, Urmia University, Urmia, Iran

² Department of Biology, Faculty of Sciences, Urmia University, Urmia, Iran

Abstract

During the recent years, unicellular algae have been considered as an important source of unsaturated fatty acids, carotenoids such as beta-carotene and food and drug supplementaries. These algae also play important role as live food in breeding of zooplankton, molluscs and aquatic animals in larval stage. So far many species of different families and generas of unicellular algae have been rightly introduced for aquaculture industry. The family of *Scenedesmaceae* is known as one of the important microalgae which belongs to Chlorophyceae class. This family is identified with several generas which are all important in aquaculture industry for *Artemia*, *Daphnia* and *Rotifer* breeding. In this research, in order to obtain laboratory demands of unicellular algae, one the most important fresh water sources of west Azerbaijan province, Mahabad dam lake was investigated. This study consisted of morphologic, molecular and nutrition value which resulted in isolation of two species of *Scenedesmus obliquus*, Kützing 1833 and *Desmodesmus cuneatus*, Hegewald 2002 of this family. The study of mass and batch culturing potential and also the fatty acid profile of these species revealed efficiency of these species for aquaculture industry. However, in spite of morphologic similarities of the two, the total fatty acids of *Desmodesmus cuneatus* was found significantly higher than other species ($P < 0.05$).

Key words: Algae, *Desmodesmus cuneatus*, *Scenedesmus obliquus*, Live food, Unicellular algae

* Corresponding Author: r.manaffar@urmia.ac.ir