CORE
Metadata, citation and similar papers at core.ac.uk
Provided by Aquatic Commons

وزارت جهاد کشاورزی
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور – مرکز تحقیقات آرتمیای کشور

عنوان :

# تعیین خط شناسه مولکولی جلبک
# *Microcystis aeruginosa* (Kützing) Kützing 1846
# دریاچه سد ارس با استفاده از ژن ITS-2

مجری:
فریدون محبی

شماره ثبت
۵۰۴۰۸

**وزارت جهاد کشاورزی**
**سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی**
**موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور- مرکز تحقیقات آرتمیای کشور**

---

**عنوان پروژه : تعیین خط شناسه مولکولی جلبک *Microcystis aeruginosa* (Kützing) Kützing 1846 دریاچه سد ارس با استفاده از ژن ITS-2**

**شماره مصوب پروژه : ٩٣١١٦-١٢-٧٩-٤**

**نام و نام خانوادگی نگارنده/ نگارندگان : فریدون محبی**
**نام و نام خانوادگی مجری مسئول ( اختصاص به پروژه ها و طرحهای ملی و مشترک دارد ) :**
**نام و نام خانوادگی مجری / مجریان : فریدون محبی**
**نام و نام خانوادگی همکار(ان) : علی محسن پور، یوسفعلی اسدپور، احمد غرقی، علی نکوئی فرد، مسعود صیدگر، لطیف اسماعیلی ، رضا احمدی، بیژن مصطفی زاده، صابر شیری، ژا له علیزاده، سیاوش گنجی، بایرام علی داداش پور**
**نام و نام خانوادگی مشاور(ان) : رامین مناف فر**
**نام و نام خانوادگی ناظر(ان) : سهراب رضوانی**

**محل اجرا : استان آذربایجان غربی**
**تاریخ شروع : ۹۳/۳/۳۱**
**مدت اجرا : ۱ سال و ۵ ماه**
**ناشر : موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور**
**تاریخ انتشار : سال ۱۳۹۵**

**حق چاپ برای مؤلف محفوظ است . نقل مطالب ، تصاویر ، جداول ، منحنی ها و نمودارها با ذکر مأخذ بلامانع است .**

**«سوابق طرح یا پروژه و مجری مسئول / مجری»**

**پروژه : تعیین خط شناسه مولکولی جلبک *Microcystis aeruginosa* (Kützing) Kützing 1846 دریاچه سد ارس با استفاده از ژن ITS-2**

**کد مصوب : ٤-٧٩-١٢-٩٣١١٦**

**شماره ثبت (فروست) : ٥٠٤٠٨ تاریخ : ٩٥/٧/١٣**

**با مسئولیت اجرایی جناب آقای فریدون محبی دارای مدرک تحصیلی دکتری در رشته زیست شناسی گیاهی گرایش سیستماتیک می‌باشد.**

**پروژه توسط داوران منتخب بخش زیست فنآوری و فرآوری آبزیان در تاریخ ۹۵/۵/۱ مورد ارزیابی و با رتبه عالی تأیید گردید.**

**در زمان اجرای پروژه، مجری در :**

**ستاد □ پژوهشکده □ مرکز ■ ایستگاه**

**با سمت در سرپرست بخش ارزیابی ذخایر و اکولوژی مرکز تحقیقات آرتمیای کشور مشغول بوده است.**

| عنوان | «فهرست مندرجات» | صفحه |
|---|---|---|


چکیده ..... ۱
۱- مقدمه ..... ۳
۱-۱- فیتوپلانکتونها ..... ۳
۱-۲- عوامل محیطی موثر بر شکل‌گیری اجتماعات فیتوپلانکتونی در اکوسیستم‌های آبی ..... ۳
۱-۳- توالی فصلی اجتماعات فیتوپلانکتونی در اکوسیستم‌های آبی ..... ۳
۱-۴- جایگاه سیانوباکتری‌ها در شکل‌گیری اجتماعات فیتوپلانکتونی ..... ۴
۱-۵- شکوفایی سیانوباکتری‌ها در آبهای شیرین ..... ۴
۱-۶- کنترل تداوم شکوفایی و از بین رفتن آن ..... ۶
۱-۷- سیانوباکتریها و چراکنندگان (Grazers) ..... ۶
۱-۸- معرفی جنس Microcystis Kützing ex Lemmermann, 1907 ..... ۶
۱-۹- اهمیت مطالعاتی جنس Microcystis ..... ۷
۱-۱۰- رده بندی فیلوژنتیک ..... ۱۰
۱-۱۱- پیشینه مطالعات انجام شده روی جنس Microcystis ..... ۱۱
۱-۱۲- بیان هدف ..... ۱۳
۲- مواد و روشها ..... ۱۴
۲-۱- ایستگاههای مطالعاتی ..... ۱۴
۲-۲- مطالعه فیلوژنتیک جنس Microcystis ..... ۱۵
۲-۲-۱- نمونه برداری ..... ۱۵
۲-۲-۲- ایزوله سازی جلبکهای جنس Microcystis ..... ۱۶
۲-۲-۳-کشت انبوه جلبکهای تک سلولی پس از ایزوله سازی ..... ۱۸
۲-۲-۴- روشهای مولکولی ..... ۲۱
۲-۲-۵- الکتروفورز ..... ۲۴
۲-۲-۶- عکس برداری از ژل ..... ۲۵
۳- نتایج ..... ۲۷
۳-۱- نتایج بررسی های مولکولی ..... ۲۷
۴- بحث و نتیجه گیری ..... ۳۰

| عنوان | «فهرست مندرجات» | صفحه |
|---|---|---|


۱-۴- بررسی های مولکولی جنس ***Microcystis*** ..... ۳۰
پیشنهادها ..... ۳۳
منابع ..... ۳۴
چکیده انگلیسی ..... ۳۶

## چکیده

امروزه به علت افزایش جمعیت و فعالیتهای انسانی و نیز به واسطه ورود پساب های شهری، روستایی و روانابهای کشاورزی در منابع آب، اکوسیستم‌های آبی در معرض آلودگی شدید قرار گرفته‌اند. فیتوپلانکتونها گروهی از جلبکهای غوطه ور در آب هستند که نقش مهمی در تأمین مواد غذایی و اکسیژن برای سایر جانداران، تثبیت ازت و دی اکسیدکربن دارند. این موجودات به عنوان تولید کنندگان اولیه در اکوسیستمهای آبی محسوب می شوند. آنها در زیستگاههای آبی مختلف در تمام جهان یافت می شوند و تحت تأثیر عوامل محیطی نظیر اسیدیته، نور و دما بوده و در تعیین میزان آلودگی آب مورد استفاده قرار می گیرند. جلبکها در اکوسیستم‌های مختلف آبی برای ارزیابی کیفیت آب یا میزان آلودگی آب مورد استفاده قرار می‌گیرند. ترکیب و تراکم فیتوپلانکتونی به عنوان یک نشانگر مکمل میزان تروفی آب قابل استفاده است. جوامع فیتوپلانکتونی نشان دهنده تغییرات محیطی بلندمدت و کوتاه مدت در اکوسیستمهای آبی می باشند. از مسائل و مشکلات بارز اکولوژیک آب ها مخصوصا آب های آشامیدنی شکوفا شدن یا ازدیاد بیش از حد جمعیت بعضی از گونه های سبز-آبی است که کاهش اکسیژن آب و در مواردی آزاد کردن سم و مسمومیت جدی و مرگ ومیر آبزیان و انسان را در پی دارد.
به علاوه، بسیاری از سیانوباکتریهای ایجاد کننده شکوفایی مضر متابولیت های ثانویه سمی تولید می کنند که می تواند مسمومیت جدی در پستانداران (شامل انسان) ایجاد نماید. جنس *Microcystis* یکی از مهمترین سیانوباکتریهای تولید کننده بلوم یا شکوفایی در سیستم های آبی بشمار می رود. جمعیت های مختلف این جنس باعث ایجاد شکوفایی در سیستم های آبی می شوند و همین امر موجب مورد توجه قرار گرفتن آنها در سالهای اخیر شده است. گونه های مختلف این جنس در آبهای شیرین ساکن و برخوردار از شرایط یوتروف موجود در تمام دنیا گسترش یافته اند و چندین گونه از آنها از قابلیت تولید سم نیز برخوردارند. جنس *Microcystis* از سیانوباکتریها طبق معیارهای ژنتیکی (توالی مولکولی 16S rRNA) مشخص و تعریف شده است، ولی طبقه بندی آن در سطح پایین تر از جنس مبهم است و وجود گونه های مورفولوژیکی سنتی آن مورد تردید می باشد. با این وجود، جمعیت های این جنس شکوفایی یا بلوم های شدیدی در آبهای یوتروف در سراسر جهان بوجود می آورند و جمعیتهای متعددی از آن سم تولید می کنند. بنابراین، شناسایی تنوع طبیعی آن در سطح پایین تر از جنس از اهمیت خاصی برخوردار است. با این وجود، چندین خصوصیت انواع ریختی *Microcystis* که به عنوان گونه های سنتی طبقه بندی شده اند، واقعا وجود داشته و مکررا در مناطق مختلف جهان مشاهده می شوند. در حال حاضر آنها را می توان تنها به طور سنتی به عنوان ریخت گونه (گونه های ریختی) در نظر گرفت که به یک ژنوتیپ متعلق بوده و اکولوژی مشابهی دارند. چنین گونه های سنتی با صفات فنوتیپی و اکوفیزیولوژیکی مشخص را نمی توان به طور کامل حذف کرد. شناسایی آنها برای مطالعات اکولوژیکی، اکوتوکسیکولوژیکی و غیره مفید و ضروری است. ژن جداکننده نسخه برداری شده داخلی (ITS) قطعه ای از ژنوم است که بین ژنهای 16S rRNA و 23S قرار دارد. این ژن نسبت به ژن 16S rRNA از میزان بالایی از عدم

تجانس (Heterogeneity) برخوردار بوده و بنابراین امکان شناسایی بسیاری از جنس های سیانوباکتریها توسط آن وجود دارد.

سد ارس در شمال غرب ایران واقع شده و نقش مهمی از نظر شیلاتی، تامین آب آشامیدنی، کشاورزی و فعالیت های تفریحی در این ناحیه دارد. این پروژه با هدف زیر انجام گرفت: بررسی مولکولی جمعیت های جلبک Microcystisبه وسیله ITS در سد ارس.

نمونه های لازم برای آنالیز های مولکولی از ۱۰ ایستگاه نمونه برداری در ۲۵ مرداد ۱۳۹۳ تهیه گردید. نمونه های لازم برای بررسی مولکولی *Microcystis* در هر ایستگاه از دو عمق متفاوت (آب سطحی و عمق یک متری از سطح آب) جمع آوری شدند و در داخل ظروف جداگانه تهیه و بدون تیمار اولیه به آزمایشگاه منتقل گردید. همچنین برای شناسایی مورفولوژیک گونه (های) *Microcystis* تصاویر میکروسکوپی آن از ایستگاههای مختلف برای پروفسور Komárek ارسال شد و مورد تایید قرار گرفت. انجام الکتروفورز با استفاده از پرایمرهای اختصاصی سیانوفیسه توانست وجود جلبکهای سیانوفیسه در نمونه های ایزوله شده مورد تائید قرار دهد. در راستای بررسی تنوع نوکلئوتیدی باندهای حاصل ژل الکتروفورز DGGE انجام شد.

همچنین به منظور تائید صحت باندهای حاصل از تکرارهای فوق تعیین توالی باندهای حاصل در ۱۰ نمونه صورت پذیرفت. نتایج این بررسی نشان دهنده وجود ۳ گونه از جلبکهای سیانوفیسه در بین نمونه ها بود که از نظر ژنتیکی اختلاف زیادی با گونه های شناخته شده در بانک ژنی بودند.

## ۱- مقدمه

### ۱-۱- فیتوپلانکتونها

فیتوپلانکتونها گروهی از جلبکهای غوطه ور در آب هستند که نقش مهمی در تأمین مواد غذایی و اکسیژن برای سایر جانداران، تثبیت ازت و دی اکسیدکربن دارند. این موجودات به عنوان تولید کنندگان اولیه در اکوسیستمهای آبی محسوب می شوند. آنها در زیستگاههای آبی مختلف در تمام جهان یافت می شوند و تحت تأثیر عوامل محیطی نظیر اسیدیته، نور و دما بوده و در تعیین میزان آلودگی آب مورد استفاده قرار می گیرند. این جلبکها پایه اولیه تمام شبکه های غذایی در اکوسیستمهای آبی و جزء عناصر مهم چرخه بیوژئوشیمیایی محسوب می شوند. فیتوپلانکتونها موجودات میکروسکوپی فتوسنتزکننده ای هستند که چندین شاخه مهم از جلبکها را در بر می گیرند. شاخص ترین شاخه های فیتوپلانکتونها عبارتنداز: سیانوباکتریها یا جلبکهای سبز- آبی، دیاتومه ها یا باسیلاریوفیتا، کلروفیتا، اوگلنوفیتا، دینوفیتا، کریزوفیتا.

کیفیت و ثبات منابع آبی از جمله مسائلی است که همواره مورد توجه جهانی بوده است (Smith, 2003)، ولی این منابع در حوزه‌های آبریز سیستمهای آبی داخلی در معرض آلودگی قرار دارند زیرا فعالیتهای انسانی تأثیر منفی روی کیفیت آب دریاچه پشت سدها گذاشته است. این اثرات منفی اکثراً ناشی از ورود فاضلاب تصفیه نشده و روان آبهای کشاورزی به سدهاست. به عبارت دیگر فعالیت انسانی باعث تخلیه مقادیر زیادی از مواد غذایی به داخل آب پشت سدها می‌گردد که رشد و تکثیر فیتوپلانکتونها را تحت تأثیر قرار داده و کیفیت و کمیت جمعیتهای آنها را دچار تغییر می‌نماید.

### ۱-۲-عوامل محیطی موثر بر شکل‌گیری اجتماعات فیتوپلانکتونی در اکوسیستم‌های آبی

فیتوپلانکتونها در اکثر دریاچه های جهان به میزان زیادی تحت تاثیر تغییرات فصلی هستند. از عوامل مهمی که ساختار اجتماعات فیتوپلانکتونی را در فصول مختلف سال تغییر می دهد میتوان به فاکتورهای فیزیکی و شیمیایی شامل نور، دما، شوری، گاز کربنیک و مواد غذایی ضروری) و عوامل بیولوژیک (نرخ رشد و فشار چرندگان) اشاره نمود که سبب کنترل جمعیت فیتوپلانکتونها از طریق تغییر ترکیب گونه های، زیتوده و الگوهای تولید می شوند (Harris, 1986) .از اینرو جایگزینی برخی از جلبک ها با یکدیگر و غالب شدن بعضی از آنها در فصول خاص و توالی فیتوپلانکتونی در اکوسیستمهای فوق را میتوان به این عوامل نسبت داد.

### ۱-۳- توالی فصلی اجتماعات فیتوپلانکتونی در اکوسیستم‌های آبی

در مناطق معتدل فیتوپلانکتونها توالی سالیانه مشخصی نشان میدهند به عنوان مثال در بهار شکوفایی دیاتومه ها، در تابستان تاژکداران گوناگون و در پاییز شکوفایی های بزرگی از دیاتومه ها، جلبکهای سبز- آبی و دینوفلاژله

ها مشاهده می شوند ( King et al., 2002). تقریباً گونه هایی که گاهی اوقات جمعیت شان در سال افزایش می یابد در بقیه اوقات سال به عنوان جمعیت کوچکی در آب حضور داشته ولی حتی ممکن است مشاهده آنها مشکل باشد. در بسیاری از اکوسیستم های آبی سیانوباکتریها در فصل گرم سال رشد زیادی دارند و گاهی یک یا چند گونه از آن غالب می شوند. در برخی سالها به علت بالا بودن دمای آب در فصل سرد ممکن است شکوفایی سیانوباکتریها در تمام طول سال البته با شدت کمتر در فصل سرد نیز ادامه یابد. روند غلبه این گونه ها بین سالهای متوالی ممکن است تاحدودی ثابت بوده یا با تغییر گونه یا گونه های غالب همراه باشد.

## ۱-٤- جایگاه سیانوباکتری‌ها در شکل‌گیری اجتماعات فیتوپلانکتونی

سیانوباکتریها (جلبکهای سبز- آبی) قدیمی ترین موجودات شناخته شده فتواتوتروف تولید کننده اکسیژن در کره زمین هستند. تکثیر آنها در طی دوران پرکامبرین (حدود ۳/۵ میلیارد سال قبل) بیوسفر فاقد اکسیژن را به شدت تغییر داد که منجر به ایجاد و تکامل حیات گیاهی و جانوری عالی بر روی خشکی شد (Schopf, 2000). بسیاری از گونه های سیانوباکتریها توانایی تثبیت نیتروژن اتمسفری ($N_2$) (یک فرایند غیر هوازی) را دارند، همچنین قادرند فسفر را ذخیره و آهن و طیفی از فلزات نادر و ضروری را جذب کنند. این صفات آنها را قادر می سازد محیط های متنوع خشکی و آبی، فقیر و غنی از مواد غذایی را در سراسر جهان به تصرف خود در آورند.

اخیرا سیانوباکتریها، استراتژی های اکوفیزیولوژیکی از خود نشان داده اند که به آنها امکان داده تا از تغییرات ایجاد شده توسط انسان در این محیط ها ، مخصوصا تغییرات مربوط به غنی شدن شدید و هیدرولوژیک در اکوسیستم ها ی متنوع از دریاچه های کوهستانی تا سواحل اقیانوسها، بهره برداری نمایند.

## ۱-۵- شکوفایی سیانوباکتری‌ها در آبهای شیرین

از مسائل و مشکلات بارز اکولوژیک آب ها مخصوصا آب های آشامیدنی شکوفا شدن یا ازدیاد بیش از حد جمعیت بعضی از گونه های سبز-آبی است که کاهش اکسیژن آب و در مواردی آزاد کردن سم و مسمومیت جدی و مرگ ومیر آبزیان و انسان را در پی دارد. تجزیه باکتریایی سیانوباکتریهای مرده ممکن است منجر به فقدان اکسیژن و تلفات ماهیها شود. به علاوه، بسیاری از سیانوباکتریهای ایجاد کننده شکوفایی مضر متابولیت های ثانویه سمی تولید می کنند که می تواند مسمومیت جدی در پستانداران (شامل انسان) ایجاد نماید ( Chorus and Bartram, 1999).

شکوفایی مضر سیانوباکتریها یکپارچگی و ثبات اکولوژیکی اکوسیستم های آبی را با مصارف مختلف نظیر آب آشامیدنی، آبیاری، ماهیگیری و تفریحی تهدید می کند.

## ۱-۵-۱- عوامل اکولوژیک کنترل کننده دینامیک شکوفایی جلبکی سیانوباکتریهای زیان‌آور

### ۱-۱-۵-۱- ورود مواد غذایی

نظرات و جمع بندی ها نشان می دهد که غنی شدن بیش از حد آبهای شیرین و اکوسیستم های دریایی به وسیله مواد غذایی ناشی از منابع انسانی (شهری، کشاورزی، و صنعتی) گسترش و تداوم شکوفایی جلبکی سیانوباکتریهای مضر را افزایش داده است (Huisman et al., 2005; Paerl et al., 2001). فسفر به طور سنتی به عنوان عنصر غذایی اصلی در نظر گرفته می شود که کمبود آن تولید اولیه و انباشته شدن توده زنده جلبکها را محدود می نماید.

غنی شدن فسفر بیش از غنی شدن با نیتروژن اهمیت دارد زیرا بسیاری از گونه های جلبک های سبز- آبی دارای هتروسیت می توانند با تثبیت ازت هوا نیتروژن مورد نیار خود را تامین کنند.

### ۲-۱-۵-۱- تغییرات آب و هوایی و توسعه شکوفایی سیانوباکتریهای زیان آور

در حالی که غنی شدن بیش از حد آب با فسفر و نیتروژن شکوفایی سیانوباکتریها را شدت می‌بخشد، تغییر شرایط آب و هوایی نیز قادر است ازدیاد جمعیت آنها را سبب شود. افزایش دمای کره زمین و تغییر الگوهای بارندگی شکوفایی سیانوباکتریها را تحت تاثیر قرار می دهد (Jöhnk et al., 2008; Paerl and Huisman, 2009).

افزایش دما محیط را برای رشد بیشر و تشکیل شکوفایی مهیا می کند، زیرا این جلبکها با دمای نسبی زیاد تطابق یافته اند و حداکثر میزان رشد آنها در دمای بیشتر از **۲۵C°** روی می دهد (Reynolds, 2006). در این دمای زیاد سیانوباکتریها معمولا در رقابت بر جلبکهای یوکاریوت پیروز می شوند. مخصوصا با افزایش رشد تاکسونهای یوکاریوت در واکنش به دما، میزان رشد سیانوباکتریها به حد مطلوب می رسد.

آبهای سطحی گرم همچنین در معرض لایه بندی شدید عمودی هستند. قدرت لایه بندی عمودی بستگی به اختلاف دانسیته لایه گرم سطحی و آب های سرد زیرین دارد. با افزایش دما در اثر تغییر آب و هوا، آب زودتر شروع به لایه بندی در بهار کرده و لایه بندی تا مدتی طولانی تر در پاییز تداوم خواهد یافت ( Peeters et al.,2007).

بسیاری از جنس های سیانوباکتریها به راحتی با تشکیل ویزیکول های گازی در شرایط لایه بندی شده رشد می کنند که باعث شناور شدن آنها شده و آنها را قادر می سازد که موقعیت خود را در منطقه ائوفوتیک و مجاور سطح حفظ کنند. این شکوفایی سطحی میزان بالای فتوسنتز را حتی تحت تاثیر اشعه شدید ماوراء بنفش حفظ کرده و همزمان سایه به لایه های زیرین می افتد و از رشد فیتوپلانکتونهای غیر شناور ممانعت می شود (Huisman et al., 2004). گرم شدن کره زمین همچنین الگوهای آب و هوایی و مقدار بارندگی را تغییر می دهد، که ممکن است باعث افزایش بیشتر غالبیت سیانوباکتریها شود.

## ٦-١- کنترل تداوم شکوفایی و از بین رفتن آن

زمانی که شکوفایی سیانوباکتریایی رخ می دهد، ممکن است حتی بعد از کاهش مواد غذایی (**N** و **P**) شکوفایی تا ماهها طول بکشد. تبادل مواد غذایی که قبلا وارد سیستم شده، ذخیره شده و باز چرخش شده، همچنین تولید مجدد مواد غذایی از طریق چرخه سلولی و باز چرخش آنها بوسیله باکتریهای و میکروزئوپلانکتونهای هتروتروف بین رسوبات و ستون آب می تواند در تداوم شکوفایی جلبکی نقش داشته باشد.

از جمله عوامل زیستی مهم در کنترل شکوفایی می‌توان به مواردی نظیر چرای آنها توسط زئوپلانکتونها (و احتمالا فون کفزی و ماهیها)، واکنش های باکتریایی و لیز سلول توسط ویروسها اشاره نمود.

## ۷-۱- سیانوباکتریها و چراکنندگان (Grazers)

بحث های زیادی در مورد میزان تاثیر زئوپلانکتونهای چرا کننده بر شکوفایی سیانوباکتریهای مضر وجود دارد. تحقیقات نشان دهنده آن است که چرا کنندگان در دریاچه های الیگوتروف نسبت به دریاچه های یوتروف تاثیر بیشتری دارند. این امر احتمالا به علت افزایش تولید اولیه فیتوپلانکتونی ناشی از شرایط غنی شدن از مواد غذایی است که به سلولها امکان می دهد که به راحتی بر اثرات منفی چرا کردن فائق آیند.

بسیاری از گونه های جلبک های سبز- آبی با تشکیل تجمعات رشته ای و کلنی از شکار شدن توسط زئوپلانکتونها جلوگیری می کنند و مانع از فیلتر شدن توسط دوکفه ای ها می شوند. بنابراین جایگزین شدن جلبک های مفید و طبیعی توسط جلبک های سبز-آبی ارزش غذا یی بخش فیتوپلانکتونی آب را کاهش داده و احتمال تولید سم را افزایش می دهد (Von Elert and Wolffrom, 2001). به علاوه، حتی در صورت بلعیده شدن این جلبک‌ها به وسیله چرا کنندگان، این امر الزاماً نشانگر جذب شدن جلبک‌های سبز-آبی و تامین نیاز غذایی بخش مصرف کننده اکوسیستم آبی نیست.

## ۸-۱- معرفی جنس *Microcystis* Kützing ex Lemmermann, 1907

جنس *Microcystis* یکی از مهمترین سیانوباکتریهای تولید کننده بلوم یا شکوفایی در سیستم های آبی بشمار می رود. جمعیت های مختلف این جنس باعث ایجاد شکوفایی در سیستم های آبی می شوند و همین امر موجب مورد توجه قرار گرفتن آنها در سالهای اخیر شده است. گونه های مختلف این جنس در آبهای شیرین ساکن و برخوردار از شرایط یوتروف موجود در تمام دنیا گسترش یافته اند و چندین گونه از آنها از قابلیت تولید سم نیز برخوردارند (Chorus and Bartram,1999 ; Komárek and Komárková, 2002).

این جلبک کلنی هایی نامنظم با سلولهای کروی و غشائی ژلاتینی بیرنگ دارد. کلنی های میکروسیستیس در اندازه های میکرو و ماکرو سکوپی می باشند و به صورت پلانکتونی در آبهای شیرین زندگی می کنند و مراحل

ریختی متفاوتی در طی چرخه رویشی جلبک تشکیل می دهند (Reynolds et al., 1981; Bittencourt – Oliveira, 2000).

سلولها کروی یا کشیده بوده، در تعداد زیاد در داخل کلنی های کروی، بیضوی یا نامنظم و روی هم افتاده یا تور مانند قرار دارند. کلنی ها در آب شناور و اغلب به کلنی های دختر چسبیده باقی می مانند. سلولها در داخل موسیلاژ بیرنگ و اغلب شناور قرار داشته و در اطراف سلولهای منفرد موسیلاژی دیده نمی شود. سلولها اغلب دارای آرایش بسیار متراکم هستند و تقسیم سلولی در تمام جهات و در سلولهای کشیده معمولا در جهت عرضی صورت می گیرد. واکوئل های گازی اغلب در سلولها وجود دارند.

## ۹-۱- اهمیت مطالعاتی جنس *Microcystis*

*Microcystis* در مناطق گسترده ای از جهان در آبهای شیرین در فصل گرم سال رشد بیش از حد از خود نشان داده و باعث ایجاد شکوفایی جلبکی در این آبها می شود که این امر بر کیفیت و کاربرد آبهای شیرین تاثیر منفی دارد. در موارد متعددی این جلبک کلنی های بزرگی ایجاد می کنند که با چشم غیر مسلح قابل مشاهده اند. این کلنی ها در سطح آب شناور می مانند و ممکن است سطح وسیعی از یک اکوسیستم آبی را بپوشانند. جنس *Microcystis* از سیانوباکتریها طبق معیارهای ژنتیکی (توالی مولکولی 16S rRNA) مشخص و تعریف شده است، ولی طبقه بندی آن در سطح پایین تر از جنس مبهم است و وجود گونه های مورفولوژیکی سنتی آن مورد تردید می باشد (Komárek and Komárková, 2002). با این وجود، جمعیت های این جنس شکوفایی یا بلوم های شدیدی در آبهای یوتروف در سراسر جهان بوجود می آورند و جمعیتهای متعددی از آن سم تولید می کنند. بنابراین، شناسایی تنوع طبیعی آن در سطح پایین تر از جنس از اهمیت خاصی برخوردار است.

## ۱-۹-۱- مطالعه تاکسونومیک جنس *Microcystis*

از آغاز قرن بیستم، بحث های زیادی بر روی تعیین ارزش گونه های *Microcystis* از نظر ریخت شناسی وجود داشته است. معیارهای اصلی تفکیک گونه ها در این جنس به طور عمده شکل کلنی، ماهیت، وجود یا عدم وجود موسیلاژ پیرامون کلنی و شکل و اندازه سلول ها می باشد. تقسیم بندی سلسله مراتبی جنس *Microcystis* در جدول ۱-۱ آمده است.

**جدول ۱-۱- تقسیم بندی تاکسونومیکی جنس *Microcystis***

| تاکسون | فارسی | لاتین |
|---|---|---|
| سلسله | باکتریها | Bacteria |
| زیر سلسلسله | یوباکتریها | Eubacteria |
| شاخه | سیانوباکتریها | Cyanobacteria |
| رده | سیانوفیسه | Cyanophyceae |
| زیر رده | اسیلاتوریوفیسیده | Oscillatoriophycideae |
| راسته | کروکوکالز | Chroococcales |
| خانواده | میکروسیستاسه | Microcystaceae |
| جنس | میکروسیستیس | *Microcystis* Kützing, 1833 |

## ۲-۹-۱- رده بندی فنتیکی

امروزه، معیار گونه در سیانوباکتریها مسئله ی مشکلی به شمار می رود. در حال حاضر این ایده وجود دارد که مفهوم گونه نه تنها در جنس *Microcystis* (Otsuka et al., 2000, 2001) بلکه در سایر جنسهای سیانوباکتریها نیز توجیه پذیر نمی باشد (Castenholz, 2001). با این وجود، چندین خصوصیت انواع ریختی[1] *Microcystis* که به عنوان گونه های سنتی طبقه بندی شده اند، واقعا وجود داشته و مکررا در مناطق مختلف جهان مشاهده می شوند. در حال حاضر آنها را می توان تنها به طور سنتی به عنوان ریخت گونه (گونه های ریختی[2]) در نظر گرفت که به یک ژنوتیپ متعلق بوده و اکولوژی مشابهی دارند. چنین گونه های سنتی با صفات فنوتیپی و اکوفیزیولوژیکی مشخص را نمی توان به طور کامل حذف کرد. شناسایی آنها برای مطالعات اکولوژیکی، اکوتوکسیکولوژیکی[3] و غیره مفید و ضروری است. آنها در شرایط کشت آزمایشگاهی نیز از صفات با ثباتی برخوردارند. به نظر می رسد یکی کردن تاکسونومیکی تمام ریخت گونه های اصلی میکروسیستیس (*M. aeruginosa, M. ichtyoblade, M. viridis, M. novacekii, M. wesenbergii*) تا زمانی که دلایلی برای تنوع فیزیولوژیکی و مورفولوژیکی آنها وجود دارد، امری غیرقابل حل خواهد بود (Komárek and Komárková, 2002).

معروفترین گونه های جنس *Microcystis* در جدول ۱-۲ آورده شده اند.

1- Morphotypes
2- Morphospecies
3- Ekotoxicological

**جدول ۱-۲- نام و مؤلفین گونه های جنس *Microcystis***

| نام گونه | |
|---|---|
| *Microcystis aeruginosa* (KÜTZING) KÜTZING | Tab. Phycol. 1: 6, 1846 |
| *Microcystis ichthyoblabe* KÜTZING | Phyc. Gener., p. 170, 1843 |
| Microcystis *firma* (KÜTZING) SCHMIDLE | Engler Bot. Jahrb. 23: 57, 1902 |
| *Microcystis flos-aquae* (WITTROCK) KIRCHNER ex FORTI | Syll. Myxophyc., p. 86, 1907 |
| *Microcystis novacekii* (KOMÁREK) COMPÈRE | Cah. O.R.S.T.O.M., Hydrobiol. 8(3-4), 1974 |
| *Microcystis smithii KOMÁREK & ANAGNOSTIDIS* | Preslia, Praha, 67: 21, 1995 |
| *Microcystis viridis* (A.BRAUN in RABENHORST) LEMMERMANN | Abh. Nat. Ver. Bremen 17: 342, 1903 |
| *Microcystis wesenbergii* (KOMÁREK) KOMÁREK in KONDRATEVA | Cvetenie vody, Naukova Dumka Kiev, p. 32, 1968 |

گونه به طور سنتی به عنوان پایه معیار تاکسونومیکی برای تمام موجودات زنده در نظر گرفته می شود، با این وجود این تاکسون در سیانوباکتریها (cyanoprokaryotes, cyanophytes) طبق معیارهای طبقه بندی مدرن، مفهومی گیج کننده و پیچیده است.

طبق بازنگری تاکسونومیکی فنوتیپی اخیر، جنس میکروسیتیس خوشه ژنوتیپی مجزا ومشخصی ارایه می نماید که تنها شامل گونه های شناور با وزیکولهای گازی در داخل سلول می باشند. با این حال، تفاوتهای ژنتیکی بین گونه های ریختی درون جنس بسیار کوچک و موقتی هستند و امکان مشخص کردن گونه را نمی دهد. کل جنس شامل تعداد بی شماری از اختلافات کوچک هستند که با ریخت گونه های سنتی مطابقت نمی کند ( Kato et al., 1991, Otsuka et al. 2000, 2001). با این حال، چندین ریخت گونه مشخص مکررا در آبهای شیرین یوتروف یافت می شوند (به عنوان نمونه *M. viridis* و *M. wesenbergii* ). این ریخت گونه ها کم و بیش پایدار هستند و توسط چرخه زندگی (Reynolds et al. 1981,) و گاهی نیازهای اکولوژیکی مشخص تعریف می شوند. بنابراین، ریخت گونه ها باید مربوط به بخش هایی از ژنوم باشند که توسط تعیین توالی 16S rRNA آشکار نشده اند.

Heidari و همکاران (۲۰۱۳) تنوع سیانوباکتریها را در چهار چشمه آب گرم ایران بر اساس خصوصیات مورفولوژیک (فنتیک) مورد بررسی قرار دادند. در روش فنتیک از آنالیز خوشه ای با استفاده از روش UPGMA

استفاده کردند و روابط فنتیک بین گونه ها را با استفاده از تاکسونومی عددی و رسم دندروگرام بررسی و تعیین کردند. نتایج نشان داد که بررسی فنتیکی جنس ها را از یکدیگر تفکیک می نماید ولی برای تفکیک سیانوباکتریها در سطح گونه کافی نمی باشند. همچنین بررسی ۱۷ سویه *M. aeruginosa* بر اساس میزان تنفس تاریکی، ظرفیت فتوسنتزی، حداکثر تولید کوانتوم، میزان رشد حداکثر، میزان تولید میکروسیستین و مساحت سطح مقطع سلول به عنوان صفات فنتیکی نشان داد که تنها سطح مقطع سلول نشان دهنده منشاء جلبک از آبگیرهای مختلف می باشد (López-Rodas et al., 2013). مطالعات فوق نمونه هایی هستند که نشان می دهند که تنها با تکیه بر روش های فنتیکی نمی توان شناخت و دید کاملی از تقسیم بندی سیانوباکتریها مخصوصا جنس *Microcystis* در سطح گونه بدست آورد.

## ۱۰-۱- رده بندی فیلوژنتیک

مطالعه فیلوژنتیکی جمعیت های *M. aeruginosa* از مناطق مختلف بر اساس ژن ناحیه ITS نشان می دهد که تمام سویه ها به جز یک سویه که دارای بیشترین تولید میکروسیستین بود، مشابه یکدیگرند. نتایج این مطالعه نشان می دهد که روش فنتیکی و فیلوژنتیکی در جمعیت های *M. aeruginosa* با یکدیگر همبستگی و ارتباط ندارند (López-Rodas et al., 2013). همچنین بررسی رده بندی فیلوژنتیکی سیانوباکتریها در چشمه های آب گرم بر اساس خصوصیات ژن 16S rRNA نشان می دهد که روش فیلوژنتیکی نه تنها اختلالی در تاکسونومی عددی یا فنتیک آنها ایجاد نمی کند بلکه مکمل آن است (Heidari et al., 2013).

### ۱-۱۰-۱- مارکرهای فیلوژنتیک بکار گرفته شده در مطالعه جنس *Microcystis*

#### ۱-۱-۱۰-۱- بررسی توالی ITS

جلبک شناسان مختلفی نظیر Wilmotte و همکاران (۱۹۹۲) و Turner (۱۹۹۷) از ژن 16S rRNA برای آشکار کردن روابط فیلوژنتیکی جنس هایی از سیانوباکتریها استفاده کرده اند. با این وجود، Fox و همکاران (۱۹۹۲) نتیجه گرفتند که یکسان بودن توالی 16S rRNA زمینه کافی برای شناسایی گونه ها را فراهم نمی کند و برای مطالعات در سطح زیر جنس مناسب نیست. در نتیجه، محققان به طور فزاینده ای به مطالعه نواحی متنوع تری از ژن نظیر 16S- 23S ITS تمایل پیدا کرده اند. ژن جداکننده نسخه برداری شده داخلی (ITS) قطعه ای از ژنوم است که بین ژنهای 16S rRNA و 23S قرار دارد. این ژن نسبت به ژن 16S rRNA از میزان بالایی از عدم تجانس (Heterogeneity) برخوردار بوده و بنابراین امکان شناسایی بسیاری از جنس های سیانوباکتریها توسط آن وجود دارد (Janse et al., 2003).

آنالیز مولکولی ناحیه ITS در جنس *Microcystis* نشان می دهد که این ناحیه از ژنوم این جنس در نواحی مختلف جهان به میزان زیادی حفظ شده است. برای توضیح این حالت دو فرضیه پیشنهاد شده است: اول اینکه این

ژنوتیپ جدیدا تمایز یافته است و این امر یا پراکنش سریع ژنوتیپ در سراسر جهان دنبال شده است. فرضیه دوم این است که این یک انتخاب طبیعی است که میزان بالایی از تشابه را در این توالی های ITS حفظ کرده است (Humbert et al., 2005). این واقعیت که برخی از ژنوتیپ های *Microcystis* در سراسر جهان پراکنده شده اند قبلا نیز در مورد گونه های باکتریو پلانکتون گزارش شده است (Zwart et al., 1998). آنها نشان دادند که این حالت را می توان با داشتن قابلیت های عملکردی بی نظیر این موجودات زنده نسبت داد که قادرند با موفقیت در دامنه وسیعی از محیط های آب شیرین رقابت نمایند. همچنین طبق عقیده Finlay (2002) فراوانی بالای افراد در گونه هایی مثل گونه های جنس میکروسیستیس (در ارتباط با اندازه کوچک آنها) پراکنش جهانی این گونه ها را توجیه می کند.

## ۱۱-۱- پیشینه مطالعات انجام شده روی جنس *Microcystis*

### ۱-۱۱-۱- بوم شناسی (ایجاد شکوفایی)

Crow (1923) نمونه هایی از آبهای شیرین سیلان را که در سال ۱۹۰۳ به وسیله پروفسور Fritsch جمع آوری شده بود، مورد بررسی قرار و نشان داد که اعضای جنس *Microcystis* احتمالا بخش مهمی از فیتوپلانکتون این اکوسیستم ها را تشکیل می دهند. گونه های میکروسیستیس در بسیاری از نمونه ها غالب بوده و شکوفایی بوجود آورده بودند.

### ۲-۱۱-۱- تاکسونومی

پیش از مطالعات Gibbons and Murray ( 1978) و Stanier et al. (1978) سیانوباکتریها به مدت ۱۵۰ سال جزء جلبکهای یوکاریوت در نظر گرفته می شدند. قرار گرفتن سیانوباکتریها تحت قوانین کد باکتری شناسی منجر به جمع آوری سویه هایی به صورت کشت خالص به جای نمونه های هرباریومی که برای سیستماتیک گیاهی ضروری است، گردید. تشخیص سیانوباکتریها به عنوان موجودات پروکاریوت امکان بررسی تکامل تاکسونهای آنها با توجه به سایر باکتریها و موجودات فتوسنتزی گردید (Doolittle, 1982).

#### ۱-۲-۱۱-۱- ریخت شناسی

اولین بار Geilter در سال ۱۹۳۲ بیست وسه گونه از جلبک میکروسیستیس را توصیف کرد، که شامل گونه های دارای وزیکول گازی و گونه های فاقد آن بود. سپس، Stainer و همکاران (۱۹۷۱) نشان دادند که تنها سلولهای دارای وزیکول های گازی را باید جزء جنس *Microcystis* در نظر گرفت و Holt و همکاران (۱۹۹۴) وزیکول های گازی را به عنوان یکی از معیارهای شناسایی جنس *Microcystis* معرفی کردند. بنابراین، گونه های جنس

*Microcystis* با داشتن وزیکولهای گازی، شکل کروی سلولی، تمایل به تشکیل مجموعه ها یا کلنی ها و موسیلاژ یا غلافی بی شکل مشخص می شوند(Holt et al., 1994).

تراکم و تنوع سیانوباکتریهای سمی چهار سد تفریحی با تاکید روی جنس *Microcystis* در تایلند توسط Somdee و همکاران (۲۰۱۳) مورد بررسی قرار گرفت. سیانوباکتریهای سمی مهم در این سدها عبارت بودند از: *Cylindrospermopsis* sp.، *Microcystis* sp.، *Oscillatoria sp.* و *Pseudoanabaena sp.* آنالیز ریختی جنس *Microcystis* موجود در این سدها و بررسی ژن 16S rRNA آن نشان داد که ارتباط نزدیکی با *M. aeruginosa* دارد.

**۲-۲-۱۱-۱- مولکولی**

آنالیزهای فیلوژنتیکی بر اساس توالی DNA زمانی که با روشهای سنتی مبتنی بر صفات ریختی و فیزیولوژیکی ترکیب می شوند، روشی مهم و مفید در تاکسونومی سیانوباکتریها محسوب می شوند. تاکسونومی جنس *Microcystis* تاکنون وابستگی زیادی با صفات ریختی داشته است. ترکیبی از روش های سنتی و مولکولی برای ارزیابی مجدد تاکسونومی سیانوباکتریها ضروری می باشد.

استفاده از آنالیزهای ژنتیک مولکولی در تاکسونومی سیانوباکتریها به روشی مهم تبدیل شده است. امروزه، آنالیز فیلوژنتیکی بر پایه ژن 16S rDNA به صورت گسترده ای در تاکسونومی کلی باکتریها به کار گرفته می شود و مزیت های این روش مورد تایید قرار گرفته است (Woose, 1987). Neilan و همکاران (۱۹۹۷) از این روش برای بررسی روابط بین گونه ای در میکروسیستیس استفاده کرده اند. با این وجود، آنها هیچ همبستگی بین خصوصیات ریختی و فیلوژنی در داخل جنس *Microcystis* پیدا نکردند.

Otsuko و همکاران (۱۹۹۸) آنالیز فیلوژنتیک روی ۱۵ سویه میکروسیستیس شامل پنج ریخت گونه و دو نوع ترکیب رنگدانه فیکوبیلین به وسیله تعیین توالی ژن 16S rRNA انجام دادند. تمام توالی ها تشابه بالایی و در برخی موارد تا ۱۰۰٪ تشابه بین ریخت گونه های مختلف نشان دادند. درخت تبارنمای حاصل رابطه نزدیکی را بین سویه های مختلف میکروسیستیس با و بدون فیکواریترین آشکار ساخت. نتایج این مطالعه نشان می دهد که فنوتیپ میکروسیستیس لزوما فیلوژنی آنها را منعکس نمی کند و اینکه لازم است که تاکسونومی موجود در سطح گونه بازسازی شود.

Otsuka و همکاران (۱۹۹۹) اولین گروه تحقیقاتی بودند که از تعیین توالی مستقیم ITS برای بررسی فیلوژنتیکی در جنس *Microcystis* استفاده کردند. آنها دریافتند که فیلوژنی مبتنی بر داده های ITS همبستگی کاملی با ریخت گونه های *Microcystis* ندارد، اگرچه همبستگی آنها با تولید میکروسیستین به اثبات رسید. اخیرا توالی های ITS همچنین برای چندین گونه از نوستوک گزارش شده است (Iteman et al., 2000 و Li, 2000).

## ۱۲-۱- بیان هدف

پژوهش حاضر با اهداف زیر صورت پذیرفته است:

شناسایی دقیق گونه (ها) ی جنس *Microcystis* در دریاچه سد ارس بر اساس صفات ریختی و مولکولی با استفاده از نشانگر ریبوزومی ITS ؛

ثبت توالی ژنی در بانک ژنی ncbi

## ۲- مواد و روشها

### ۱-۲- ایستگاه‌های مطالعاتی

رودخانه ارس یکی از بزرگترین رودخانه‌های شمالغرب ایران و حوزهٔ آبریز دریای خزر می‌باشد. رودخانه ارس از کشورهای ترکیه و آذربایجان (نخجوان) سرچشمه گرفته و در ناحیه میرقاپو (شمال غربی)، مرز ایران و جمهوری آذربایجان را تشکیل داده و در روستای دره شام (جنوب غربی) از ناحیه دشت ماکو خارج می شود. حداکثر دبی رودخانه ۲۲۶۰ مترمکعب در ثانیه و حداقل آن ۳۳۹ مترمکعب برثانیه است. این رودخانه با طولی بالغ بر ۱۰۷۲ کیلومتر در شمال کشور، به دریای خزر سرازیر شده و از بزرگ ترین رودخانه های موجود در کشور به شمار می آید. تولیدات آبزیانی نظیر ماهی و خرچنگ، به واسطه وجود دریاچه سد ارس و اقلیم مناسب رودخانه بسیار قابل توجه است.

مخزن دریاچه به طول ۵۲ کیلومتر و عرض متوسط ۸ کیلومتر و عمق متوسط ۲۰ متر و مساحتی حدود ۱۴۵ کیلومتر، ۱۴۵۰۰ هکتار را اشغال نموده و حجم کل آن ۱۳۵۰ میلیون مترمکعب است. این دریاچه در ارتفاع ۷۷۰ متر از سطح دریا واقع شده و حداکثر حرارت هوای منطقه در تابستان تا ۴۰ درجه سانتگراد و حداقل برودت آن در زمستان تا ۲۰ درجه سانتیگراد زیر صفر ثبت شده است. آب مخزن دریاچه سرشار از مواد مغذی است و به همین دلیل زنجیره غذایی آن، یعنی پلانکتون ها، موجودات بنتیکی و در نهایت ماهیان موجود در این اکوسیستم آبی، از تنوع و کمیت خوبی برخوردارند و سالیانه بیش از ۷۰۰ تن از انواع گونه های مرغوب ماهی از دریاچه صید می شود. ذکر این نکته لازم است که میزان تولیدات اولیه پلانکتونی و بنتوزی در دریاچه مزبور بسیار قابل ملاحظه و بیشتر از منابع آبی دیگر استان است و امکان بهره برداری بیشتر از آن با برنامه ریزی و کنترل دقیق تر ذخایر وجود دارد.

سد ارس که در شهرستان پلدشت استان آذربایجان غربی قرار دارد، آب لازم برای آبیاری حدود ۴۰۰۰۰۰ هکتار از زمینهای قابل کشت را در ایران و آذربایجان فراهم می نماید (Filipuzzi and Faramarzi, 2007). سد ارس نقش اقتصادی مهمی به عنوان منبع آب آشامیدنی و فعالیت شیلاتی در منطقه دارد. مشخصات مورفومتریک و هیدرولوژیک سد ارس در جدول ۳- ۲ ارائه گردیده است.

**جدول ۲-۱-خصوصیات مورفومتریک و هیدرولوژیکی سد ارس**

| خصوصیت | مقدار |
|---|---|
| مساحت حوزه آبریز | ۱۰۲۰۰۰ کیلومترمربع |
| حداکثر ظرفیت | ۱۳۵۰ میلیون مترمکعب |
| ظرفیت قابل استفاده | ۱۱۵۰ میلیون مترمکعب |
| حداکثر مساحت | ۱۵۳ کیلومترمربع |
| حداکثر عمق | ۲۷/۵ متر |
| عمق میانگین | ۲۰ متر |
| ارتفاع تاج سد | ۳۶ متر |

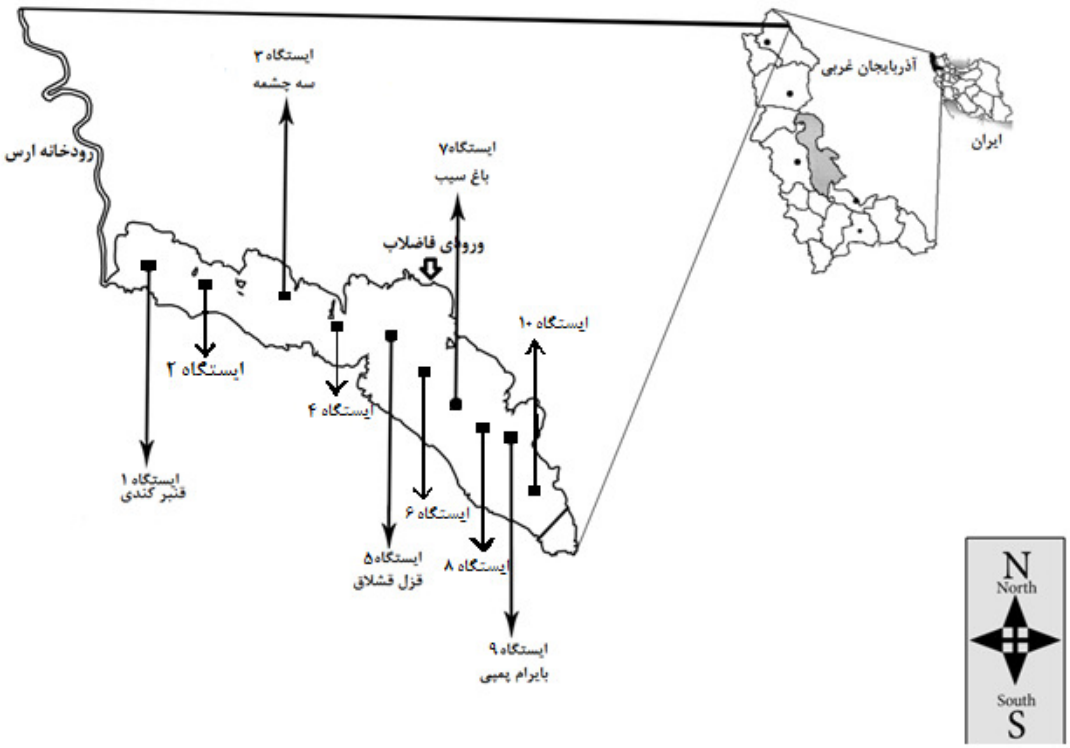
نرم افزار Motic Image Plus 2.0 برای اندازه گیری ابعاد سلولها و کلنی های *Microcystis* مورد استفاده قرار گرفت. همچنین برای شناسایی مورفولوژیک گونه (های) *Microcystis* تصاویر میکروسکوپی آن از ایستگاههای مختلف برای پروفسور Komárek ارسال شد و مورد تایید قرار گرفت.

## ۲-۲- مطالعه فیلوژنتیک جنس *Microcystis*

با توجه به اهمیت اکولوژیکی جنس *Microcystis* در آبهای شیرین و به ویژه نقش آن در شکوفایی جلبکی و اثرات منفی ناشی از آن بر کارکردهای طبیعی اکوسیستم دریاچه سد ارس، بخشی از این پایان نامه به بررسی مورفولوژیکی و فیلوژنتیکی جنس*Microcystis* اختصاص یافت. در بخش مطالعه فیلوژنتیکی این جنس از روشهای مولکولی رایج برای بررسی فیلوژنتیکی سیانوباکتریها نظیر بررسی ژن ITS استفاده گردید.

### ۱-۲-۲- نمونه برداری

نمونه برداری جهت بررسی مولکولی جلبک *Microcystis* از ۱۰ ایستگاه تعیین شده در طول بدنه اصلی سد انجام شد (تصویر ۳-۲). در هر ایستگاه دو نمونه جمع آوری شد: یک نمونه از سطح آب و نمونه دوم از عمق یک متری. نمونه برداری از آب در دو عمق مختلف با هدف تعیین اختلافات احتمالی در خصوصیات مورفولوژیک و ژنتیکی جمعیت‌های جنس مورد نظر انجام شد. نمونه ها در حین عملیات از فیلتر ۱۵۰ میکرونی عبور داده شدند تا زئوپلانکتونها از نمونه ها حذف شوند. حجم آبی که در هر نمونه از الک عبور داده شد، حدود ۱۰۰ لیتر بود. نمونه های تهیه شده را در ظروف نمونه برداری ریخته و برچسب حاوی مشخصات و محل ایستگاه نمونه برداری بر روی آنها الصاق شد. نمونه ها را جهت انتقال به آزمایشگاه در داخل جعبه مخصوصی که آنها را خنک نگه می داشت، قرار دادیم.




**شکل۲-۱- نقشه موقعیت منطقه و ایستگاههای نمونه برداری برای بررسی مولکولی جنس *Microcystis* در سد ارس**

## ۲-۲-۲- ایزوله سازی جلبکهای جنس Microcystis

در ایزوله کردن جلبکهای تک سلولی روشهای مختلفی از جمله خالص سازی مستقیم توسط میکروسکوب و کشت استریک بر روی محیط کشت جامد دارند که در تحقیق حاضر از ترکیبی از هر دو روش استفاده شد(Richmond, 2004).

### ۱-۲-۲-۲- ایزوله سازی مستقیم زیر میکروسکوپ

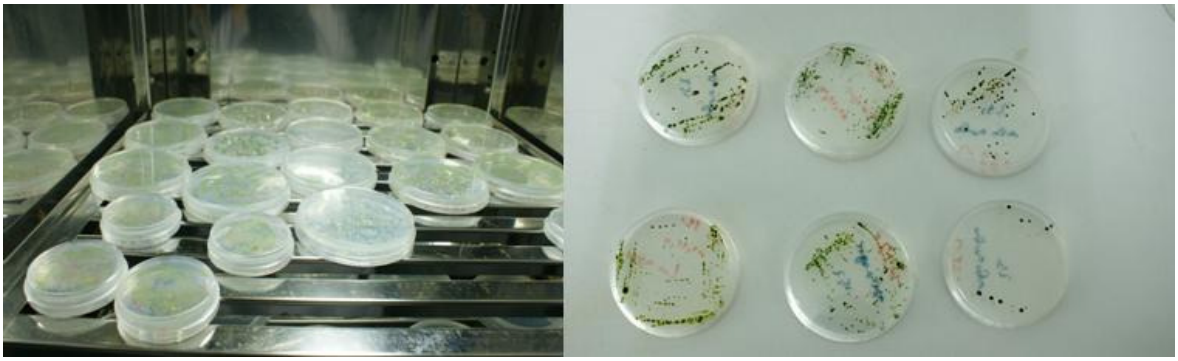
نمونه آب هر ارلن را آنقدر رقیق شد (با استفاده از آب با شرایط واقعی خود نمونه جلبک) که وقتی در زیر میکروسکوب به آن قطره آب نگاه میشد در هر میدان دید یک جلبک دیده شود. سپس نوک یک پیپت پاستور را بر روی شعله کمی بکشید تا بسیار بلند و باریک تر شود. بوسیله این پیپت که انگشت خود را در انتهای دیگر آن قرار داده اید در حین نگاه کردن زیر میکروسکوب این جلبک را برداشت شد و به یک میکرو تیوب ۲ میلی لیتری حاوی ۱ میلیتری آب و محیط کشت انتقال شد. همین تیوبها را در زیر لامپ مهتابی قرار شد تا اینکه رشد نماید. تمامی جلبکهایی که از نظر شکل و مورفولوژی شبیه هم هستند را در این کار در یکجا دسته بندی خواهیم کرد ابتدا چند قطره از نمونه های استوک اولیه کشت یافته را داخل یک پتری دیش شیشه ای ریخته و

حجم آن با آب مقطر افزایش یافت. با استفاده از یک میکروپیپت و بوسیله میکروسکوپ اینورت سلولها و کلنی های مورد نظر را از پتری دیش برداشته و داخل ارلن های کوچک ۵۰ و ۱۰۰ سی سی حاوی آب مقطر استریل, ریخته شد. تعداد حداقل ۲۰ سلول یا بیشتر از جلبک مورد نظر داخل هر ارلن قرار داده شد. سپس بار دیگر محیط کشت به آنها افزوده شده و در مقابل نور قرار گرفتند تا دوباره تکثیر یافته و سبز شوند. البته دقت این روش پایین است و همیشه تعدادی سلول از انواع دیگر به طور ناخواسته همراه با جلبک مورد نظر انتقال می یابد. به همین جهت و برای بالا بردن درصد خلوص این کار چندین بار تکرار شد و هر بار که ارلن ها سبز شدند دوباره از آنها جلبک مورد نظر جدا شده و در ارلن دیگری کشت شد(Richmond, 2004).

**۲-۲-۲-۲-ایزوله سازی با استفاده از محیط کشت جامد**

یک میلی لیتر از آب هر یک از ارلنها به نسبت ۱:۱۰ و ۱:۲۰ و ۱:۵۰ با آب مقطر رقیق شد. سپس آن را بر روی محیط کشت جامد که پیش از این تهیه شده هست بصورت کشت استریک (از یک ناحیه غلیظ به یک ناحیه رقیق) کشت شد. جهت تهیه محیط کشت جاند در پتری دیش از ۱ درصد آگار میکروبی+ همان محیط کشت جلبک (آب+ محیط کشت F2) استفاده شد. یادتان باشد ویتامین را در زمانیکه دمای محیط کشت به زیر ۴۰ درجه سانتی گراد رسید اضافه شد. سپس پتری دیشها را در زیر نور مهتابی کنار ارلنها در شرایط استریل کشت شد. در مدت ۷ روز سبز خواهد شد.

در روش کشت استریک بر روی محیط کشت جامد (Streak plating) زمانیکه خلوص جلبک هدف به حد قابل قبولی رسید از کشت جامد استفاده شد. محیط کشت جامد با افزودن مقدار معینی آگار به محلول کشت مایع تهیه می شود. برای حل شدن کامل آگار در مایع و استریل نمودن، از اتوکلاو استفاده می شود. پس از آنکه محلول حاوی آگار اندکی خنک شد، درون پتری دیش های پلاستیکی یکبار مصرف خالی می شود. محلول هایی که چندین بار مراحل خالص سازی را طی کرده با آب مقطر رقیق کرده یک آنس که روی شعله استریل شده، داخل محلول فرو برده و روی محیط کشت جامد به صورت زیگزاگ حرکت داده شد. این کار کنار شعله انجام گرفت. دور پلیت های پلاستیکی با پارافیلم کاملا پوشانده شد تا از تبخیر آب محیط کشت و ورود هر شیء ناخواسته به داخل پتری دیش جلوگیری شود. پلیت ها درون انکوباتوری که دمای آن روی ۲۰ در جه سانتی گراد تنظیم شده بود قرار داده شد. این دما برای رشد بسیاری از جلبک ها مناسب است. پلیت ها در معرض نورممتد فلورسنت به شدت $50\ \mu mol\ m^{-2}\ s^{-1}$ قرار گرفتند. پس از دو تا سه هفته کلنی های سبز جلبک ها داخل پلیت ها ظاهر شدند. هر کلنی حاصل از چند صد تقسیم یک سلول اولیه فعال است.



**شکل ۲-۲- جلبک های کشت شده روی آگار و نگهداری آنها در انکوباتور**

اگر بین کلنی ها فاصله مناسب وجود داشته باشد و کلنی گونه های مختلف با هم آمیخته نشده باشند در این صورت برداشت سلولها از آنها راحت تر و قابل اطمینان تر است. پس از بررسی نوع کلنی ها زیر میکروسکوپ، کلنی خالص مورد نظر به ارلن های کوچک ۵۰ و سپس ۲۰۰ میلی لیتری جهت تکثیر در محلول مایع انتقال داده شد. جلبک خالص سازی شده با محیط کشت اختصاصی در شدت نور $\mu mol\ photon\ m^{-2}\ s^{-1}$ ۱۰۰ و دمای ۲۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱۴روز در آب مقطر استریل با هوادهی ملایم کشت داده شدند. در ساعت معینی از هر روز شمارش تعداد سلولها انجام گرفت و منحنی رشد مربوط به دو نمونه خالص سازی شده رسم گردید.

## ۳-۲-۲-کشت انبوه جلبکهای تک سلولی پس از ایزوله سازی

روش کار کشت انبوه جلبک درآزمایشگاه

### ۱-۳-۲-۲- شرایط فیزیکی اتاق کشت

- نور

اتاق کشت جلبک (شکل۱) فاقد هر گونه پنجره یا دریچه‌ای است تا نور خورشید نتواند وارد اتاق شود. نور مورد نیاز در کشت جلبک توسط لامپ‌های فلورسنت تأمین می‌شد. برای این کار ارلن‌های مختلف توسط دو عدد لامپ فلورسنت از فاصله ۱۵ cm نوردهی می‌شدند.

**- دما**

دمای اتاق کشت ما بین c ۲۴- ۱۸ کنترل شد.

**- هوا**

هوادهی از طریق لوله‌های هوادهی متصل به پمپ مرکزی انجام گرفت. برای جلوگیری از ورود هر گونه آلودگی از طریق هوا، از پیپت‌های فیلتردار استفاده شد.

**pH –**

pH محیط پرورش‌در حدود ۸/۵ – ۸ حفظ گردید. خروج از محدوده pH فوق، باعث از هم پاشیده شدن بسیاری از فرایندهای سلولی و در نتیجه مرگ سلول می‌شود. در غلظت‌های زیاد جلبک، pH محیط بالا می‌رود که این نقص را می‌توان با افزودن دی اکسید کربن برطرف کرد.

**شکل ۲-۳- اتاق پرورش جلبک**

**جدول ۲-۲- ترکیب شیمیایی و نحوه‌ی آماده سازی محلول والنه و ویتامین (والنه[1]، ۱۹۷۰)**

| مقادیر | ترکیبات |
|---|---|
| | محلول A (یک میلی لیتر در هر لیتر محیط پرورش) |
| ۰/۸ g | کلرید آهن ($Fecl_3$) |
| ۳۳/۶ /g | اسید بوریک |
| ۴۵ g | EDTA, di sodiumsalt |
| ۲۰ g | سدیم دی هیدروژن ارتو فسفات ($NaH_2po_4. 2H_2o_2$) |
| ۱۰۰ g | نیترات سدیم($NaNo_3$) |
| ۱ ml | محلول B |
| | در یک لیتر آب شیرین حرارت داده شود تا حل شوند |
| | محلول B |

[1] Walne

| مقادیر | ترکیبات |
|---|---|
| $\frac{1}{2}g$ | کلرید روی ($ZNC1_2$) |
| $\frac{1}{2}g$ | کلرید کبالت ($COCI_2.4H_2O$) |
| ۰/۹ g | مولیبدات آمونیوم $(NH_4)_6 MO_7O_{24}.4H_2O$ |
| ۲ g | سولفات مس ($CuSo_4.5H_2O$) |
| ۱۰ ml | اسید کلرید غلیظ ($HCl$) |
| | در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب شیرین حرارت داده شود تا حل شوند |
| | محلول C (۰/۱ میلی‌لیتر برای هر لیتر محیط پرورش) |
| ۰/۲ g | ویتامین ($B_1$) |
| ۲۵ m1 | محلول D |
| | در ۲۰۰ میلی لیتر آب شیرین درست شود |
| | محلول D |
| ۰/۱ g | ویتامین ($B_2$) |
| | در ۲۵۰ میلی لیتر آب شیرین درست شود |

**جدول ۲-۳- نسبت های مورد استفاده در کشت جلبک**

| حجم آب شور(ml) | والنه(ml) | ویتامین(ml) |
|---|---|---|
| ۲۰ | ۰.۰۲ | ۲-۱ قطره |
| ۴۰ | ۰.۰۴ | ۰.۰۲ |
| ۴۰۰ | ۰.۴ | ۰.۰۴ |
| ۱۰۰۰ | ۱ | ۰.۱ |
| ۳۰۰۰ | ۳ | ۰.۳ |
| ۱۲۰۰۰ | ۱۲ | ۱.۲ |
| ۵۰۰۰۰ | ۵۰ | ۵ |

**شکل ۲-٤- کشت انبوه جلبک در حجم های بالا**

## ٤-۲-۲-روشهای مولکولی

### ۱-٤-۲-۲- استخراج DNA

جهت این کار ابتدا نمونه های جلبک در داخل میکروتیوبها ۱/۵ میلی لیتری ریخته شده و در سانتریفیوژ با ۱۰۰۰۰۰ دور در دقیقه در مدت ۵ دقیقه رسوبداده شدند. رسوب جدا شده در پروتکل استخراج DNA بر اساس روش SDS- کلروفورم (Sambrook et al ,.1989) بصورت زیر اقدام بکار رفتند.

مقدار µl ۸۰۰ از بافر SDS ۰/۵٪ در هر یک از اپندروفها ریخته شد، µl ۱۰ پروتئیناز K به آن اضافه گردید .

- سپس به حمام آبی (انکوباتور جوش ) منتقل و مدت ۶۰-۳۰ دقیقه در دمای °C ۶۰-۵۵ نگهداشته شد در طول این مدت هر ده دقیقه یکبار خوب بهم زده می شد.

- با دور ۵۰۰۰ بمدت نیم ساعت سانتریفوژ گردید، لایه بالایی که صافتر بود به اپندوفهای جدید با همان مشخصات قبلی منتقل و مابقی دور ریخته شد سپس به میزان حجم محلول موجود، فنل به هر یک اضافه شد مدت دو دقیقه بهم زده شد و ۱۵ دقیقه با دور ۵۰۰۰ سانتریفوژ گردید (این مرحله دوبار تکرار شد ).

- لایه بالایی محلولها به اپندروفهای جدید منتقل و مقدار نصف سری قبل فنل و به همان اندازه کلرفورم ایزوآمیل الکل (۲۴:۱) به آنها اضافه گردید. مدت دو دقیقه بهم زده شد و ۱۵ دقیقه با دور ۵۰۰۰ سانتریفوژ شد (این مرحله نیز دوبار تکرار گردید).

– دوباره لایه بالایی محلولها به اپندروفهای تازه منتقل گردید و هم حجم محلول داخل تیوبها کلروفورم ایزوآمیل الکل (۲۴:۱) اضافه شد و مدت ۱۵ دقیقه با دور ۵۰۰۰ در دقیقه سانتریفوژ شد.

– ۲/۵ برابر حجم محلول داخل اپندروفها اتیل الکل (ETOH) ۱۰۰٪ اضافه گردید و مدت یک شب در دمای c ۲۰° – نگه داشته شد .

–سپس در دور ۱۴۰۰۰ بمدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ گردید.

– اتانل رویی دور ریخته شد و DNA در اتانل ۷۰٪ قرار داده شد و باز مدت ۵ دقیقه در دور ۱۴۰۰۰ سانتریفوژ گردید.

– الکل که در بالابود دور ریخته شد و تیوبها در انکوباتور c ۳۷° کاملا خشک گردید.

– در مرحله آخر DNA های بدست آمده در ۵۰µl بافر TE در دمای ۴ درجه سانتی گراد بمدت یک شب نگه داشته شدند و از این DNA ها جهت کارهای بعدی استفاده گردید.

پس از پایان مرحله استخراج، DNA نمونه ها با استفاده از دستگاه بیوفوتومتر اندازه گیری شد که تمامی آنها از غلظت مناسب برخوردار بودند.

### ۲-۲-٤-۲- تهیه و رقیق سازی پرایمرها

با توجه به احتمال وجود خطا در شناسایی جلبکهای سیانوفیسه از جنس Microcystis از جفت پرایمرهای ویژه ای به این منظور استفاده شد که منحصرا قادر به شناسایی جلبکهای سیانوفیسه می باشند. پرایمرهای مورد نیاز ما در این آزمایش از ناحیه ژنومی 16S rRNA gene با ترتیب نوکئوتیدی زیر می باشند. این پرایمرها با توجه به توالی ژنوم موجود در بانک ژنی در مربوط به نمونه های گونه های مختلف Microcystis انتخاب شدند ( Bone et al., 2002). پرایمرها به سفارش شرکت دنا زیست مشهد در کشور کره ساخته شدند.

Forward: (5′ - act-cct-acg-gga-ggc-agc-ag- 3′ )
Reverse: (5′ -att-acc-gcg-gct-gct-gg-3′ )

جهت استفاده نمونه های اصلی پرایمرها حجم آنها را به ۱۰ پیکومول (pmol) می رسانیم و برای این کار از آب دیونیزه استریل طبق فرمولی که معمولا همراه نمونه اصلی وجود دارد عمل می کنیم. قابل ذکر است که شرایط نگهداری پرایمر در هر غلظتی برای کوتاه مدت دمای C°۲۰– می باشد و در صورت لزوم می توان پرایمر را در دما C° ۸۰– تا زمان طولانی تری نگهداری کرد.

### ۳-٤-۲-۲- واکنش زنجیره ای پلی مراز ( PCR ampliphication )

مواد مورد نیاز جهت واکنش زنجیره ای پلی مراز شامل آب، $Mgcl_2$، بافر PCR، dNTpase , Taq پلی مراز و پرایمرهای می باشند که در این آزمایش در بیشتر موارد از نسبت مواد بصورت جدول زیر استفاده گردید (جدول ۵-۲).

**جدول ۲-٤- نسبتهای مواد مورد استفاده perPCR در تهیه فراگمنت (۱۲s=۱٦s)(واکنش PCR)**

| مواد | مقداربرحسب µl |
|---|---|
| $H_2O$ | 5.2 |
| Buffer | 1 |
| $Mgcl_2$ | 1.4 |
| $P_1$ | 0.2 |
| $P_2$ | 0.2 |
| Taq ply A | 0.2 |
| $dntp_s$ | 0.8 |

که البته این نسبتها در هر آزمایش ممکن است جهت دستیابی به نتیجه بهتر تغییر داده شوند که قضاوت آن بر اساس نتایج حاصل از عمل الکتروفورز خواهد بود.

جهت اجرای واکنش PCR ابتدا نمونه اصلی هر یک از مواد (جدول ۲) کاملا بهم زده شدند و به اندازه تعیین شده و به نسبت مساوی در اپندروفها (به تعداد نمونه ) و یک نمونه شاهد منفی ریخته شد سپس به هر یک از ظرفها با توجه به ایستگاه و شماره آن نمونه DNA خاص آن به مقدار ۱µl و سپس مقدار ۱۰µl روغن مینرال Mineral oil اضافه گردید بعد از اتمام، نمونه ها به دستگاه PCR (تصویر ۶-۲) منتقل گردیدند مطابق یک برنامه خاص اجازه داده شد که دستگاه PCR از فراگمنت مورد نظر کپی برداری نماید. که برنامه مورد استفاده جهت این آزمایش بصورت (جدول ۶-۲) بود.

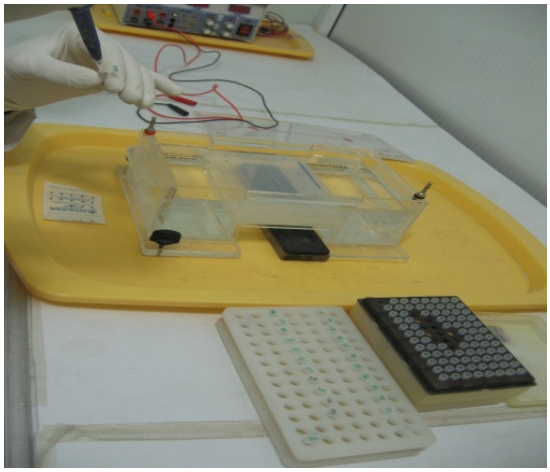
**جدول ۲ -۵- برنامه بکار گرفته شده در دستگاه PCR جهت کپی فراگمنت (۱۲S)**

| Temperature | | Time |
|---|---|---|
| $94^{0C}$ | | 5 min |
| | $94^{0C}$ | 60 sec |
| 35cycle | $55^{0C}$ | 60 sec |
| | $72^{0C}$ | 120 sec |
| $72^{0C}$ | | 10 min |

**شکل ۲- ۵- دستگاههای ترموسایکلر و بیوفتومتر**

### ۵-۲-۲-الکتروفورز

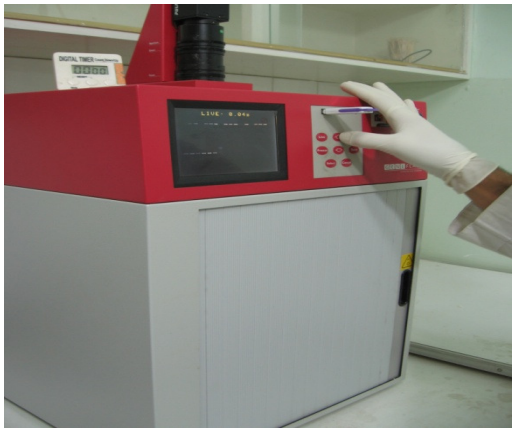
جهت انجام الکتروفورز ابتدا باید ژل مورد نیاز آن تهیه می گردید. برای اینکار محلول حاصل از ۱۰۰ ml بافر TBE و ۰/۸ – ۱/۳ گرم آگارز در ماکروویو جوشانده می شد و بعد از اضافه کردن حدود ۳µl اتیدیوم بروماید به آن، در تشتک الکتروفورز ریخته می شد که مدت ۴۰-۳۵ دقیقه طول می کشید تا سفت شده و جهت انجام الکتروفورز آماده گردد. بعد از انتقال ژل به ظرف الکتروفورز نمونه های مورد نظر و دو نمونه شاهد منفی و مثبت پس از مخلوط کردن با حدود ۲µl بافر ویژه ( Loading Buffer)، به ژل مورد نظر تزریق می شدند. ضمناً دو قطره (۲µl) مارکر DNA (Ladder ,1Kb) نیز در اول و آخر نمونه ها تزریق می شدند سپس توسط الکترودهای منفی و مثبت به جریان برق با ولتاژی حدود ۱۷۰-۱۲۰ وصل می شدند ( باید دقت شود که جهت جریان از منفی به مثبت باشد) بعد از اطمینان از برقراری جریان روی ظرف با وسیله ای پوشانده می شد و مدت ۴۰-۳۵ دقیقه به نمونه ها اجازه داده می شد که روی ژل حرکت کنند که برحسب وزن موجود خود ایجاد باند می نمودند (تصویر ۲). بدلیل کاربرد مواد سمی از جمله اتیدیوم بروماید در عمل الکتروفورز از اتاقی کاملاً ایزوله استفاده می شد که تمام مواد و وسایل مورد استفاده در همان جا نگه داشته می شدند و جهت اطمینان بیشتر در این اتاق از یک جفت دستکش اضافی استفاده میگردید.



**شکل ۲-٦- دستگاه الکتروفورز**

## ٦-۲-۲- عکس برداری از ژل

بعد از سپری شدن زمان مورد نظر دستگاه الکتروفورز خاموش و ژل به دستگاه عکس برداری از ژل منتقل و در زیر اشعه UV به بررسی باندهای بدست آمده که روی صفحه مانیتور نشان داده می شدند پرداخته می شد که در این آزمایشی که ما انجام دادیم باند مورد نظر ما در مقایسه با Ladder وزن مولکولی ۱۵۰۰bp را نشان داد یعنی در واقع فراگمنت مورد نظر ما (۱۲s-۱۶s) که مربوط به DNA میتوکندریایی - منطقه ژنهای ریبوزومی- است وزنی معادل ۱۵۰۰ bp دارا می باشد (Bossier et al , 2004) و این باند در هر ۱۵۰ نمونه تهیه شده مشاهده و تصویر باند تعدادی از نمونه های مورد نظر تهیه گردید (تصویر۳).



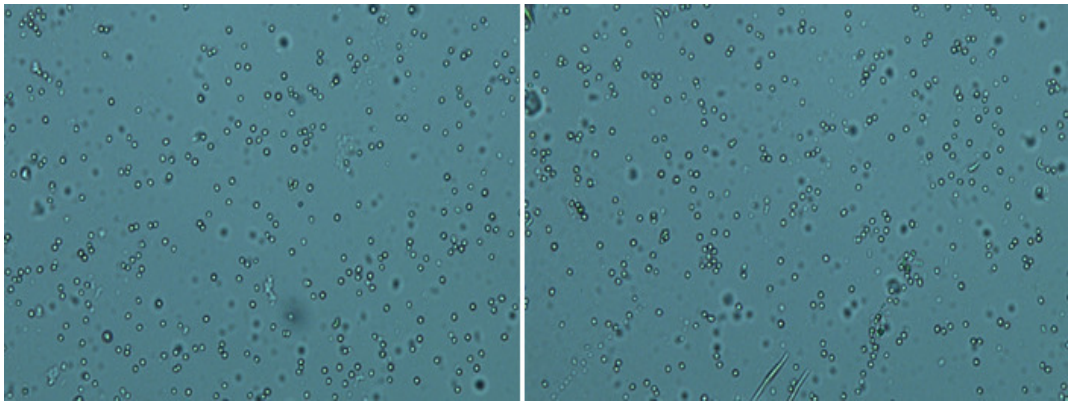
**شکل ۲-۷- دستگاه عکس برداری از ژل جهت نمایان شدن باندهای مورد نظر حاصل از الکتروفورز**

## ژل پلی اکریل آمید:

ژل پلی‌آکریل آمید با پلیمریزاسیون آکریل‌آمید مونومریک و مونومر ایجادکنندهٔ پیوند متقاطع , بیس آکریل آمید شکل می‌گیرد.ژل پلی‌اکریل‌آمید در برابر حرارت پایدار، شفاف، مقاوم و از لحاظ شیمیایی نسبتاً خنثی و از لحاظ اندازه سوراخ‌ها دارای میدان عمل وسیعی می‌باشد.اندازه متوسط سوراخ‌ها در ژل پلی‌اکریل‌آمید ۷/۵درصد، حدود پنج نانو متر است. درشت بودن سوراخ‌ها اجازه مهاجرت یکنواخت را به اکثر پروتئین‌ها می-دهد. با تغییر غلظت مقدار آکریل‌آمید می‌توان اندازه و میزان خلل و فرج داخل ژل را تغییر داد . هر چه غلظت پلی‌اکریل آمید بیشتر باشد قدرت تفکیک ژل بیشتر خواهد بود و مولکول‌های دارای وزن مولکولی نزدیک به هم را بهتر تفکیک می‌نماید.معمولاً برای تفکیک قطعات کوچک DNA دو رشته‌ای و قطعات DNA تک رشته‌ای از ژل پلی‌اکریل آمید استفاده می‌شود (پاشاپور، ۱۳۸۹).

## ۳-نتایج

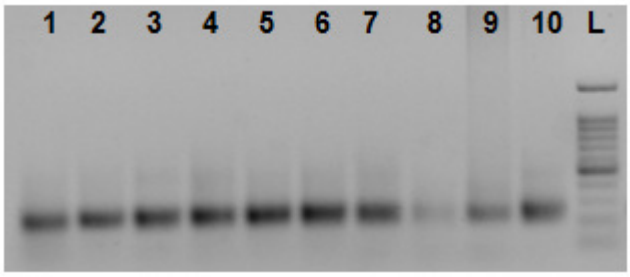
از تعدادی از نمونه های آب تهیه شده با شماره های ۲، ۳، ۴، ۵، ۶، ۱۱، ۱۲، ۱۵، ۱۶، ۱۸ نمونه هایی مشابه با مورفولوژی جلبکهای تک سلولی Microcystis جدا شد. با توجه به سایز بسیار کوچک این جلبکها و احتمال اشتباه در شناسایی این جلبکها تکنیک مولکولی برای شناسایی آنها بکار رفت.



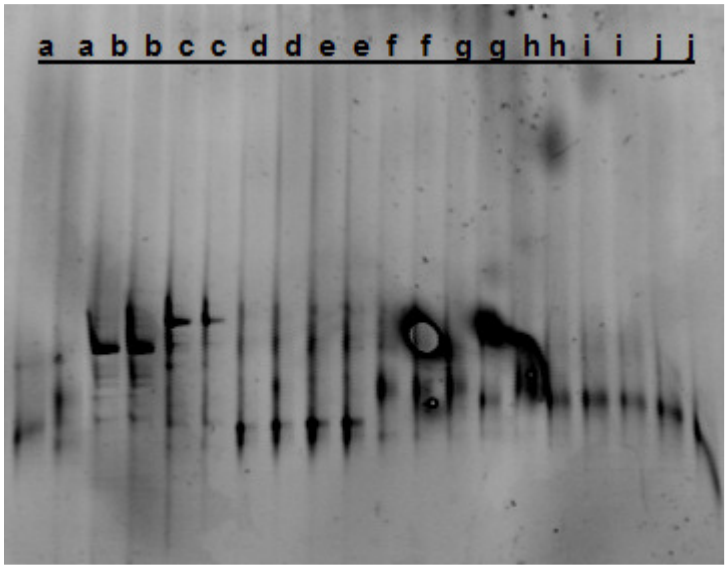
**شکل ۳-۱- نمونه های جلبک میکروسیستیس سد ارس در زیر میکروسکوپ**

### ۳-۱-نتایج بررسی های مولکولی

انجام الکتروفورز با استفاده از پرایمرهای اختصاصی سیانوفیسه توانست وجود جلبکهای سیانوفیسه در نمونه های ایزوله شده مورد تائید قرار دهد. در راستای بررسی تنوع نوکلئوتیدی باندهای حاصل ژل الکتروفورز DGGE انجام شد.




**شکل ۳-۲- باندهای حاصل از الکتروفورز محصولات PCR نمونه های خالص جلبک میکروسیتیس**




**شکل ۳-۳- ژل DGGE مربوط به نمونه های مختلف. به ترتیب a: نمونه ۲، b: نمونه ۳، c: نمونه ٤، d نمونه ٥، e: نمونه ٦، f: نمونه ١١، g: نمونه ١٢، h: نمونه ١٥، i: نمونه ١٦، j: نمونه ١٨.**

همچنین به منظور تائید صحت باندهای حاصل از تکرارهای فوق تعیین توالی باندهای حاصل در ۱۰ نمونه صورت پذیرفت. نتایج این بررسی نشان دهنده وجود ۳ گونه از جلبکهای سیانوفیسه در بین نمونه ها بود که از نظر ژنتیکی اختلاف زیادی با گونه های شناخته شده در بانک ژنی بودند.

CLUSTAL format alignment by MAFFT (v7.245)

```
Z82786.1|     aattttccgcaatgggcgaaagcctgacggagcaacgccgcgtgagggaggaaggtcttt
Z82785.1|     aattttccgcaatgggcgaaagcctgacggagcaacgccgcgtgagggaggaaggtcttt
Z82808.1|     aattttccgcaatgggcgaaagcctgacggagcaacgccgcgtgagggaggaaggtcttt
Z82783.1|     aattttccgcaatgggcgaaagcctgacggagcaacgccgcgtgagggaggaaggtcttt
AB023283.1|   aattttccgcaatgggcgaaagcctgacggagcaacgccgcgtgagggaggaaggtcttt
AB023284.1|   aattttccgcaatgggcgaaagcctgacggagcaacgccgcgtgagggaggaaggtcttt
AB023286.1|   aattttccgcaatgggcgaaagcctgacggagcaacgccgcgtgagggaggaaggtcttt
Z82784.1|     aattttccgcaatgggcgaaagcctgacggagcaacgccgcgtgagggaggaaggtcttt
CY-4          aattttccgcaatgggcgaaagcctgacggagcaatgccgcgtgagggaggaaggccctt
CY-2          aattttcccaattgggcgaaagcctgacggagccatgccgcgtgagggacgaaggccttc
CY-16          atatttcccaattgggcgcaagcctgatccagcaatgccgcgtgagggaagaaggccctc
              * ***** * ****** ********. *** *.************ *****.*.*.

Z82786.1|     ggattgtaaacctcttttctcaaggaagaagttctgacggtacttgaggaatcagcctcg
Z82785.1|     ggattgtaaacctcttttctcaaggaagaagttctgacggtacttgaggaatcagcctcg
Z82808.1|     ggattgtaaacctcttttctcaaggaagaagttctgacggtacttgaggaatcagcctcg
Z82783.1|     ggattgtaaacctcttttctcaaggaagaagttctgacggtacttgaggaatcagcctcg
AB023283.1|   ggattgtaaacctcttttctcaaggaagaagttctgacggtacttgaggaatcagcctcg
AB023284.1|   ggattgtaaacctcttttctcaaggaagaagttctgacggtacttgaggaatcagcctcg
AB023286.1|   ggattgtaaacctcttttctcaaggaagaagttctgacggtacttgaggaatcagcctcg
Z82784.1|     ggattgtaaacctcttttctcaaggaagaagttctgacggtacttgaggaatcagcctcg
```

```
CY-4          gggttgtaaacctcttttctcaaggaagaaaaaatgacggtacttgaagaataagcatcg
CY-2          gggttgtaaacctcttttgttagggaagaaaacgaccctataccttacaaaaatgcaccg
CY-16          gggttttaaacctctttttcagggaagaaaatgatcctgcgtgcctgaaaaagacccac
              **.** ************ *.*.*******.     * .... .  .**   .* .

Z82786.1|      gctaactccgtgccagcagccgcggtaat
Z82785.1|      gctaactccgtgccagcagccgcggtaat
Z82808.1|      gctaactccgtgccagcagccgcggtaat
Z82783.1|      gctaactccgtgccagcagccgcggtaat
AB023283.1|    gctaactccgtgccagcagccgcggtaat
AB023284.1|    gctaactccgtgccagcagccgcggtaat
AB023286.1|    gctaactccgtgccagcagccgcggtaat
Z82784.1|      gctaactccgtgccagcagccgcggtaat
CY-4          gctaactccgtgccagccgccgcggtaat
CY-2          gctaaatccgtgcccccagccgcggtaat
CY-16          ccttaatc--tcccagcccgcccggtaat
              ** * **  * **  *   * *******
```

**شکل ۳-٤- توالی مرتب شده ۳ نمونه مورد مطالعه در مقایسه با ۸ نمونه از ۳ گونه شناخته شده از جلبک Microcystis. شماره های قید شده در هر نمونه مربوط به کدهای بانک ژنی می باشد.**

## ٤-بحث و نتیجه گیری

### ٤-١- بررسی های مولکولی جنس *Microcystis*

خصوصیات مورفولوژیکی میتواند اطلاعات مهمی در باره موجود زنده مورد مطالعه ارائه نمایند، با این حال، لازم است در نظر داشته باشیم که برخی از موجودات زنده را نمی توان تنها بر پایه خصوصیات ریختی طبقه بندی کرد. مشاهده ریخت گونه های مختلف جنس *Microcystis* در شرایط کشت نشان می دهد که تفکیک آنها مبهم یا غیر ممکن است (Otsuko et al., 2000). Otsuko و همکاران (۲۰۰۰) از مطالعات خود نتیجه گرفتند که تقسیم بندی جنس *Microcystis* بر اساس خصوصیات مورفولوژیکی معتبر نمی باشد و یک سویه (strain) ممکن است اشکال کلنی متفاوتی داشته باشد. بر این اساس، امروزه دانشمندان برای تشخیص دقیق گونه های *Microcystis* از تلفیقی از روشهای مورفولوژیکی و مولکولی استفاده می نمایند.

مقایسه نتایج مطالعه حاضر با یک مطالعه قبلی نشان داد که الگوی شکوفایی سیانوباکتریها در سد ارس افزایش داشته و از جلبک تشکیل دهنده کلنی Microcystis به جلبک رشته ای فاقد کلنی Ps. Limnetica تغییر یافته است. این تغییرات را می توان به افزایش اثرات انسانی، گرم شدن و تغییرات آب وهوایی نسبت داد. یافته های این رساله نشان داد که سد ارس تحت تاثیر روانابهای کشاورزی و فاضلاب تصفیه نشده قرار دارد. بنابراین، استفاده مناسب از کودها و تصفیه فاضلاب باید در برنامه های حفاظتی و مدیریتی این سد مد نظر قرار گیرد.

آنالیز مولکولی ناحیه ITS در جنس *Microcystis* نشان می دهد که این ناحیه از ژنوم این جنس در نواحی مختلف جهان به میزان زیادی حفظ شده است. برای توضیح این حالت دو فرضیه پیشنهاد شده است: اول اینکه این ژنوتیپ جدیدا تمایز یافته است و این امر یا پراکنش سریع ژنوتیپ در سراسر جهان دنبال شده است. فرضیه دوم این است که این یک انتخاب طبیعی است که میزان بالایی از تشابه را در این توالی های ITS حفظ کرده است. این واقعیت که برخی از ژنوتیپ های *Microcystis* در سراسر جهان پراکنده شده اند قبلا نیز در مورد گونه های باکتریو پلانکتون گزارش شده است. آنها نشان دادند که این حالت را می توان با داشتن قابلیت های عملکردی بی نظیر این موجودات زنده نسبت داد که قادرند با موفقیت در دامنه وسیعی از محیط های آب شیرین رقابت نمایند. روش مولکولی ژل الکتروفورز شیب واسرشته (PCR- DGGE) ژن ITS روشی مفید برای شناسایی سریع و تشخیص تاکسونومیکی جلبکها مخصوصا اجتماعات متنوع سیانوباکتریها در نمونه های آب می باشد. سرعت این روش به وسیله روشهای دیگر دست نیافتنی است. در هر حال، با توجه به محدود بودن توالی های نوکلئوتیدی که در پایگاههای داده ای عمومی قرار داده شده است، این روش هنوز برای ارزیابی ترکیب کامل تاکسونومیکی سیانوباکتریها در دریاچه ها کافی نیست. در بسیاری از روشهای الکتروفورزی، قطعات اسید نوکلئوتید بر اساس اندازه آنها از یکدیگر جدا می شوند، ولی در روش DGGE رشته های DNA بر پایه ترکیب توالی آنها از هم تفکیک می شوند.

علل شکوفایی جلبک *Microcystis* از سیانوباکتریها در دریاچه سد ارس واقع در خط مرزی ایران و آذربایجان توسط محبی و همکاران (۲۰۱۲) مورد بررسی قرار گرفت. آنها نتیجه گرفتند که تشکیل کلنی های بزرگ و شکوفایی جلبک میکروسیستیس بیشتر به دلیل دما، pH و DO بالا در زمان نمونه برداری می باشد. در این مطالعه، جلوگیری یا کاهش ورود مواد غذایی به دریاچه سد ارس به عنوان اولویت اصلی جهت کاهش شکوفایی جلبک میکروسیس تیس پیشنهاد گردید.

آب دریاچه زریوار در شمال غرب ایران توسط رحمانی و همکاران (۲۰۱۳) از لحاظ تاثیرپذیری بوسیله فعالیتهای انسانی و ارتباط آن با اجتماعات فیتوپلانکتونی مورد تحقیق قرار گرفت. در این مطالعه معلوم شد که روانابهای کشاورزی، بیشترین تاثیر را روی یوتریفیکاسیون دریاچه داشته است.

در سال ۲۰۰۶ ترکیب تاکسونومیکی اجتماعات فیتوپلانکتونی در دریاچه Sheldon در کلرادوی آمریکا و تغییرات فیزیکی و شیمیایی آب آن توسط Oberholster و همکاران مورد بررسی قرار گرفت. وجود استرین های سمی سیانوباکتریها با استفاده از مارکرهای مولکولی ژن myc، عامل تولید سم توسط گونه های *Microcystis* در این دریاچه مورد تایید قرار گرفت. کاربردی کردن این روش امکان استفاده زود هنگام اصلاحی مخصوصا برای دریاچه هایی مثل Sheldon که کاربری تفریحی نیز دارد، میسر می سازد.

Katsiapi و همکاران (۲۰۱۱) برای اولین بار اجتماعات فیتوپلانکتونی و کیفیت آب سد ماراتوناس را در یونان مورد مطالعه قرار دادند. در طی این مطالعه، ترکیب فیتوپلانکتونی نشان دهنده شرایط یوتروفیک در آب این سد که به عنوان آب آشامیدنی مورد استفاده قرار می گرفت، بود. در این مطالعه، درصد مشارکت سیانوباکتریها و نیز غالب بودن جلبک *Microcystis aeruginosa* در این سد خطر بالقوه آن را برای سلامت انسان نشان داد.

تغییرات فیتوپلانکتونی در کانالها بر اساس اجتماعات دریاچه های انتخاب شده سیستم دریاچه ای Konin در لهستان توسط Napiórkowska-Krzebietke (۲۰۱۴) مورد بررسی قرار گرفت. او یک رابطه مستقیم بین این تغییرات و کیفیت آب با در نظر گرفتن شاخص های بیولوزیکی مختلف مشاهده کرد. مطالعه فصلی فیتوپلانکتونها در کانالهای Warta-Gopo (WG) و Konin Power Plant (EK) انجام گرفت. شکوفایی جلبک *Microcystis aeruginosa* و *Aphanizomenon flos-aquae* تنها در کانال WG قابل توجه بود. طبقه بندی بر اساس شاخص تنوع شانون نشان داد که کیفیت آب در کانال EK بود در حالیکه آب در کانال WG دارای مقدار کمی آلودگی بود و حالت اکولوزیکی ضعیفی داشت.

فیتوپلانکتونها به علت حساسیت و واکنش های دینامیک به تغییرات محیطی می توانند به عنوان یک شاخص تغییرات کیفیت آب مورد استفاده قرار گیرند (Padisák et al. 2006). از آنجا که اجتماعات فیتوپلانکتونی در سدها بشدت نسبت به عملکردهای بیرونی مثل بار هیدرولوژیکی، زمان رکود آب، ورود مواد جامد معلق و فعالیتهای انسانی نظیر کشاورزی و ورود فاضلاب تصفیه نشده حساس می باشند، بنابراین جلوگیری یا کاهش ورود مواد غذایی به داخل سد باید به عنوان یک اولویت جهت کنترل رشد بیش از حد سیانوباکتریها در نظر

گرفته شود. به علاوه، به کار گیری برنامه پایش مداوم روشی مفید برای پیش بینی اثرات احتمالی گرم شدن هوا روی اکوسیستم سد ارس به عنوان یک اکوسیستم آب شیرین می باشد.

اگرچه در مطالعه حاضر حضور جلبک میکروسیس تیس در تمام دوره مطالعه تایید شد، ولی وجود کلنی های ماکروسکوپی این جلبک در طول دوره مطالعه مشابه به آنچه محبی و همکاران در سال ۲۰۱۲ گزارش نموده بودند، مطابقت نداشت. از آنجا که اندازه کلنی بر حالت شناور بودن و مهاجرت عمودی جلبک تاثیر دارد (Kromkamp and ealsby, 1990)، پراکنش عمودی کلنی ها ممکن است تحت تاثیر اندازه کلنی قرار گیرد و کلنی های بزرگ میکروسیس تیس معمولا به صورت شناور در سطح آب می مانند، در حالیکه کلنی های کوچک (کمتر از ۳۶ میلی متر) و تک سلولی های آن تقریبا پراکنش عمودی یکنواختی از خود نشان می دهند (Wu and Kong, 2009).

در طی چند دهه گذشته، فعالیتهای انسانی کیفیت آب را در تعداد زیادی از دریاچه ها و سدها در سراسر جهان کاهش داده است. این امر همراه با ضرورت تامین نیازهای جامعه برای کیفیت و کمیت مناسب آب، نشان می دهد که پایش کیفیت آبهای شیرین برای مدیریت مناسب آنها در دراز مدت امری حیاتی است (Kennedy, 1999).

## پیشنهادها

۱- بررسی سیانوتوکسین های (میکروسیستین) احتمالی موجود در آب دریاچه سد ارس

۲- ثبت توالی های ژنی جدید در سایت بانک ژنی nbci

۳- مطالعه شکوفایی جلبک میکروسیستیس در اکوسیستم های آب شیرین دیگر کشور

۴- شناسایی تاکسونومیکی (مورفولوژیکی و مولکولی) جمعیت های میکروسیستیس در اکوسیستم های آب شیرین کشور

۵- شناسایی گونه های میکروسیستیس از نظر تولید یا عدم تولید میکروسیستین در اکوسیستم های آب شیرین کشور

## منابع


- Bittencourt- Oliveira M.C. (2000): Development of *Microcystis aeruginosa* (Kütz.) Kütz.(Cyanophyceae/Cyanobacteria) under cultivation and its taxonomic implications. – Arch.Hydrobiol./Algolog. Stud. 99: 29-37.
- Castenholz R.W. (2001). Phylum BX. Cyanobacteria. Oxygenic Photosynthetic Bacteria. – In: BOONE D.R. & CASTENHOLZ R.W. (eds.), Begey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd Edition, Springer, 473-599.
- Chorus I, Bartram J .(1999). Toxic cyanobacteria in water: a guideto their public health consequences, monitoring and management. E&F Spon, London.
- Crow, W. B. (1923). The taxonomy and variation of the genus *Microcystis* in Ceylon. New Phycologist 22, 59- 68.
- Doolittle, W. F. (1982). Molecular evolution. In: TheBiology of Cyanobacteria, Volume 19. N. G. Carr andB. A. Whitton, eds. Berkeley, University of California Press. p. 307-332.
- Filipuzzi S. & Faramarzi M. (2007). The Science and Politics of Large Dam Project Aras river basin: damfacility and water management policy.An analysis on performance. Swiss Federal Institute of Aquatic Scienceand Technology.
- Finlay, B.J. (2002). Global dispersal of free-living microbial eukaryote species. Science 296, 1061–1063.
- Fritsch, F.E. & Rich, F. (1913). Studies on the occurrence and reproduction of British freshwater algae in nature. 3. A 4 years' observation of a freshwater pond. *Annales de Biologie lacustre* **6**, 1-83.
- Gibbons, N. E., and R. G. E. Murray.(1978). Proposals concerning the higher taxa of bacteria. Int. J. Syst. Bacteriol. 28: 1-6.
- Harris, G.P. (1986). Phytoplankton ecology, structure, function and fluctuation. Chapman and Hall Ltd, London, New York. 384 pp.
- Heidari, F., Riahi, H., Yousefzadi, M., & Shariatmadari, Z. (2013). Morphological andphylogenetic diversityofcyanobacteriainfourhotsprings ofIran. Iran. J. Bot. 19 (2): 162-172.
- Holt, J. G., Krieg, N. R., Sneath, P. H. A., Staley, J. T., and Williams, S. T. (1994) Group 11. Oxygenic phototrophic bacteria. *In* Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 9th ed., ed. by Hensyl, W. R., Williams & Wilkins, Baltimore, pp. 377–425.
- Huisman J, Sharples J, Stroom J et al. (2004). Changes in turbulentmixing shift competition for light between phytoplankton species. Ecology 85:2960–2970.
- Huisman JM, Matthijs HCP, Visser PM .(2005). Harmful cyanobacteria. springer aquatic ecology series 3. Springer, Dordrecht, The Netherlands, 243p.
- Humbert, J.F., Duris-Latour, D., Le Berre, B., Giraudet H.and Salenc¸on, M.J. (2005). Genetic Diversity in *Microcystis* Populations of a French Storage Reservoir Assessed by Sequencing of the 16S-23S rRNA Intergenic Spacer. Microbial Ecology 49, 1–7.
- Humbert, J.F., Le Berre, B. (2001). Genetic diversity among two freshwater cyanobacteria species, Planktothrix (Oscillatoria) rubescens and P. agardhii. Arch Hydrobiol 2, 197–206.
- Iteman, I., R. Rippka, N. Tandeaude Marsac, and M. Herdman.(2000). Comparison of conserved structural and regulatory domains within divergent 16S rRNA–23S rRNA spacer sequences of
- Janse, I., Meima, M., Kardinaal, W.E., Zwart, G(.2003). High-resolution differentiation ofCyanobacteria by using rRNA-internal transcribed spacer denaturinggradient gel electrophoresis. Appl Environ Microbiol, 69, 6634–6643.
- Jöhnk, K.D., Huisman, J., Sharples, J. et al. (2008). Summer heatwavespromote blooms of harmful cyanobacteria. Glob Change Biol 14:495–512.
- Kato, T; Watanabe, M. F. & Watanabe, M. (1991). Allozyme divergence in *Microcystis* (Cyanophyceae) and its taxonomic interference. – Arch. Hydrobiol. /Algolog. Stud., Stuttgart, 64, 129–140.
- King, L., Jones, R.I. and Barker, P. (2002). Seasonal variation in the epilithic algal communities from four lakes of different trophic state. Arch. Hydrobiol. 154(2), 177-198.
- Komárek, J. and Komárková, J. (2002). Review of the European *Microcystis* morphospecies (Cyanoprokaryotes) from nature. Czech Phycology, Olomouc, 2: 1- 24.
- Li, X. (2000). Phenotypic and genotypic characterization of *Nostoc* species from 6 different sites in the Mojave desert. Master'sthesis, John Carroll University, Cleveland, Ohio.
- López-Rodas, V., Costas, E. and Flores-Moya, A. (2013). Phenotypicand Genetic Diversitiesare notCorrelatedin Strainsofthe Cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* Isolatedin Sw Spain. Acta Botanica Malacitana, 38, 5-12.

- Neilan, B.A., Jacobs, D., Del Dot, T., Blackall, L.L., Hawkins, P.R., Cox, P.T. and Goodman, A.E. (1997). rRNA sequences and evolutionary relationships among toxic and nontoxic cyanobacteria of the genus Microcystis. Int. J. Syst. Bacteriol. 47, 693-697.
- Otsuka, S., Suda, Sh., Li, R., Watanabe, M., Oyaizu, H. et al.(1998). 16S rDNA sequences and phylogenetic analyses of Microcystis strains with and without phycoerythrin. FEMS Microbiology Letters 164, 119-124.
- Otsuka, S., S. Suda, R. Li, M. Watanabe, H. Oyaizu, S. Matsumoto, and M. M. Watanabe.(1999). Phylogenetic relationships between toxic and non-toxic strains of the genus *Microcystis* based on 16S to 23S internal transcribed spacer sequence. FEMS Microbiol. Lett. 172**,** 15–21.
- Otsuka S., Suda S., Li R., Matsumoto S. and Watanabe M.M. (2000). Morphological variability of colonies of *Microcystis* morphospecies in culture. – J. Gen. Appl. Microbiol. 46: 39-50.
- Otsuka, S., Suda, S., Shibata, S., Oyaizu, H., Matsumoto, S. and Watanabe, M.M. (2001): A proposal for the unification of fine species of the cyanobacterial genus *Microcystis* Kutzing ex Lemmermann 1907 under the Rules of the Bacteriological Code. – Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 51: 873-879.
- Paerl, H.W., Fulton, R.S. III, Moisander, P.H. et al. (2001). Harmful freshwater algal blooms, with an emphasis on cyanobacteria. The Scientific World 1:76–113.
- Paerl, H.W. and Huisman, J. (2009). Climate change: a catalyst for global expansion of harmful algal blooms. *EnvironmentalMicrobilogy Reports*, 1, 27-37.
- Peeters, F., Straile, D., Lorke, A. et al. (2007). Earlier onset of thespring phytoplankton bloom in lakes of the temperate zone in a warmer climate. Glob Change Biol 13, 1898–1909.
- Reynolds, C.S., Jaworski, G.H.M., Cmiech, H.A. and Leedale, G.F. (1981). On the annual
- cycle of the blue-green alga *Microcystis aeruginosa* Kütz. emend. Elenkin. - Phil. Trans.
- R. Soc. Lond. B. 293: 419-477.
- Reynolds, C.S. (2006). The Ecology of Phytoplankton. New York: Cambridge University Press.
- Sambrook, J., Fritschi, E.F. and Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: a laboratorymanual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Schopf, J.W. (2000). The fossil record: tracing the roots of the cyanobacterial lineage. In: Whitton BA, Potts M (Eds) The ecology of cyanobacteria. Kluwer Academic, Dordrecht, pp 13–35.
- Smith, V.H. (2003). Eutrophication of freshwater and coastal marin ecosytems: a global problem. Envirom. Sci. Pollut. Res. Int. 10, 126-139.
- Somdee, Th., Kaewkhiaw, K. and Somdee, A. (2013). Detection of toxic cyanobacteria and quantification of microcystins in four recreational water reservoirs in Khon Kaen, Thailand. KKU Res. J. 18(1),1-8.
- Stanier, R. Y., Kunisawa, R., Mandel, M., and Cohen-Bazire, G. (1971). Purification and properties of unicellular blue-green algae (order Chroococcales). *Bacteriol. Rev*., 35, 171–205.
- Stanier, R. Y., W. R. Sistrom, T. A. Hansen, B. A. Whitton, R. W. Castenholz, N. Pfenning, V. N. Gorlenko, E. N. Kondratieva, K. E. Eimhjellen, R. Whitten bury, R. L. Gherna, and H. G. Truper. (1978). Proposal to place the nomenclature of the cyanobacteria (blue-green algae) under the rules of the International Code of Nomenclature of Bacteria. Int. J. Syst. Bacteriol. 28, 335-336.
- Turner, S. (1997). Molecular systematics of oxygenic photosynthetic bacteria. Plant Syst. Evol. 11(Suppl.), 13–52.
- Von Elert, E. and Wolffrom, T. (2001). Supplementation of cyanobacterial food with polyunsaturated fatty acids does not improve growth of Daphnia. Limnol Oceanogr 46(6), 1552–1558.
- Wilmotte, A., S. Turner, Y. Van Der Peer, and N. R. Pace. (1992). Taxonomic study of marine Oscillatorian strains (Cyanobacteria) with narrow trichomes. II. Nucleotide sequence analysis of the 16S ribosomal RNA. J. Phycol. 28, 828–838.
- Woose, C.R. (1987) Bact. Evol. Microbiol. Rev. 51, 221-271.
- Zwart, G., Hiorns, W.D., Methe, B.A., van Agterveld, M.P., Huismans, R., Nold, S.C., Zehr, J.P., and Laanbroek, H.J. (1998). Nearly identical 16S rRNA sequences recovered from lakes in North America and Europe indicate the existence of clades of globally distributed freshwater bacteria. Syst Appl Microbiol 21, 546–556.

## Abstract

Today, due to population increase and anthropogenic activities together with sewage and agricultural waste water entrance, aquatic ecosystems have been exposed to high pollutions. Phytoplankton is a group of water-floating algae that have crucial roles in providing nutrients and oxygen for other organisms, nitrogen and $CO_2$ fixation.

These organisms are considered as primary producers in aquatic ecosystems. They are found in various water habitats all over the world, affected by environmental variables such as pH, light and temperature and used for determination of water pollution degree and quality.

Phytoplankton composition and density may be used as a complementary indicator of water trophy state. Phytoplankton communities indicate short and long term variations of aquatic systems. One of the most obvious problems in freshwater ecosystems is algal bloom or over growth of some blue- green algae which can decrease oxygen, and in some cases bring about toxin excretion and fish and human kills.

In addition, many of bloom forming cyanobacteria produce secondary metabolites which can create sever poisoning in mammals including human. The genus Microcystis is a key bloom forming cyanobacteria in aquatic ecosystems. Populations of this genus form intense blooms in water bodies that has attracted more attentions in recent years. Various species of this alga have been distributed in stagnant and eutroph freshwater around the world.

Microcystis has been defined by genetic criteria such as 16S rRNA molecular sequencing, but its classification in levels lower than genus is unclear and the presence of its classical morphospecies is doubtful. However, this genus creates sever blooms in eutrophic waters all over the world and many species produce toxins. Therefore, identification of its natural diversity in the levels lower than genus has high importance. However, several characteristics of Microcystis morphotypes which are classified a traditional species, actually are present and observed in different regions of the world. At present, they can be considered as morphospecies that belong to one genotype and have similar ecology. These traditional species with definite phenotypic and ecophysiological characteristics cannot be eliminated completely. Their identification is essential for ecological and ecotoxicological studies.

Interistic transcribed separator (ITS) gene is a section of genome which is located between 16s rRNA and 23s genes. This gene has more heterogeneity than 16s rRNA; so it is used to identify many genera of cyanobacteria. The Aras reservoir located in the north-west of Iran plays important roles as fisheries, drinking and agricultural water supply and recreational activities in the region. The present thesis was undertaken to: analyze the *Microcystis* sp. populations by molecular methods such as ITS in Aras Reservoir.

Samples for molecular analysis were collected from 10 sampling sites on 18 August 2013.

Samples for molecular study of Microcystis were collected from two different depths (surface and 1 m depth) and transferred to laboratory without any treatments. Microscopic images of Microcystis were sent to professor Komárek and was confirmed.

**Ministry of Jihad – e – Agriculture**
**AGRICULTURAL RESEARCH, EDUCATION & EXTENSION ORGANIZATION**
**Iranian Fisheries Science Research Institute –National Artemia Research Center**

---

**Project Title : Molecular barcoding of the Aras reservoir alga *Microcystis aeruginosa* (Kützing) Kützing 1846 by ITS-2 gene**
**Approved Number: 4-79-12-93116**
**Author: Fereidun Mohebbi**
**Project Researcher : Fereidun Mohebbi**
**Collaborator(s) : A. Mohsenpour, YA. Asadpour, A. Ghoroghi, M. Seidgar, L. Esmaili, R. Ahmadi, B. Mostafazadeh, S. Shiri, Zh. Alizadeh, S. Ganji, B.A. Dadashpour**
**Advisor(s): R. Manaffar**
**Supervisor: S. Rezvani**
**Location of execution : West Azarbaijan Province**
**Date of Beginning : 2014**
**Period of execution : 1 Year & 5 Months**
***Publisher : Iranian Fisheries Science Research Institute***
***Date of publishing : 2016***

**All Right Reserved . No Part of this Publication May be Reproduced or Transmitted without indicating the Original Reference**

**MINISTRY OF JIHAD - E - AGRICULTURE**
**AGRICULTURAL RESEARCH, EDUCATION & EXTENSION ORGANIZATION**
**Iranian Fisheries Science Research Institute - National Artemia Research Center**

**Project Title :**

# Molecular barcoding of the Aras reservoir alga *Microcystis aeruginosa* (Kützing) Kützing 1846 by ITS-2 gene

**Project Researcher :**

***Fereidun Mohebbi***

**Register NO.**

***50408***