

مقایسه اثر غلظت‌های مختلف کلرور سدیم بر فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان، اسمولیت‌ها و رنگیزه‌های فتوسنتزی در *Dunaliella salina*

افضل سادات برهانی سزوار^{۱*}، ارین ساطعی^۲ و مه لقا قربانلی^۳

۱- گروه زیست‌شناسی دانشکده علوم، دانشگاه گلستان، گرگان
۲ و ۳- گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرگان

تاریخ پذیرش: ۹۰/۶/۲۶

تاریخ دریافت: ۹۰/۴/۱۵

چکیده

در پژوهش حاضر، تأثیر غلظت کلرور سدیم در محیط کشت بر تغییرات فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان (کاتالازی، اسکوربات پراکسیدازی، پراکسیدازی، سوپراکسیددیسموتازی)، تغییرات محتوای اسمولیت‌ها (گلیسین بتائین و پرولین) و تغییر در میزان رنگیزه‌های *Dunaliella salina* مورد بررسی قرار گرفت. در تیمارهای ۲/۵، ۷/۵ و ۱۲/۵ درصد نمک طعام، سویه مورد آزمایش رشد نموده و، امکان سنجش سایر پارامترهای مورد نظر فراهم شد. بیشترین رشد در تیمار ۷/۵ درصد مشاهده شد. بیشترین مقدار رنگیزه‌های کلروفیل a (۱۰/۳ میلی گرم بر گرم وزن تر جلبک)، کلروفیل b (۰/۷۳۵ میلی گرم بر گرم وزن تر جلبک) و بتا کاروتن (۰/۲۱۱ میلی گرم بر گرم وزن تر جلبک) در تیمار ۷/۵ درصد دیده شد اما افزایش درصد کلروفیل b در سایر تیمارها اتفاق افتاد. نتایج بررسی آنزیمی، نشان داد که در شرایط مربوط به سایر تیمارها میزان نمک در محیط کشت، فعالیت پراکسیدازی و اسکوربات پراکسیدازی به طور معنی‌داری افزایش یافت ($P < 0/05$). علاوه بر این، در شرایط بهینه میزان گلیسین بتائین به طور معنی‌داری ($P < 0/05$) بیش از دو تیمار دیگر بود. در شرایط غیر بهینه مورد آزمایش، مقدار پرولین افزایش معنی‌داری داشت ($P < 0/05$). به نظر می‌رسد در تیمار ۷/۵ درصد بیشترین رشد مشاهده می‌شود و سلول برای رفع تنش به تغییر ترکیب آنتن‌های فتوسنتزی، در جهت افزایش فتوسیستم ۲ همراه با سنتز پرولین و پروتئین‌های آنزیمی آنتی اکسیداتیو به مقابله با اثرات شوری و یا به عبارتی سازش با آن می‌پردازد.

واژگان کلیدی

اسمولیت‌ها، آنزیم‌های آنتی اکسیدان، پرولین، دونالیا، کلرور سدیم، گلیسین بتائین

* نگارنده پاسخگو: Afzalborhani@yahoo.com

مقدمه

گونه *Dunaliella salina* نوعی جلبک سبز تک سلولی است که توانایی منحصر به فردی در سازش با نامساعدترین محیط‌های شناخته شده روی کره زمین دارد. این گونه، در شرایط متنوعی از ۰/۵ تا ۵ مول نمک طعام رشد می‌کند و در این دامنه نمک، مقدار نمک داخلی را پایین نگه می‌دارد (Fisher et al., 1994). این جلبک مکانیسم‌های موثری برای تنظیم یون سدیم داخل سلولی دارد (Katz, 2001). دونالیلا یوکاریوت و فتوسنتز کننده است و می‌تواند در شرایط مناسب بتاکاروتن را در سطح وسیعی در خود جمع کند (Ben Amotz et al., 1987).

کارتونوئیدها اکنون به عنوان عوامل حفاظتی موثر علیه بیماری‌های متنوع بشر از جمله آب مروارید و تخریب رتینال مرتبط با پیری محسوب می‌گردند. ترکیب لوتئین به عنوان افزودنی غذا در آمریکا در هر سال حدود ۱۵۰ میلیون دلار فروش دارد (Jin et al., 2003). بنابراین پژوهش پیرامون این جلبک، به عنوان یک منبع ارزشمند غذایی، دارویی و بهداشتی و آرایشی، مورد توجه می‌باشد (Richmond et al., 1986).

با توجه به اینکه از جمله پاسخ‌های سلولی گیاهان به شرایط تنش، تولید ترکیبات آنتی اکسیدان (از جمله آنزیم‌های آنتی اکسیدان) و اسمولیت‌ها و تغییر در ترکیب رنگی‌های فتوسنتزی می‌باشد لذا در این پژوهش، این پارامترها تحت اثر غلظت بهینه نمک (۷/۵ درصد) و غلظت‌های بالا و پایین‌تر از آن (۱۲/۵ و ۲/۵ درصد) مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

شرایط اتاق کشت

اتاق کشت لازم متناسب با گونه جلبک و امکانات در دسترس طراحی گردید.

امکان نوردهی مناسب، هوادهی و مکان مناسب برای قرارگیری ظروف حاوی محیط کشت از مواردی است که در این طراحی مدنظر قرار گرفت. (R) قفسه‌ها در یک اتاق به دیوارها عمود شدند. فاصله طبقات ۳۰ سانتیمتر تنظیم شد. شدت نور در هر طبقه به وسیله دو لامپ فلور سنت سفید و یک لامپ زرد (۲۰ وات)، حدود ۵۰۰۰ لوکس تامین گردید. زمان نوردهی به وسیله دستگاه تنظیم کننده، ۲۰ ساعت تاریک و ۴ ساعت نور، تنظیم شد (حسینی و ساطعی، ۱۳۸۵). دمای اتاق کشت بین ۲۵-۳۰ درجه سانتی‌گراد تنظیم گردید. مینیم و ماگزیمم دما در ۲۴ ساعت به وسیله دماسنج بررسی، و سپس تنظیم گردید. هوادهی کشت‌ها، روزانه یک ساعت و معمولا، صبح‌ها انجام شد. این کار توسط پمپ‌های هوادهی اکواریوم انجام گرفت.

محیط کشت جانسون در ارلن‌های ۲۵۰ میلی لیتری در حجم ۱۰۰ میلی لیتر با اضافه کردن ۲/۵، ۷/۵ و ۱۲/۵ درصد کلرور سدیم (هر غلظت ۳ ارلن جداگانه) ساخته شد. اسیدیته این محیط در حد ۷/۵، به کمک pH متر تنظیم گردید. در طی ۱۲ روز شمارش روزانه تعداد جلبک در واحد حجم محیط کشت بطور روزانه با کمک میکروسکوپ اولیمپوس و لام شمارش توما انجام شد. پس از دوازده روز سنجش آنزیم‌های آنتی اکسیدان، اسمولیت‌ها و رنگی‌های فتوسنتزی در جلبک انجام گردید.

تهیه نمونه و انتقال به محیط مایع

نمونه جلبک از پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی شهید بهشتی تهیه شد. این جلبک به منظور خوگیری با شرایط حاضر، پیش از آغاز پژوهش، چند دوره واکشت گردید. جلبک در شرایط استریل به محیط کشت جدید انتقال یافت. برای این کار پانزده میلی لیتر از محیط کشت واجد جلبک در لوله‌های آزمایش در ۴۰۰ دور و مدت زمان ۳۰ دقیقه سانتریفوژ شد. سپس لایه رویی دور ریخته شده و بر روی جلبک‌ها ۱۰ میلی لیتر از محیط جدید ریخته و آنها به

یک ارلن ۲۵۰ میلی لیتری حاوی ۹۰ میلی لیتر محیط کشت تازه جانسون منتقل، گردیدند. تعداد جلبک در واحد حجم محیط کشت جدید در آغاز حدود 2×10^4 جلبک در میلی لیتر بود. سنجش‌ها پس از دوازده روز، انجام گرفت. به منظور سنجش پرولین ده میلی لیتر سوسپانسیون جلبکی در لوله‌های توزین شده، در ۱۰۰۰ دور سانتریفوژ شد و با محاسبه وزن جلبک، رسوب جلبکی در ۱۰ میلی لیتر محلول ۳ درصد اسید سولفوسالسیلیک ساییده شد و سپس مخلوط، دوباره در ۱۰۰۰ دور سانتریفوژ، و ۲ میلی لیتر از محلول رویی به ۳ میلی لیتر نین هیدرین (حاصل از حل کردن ۱/۲۵ گرم نین‌هیدرین در ۳۰ میلی لیتر استیک خالص و ۲۰ میلی لیتر اسید فسفریک ۶ مولار) و ۳ میلی لیتر اسید استیک خالص اضافه شد. لوله‌ها یک ساعت در بن ماری جوش و پس از آن نیم ساعت در حمام یخ قرار گرفتند. سپس ۴ میلی لیتر تولون به هر لوله اضافه شد و پس از کمی هم زدن و تشکیل دو لایه رنگی مجزا، جذب لایه رنگی فوقانی در ۵۲۰ نانومتر خوانده شد و غلظت پرولین (Bates, 1973) با مقایسه با محلول‌های استاندارد محاسبه شد. به منظور سنجش گلیسین بتائین، حجمی از محیط مورد نظر واجد جلبک در لوله‌های توزین شده در ۱۰۰۰ دور سانتریفوژ شد و پس از توزین جلبک، رسوب جلبکی در ۲۰ میلی لیتر آب مقطر ساییده و دوباره در ۱۰۰۰ دور سانتریفوژ گردید. لایه رویی به نسبت یک به یک با اسید سولفوریک ۲ نرمال رقیق شد و سپس ۰/۸ میلی لیتر معرف یدیدین سرد اضافه و پس از ۱۶ ساعت نگهداری در دمای صفر و سانتریفوژ در ۱۰۰۰۰ دور، یک میلی لیتر از محلول فوقانی با ۹ میلی لیتر ۲۰ دی کلرو اتان مخلوط و پس از ورتکس شدید، جذب محلول تحتانی بعد از ۳ ساعت در طول موج ۳۶۵ نانو متر تعیین و با استفاده از محلول‌های استاندارد، غلظت گلیسین بتائین محاسبه گردید (Sairam, 2002).

تهیه عصاره جلبکی جهت سنجش‌های آنزیمی

الف - تهیه محلول عصاره‌گیری با مخلوط کردن ۱/۲ گرم تریس و ۲ گرم اسید اسکوربیک و ۳/۸ گرم بوراکس (Disodium tetraborate) و ۲ گرم Na_2EDTA و ۵۰ گرم پلی اتیلن گلیکول ۲۰۰۰ و رساندن حجم با آب مقطر به ۱۰۰ میلی لیتر (PH7) و نگهداری در یخچال انجام گردید.

ب - پس از استخراج عصاره جلبکی حاوی آنزیم به وسیله ساییدن وزن مشخصی از رسوب حاصل از سانتریفوژ سوسپانسیون جلبکی با چهار میلی لیتر محلول عصاره‌گیری به مدت نیم ساعت، محلول به مدت ۲۴ ساعت در یخچال (دمای ۴ درجه سانتی‌گراد)، قرار گرفت. مخلوط به مدت سی دقیقه در ۴۰۰ گرم سانتریفوژ گردیده و لایه فوقانی در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید.

اندازه‌گیری فعالیت پراکسیدازی

پس از مخلوط کردن یک میلی لیتر تامپون استات (PH=5) $M(0.1)$ با ۰/۴ میلی لیتر آب اکسیژنه ۳ درصد و ۰/۲ میلی لیتر بنزیدین محلول در الکل ۵۰ درجه و اضافه کردن ۰/۱ میلی لیتر عصاره آنزیمی و خواندن جذب در طول موج ۵۳۰ nm پس از ۱ دقیقه و محاسبه آن به ازای ۱ گرم وزن تر جلبک فعالیت پراکسیدازی مورد سنجش قرار گرفت (Koroi, 1989).

اندازه‌گیری فعالیت اسکوربات پراکسیدازی

در این سنجش ۲ میلی لیتر بافر فسفات (PH=۵) $M(0.05)$ با ۲ میلی لیتر آب اکسیژنه سه درصد و ۰/۲ میلی لیتر اسکوربات ۵۰ میکرو مولار در حمام یخ مخلوط شد و بلافاصله ۰/۱ میلی لیتر عصاره آنزیمی به آن اضافه شد. سپس جذب نوری را پس از در ۶۲۵nm خوانده شده و به ازای ۱ گرم جلبک، فعالیت آنزیمی معرفی شد (Arrigoni, 1992).

اندازه‌گیری فعالیت کاتالازی

۲/۵ میلی لیتر بافر فسفات (pH7) ۰/۵ M را و ۲/۰ میلی لیتر آب اکسیژنه سه درصد با هم در یخ مخلوط شده و سپس ۰/۲ میلی لیتر عصاره آنزیمی تازه استخراج شده به آن گردید. سپس تغییرات جذب در ۲۴۰ nm خوانده و فعالیت کاتالازی را به ازای ۱ گرم جلبک، محاسبه گردید (Maehly & Chence, 1995).

اندازه‌گیری فعالیت سوپر اکسید دیسموتازی

محلول واکنش برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم شامل بافر فسفات (۵/۵) (PHY/۵) ۵۰ میلی مولار، NBT (نیترو بلو تترا زولیوم) (۷۵ میکرو مولار)، ۲ ریبو فلاوین (۲ میکرو مولار) و EDTA (۱۰ میلی مولار) بود که در تاریکی کامل نگهداری شد. بلافاصله پس از اضافه کردن ریبو فلاوین، ۳ میلی لیتر از آن را در یک لوله آزمایش ریخته و به هریک ۱۰۰ میکرو لیتر عصاره آنزیمی اضافه شد. در ۳۰ سانتیمتری لامپ‌ها قرار داده و پس از ۱۶ دقیقه جذب آن در طول موج ۵۶۰ نانو متر خوانده شد. جذب محلول تاریک نیز به عنوان شاهد، تعیین گردید و میزان کاهش جذب نوری نسبت به محلولهای فاقد آنزیم به عنوان فعالیت آنزیم محاسبه شد (Gianantolis & Ries, 1977).

سنجش کلروفیل a و b و بتا کاروتن (Jensen, 1978)

برای سنجش کلروفیل a و کلروفیل b و بتا کاروتن از سوسپانسیون جلبک با استن ۸۰ درصد استفاده گردید. ابتدا به هر لوله سانتریفیوژ ۱۰ میلی لیتر از سوسپانسیون جلبک انتقال داده شد و سپس توسط دستگاه سانتریفیوژ به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۲۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید. محلول فوقانی را به آرامی جدا کرده و پس از توزین رسوب جلبکی حاصل، به آن ۳ میلی لیتر استن ۸۰ درصد اضافه گردید. پس از هم زدن کامل توسط دستگاه همزن (vortex) مجدداً به مدت ۱۰ دقیقه عمل سانتریفیوژ تکرار گردید. محلول فوقانی جدا شده و جذب آن در طول موجهای ۶۶۳، ۶۴۵، ۶۴۰، ۴۸۰، ۴۶۰، ۴۳۱ و ۴۱۲ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری گردید. با استفاده از فرمولهای ذیل میزان بتا کاروتن، کلروفیل a و b بر حسب میکرو گرم در میلی لیتر سوسپانسیون جلبکی محاسبه شد (Jensen, 1978):

$$C_{chl a}(\text{mg/ml}) = 0/0127A_{663} - 0/00269A_{645}$$

$$C_{chl b}(\text{mg/ml}) = 0/0229A_{645} - 0/00468A_{663}$$

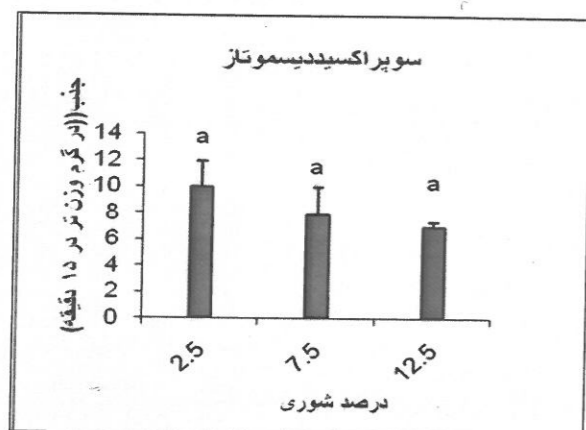
$$C(\text{chl a} + \text{chl b}) = 0/0202A_{665} - 0/00802A_{663}$$

$$\beta\text{-Carotene}(\mu\text{g/ml}) = -0/430A_{412} + 0/251A_{431} - 0/376A_{460} + 13.216A_{480}$$

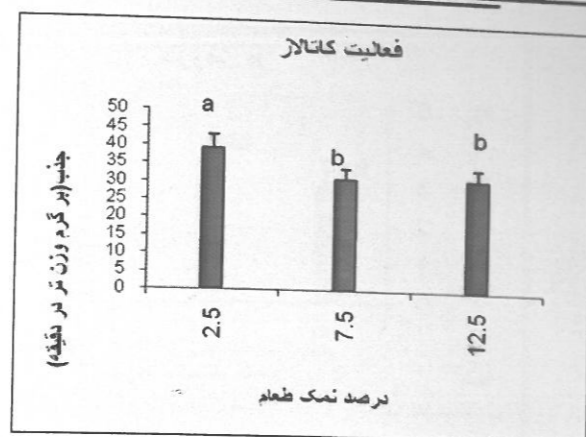
رسم نمودارها با نرم افزار Excel 2003 انجام گرفت. بررسی آماری با استفاده از نرم افزار SPSS 11.5 انجام، و آزمون آنالیز واریانس یک طرفه در سطح معناداری ۰/۰۵ صورت گرفت.

نتایج

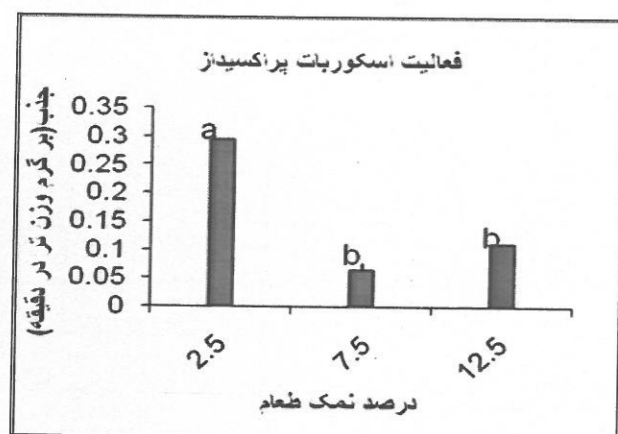
تغییرات فعالیت آنزیمها و محتوای اسمولیتها در شکل‌های (۱ تا ۶) نشان داده شده است. در تمام شکل‌ها آنتنک‌ها نشان‌دهنده انحراف معیار است.



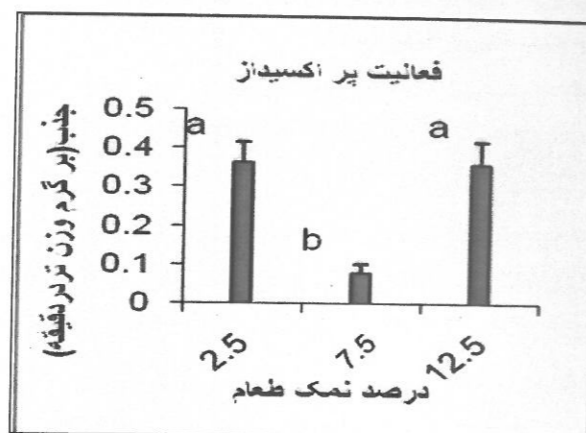
شکل ۲- اثر تیمارهای ۲/۵، ۷/۵ و ۱۲/۵ درصد نمک بر تغییرات فعالیت سوپر اکسید دیسموتازی جلبک *Dunaliella salina* (آنتنک‌ها نشان‌دهنده انحراف معیار است)



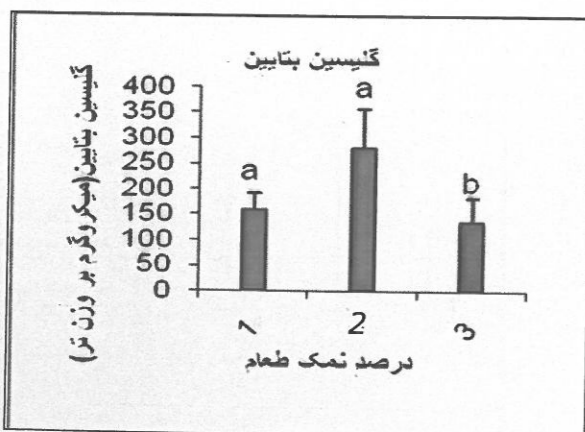
شکل ۱- اثر تیمارهای ۲/۵، ۷/۵ و ۱۲/۵ درصد نمک بر تغییرات فعالیت کاتالازی جلبک *Dunaliella salina* (آنتنک‌ها نشان‌دهنده انحراف معیار است)



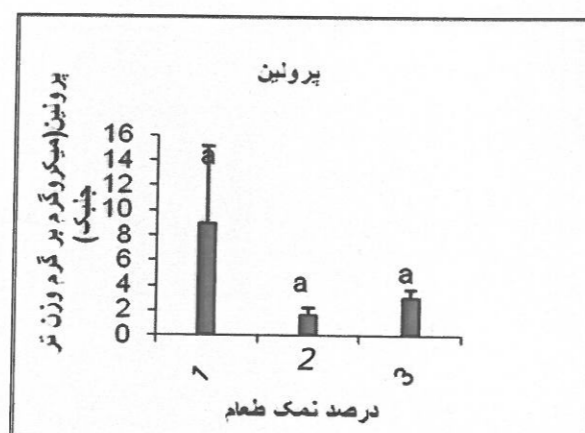
شکل ۴- اثر تیمارهای ۲/۵، ۷/۵ و ۱۲/۵ درصد نمک بر تغییرات فعالیت اسکوربات پر اکسیدازی جلبک *Dunaliella salina* (آنتنک‌ها نشان‌دهنده انحراف معیار است)



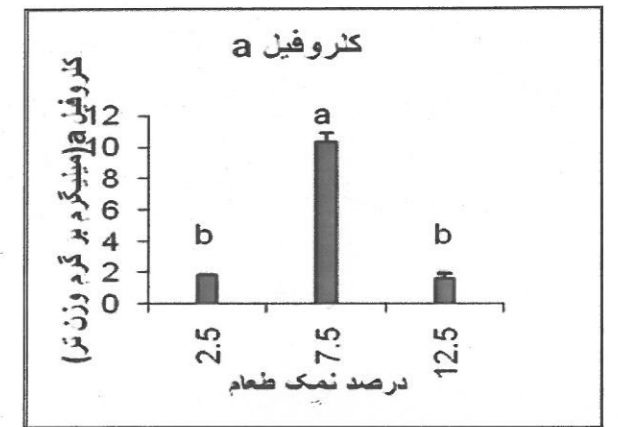
شکل ۳- اثر تیمارهای ۲/۵، ۷/۵ و ۱۲/۵ درصد نمک بر تغییرات فعالیت پر اکسیدازی جلبک *Dunaliella salina* (آنتنک‌ها نشان‌دهنده انحراف معیار است)



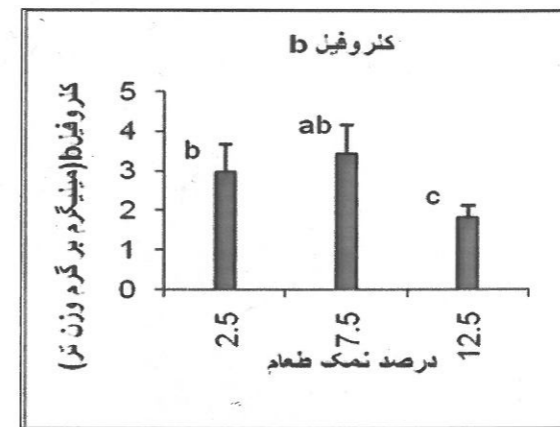
شکل ۶- اثر تیمارهای ۲/۵، ۷/۵ و ۱۲/۵ درصد نمک بر تغییرات مقدار گلیسین بتائین (میکروگرم بر وزن تر جلبک) (آنتنک‌ها نشان‌دهنده انحراف معیار است)



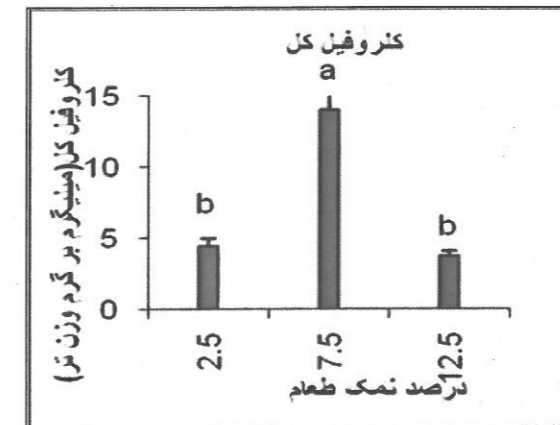
شکل ۵- اثر تیمارهای ۲/۵، ۷/۵ و ۱۲/۵ درصد نمک بر تغییرات محتوای پروتئین جلبک *Dunaliella salina* (آنتنک‌ها نشان‌دهنده انحراف معیار است)



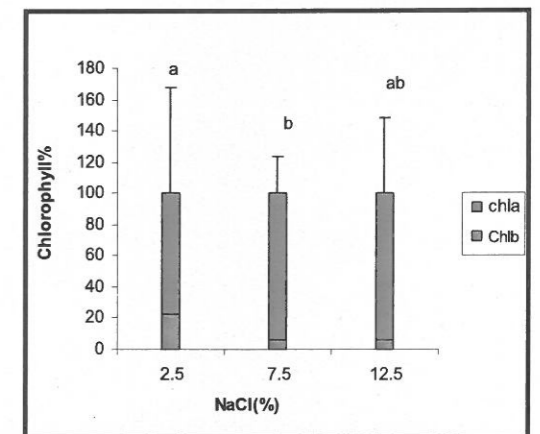
شکل ۷- اثر تیمارهای ۲/۵، ۷/۵ و ۱۲/۵ درصد نمک بر تغییرات مقدار کلروفیل a در جلبک *Dunaliella salina* (آنتنک‌ها نشان‌دهنده انحراف معیار است)



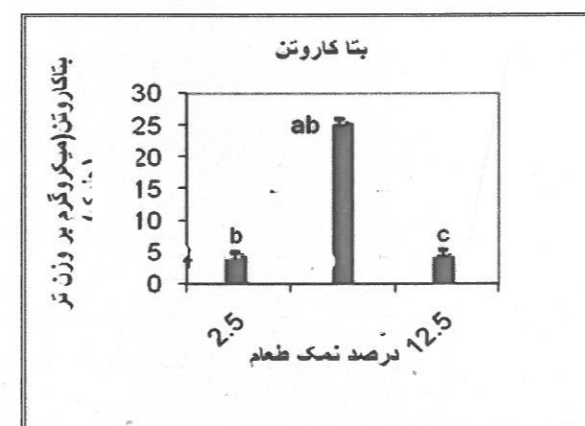
شکل ۸- اثر تیمارهای ۲/۵، ۷/۵ و ۱۲/۵ درصد نمک بر تغییرات مقدار کلروفیل b در جلبک *Dunaliella salina* (آنتنک‌ها نشان‌دهنده انحراف معیار است)



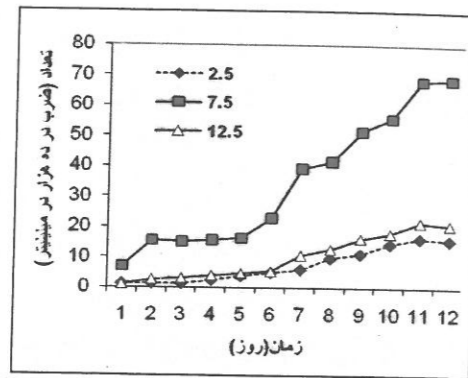
شکل ۹- اثر تیمارهای ۲/۵، ۷/۵ و ۱۲/۵ درصد نمک بر تغییرات مقدار کلروفیل کل در جلبک *Dunaliella salina* (آنتنک‌ها نشان‌دهنده انحراف معیار است)



شکل ۱۰- اثر تیمارهای ۲/۵، ۷/۵ و ۱۲/۵ درصد نمک بر تغییرات درصد کلروفیل a و b در جلبک *Dunaliella salina* (آنتنک‌ها نشان‌دهنده انحراف معیار است) *انحراف معیار، مربوط به کلروفیل b می‌باشد.



شکل ۱۱- اثر تیمارهای ۲/۵، ۷/۵ و ۱۲/۵ درصد نمک بر تغییرات مقدار بتا کاروتن در جلبک *Dunaliella salina* (آنتنک‌ها نشان‌دهنده انحراف معیار است)



شکل ۱۲- مقایسه منحنی رشد جلبک *Dunaliella salina* در فاز لگاریتمی در سه تیمار ۲/۵، ۷/۵ و ۱۲/۵ درصد نمک طعام (آنتنک‌ها نشان‌دهنده انحراف معیار است)

اثر کلی تیمارها بر فعالیت کاتالازی معنی‌دار ($P < 0.05$) بود. فعالیت کاتالازی در تیمار ۲/۵ درصد نسبت به دو تیمار دیگر افزایش معنی‌داری نشان داد. این مقدار در تیمار ۱۲/۵ درصد بیش از تیمار ۷/۵ درصد بود (شکل ۱). ولی این تفاوت معنی‌دار نبود ($P > 0.05$). اثر کلی تیمار بر فعالیت سوپر اکسید دیسموتازی معنی‌دار ($P < 0.05$) نبود. میزان فعالیت سوپر اکسید دیسموتازی در تیمارهای مختلف با افزایش شوری، کاهش یافت (شکل ۲)، ولی این کاهش در هیچ تیماری معنی‌دار نبود ($P > 0.05$). اثر کلی تیمار بر فعالیت پراکسیدازی معنی‌دار ($P < 0.05$) بود. میزان فعالیت پراکسیدازی در تیمار ۷/۵ درصد کاهش معنی‌داری نسبت به دو تیمار دیگر داشت (شکل ۳). اثر کلی تیمار بر فعالیت اسکوریات پراکسیدازی معنی‌دار ($P < 0.05$) بود. میزان فعالیت اسکوریات پراکسیداز در تیمار ۲/۵ درصد شوری افزایش معنی‌داری نسبت به دو تیمار دیگر داشت (شکل ۴). اثر کلی تیمار بر محتوای پرولین معنی‌دار ($P < 0.05$) بود. تیمار ۲/۵ درصد بیش از تیمارهای ۷/۵ و ۱۲/۵ درصد بود، این تفاوت نسبت به تیمار ۷/۵ درصد معنی‌دار ($P < 0.05$) بوده ولی نسبت به تیمار ۱۲/۵ درصد معنی‌دار نبود (شکل ۵). اثر کلی تیمار بر محتوای گلیسین بتائین معنی‌دار ($P < 0.05$) بود. مقدار گلیسین بتائین در تیمار ۷/۵ از دو تیمار دیگر بیشتر بود. این تفاوت بین دو تیمار ۲/۵ و ۷/۵ درصد معنی‌دار نبود (شکل ۶). اثر کلی تیمار بر درصد کلروفیل a معنی‌دار ($P < 0.05$) بود. مقدار کلروفیل a در تیمار ۲/۵ درصد کاهش معنی‌داری نسبت به مقدار آن در تیمار ۷/۵ درصد داشت. این مقدار در تیمار ۱۲/۵ درصد نسبت به ۲/۵ درصد کمی بیشتر بود اما تفاوت معنی‌دار نبود ($P > 0.05$) (شکل ۷). اثر کلی تیمار بر مقدار کلروفیل b معنی‌دار بود ($P < 0.05$). مقدار کلروفیل b در تیمار ۱۲/۵ درصد نسبت به تیمار ۷/۵ درصد اختلاف معنی‌داری نشان داد ($P < 0.05$) (شکل ۸). اثر کلی تیمار بر مقدار کل کلروفیل معنی‌دار بود ($P < 0.05$). مقدار کلروفیل کل در تیمار ۷/۵ درصد نسبت به دو تیمار دیگر افزایش نشان داده و این افزایش معنی‌دار بود ($P < 0.05$) (شکل ۹). اثر کلی تیمار بر تغییرات درصد کلروفیل b معنی‌دار بود ($P < 0.05$). درصد کلروفیل b در تیمار ۲/۵ درصد به طور معنی‌دار ($P < 0.05$) بیش از مقدار در صد آن در تیمار ۷/۵ درصد بود. این مقدار هم چنین کمی بیشتر از درصد این پارامتر در تیمار ۱۲/۵ بود. ولی تفاوت آن‌ها معنی‌دار نبود (شکل ۱۰). اثر کلی تیمار بر مقدار بتا کاروتن معنی‌دار بود ($P < 0.05$). مقدار بتا کاروتن نیز در سطح ۵ درصد معناداری در سه تیمار تفاوت آشکار و معنی‌داری نشان داد ($P < 0.05$) (شکل ۱۱). در دوازده روز شمارش در سه تیمار مختلف نمکی. جلبک در فاز لگاریتمی رشد بود. اما تکثیر جلبک به شکل معنی‌داری در محیط کشت ۷/۵ درصد بیشتر بوده و این غلظت از نمک طعام برای جلبک *Dunaliella salina* بهینه بنظر می‌رسید.

بحث و نتیجه‌گیری

نتایج این تحقیق افزایش معنی‌داری ($P < 0.05$) در فعالیت پراکسیدازی در تیمار ۲/۵ و ۱۲/۵ درصد نسبت به تیمار ۷/۵ درصد را نشان داد (شکل ۳). به نظر می‌رسد دور شدن از وضعیت بهینه (۷/۵ درصد)، تنش است که سلول برای

مقابله با آن فعالیت پر اکسیدازی خود را افزایش می‌دهد (Jahnkel, 2004). این تنش احتمالاً در نتیجه عدم توازن در مبادله آنیون‌ها و کاتیون‌هایی است که نقل و انتقالات آنها به شکلی، به یون سدیم و یا کلر مربوط است. تغییرات فعالیت آسکوربات پراکسیدازی و تغییرات فعالیت کاتالازی با آزمون‌های مختلف انجام شده معنی‌دار بود ($P < 0.05$). این آنزیم‌ها در شرایط تنش اکسیداتیو فعال هستند. بنا بر این افزایش فعالیت آنها می‌تواند مبین مقابله آنتی اکسیداتیو آنزیمی، هم سو با سایر آنزیم‌های آنتی اکسیداتیو باشد.

تغییرات فعالیت سوپر اکسید دیسموتازی در سه تیمار مورد سنجش با آزمون‌های مختلف انجام شده معنی‌دار ($P > 0.05$) نبود. میزان آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز با افزایش شوری کاهش یافت. ولی این کاهش معنی‌دار نبود. احتمالاً سلول از سایر آنزیم‌های آنتی اکسیداتیو برای رفع تنش استفاده می‌کند.

گلیسین بتائین (اسمیت‌ها) موجب افزایش فعالیت فتوسنتزی از طریق تجمع کلروفیل، افزایش جذب CO_2 ، تسهیل انتقال الکترون، محافظت از فعالیت پروتئین‌ها و لیپیدهای غشاء تیلاکوئیدی در PSII، می‌شود (William, 1992). در تیمار ۷/۵ درصد این پارامتر بیشترین مقدار را دارد و افزایش آن نسبت به دو تیمار دیگر معنی‌دار ($P < 0.05$) بود. لذا به نظر می‌رسد در شرایط پایدار سلول از گلیسین بتائین (علاوه بر گلیسرول) برای دستیابی به هموستازی استفاده می‌کند. سنتز گلیسین بتائین می‌تواند توسط هر دو عامل خشکی و شوری بوسیله بیان بالایی از کولین منواکسیژناز و بتائین آلدئید دهیدروژناز القا شود. گلیسین بتائین با رشد گیاهان در محیط‌های خشک و شور همبستگی بالایی دارد. به علاوه تاثیرات گلیسین بتائین بیش از دیگر محلول‌های سازگار در پایداری ساختمان آنزیم‌ها و ترکیبات پروتئینی و پایداری غشاها در شرایط خشکی، شوری و دماهای بالاست، به علاوه با تثبیت ترکیبات پروتئینی فتوسیستم را حفظ می‌کند. حفاظت کننده‌های اسمزی از جمله گلیسین بتائین بیشتر در سیتوپلاسم انباشته می‌شوند (Reddy, 2004).

در تیمار ۷/۵ درصد بیشترین رشد مشاهده می‌شود (شکل ۱۲). افزایش معنی‌دار گلیسین بتائین در این شرایط نشان می‌دهد که گلیسرول تنها عاملی نیست که سلول دونالیلا برای تنظیم اسمزی از آن سود می‌برد. کاهش توانایی سلول دونالیلا در تولید این عامل به هر دلیلی که رخ دهد، رشد را کاهش خواهد داد.

مقدار پرولین در ۲/۵ و ۱۲/۵ درصد افزایش معنی‌داری نسبت به تیمار ۷/۵ درصد می‌یابد ($P < 0.05$). به نظر می‌رسد اگرچه سلول دونالیلا برای تنظیم اسمزی از گلیسرول استفاده می‌کند، در شرایط مناسب گلیسین بتائین نیز در این جلبک کاربرد دارد (احتمالاً برای تنظیم اسمزی). اما در شرایط تنش (به همراه کاهش سنتز گلیسین بتائین)، سنتز پرولین افزایش می‌یابد. پرولین، پایداری بعضی از آنزیم‌های سیتوپلاسمی و میتوکندریایی را بهبود می‌بخشد و حلالیت پروتئین را افزایش می‌دهد (Kazuko, 2001). بنا بر این افزایش آن، به همراه افزایش آنزیم‌های آنتی اکسیدان، با نظر Kazuko (2001) همخوانی دارد.

پذیرفته شده است که پرولین در مکانیسم‌های بردباری به تنش دخیل می‌باشد (Lutts, 1999). ظاهراً این پدیده تایید می‌کند که کمبود نمک در محیط کشت نسبت به شرایط بهینه نیز، برای جلبک دونالیلا نوعی تنش محسوب می‌گردد. سنتز پرولین تحت تنش‌های محیطی مانند خشکی، شوری بالا، دمای بالا، یخزدگی، تابش اشعه ماورا بنفش، اثرات آلودگی هوا و فلزات سنگین افزایش می‌یابد (Kazuko, 2001) با توجه به آنکه پرولین به عنوان محلول سازشی در حفظ اسمز و کاهش اسیدیت سیتوپلاسمی نقش دارد و همچنین در شرایط تنش به عنوان بخش ضروری ساختار پروتئین‌های ساختمانی دیواره سلول‌های گیاهی و پایدار کننده ماشین سنتز پروتئین‌ها محسوب می‌شود و نیز در پاکسازی رادیکال‌های آزاد و هیدروکسی رادیکال‌ها موثر است و به عنوان منبع ذخیره کننده نیتروژن و کربن (Fukutaku, 1984) به کار می‌رود، افزایش آن در شرایط غیر بهینه، احتمالاً بیانگر راهکار سلول دونالیلا برای رفع تنش می‌باشد

بیشترین مقدار رنگیزه‌های کلروفیل a (شکل ۷)، کلروفیل b (شکل ۹) و بتا کاروتن (شکل ۱۱) در تیمار بهینه دیده می‌شود. اما افزایش درصد کلروفیل b در تیمارهای غیر بهینه، نشان می‌دهد سلول برای رفع تنش اقدام به تغییر ترکیب آنتن‌های فتوسنتزی، در جهت افزایش فتوسیستم ۲ می‌نماید. حضور مقدار زیاد بتا کاروتن، می‌تواند به تعبیری، یاریگر توفیق در رفع تنش و تکثیر بیشتر باشد.

آنالیز آماری نشان داد که فعالیت کاتالازی با فعالیت اسکور بات پر اکسیدازی و پرولین در سطح معنی‌داری همبستگی مثبت نشان می‌دهد. سایر تحقیقات نشان داده است که پرولین می‌تواند صدمات ناشی از خشکی و شوری را بر غشا سلولی کاهش دهد. لازم به ذکر است که کاهش و افزایش نمک نسبت به غلظت بهینه برای دونالیلا سالینا تنش محسوب می‌گردد.

بین تغییرات پرولین و فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان نیز همبستگی مثبت مشاهده شد. این امر می‌تواند تایید کند که جلبک دونالیلا سالینا از طریق سنتز پروتئین‌های آنزیمی آنتی اکسیداتیو به مقابله با اثرات شوری و یا به عبارتی سازش با آن می‌پردازد.

در این پژوهش بین مقادیر کلروفیل a و گلیسین بتائین و بتا کاروتن همبستگی مثبت مشاهده شد. اما بین مقدار بتا کاروتن و کلروفیل a همبستگی منفی مشاهده شد. این نتیجه در سایر مطالعات نیز دیده شده است (Nikookar, 2004). می‌توان گفت در شرایط غیر بهینه آنتن‌های فتوسنتزی در این جلبک ترکیب متفاوتی پیدا می‌کند (افزایش مقدار کلروفیل b نسبت به کلروفیل a).

منابع

- حسینی ز. و ساطعی، آ. ۱۳۸۵. تغییرات رشد، برون ریزش آمونیم، فعالیت نیترات ردوکتازی و محتوای رنگیزه‌های فتوسنتزی در جلبک دونالیلا سالینا، تحت تاثیر شوری، نور ممتدو تناوب نور، پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرگان.
- Arrigoni, 1992. Ascorbate system in plant development J. Bionergy. Biomember., 26:407-409.
- Ben-Amotz, A., Gressel, J. & Avron, M. 1987. Massive accumulation of phytoene induced by norflurozon in *Dunaliella bardawil* (Chlorophyceae) prevents recovery from photoinhibition. Journal of Phycology, 23:176-181.
- Bates, I. S., Walderen, R. P. & Trear, I.D. 1973. Rapid determination of free proline in water stress. Studies Plant of Soil, 34:205-207.
- Chance, B. & Maehley, A. 1955. Assay of Catalases and Peroxidases. Meth. Enzymol., 2: 764.
- Fisher, M., Pick, U. & Zamir, A. 1994. A salt-induced 60-kilodalton plasma membrane protein plays a potential role in the extreme halotolerance of the alga *Dunaliella*. Plant Physiol., 106:1359-1365.
- Fukutaku, Y. & Yamada, Y. 1984. Sources of proline nitrogen in water-stressed soybean (*Glycine max*). II. Fate of ^{15}N -labelled protein. Physiol. Plant., 61:622-628.
- Ginannoto, C.N. & Ries, S.K. 1977. Superoxid dismutase: II. Purification and quantitative relationship with water-soluble protein in seedlings. Plant Physiol., 95:315-318.
- Jahnkel, L., S. & White, A. L. 2004. Long term hypo saline and hyper saline stresses produce distinct antioxidant responses in the marine alga *Dunaliella salina*, J. of Plant Physiol., 160: 1193-1202.
- Jensen, A. 1978. Chlorophyll and carotenoid: Hand book of physiological and biochemical method. Cambridge Univ. Press.
- Jin, E., Jurgen, E. W., Polle, Hong Kum L., Sang Min H. & Man C. 2003. Xanthophylls in microalgae: From biosynthesis to biotechnological mass production and application. J. Microbiol. Biotechnol., 13(2): 165-174.
- Johnson, M. K., Johnson, E. J., Mac Elory, R.D., speer, H.L. & Bruff, B.S. 1968. Effects of salt on the hemophilic alga *Dunaliella viridis*. J. Bacteriol., 95: 1461-1468.

- Katz, A. & Pick U. 2001. Plasma membrane electron transport coupled to Na⁺ extrusion in the halotolerant alga *Dunaliella*. *Biochim Biophys. Acta*, 150: 23-31.
- Kazuko, Y.S. 2001. Biological function of proline in osmotolerance revealed in Antisense transgenic plants. *J. IRCAS, New Letter*, 27: 32-45.
- Koroi, S. A. A. 1989. Gel elektrophoresis und Spektrometrie unter Einfluss der Temperatur auf Struktur und Aktivität der Amylase und Peroxidase Isoenzyme. *Physiol. Veg.*, 20: 15-23.
- Lutts, S., Majerus, V. & Kinet, J. M. 1999. NaCl effect on proline metabolism in rice (*Oryza sativa*) seedlings. *Physiologia Plantarum*, 105: 450-458.
- Nikokar, K., Moradshahi, A. & Kharati, M. 2004. Influence of salinity on the growth, pigmentation and ascorbate peroxidase activity of *Dunaliella salina*, *Iranian Journal of Technology*, 28: 48-56.
- Richmond, A. 1986. Handbook of microalgae mass culture. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.
- Sairam, R. L., Rao, K.V. & Srivastava, G. C. 2002. Differential response of wheat genotypes to long term salinity stress in relation to oxidative stress, antioxidant activity and osmolyte concentration. *Plant Sci.*, 163: 1037-1049.
- William, W.P., Brain, A.P.R. & Dominy, P.J. 1992. Induction of non-bilayer lipid phase separation in chloroplast thylakoid membranes by compatible solutes and its relation to the thermal stability of photosystem II. *Biochem. Biophys. Acta.*, 1099: 137-141.