مقایسه اثرات محلول‌های ایزواسموتیک (پلی اتیلن گلیکول، اتیلن گلیکول، سوکروز، مانیتول، نمک طعام و گلیسرول) بر رشد و مورفولوژی *Dunaliella salina*

افضل سادات برهانی سبزوار*[1]، مه لقا قربانلی[2] و آرین ساطعی[13]

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

تاریخ دریافت: ۹۰/۲/۳۱ تاریخ پذیرش: ۹۰/۱۱/۳۰

چکیده

در پژوهش حاضر، تأثیر محیط کشت جانسون(بدون نمک) و محیط کشت‌های ایزو اسموتیک مختلف بر رشد (نقسیم سلولی و وزن تر) و مورفولوژی سلول دونالیلا سالینا مورد بررسی قرار گرفت. فشار اسمزی معادل فشار اسمزی محلول‌های ۲/۵ و ۷/۵ و ۱۲/۵ درصد نمک طعام، با ترکیبات مختلف شامل پلی اتیلن گلیکول، اتیلن گلیکول، سوکروز، مانیتول، نمک طعام و گلیسرول بر پایه محیط کشت جانسون تهیه شد. درصدهای مختلف پلی اتیلن گلیکول و نسبت‌های مختلف نمک طعام و پلی اتیلن گلیکول نیز از جمله تیمارها بودند. سویه جلبک مورد آزمایش از آزمایشگاه تحقیقات گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی شهید بهشتی تهیه و در ارلن‌های ۲۵۰ میلی لیتری در ۱۰۰ میلی لیتر محیط کشت، کشت داده شد. شرایط کشت در آزمایشگاه با ایجاد محیط کشت استریل، شدت نور ۵۰۰۰ لوکس، دمای۲ ± ۲۵ و هوادهی روزانه یک ساعت فراهم شد. آزمایش پس از سازگاری جلبک به مدت ۱۲ روز ادامه یافته و هر روز بررسی و شمارش سلولی انجام شد. نتایج بررسی رشد، در این تیمارها نشان داد که رشد بهینه در تیمار ۷/۵ درصد نمک اتفاق افتاد و دور شدن از غلظت بهینه نمک، سبب کاهش معنی‌داری در رشد گردید($P<۰/۰۵$) اما وزن یک سلول در تیمار ۷/۵ درصد نمک طعام، کاهش معنی‌داری نسبت به دو تیمار دیگر داشت ($P<۰/۰۵$)، این امر به دلیل تقسیمات سلولی فراوان قابل انتظار بود. نتایج نشان داد که در محیط کشت جانسون بدون نمک و محیط‌های ایزو اسموتیک غیر نمکی، سویه مورد آزمایش قادر به خوگیری نبوده و اثر تیمار پس از ایجاد تغییرات مورفولوژیک در سلول جلبک دونالیلا سالینا، به مرگ آن منجرشد. این تغییرات در محیط پلی اتیلن گلیکول و اتیلن گلیکول شدیدتر و سریعتر از سایر تیمارها رخ داد. در تیمار گلیسرول، به ویژه در تیمار ایزواسموتیک با محیط نمک طعام ۷/۵ درصد، تغییرات مورفولوژیک ناچیز بوده و مرگ سلولی بسیار با تأ خیر اتفاق افتاد. اما دراین تیمار هم جلبک قادر به تکثیر نبود. نتایج گویای این حقیقت است که محیط واجد نمک نه تنها شرایط اسمزی مناسب جلبک دونالیلا سالینا را فراهم می‌سازد بلکه محیط یونی مناسبی برای فرایندهای زیستی لازم در این جلبک را نیز ایجاد می‌کند.

واژگان کلیدی

ایزواسموتیک،دونالیلا سالینا، مورفولوژی،

* نگارنده پاسخگو Afzalborhani@ yahoo.com

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

دونالیلا سالینا یک جلبک نمک دوست است، که خصوصا در دریاهای شور وزمین‌های تبخیر نمک دیده می‌شود. این جلبک متحرک، تک سلولی،معمولا گرد(rod shaped)، با ابعاد (۹ـ۱۱میکرومتر)، سبز از (کلروفیسه) که در آب اقیانوس‌ها شناخته شده است،کلنی یا زنجیره تشکیل نمی دهد وتقریبا به سادگی کشت می‌شود. دیواره سلولی ندارد، بلکه تنها یک غشاء پلاسمایی نازک دارد(Pick, 1998). دونالیلا یوکاریوت وفتوسنتز کننده است ومی تواند در شرایط مناسب بتاکاروتن را در سطح وسیعی در خود جمع کند (Ben Amotz *et al*., 1987). این ماده ارزشمند در طیف وسیعی از صنایع غذایی، ارایشی پزشکی و بهداشتی کاربرد دارد. دونالیلا شباهت زیادی به کلامیدوموناس دارد.شکل سلول در گونه‌های مختلف متفاوت است: بیضی، تخم مرغی، استونه‌ای، گلابی، مخروطی و گرد، دارای تقارن شعاعی، دوجانبی واندکی نامتقارن است. دراغلب گونه‌ها بسته به تغییر شرایط محیط شکل سلول تغییر می‌کند.گاهی تحت شرایط خاصی به شکل کروی در می‌آید (Riisgard,1981). جلبک سبزدونالیلا متعلق به کلروفیتا (Ben Amotz *et al*.,1987) بوده و در خانواده *Dunaliellaceae* و راسته دونالیلالز *Dunaliellales* قرار داده شده است.

شکل ۱ـ دو شکل متفاوت دونالیلا در دو محیط با فشار اسمزی بالا(سمت راست) و پایین(سمت چپ)

جلبک دونالیلا با اندازه ۱۰ـ۱۲ میکرومتر، دارای دو تاژک است که بـه شـکل راسـی بـه آن متـصل اسـت(شـکل ۱) (Musjuk & Redceko, 1973). ساختاردستگاه حرکتی جلبکی در دونالیلا بسیار پیچیـده اسـت و نـوع آن ماننـد دیگـر کلروفیسه‌ها است (Melkonian,1989).

Labbe (۱۹۲۱ و ۱۹۲۲) اثر شدت نور، دما و اسیدیته آب را بر این جلبک بررسی نمود. اما سالها پس از ان دانشمندان توانستند بر اساس توالی ژن 18srRNA بین گونه‌های *D.salina* ,*D.parva* ,*D.bardawil* به عنوان گونه‌های واجد یک، دو، و سه اینترون تمایز قایل شوند (Olmos *et al*., 2000).

پیش از این، اثر شرایط مختلف بر میزان برون ریزش آمونیوم در جلبک دونالیلا مورد بررسی قرار گرفته بود (ساطعی و حسینی، ۱۳۸۵). همچنین استفاده از سرعت حرکت دونالیلای دوتاژکی (*Dunaliella bioculta*) به عنوان یک روش مناسب جایگزین برای تعیین آلودگی آب ارائه شده است (Sushi *et al*., 1993). پیش از آن نیز این جلبک برای آنالیز اثرات سمی فاز گازی دود سیگار مورد استفاده قرار گرفته است. علاوه بر ان استفاده گسترده از این جلبک در صنایع آرایشی و پزشکی و بهداشتی اهمیت تحقیق در مورد این جلبک را اشکار می‌سازد. بنابراین در پژوهش جاری اثرات محیط‌های اسموتیک مختلف بر تکثیر و مورفولوژی این جلبک مورد نظر قرار دارد.

Archive of SID

www.SID.ir

مواد وروش‌ها

برای کشت جلبک دونالیلا در تیمارهای اسمزی متفاوت وبررسی رشد و تغییرات آنزیمی جلبک در این تیمار از مقدمات و روش‌های زیر استفاده شد. اتاق کشت برای ریزجلبک‌ها متناسب با نوع جلبک و امکانات در دسترس طراحی گردید.

در تحقیق حاضر، قفسه‌ها در یک اتاق به دیوارها عمود شدند. فاصله طبقات ۳۰ سانتی‌متر تنظیم شد.۲۰۰ میلی لیتر محلول کشت حاوی مقدار معین جلبک در ارلن ۲۵۰ میلی لیتری وبرای هر تیمار سه تکرار در فواصل یکسان از منبع نوری قرار گرفت. هوادهی کشت‌ها، روزانه یک ساعت و معمولا، صبح‌ها انجام شد. نوردهی در هر طبقه با لامپ‌های فلور سنت فراهم وزمان نوردهی به وسیله دستگاه تنظیم کننده در ۲۰ ساعت تاریکی و ۴ ساعت نوردهی (با شدت ۵۰۰۰ لوکس) تنظیم شد. دمای اتاق کشت بین ۲۷ـ۲۵ درجه سانتی‌گراد تنظیم گردید. محیط کشت طبق روش جانسون (Johnson *et al.* , 1986) ساخته شد. اسیدیته محیط در حد ۷/۵ تنظیم گردید.

شمارش و بررسی میکروسکوپی جلبک‌ها با میکروسکوپ اولمپوس بطور روزانه در مدت ۱۲ روز،هر صبح بلا فاصله پس از تلقیح جلبک‌ها اغاز و تا ۱۲ روز تکرار شد. برای شمارش سلول‌ها از لام نئوبار استفاده گردید.

شمارش درصد سلول‌های زنده با توجه به شمارش سلول‌های دارای غشاء سالم و متحرک و با در نظر گرفتن کل سلول‌های جلبک در محیط شمارش(لام نئوبار) انجام شد.

حجم معینی از محیط واجد جلبک را سانتریفوژ کرده و رسوب توزین گردید (با در دست داشتن تفاضل وزن لوله خالی و لوله واجد رسوب). محاسبه وزن تر با در نظر گرفتن تناسب بین تعداد سلول جلبک شمارش شده و وزن کل انجام شد.

تهیه محلول‌های لازم برای تیمارهای اسمزی شامل نمک طعام، پلی‌اتیلن گلیکول، مانیتول، اتیلن گلیکول، گلیسرول و سوکروز

محیط کشت نمک طعام با استفاده از محلول غذایی جانسون و اضافه کردن مقادیر صفر، ۲/۵ و۷/۵ درصد نمک طعام استریل شده در اتوکلاو۲۰۰ درجه به مدت ۲۰ دقیقه ساخته شد و فشار اسمزی حاصل از آن به ترتیب صفر، ۲۰/۴۶ و ۶۱/۴ اتمسفر بود. تیمارهای اسمزی متفاوت با غلظت‌های مختلف مواد مورد نظر با توجه به جرم ملکولی آنها و رابطه بین فشار اسمزی و مقدار ماده به شرح زیر تهیه گردید.فشار اسمزی حاصل از نمک در تیمارهای نمکی ۲/۵ و ۷/۵ درصد(ویا مانیتول و سوکروز) برای ساخت محلول‌های با فشار اسمزی مشابه ملاک عمل قرار گرفت.فشار اسمزی ناشی ازانحلال نمک در یک محلول از فرمول زیر محاسبه گردید.

$\pi = nicRT$

n=۲ (تعداد یون) i=درجه یونیزاسیون(۰،۹۸)، c=مولاریته، R= ثابت گازها، T= درجه حرارت (کلوین)

مقدار پلی اتیلن گلیکول (PEG) لازم برای تهیه محلول‌های ایزو اسموتیک از رابطه بین درصد وزنی و فشار اسمزی برای پلی اتیلن گلیکول ۶۰۰۰ محاسبه شد:

با توجه به رابطه درصد وزنی پلی اتیلن گلیکول و فشار اسمزی حاصل از ان برای محلول پلی اتیلن گلیکول (Michel & Khaufman,1973)، برای تهیه فشار اسمزی معادل ۲/۵ درصد نمک، مقدار ۳۴/۰۴۲درصد و برای محلول پلی اتیلن گلیکول با فشار اسمزی معادل ۷/۵درصد نمک، مقدار۴۷ درصد پلی اتیلن گلیکول محاسبه شد. بطور مثال اول فشار اسمزی محلول نمک طعام ۷/۵ درصد از رابطهnciRT محاسبه شد. سپس با قرار دادن این فشار در رابطه بین فشار اسمزی و درصدوزنی پلی اتیلن گلیکول (۶۰۰۰)، درصد پلی اتیلن گلیکول لازم برای ایجاد فشار اسمزی مشابه بدست آمد (جدول ۱).

Archive of SID

www.SID.ir

جدول۱ـ مقدار لگاریتم فشار حاصل از درصدهای متفاوت پلی اتیلن گلیکول

پلی اتیلن گلیکول ـ جرم ملکولی ۶۰۰۰	
log P (dynes/cm^2)	درصد وزنی
۶/۲۳	۱۰
۶/۵۱	۱۵
۶/۷۹	۲۰
۷/۰۲	۲۵
۷/۲۳	۳۰
۷/۴۳	۳۵

رابطه بین فشار اسمزی و درصدوزنی پلی اتیلن گلیکول (۶۰۰۰)

$\log P = a + b \times (wt\%) \wedge c$

$p=nciRT$

p = فشار اسمزی مورد نظر

a = ۵/۱۲, b = ۰/۲۸ , c = ۰/۵۹

wt%= درصد وزنی پلی اتیلن گلیکول لازم برای ایجاد فشار اسمزی مورد نظر

جهت تهیه محیط کشت گلیسرول از گلیسرول محلولی۹۷ درصد استفاده شد. بنابر این برای ساخت محیط با فشارهای اسمزی مورد نظرباید علاوه بر درجه یونیزاسیون و جرم ملکولی، به درجه خلوص آن نیز توجه گردد (M=۹۲/۰۹۳۸۲). در این پژوهش چندین تیمار متفاوت به کار برده شد. در هر کدام از تیمارها عامل مورد نظر متغیر و بقیه عوامل محیطی ثابت نگاه داشته شدند، تا اثر تیمار بطور جداگانه مورد بررسی قرار گیرد.

تهیه تیمارهای اسمزی متغیر (که عامل مولد فشار اسمزی معادل در آنها نسبت‌های متفاوت نمک طعام و پلی اتیلن گلیکول می‌باشد.

این محلول‌ها با استفاده از محیط پایه جانسون با نسبت‌های اسمزی جدول تهیه شد. جدول۲ درصد وزنی PEG و NaCl مورد نیاز برای ساخت این محیط‌ها را نشان می‌دهد.

جدول ۲ـ نسبت فشار اسمزی حاصل از PEG و NaCl

فشار اسمزی حاصل از PEG (اتمسفر)	فشار اسمزی حاصل از NaCl (اتمسفر)
۰	۶۱/۵
۶۱/۵× ۰/۱	۶۱/۵× ۰/۹
۶۱/۵× ۰/۵	۶۱/۵× ۰/۵
۶۱/۵× ۰/۹	۶۱/۵×۰/۱
۰	۶۱/۵× ۰/۹
۰	۶۱/۵×۰/۵
۰	۶۱/۵× ۰/۱

Archive of SID

www.SID.ir

با توجه به فشار اسمزی لازم،در صدهای نمک طعام و پلی اتیلن گلیکول در محلول‌های فوق محاسبه وتهیه شد (فشاراسمزی معادل۵/ ۶۱ اتمسفر با نسبت‌های متفاوت از نمک طعام و پلی اتیلن گلیکول متناسب با جدول ۳ تأمین شد).

جدول ۳ـ درصد وزنی PEG و NaCl برای تهیه محیط توام PEG و نمک طعام

شماره محلول	ترکیب مواد (درصد وزنی)	
۱	NaCl%	PEG%
۲	۷/۵۰	۰
۳	۶/۷۵	۲۰/۶۸
۴	۳/۷۵	۳۳/۴۰
۵	/۷۵	۴۴/۵۰
۶	۶/۷۵	۰
۷	۳/۷۵	۰
۸	۰/۷۵	۰

شمارش سلولی توسط لام نئوبار در تیمارهایی انجام شد که به جلبک اجازه تکثیر داد. سپس با درنظر گرفتن حجم محلول موجود در هر واحد لام، شمارش تعداد جلبک در واحد حجم محیط کشت انجام گردید. بررسی جلبک و شمارش سلولی به طور روزانه در مدت دوازده روز در طی تیمار دهی به وسیله میکروسکوپ نوری دو چشمی(اولمپوس)، انجام شد(حسینی و ساطعی،۱۳۸۵).

نتایج حاصل از سنجش مقادیر مختلف با در نظر گرفتن ۳ تکرار برای هر مورد محاسبه و به صورت میانگین و انحراف معیار معرفی شدند. نتاج رشد تنها در تیمارهایی که تکثیر جلبک در آنها رخ داد مورد بررسی آماری قرار گرفت. آزمون آنالیز واریانس (ANOVA) و همبستگی با استفاده از نرم افزار SPSS در سطح اطمینان ۰/۰۵ انجام شدند و برای رسم نمودارها از نرم افزار EXCEL استفاده شد.

نتایج

اثر محیط کشت جانسون (بدون نمک) برجلبک دونالیلا

واکنش سلول‌ها به محیط کشت با تغییر در غشاء سلولی آغاز شد. سلول‌ها در ساعت اول تلقیح، متورم و کروی شده و تاژک خود را از دست داده و پس از مدت کوتاهی می‌ترکیدند. تنها یک تا دو سلول در محوطه دید، زنده بنظر می‌رسید. بنا براین شمارش تعداد سلول به طور روزانه و سنجش‌های پس از ان به منظور بررسی رشد میسر نشد.

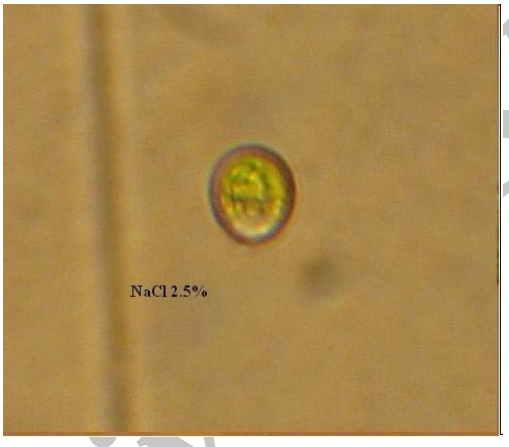
اثر محیط‌های ایزو اسموتیک بر رشد جلبک دونالیلا (مانیتول ـ سوکروز ـ اتیلن گلیکول و پلی‌اتیلن گلیکول)

در این محیط‌ها سلول‌ها به محض ورود به محیط جدید تحرک خود را ازدست دادند.تاژک‌ها ناپدید شده و سلول‌ها ثابت شدند مشاهدات میکروسکوپ نوری به خوبی نتایج فوق را نشان داد (شکل۵). پس از مدت ۱۲ ساعت خوگیری، نه تنها سلول‌ها تحرک خود را باز نیافتند، بلکه تعداد زیادی با مرگ سلولی مواجه شدند (شکل ۸). بنا براین شمارش تعدادسلول بطور روزانه و سنجش‌های پس از ان به منظور بررسی رشد میسر نشد.

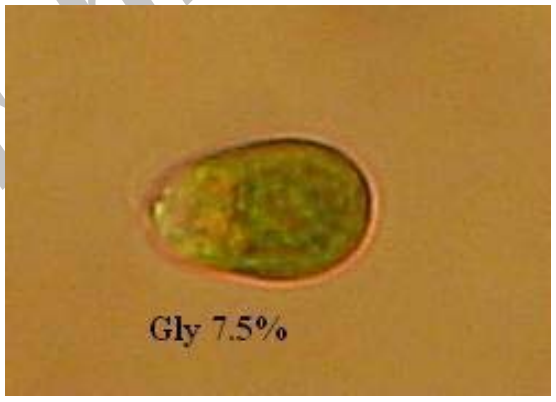
Archive of SID

www.SID.ir

شکل ۱ـ سلول‌های سالم و متحرک دونالیلا (در تیمار ۷/۵ درصد نمک طعام)



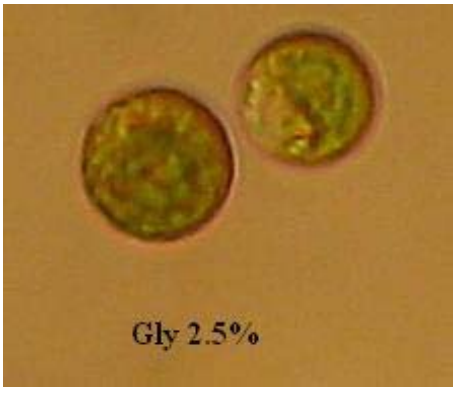
شکل ۲ـ سلول‌های دونالیلا در تیمار ۲/۵درصد نمک طعام



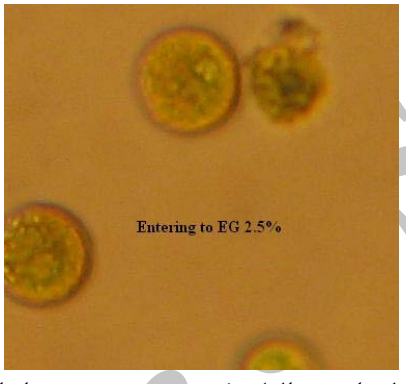
شکل ۳ـ سلول‌های دونالیلا در تیمار ۷/۵ درصد گلیسرول

Archive of SID

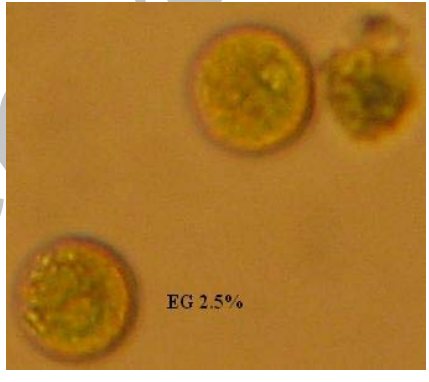
www.SID.ir



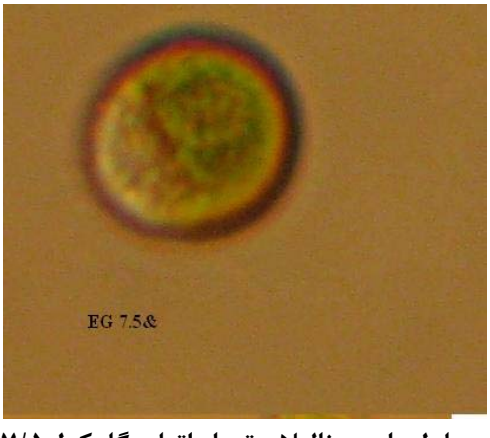
شکل۴ـ سلول‌های دونالیلا در تیمار۲/۵درصد گلیسرول



شکل۵ـ تغییر شکل سلول‌های دونالیلا (در بدو ورود به تیمار اتیلن گلیکول۲/۵درصد)



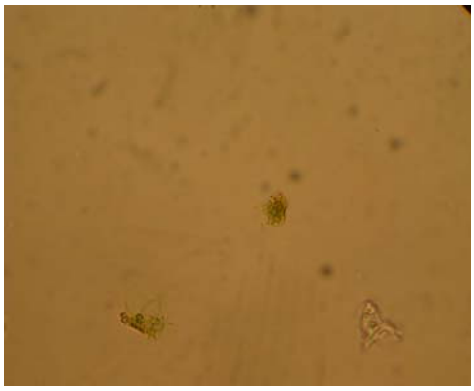
شکل ۶ـ تغییر شکل سلول‌های دونالیلا(در تیمار۲/۵ درصداتیلن گلیکول)



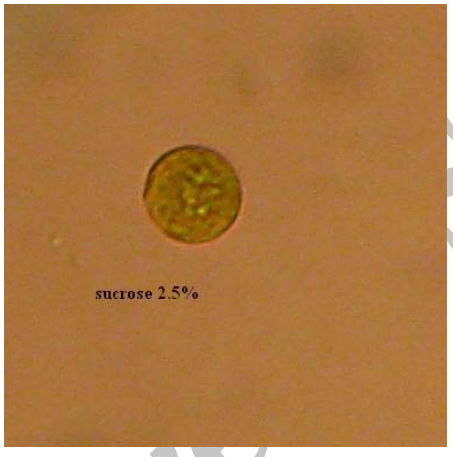
شکل۷ـ سلول‌های دونالیلادر تیمار اتیلن گلیکول۷/۵ درصد

Archive of SID

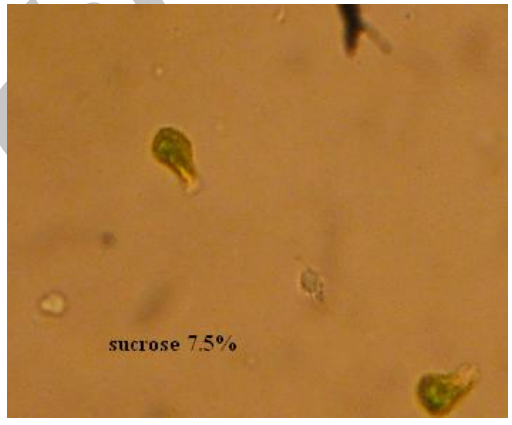
www.SID.ir



شکل ۸ـ مرگ و تلاشی سلول‌هادر تیمار اتیلن گلیکول۷/۵درصددر تیمار اتیلن گلیکول۷/۵ درصد



شکل۹ـ سلول‌های دونالیلا در تیمار۲/۵ درصد سوکروز



شکل۱۰ـ سلول‌های دونالیلا در تیمار۷/۵ درصد سوکروز

اثر محیط پلی اتیلن گلیکول (PEG)

در محیط ایزواسموتیک با تیمار نمک۲/۵ درصد (۳۴درصد) تقریباً تمامی سلول‌ها تغییر شکل داده ومرده بنظر می‌رسید. در محیط ایزو ایزواسموتیک با تیمار نمک ۷/۵ درصد (۴۷درصد) چند سلول زنده ماندند، اما مشاهده سلول‌ها در زیر میکروسکوپ نوری، نشان داد که شکل سلول‌ها تغییر یافته است. اما به سبب عدم تکثیر سلولی، شمارش تعدادسلول‌ها بطور روزانه و سنجش‌های پس از ان به منظور بررسی رشد میسر نشد.

www.SID.ir

اثر محلول‌های ایزو اسموتیک مانیتول

جلبک پس از تلقیح، در زیر میکروسکوپ نوری، زنده و دارای تحرک بود.جلبک‌ها پس از ۱۲ ساعت،در هر دو تیمار، قادر به خوگیری نبوده و همه سلول‌ها بدون تحرک و مرده به نظر می‌رسید. بنا براین شمارش تعدادسلول بطور روزانه و سنجش‌های پس از ان به منظور بررسی رشد، میسر نشد.

اثر محلول‌های ایزو اسموتیک سوکروز

مانند محلول‌های ایزو اسموتیک فوق، تکثیری در جلبک مشاهده نشد. مشاهدات میکروسکوپی، بیانگر نتایج زیر در مورد دو تیمارایزو اسموتیک با نمک ۲/۵و۷/۵ درصد تا ۴۸ ساعت پس از تلقیح بود:

پس از ۱۲ ساعت در محلول‌های ایزو اسموتیک با نمک ۲/۵ درصد حدود ۲درصد سلول‌ها زنده وکمی متحرک بودند. بقیه سلول‌ها تغییر شکل دادند. در محلول‌های ایزو اسموتیک با نمک۷/۵ درصد، حدود ۸ درصد سلول‌ها زنده و متحرک بوده و بقیه تغییر شکل دادند.به نظر می‌رسید رنگ سبز سلول‌ها به قهوه‌ای گراییده است(شکل ۱۰).

اثر محلول‌های ایزو اسموتیک گلیسرول

سلول‌های سویه مورد آزمایش تلقیح شده به محیط‌های گلیسرول ایزو اسموتیک، در هیچ تیماری تکثیر نشدند. مشاهده میکروسکوپی جلبک‌های تلقیح شده، نتایج زیر را نشان داد.

مشاهده پس از ۱۲ ساعت: در تیمار اول(ایزو اسموتیک با تیمار ۲/۵ ٪ نمک):سلول‌ها کروی و غالبا غیر متحرک شده و بدون تاژک بودند. در تیمار دوم(ایزو اسموتیک با تیمار ۷/۵درصدنمک):حدود ۱۵ درصدسلول‌ها زنده ماندند و شکل طبیعی خود را حفظ کرده بودند. مشاهده پس از ۲۴ ساعت: در هردو تیمار حدود ۴درصد سلول‌ها زنده بوده و بقیه تغییر شکل دادند (در تیمار اول تغییر شکل سلول‌ها بیشتر بود).

مشاهده در ساعات بعد: پس از ۷۲ ساعت سلول زنده و متحرکی در تیمار اول مشاهده نمی شود و سلول‌ها به شدت دچار تغییر شکل شدند، اما در تیمار دوم میزان تغییر شکل کمتر بوده و حدود یک درصد سلول‌ها هنوز زنده و متحرک بودند.

نتایج کشت در محیط‌های اسمزی مختلف

کشت در چهار تیمار اول در محیط‌های ایزواسموتیک با تیمار نمکی۷/۵ درصدانجام شد که با نسبت‌های متفاوت PEG و نمک طعام تهیه شدند. درسه تیمارآخردرصدهای مختلف نمک به محیط جانسون اضافه شد.

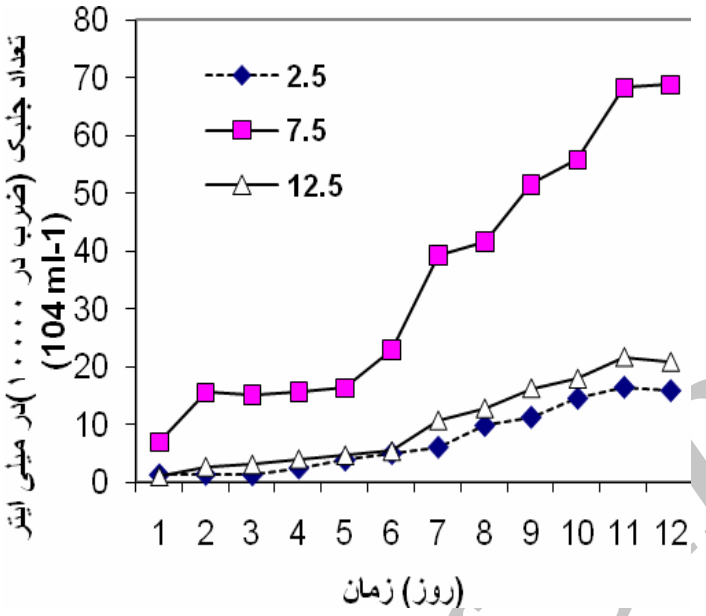
جدول شماره۴ـ نتایج کشت جلبک در محیط‌های با فشار اسمزی مختلف(مانند محلول کشت با ۷/۵ درصد نمک طعام) حاصل از نسبت‌های متفاوت نمک طعام و PEG

شرح	ترکیب محیط کشت	
نتایج رشد	PEG%	NaCl%
رشد بهینه	۰	۷/۵۰
عدم تکثیر(مرگ سلولی)	۲۰/۶۸	۶/۷۵
عدم تکثیر(مرگ سلولی)	۳۳/۴۰	۳/۷۵
عدم تکثیر(مرگ سلولی)	۴۴/۵۰	۰/۷۵
مشاهده تکتیر	۰	۶/۷۵
مشاهده تکتیر	۰	۳/۷۵
عدم تکثیر(مرگ سلولی)	۰	۰/۷۵

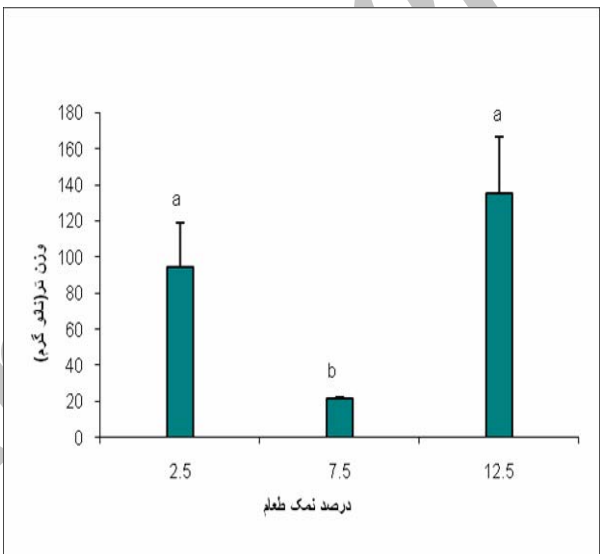
Archive of SID

www.SID.ir

مقایسه اثر تیمارهای نمکی بر رشد (تقسیم سلول و وزن سلول)



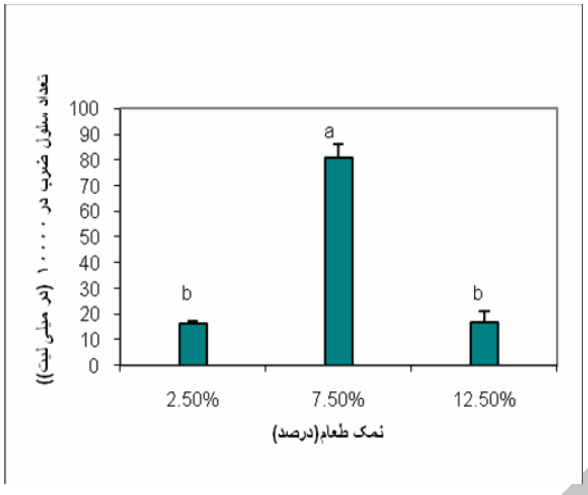
شکل ۱۱ـ مقایسه منحنی رشد جلبک در فاز لگاریتمی در سه تیمار۲/۵ و۷/۵ و ۱۲/ ۵ درصد نمک طعام



شکل ۱۲ـ نمودار ستونی اثر تیمارهای ۲/۵ و۷/۵ و ۱۲/ ۵ درصد نمک بر وزن تر یک سلول جلبک (نانوگرم)

اثر تیمار درصدهای مختلف نمک طعام بر وزن تر سلول جلبک دونالیلا سالینا معنی‌دار ($P<0/05$) بود.وزن تر سلول جلبک در تیمار۲/۵ و ۱۲/ ۵ درصد بیشتر ۷/۵ درصد نمک بوده و این تفاوت معنی‌دار ($P<0/05$) بود.

www.SID.ir



شکل ۱۳ـ مقایسه رشد میانگین در سه نیمار ۲/۵ و۷/۵ و ۵/ ۱۲ درصد نمک، در دوازده روز شمارش در سه تیمار مختلف نمکی.

اثر تیمار غلظت‌های مختلف نمک بر رشد در تیمار فوق معنی‌دار بود. این رشد در مدت ۱۲ روز در تیمار ۷/۵ درصد نمک طعام تفاوت معنی‌داری با رشد این جلبک درتیمارهای ۲/۵ و ۵/ ۱۲درصد داشت. رشد بهینه در تیمار ۷/۵٪ مشاهده می‌شد.

بحث و نتیجه‌گیری

اثر تیمارهای مختلف بر رشد و مورفولوژی سلول‌های دونالیلا

نتایج بررسی رشد در تیمارهای ایزو اسموتیک پلی اتیلن گلیکول و اتیلن گلیکول نشان داد که سلول‌ها قادر به خوگیری به این تیمار نبودند. سلول‌های دونالیلا فاقد دیواره سخت سلولی بوده و فقط با یک غشاء سلولی احاطه شده اند. در نتیجه مورفولوژی سلول شدیدا تحت تاثیر تغییرات اسمزی قرار می‌گیرد (Avron ,1992). بنا براین واکنش سلول‌ها به محیط کشت با تغییر در غشاء سلولی آغاز شد (Cowan *et al.*,1992). اما سلول‌ها نتوانستند با فعال‌سازی سیستم‌های مقاومتی، به مقابله با تنش بپردازند. به نظر می‌رسد PEG دارای اثرات سمی بر سلول‌های جلبک بوده و سلول‌ها ی این سویه قادر به بازیابی قدرت تحرک وحیات، در این محلول با شرایط حاکم بر این تجربه نبودند. در تحقیق Gilmour بیان شده بود که جلبک در پاسخ به افزایش سوکروز و نمک‌های NaCl و KCl و نه اتیلن گلیکول،گلیسرول سنتز می‌کند (Gilmour *et al.*, 1984). بنا بر این عدم خوگیری این سویه از جلبک با نتایج وی در مورد *Dunaliella tertiolecta* مطابقت دارد. اما با توجه به عدم خوگیری، علاوه بر عدم سنتز گلیسرول، چند احتمال مفروض است.

یک احتمال این است که PEG آسیب‌هایی به سلول وارد می‌کند که این آسیب‌ها بیان ژن‌های مربوط به تنظیم اسمزی، پیش از مرگ سلول، را مانع می‌شود. با توجه به نتیجه زنده ماندن سلول‌ها در محیط ایزو اسموتیک گلیسرول، این فرضیه را نمی توان نادیده گرفت. عدم رشد و تکثیر جلبک در محیط‌های توأم PEG و نمک، نشان می‌دهد که پذیرش اثرات سمی PEG، قابل تأمل است. حال آنکه این سویه جلبک قادراست در محیط‌های با فشارهای اسمزی متفاوت، که با نمک تأمین می‌شود، رشد نموده و تکثیر گردد.

فرضیه بعد این است که به دلیل ویسکوزیته زیاد محلول PEG، سلول‌ها قدرت تحرک، تغذیه و متابولیسم طبیعی خود را از دست داده، قادر به رشد و تکثیر نبودند. با مقایسه تفاوت قابل ملاحظه ویسکوزیته محلول‌های ایزواسموتیک نمک و PEG این امر، بسیار محتمل می‌باشد.

Archive of SID

www.SID.ir

اما فرضیه بعدی، که مطابقت بیشتری با مطالعات دانشمندان دارد، این است که حضور نمک برای القا بیان ژن‌های مقاومت به استرس، مثل بیان ژن مربوط به پروتئین P60 و نیز برای همبری آنیون‌ها ضروری است. آنها عنوان می‌کنند که سلول انتقال یافته از محیط نمکی به محیط ایزو اسموتیک دیگری مثل گلیسرول، پس از افزایش پروتئین P60 سلول رشد را از سر می‌گیرد (Fisher et al., 1998). با توجه به پیچیدگی و اندر کنش عوامل بسیار زیاد درونی و بیرونی مؤثر بر واکنش جلبک، نسبت به یک عامل، سایر احتمالات را نمی توان نادیده گرفت.

بنا بر این در عدم حضور نمک، حتی اگر فشار اسمزی توسط گلیسرول تامین گردد، سلول‌ها به دلیلی غیر از ناتوانی در تنظیم اسمزی (مانند موارد فوق)، دچار بحران شده و سرانجام می‌میرند. مرگ سلول‌ها در محیط گلیسرول احتمالاً می‌تواند تأییدی بر این مورد باشد.

چنانکه از مطالعات اخیر بر می‌آید، تنظیم اسمزی مناسب، تنها یکی از جنبه‌های نیاز این جلبک، در مواجهه با محیط‌های شور است، که گلیسرول در آن نقش اساسی ایفا می‌کند. خوگیری به شرایط اسمزی که با ماده‌ای غیر از نمک، ایجاد شده است، به بیان ژن‌هایی نیاز دارد که با یون سدیم القا می‌شوند.از جمله آنها، بیان ژن P60 می‌باشد که با شوری بالا القا می‌شود و زمانی که این پروتئین ساخته نشود، جلبک قادر به بازیابی قدرت تحرک و خوگیری با محیط جدید نخواهد بود (Fisher *et al.*,1994).

اثرات تیمارها روی رشد دونالیلا

نتایج بررسی رشد در تیمارهای ایزو اسموتیک سوکروز و مانیتول و گلیسرول نشان میداد که سلول‌ها در این تیمارها تا مدتی به تحرک و حیات خود ادامه دادند. این امر به دلیل ویسکوزیته کمتر این محلول‌ها قابل توجیه است. در ضمن این محلول‌ها اثرات احتمالاً سمی PEG و اتیلن گلیکول را ندارند. باز هم احتمالاً، به دلایلی که در مورد PEG صادق بود، سلول‌ها قادر به از سرگیری تحرک و تکثیر خود نبوده اند.

بررسی میکروسکوپی همچنین نشان داد که رنگ سبز سلول‌ها پیش از مرگ، در محلول سوکروز، به قهوه‌ای گراییده است. این امر مبین تغییر ترکیب رنگدانه ای، در جلبک مواجه با تنشی است که ممکن است، در نتیجه عدم توازن در تبادلات یونی (در رابطه با فقدان حضور یون سدیم در غلظت بهینه) به وجود آمده باشد. جذب هردو آنیون سولفات و فسفات شدیداً به یون‌های سدیم نیاز دارد(Meira *et al.*,2001).

بررسی نتایج رشد جلبک نشان داد که میزان رشد روزانه (تقریبا از روز سوم) به طور کاملا روشنی در تیمار۷/۵ درصد نسبت به دوتیمار دیگر افزایش معنی دار ($P<۰/۰۵$) دارد. چنانچه تحقیقات قبلی (حسینی و ساطعی، ۱۳۸۵) نیز نشان داده بودند که این غلظت از نمک شرایط بهینه‌ای برای رشد جلبک فراهم می‌کند.در این شرایط تقسیمات سلولی به خوبی در فاز لگاریتمی اتفاق می‌افتد.

وزن تر سلول

این پارامتر در ۱۲/۵ درصد نمک طعام بیشترین مقدار را داشت و در۷/۵ درصد، کمترین مقدار بود و این تفاوت درتیمار ۷/۵ درصد نمک طعام با دو تیمار دیگر معنی‌دار بود($P<۰/۰۵$) (شکل ۱۲).این امر نیز بسیار طبیعی است زیرا سرعت بالای تقسیمات سلولی مانع از افزایش وزن سلول می‌گردد.در ضمن غلظت بالای نمک در محیط جلبک در تیمار۱۲/۵ درصد تا حدودی مانع از جذب آب توسط سلول‌ها شده و سلول‌ها حجم کمتری دارند. پس جرم حجمی آنها افزایش یافته و با رسوب سریع‌تر در تعداد دور مشابه سبب افزایش وزن محاسبه شده جلبک می‌شوند.

با توجه به موارد فوق به نظر می‌رسد جلبک دونالیلا به دلیل نیاز به شرایط خاص برای رشد علاوه براین که از نظر اقتصادی برای تولید مقادیر متنابه اسیدهای چرب (امگا ۳) گلیسرول و بتاکاروتن اهمیت دارد (Jin *et al.*, 2003)،

Archive of SID
www.SID.ir

واکنش سریع و قابل مشاهده ای نسبت به محیط‌های اسمزی مختلف دارد که هم از نظر فیزیولوژ یک برای درک مکانیسم‌های مقاومت به تنش مهم است(Oren ,2005) و هم از نظر تشخیص سریع وجود آلودگی در محیط پتانسیل خوبی دارد(Sushil & Krishna , 1993).

منابع

حسینی، ز. و ساطعی،آ. ۱۳۸۵. تغییرات رشد، برون ریزش آمونیوم، فعالیت نیترات ردوکتازی و محتوای رنگیزه‌های فتوسنتزی در جلبک دونالیلا سالینا، تحت تاثیر شوری، نور ممتد و تناوب نور، پایان نامه کارشناسی ارشد، پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرگان.

Avron, M. 1999 Osmoregulation in *Dunaliella*: physiology, Biochemis, and Biotechnology, pp.135-164. Edited by M., Avron and Ben -Amotz, A. Bocaon: CRC press.

Ben-Amotz, A. Gressel, J. & Avron, M.1987. Massive accumulation of phytoene induced by norflurozon in in *Dunaliella bardawil* (Chlorophyceae)prevents recovery from photoinhibition. Journal of phycology, 23:176-181.

Cowan, A.K., Rose, R. D. & Horne G. 1992. *D. salina*: A model system for studying the response of plant cells to stress. J. of Experimental Botant., 43(12): 1535-1547.

isher, M., Zamir, A. & Pick, U. 1998. A transferrin-like protein mediates Fe3+ uptake in the halotolerant alga *Dunaliella*. J. Biol. Chem., 273, 17553-1755.

Gilmour, D.J., Hipkins, F.M.& Boney, A.D. 1984. The effect of osmotic and ionic stress on the primery processes of photosynthesis in *Dunaliella tertiolecta*. J. of Experimental Botany 35 (1): 18-27.

Jin, E., Jurgen, E., Polle, W., Hong, K. L., Sang, M. H. & Man, C. 2003. Xanthophylls in Microalgae: From Biosynthesis to Biotechnological Mass Production and Applicati J. Microbiol. Biotechnol. , 13(2): 165-174.

Johnson, M.K., Johnson, E.J., MacElroy, R.D., Speer, H.L.& Bruff, B.S. 1968. Effects of salts on the halophilic alga *Dunaliella viridis*. J Bacteriol., 95:1461-1468.

Labbé, A. 1921. Le cycle évolutif de *Dunaliella salina*. C R Acad Sci, 172:1689-1690.

Labbé A. 1922. Les variations de la concentration en ions hydrogen dans les marais salants, comme facteur biologique. C R Acad Sci, 175:843-845.

Masjuk, N. P. & Redceko, M.I. 1973. New Taxons from the genus *Dunaliella* Teod.III, Ukr. Bot. zh., 30: 468.

Meira, W., Haimovich, G. A. I. & Pick, U. 2001. Phosphate and Sulfate uptake in the halotolerant alga, *Dunaliella* are driven by Na+-symport mechanism , Biochemistry epartment,j. of plant physiology, 158: 1519-1525.

Melkonian, M. 1989. Phylum chlorophyta class chlorophyceae, in handbook of porotista, (Margulis, L.,Corliss, J.O., Melkonia, M., andChapman, D.J.Eds.).Jones and Bartlett publishers. Boston, USA.

Michel, B.E. & Kaufmann.1973. The osmotic pressure of PEG 6000 and OEG8000. Plant Physiol., 51: 914-917.

Oren, A. 2005. Saline Systems. Available in: http://www.salinesystems.org/.

Olmos, J., Paniagua, J., Contreras R. 2000. Molecular identification of *Dunaliella sp*. utilizing the 18S rDNA gene. Lett. Appl. Microbiol., 30:80-84.

Pick, U. 1999. *Dunaliella*-a model extremophilic alga. Israel J. Plant Sci., 46: 131-140.

Riisgard, H.U. 1981. Cell volume responses in the naked marine flagellate *Dunaliella marina* transferred from darkness to light of different intensities. Bot.Mar., 24:657- 765.

Sushil, A., Krishna, S.& Chung, W. 1993. Determinationof toxic pollutants in water using a marine phytoplankton *Dunaliella biocalta* and dupler laser velocimetry. J. chemistry and ecology, 10: 87-95.

Archive of SID

www.SID.ir