Archive of SID

شناسایی چهارگونه جلبک سبز *Dunaliella* جداشده از آب های منطقه جزر و مدی جزیره قشم

بی بی مریم حسینی[1]*؛ محمدرضا هادی[2]؛ سعید افشارزاده[2]؛ فاطمه قادر[3]

Bbm_hosseini@yahoo.com

۱-دانشگاه آزاداسلامی واحد علوم وتحقیقات فارس گروه زیست شناسی علوم گیاهی

۲-دانشگاه اصفهان گروه زیست شناسی

۳-پارک زیست فناوری خلیج فارس قشم

تاریخ دریافت : فروردین ۱۳۹۲ تاریخ پذیرش : خرداد ۱۳۹۲

چکیده

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

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

*نویسنده مسئول

www.SID.ir

Archive of SID

۱.مقدمه

جلبک سبز تک سلولی *Dunaliella* مقاوم‌ترین یوکاریوتیک نسبت به نمک (NaCl) شناخته می‌شود و در شاخه جلبک‌های سبز (*Chlorophyta*)، راسته *Volvocales* و خانواده کلامیدوموناداسه (Chlamydom-onadaceae) قرار دارد (۷). جنس جلبک *Dunaliella* دارای ۲۸ گونه است و بعضی از گونه‌های آن نیز دارای فرم‌های مختلفی می‌باشند. این جلبک‌ها از نظر مورفولوژی شبیه جلبک‌های کلامیدوموناس هستند ولی دیواره سلولی ندارند. گرچه این جلبک فاقد دیواره سلولی است ولی می‌تواند دامنه وسیعی از غلظت نمک محیط از۰/۰۵تا ۵ مولار NaCl را به وسیله تولید گلیسرول در سلول، تحمل نماید (۱۹). گونه‌های *Dunaliella* معمولا در همه نقاط دنیا مخصوصاً دریاچه‌های آب شور و دریاها از نواحی گرمسیری تا قطبی دیده می‌شوند. این جلبک می‌تواند در مقابله با تنش‌های محیطی مقادیر قابل توجهی مواد شیمیایی ارزشمند مختلف مانند گلیسرول (۱۱)، کاروتنوئیدها (۱۳) ویتامین‌ها و پروتئین‌ها (۱۳) تولید نماید. توانایی رشد درغلظت‌های بسیار بالای نمک و محتوای زیاد ترکیبات کارتنوئید، گلیسرول یا پروتئین، این جلبک را داوطلب مناسبی برای تولیدات صنعتی بویژه برای تولید بتا کاروتن ساخته است (۲۰،۸). بتاکاروتن در صنایع غذایی(۱۳)، رنگ‌سازی (۱۵،۴)، آرایشی و دارویی به عنوان آنتی اکسیدانت قوی (۹)، آنتی تومور، محافظ در برابر بیماری‌های قلبی عروقی(۲۱) و پیش‌ساز ویتامین A کاربرد دارد. به علاوه، امروزه کاربرد این جلبک به دلیل تولید چربی(۱۱) برای تولید سوخت زیستی نیز به اثبات رسیده است (۲۲). از سوی دیگر این جلبک‌ها شاخص خوبی برای تعیین آلودگی‌های اکولوژیک می‌باشند، زیرا از حساسیت بالایی نسبت به اثرات عوامل شهری و صنعتی برخوردارند. اولین توضیح از یک جلبک تک سلولی قرمز با دوتاژک موجود درآب های شورغلیظ شده درسال ۱۸۳۸ بوسیله Dunalارائه شد. طی قرن نوزدهم جلبک تاژکدار قرمز Dunal بوسیله زیست شناسان دیگر بخوبی دردریاچه های نمکی و مکان های اشباع از نمک دیگر در Crimea, Algeria,Lorraine, فرانسه و رومانی مشاهده شد و بوسیله هرمحقق نام های مختلفی به این ارگانیسم داده شد. Teodoresco دوگونه راتوضیح داد: *D. salina* و *D. viridis*(۱۷). Lerche در سال ۱۹۳۷ توضیح داد که گونه های تشکیل دهنده *D. viridis* یکنواخت نیستند و باید به چندین گونه جدید منشعب شوند. بنابراین گونه های *D. media* *D. euchlora,D. minuta* و *D. parva* ایجاد شدند. Massjuk در سال ۱۹۷۳ جنس ها را به دو زیر جنس Dunaliella و Pascheria تقسیم کرد. جنس اخیر شامل گونه های آب شیرین است که شامل ۵ گونه می باشد(۱۷). یکی ازگونه های جالب *D. acidophila* است که توسط Kalina در سال ۱۹۶۵ و Albertano در سال ۱۹۸۱ از آب ها و خاک های اسیدی در جمهوری چکسلواکی و ایتالیا جداسازی شدند. این گونه هالوفیت واقعی نیست، اما یک جلبک اسیدوفیل است که به طور بهینه در pH بین ۰/۵ و ۲ رشد می کند. ۲۳ گونه از جنس دونالیلا تاژکدار و فاقد دیواره سلولی می باشند (۱۷). اولین مشاهداتی که گلیسرول به وسیله دونالیلا برای بهبود تعادل اسمزی تجمع پیدا می کند در سال ۱۹۶۴ به وسیله Craigie و Lachlan ارائه شد این جلبک های یوکاریوت درمحیط های شوریافت می شوند و بهینه رشد را درغلظت های مختلف نمک، با توانایی های مختلف برای ایجاد رنگ نارنجی- قرمز تحت وضعیت های محیط کشت خاص نشان می دهند(۱۶). Bass و Beching در سال ۱۹۳۱ مشاهده کرد که *D. viridis* در همه دامنه های۴-۱ مولار NaCl و pH ۹-۶ به خوبی رشد می کند (۱۷). وجود این جلبک در بسیاری از مناطق دنیا و همچنین در ایران در مناطقی چون حوضچه‌های تبخیر نمک در تالاب گاوخونی در منطقه اصفهان (۲) دریاچه ارومیه (۶) به اثبات

www.SID.ir

Archive of SID

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

۲. مواد و روش‌ها

نمونه های جلبک سبز *Dunaliella* در تیرماه سال ۱۳۹۰ از سواحل جنوبی جزیره قشم، با فاصله ۱۰ کیلومتر از خروجی شهرقشم، از آب‌های موجود در حوضچه‌های حاصل از جزر و مد دریا صورت گرفت. نمونه‌های جلبکی، توسط ارلن مایر به آزمایشگاه مرکز بیوتکنولوژی خلیج فارس قشم منتقل و در محیط کشت جانسون مایع کشت و تکثیرگردید.

برای کشت و تکثیر نمونه‌های خالص‌سازی شده جلبک‌های *Dunaliella*از محیط کشت جانسون (۱۹۶۸) که توسط Shariati and Lilley (۱۹۹۴) اصلاح شده است استفاده گردید (۱۸). pH محیط کشت در حدود ۷ الی ۷/۵ تنظیم و برای تهیه محیط کشت جامد از ۱/۵ ٪ آگار استفاده گردید. نمونه‌های جلبکی در اطاق کشت تحت تابش نور لامپ‌های فلوئورسنت (مهتابی) و حبابی با شدت نور۶۰ میکرومول فوتون بر مترمربع بر ثانیه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد بر روی شیکر (Shaker) با ۸۰ دور در دقیقه به همراه دوره نوری ۱۶ ساعت روشنائی و ۸ ساعت تاریکی کشت داده شدند.

جداسازی و خالص‌سازی جلبک‌های *Dunaliella* مطابق روش استفاده شده توسط شریعتی و هادی (۱۳۷۹) صورت گرفت (۲). در این روش، پس از رشد جلبک ها در محیط کشت اصلاح شده جانسون، ۱۰میلی لیتراز سوسپانسیون جلبکی جمع‌آوری شده را به مدت ۵ دقیقه در ۱۶۱g سانتریفوژ نموده و محلول فوقانی خارج گردید. به رسوب جلبکی، محلول ۱۰٪ نمک اضافه نموده وبه آرامی رسوب جلبکی را در آن حل کرده و مجدداً سانتریفوژ گردید. این عمل جهت از بین بردن آلودگی احتمالی باکتریائی حداقل پنج مرتبه تکرار گردید (۱). پس ازآن جلبک‌های ته نشین شده در لوله سانتریفوژ را توسط لوپ تلقیح در شرایط کاملاً استریل جهت جداسازی وخالص‌سازی تک کلنی به محیط کشت های اصلاح شده جانسون جامد حاوی Penicillin G (۱۵۰ واحد در میلی‌لیتر) در ظرف پتری انتقال و کشت داده شد (۱). پس از اینکه کلنی های جلبک *Dunaliella* بر روی محیط کشت جامد با مولاریته‌های مختلف نمک (۰، ۱، ۲، ۳ و۴ مولارNaCl) ظاهرگردید، هرتک کلنی با استفاده از لوپ تلقیح تحت شرایط استریل به ارلن‌های ۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۱۰ میلی‌لیتر از محیط‌های کشت مایع استریل (با همان مولاریته نمک محیط کشت جامد) به صورت جداگانه انتقال و سپس جهت رشد در اطاق کشت قرار داده شدند. پس از یک تا دو هفته یکسری سوسپانسیون‌های خالص جلبکی بدست آمد که با میکروسکوپ نوری مورد مطالعه قرار گرفت. نمونه‌هایی که به صورت جلبک‌های *Dunaliella* تشخیص داده شدند در ارلن‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۱۰۰ میلی‌لیتر از محیط کشت مایع جانسون جهت مطالعات بعدی کشت داده شدند.

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

شمارش سلول‌های *Dunaliella* با استفاده از لام Hemocy-tometer یا لام شمارش سلولی با بزرگنمائی ۱۰ عدسی شیئی انجام شده و بر حسب تعداد سلول در میلی‌لیتربا استفاده از فرمول(

www.SID.ir

Archive of SID

تعداد سلول در میلی لیتر= میانگین تعداد سلول در ۱۰ مربع × $۱۰^{۶}$× ضریب رقت)محاسبه گردید(۵).

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

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

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

مقدار گلیسرول در جلبک‌های رشد یافته در غلظت‌های مختلف نمک (۱، ۲، ۳ و۴ مولار NaCl) اندازه گیری شد. در این روش مقدار ۲۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون جلبکی مورد نظر را برداشته و به آن مقدار یک میلی‌لیتر معرف پریودات (۶۵ میلی‌گرم سدیم متاپریودات + ۱۰۰ میلی‌لیتر اسید استیک ۶٪+ ۷/۷ گرم آمونیوم استات) و ۲/۵ میلی‌لیتر معرف استیل استن (۲/۵ میلی‌لیتراستیل استن + ۲۴۷/۵ میلی لیترایزوپروپانول) افزوده و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. در مرحله بعد با روش اسپکتروفتومتری، میزان جذب نور در طول موج ۴۱۰ نانومتر اندازه گیری و توسط منحنی استاندارد، غلظت گلیسرول بر حسب میلی‌گرم گلیسرول در میلی‌لیتر سوسپانسیون جلبکی (دارای بهینه رشد)، محاسبه گردید(۱۴). داده های حاصل ازاندازه گیری میزان رشدومیزان تولیدگلیسرول در مولاریته های مختلف نمک مورد تحلیل آماری قرارگرفت و مقایسه میانگین داده ها با استفاده ازآزمون دانکن درسطح ($P\geq ۰/۰۵$) انجام و نمودارهای مربوطه با نرم افزاراکسل رسم گردید.

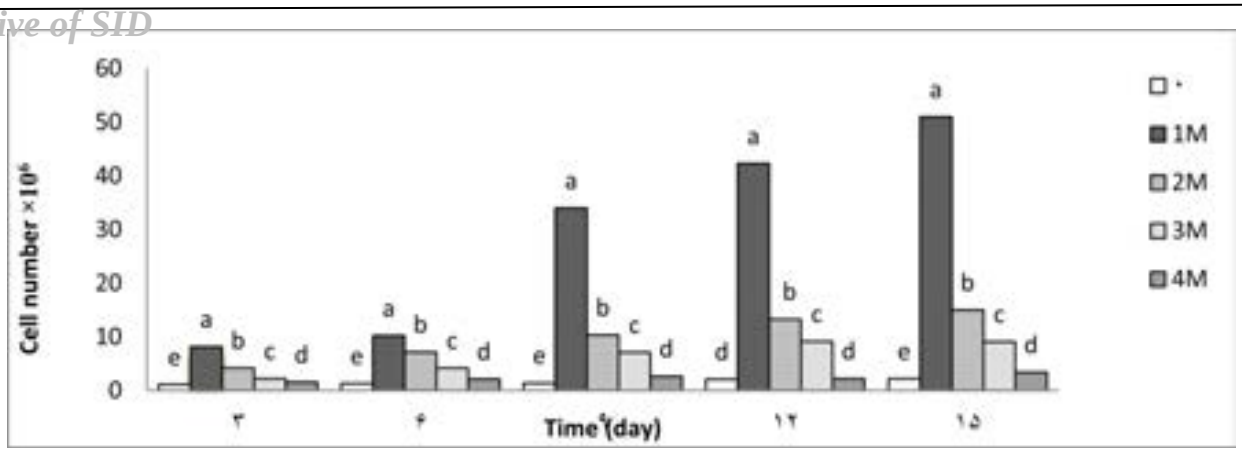
۳. نتایج

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

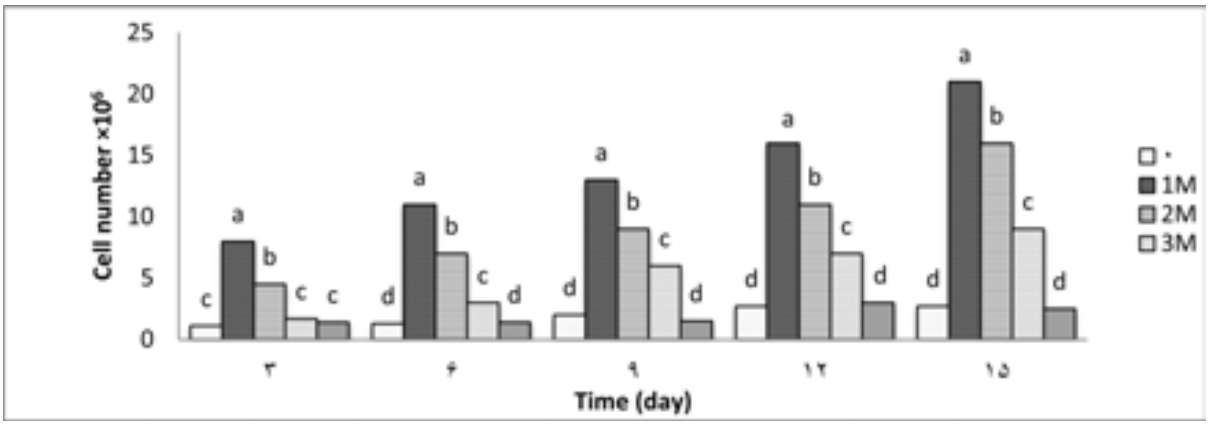
اختلاف میزان رشد سلول های جلبکی در تیمارهای ۰تا۴ مولار نمک به صورت نمودار در شکل های ۱تا۴ نشان داده شده است. حروف لاتین متفاوت روی ستون ها (a,b,c,d,e)نشان دهنده معنی داربودن تفاوت بین تیمارها ($P\geq ۰/۰۵$)می باشد.

www.SID.ir

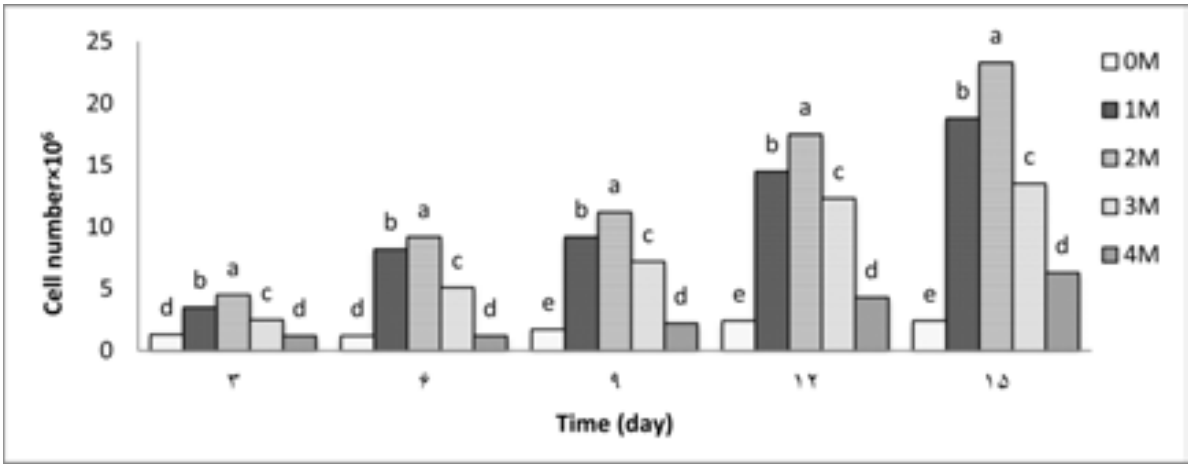
Archive of SID



شکل ۱ : میزان رشد *D. maritima* در محیط کشت حاوی غلظت‌های مختلف نمک از ۰ تا ٤ مولار NaCl طی ۱۵ روز.
(خطای استاندارد±میانگین)



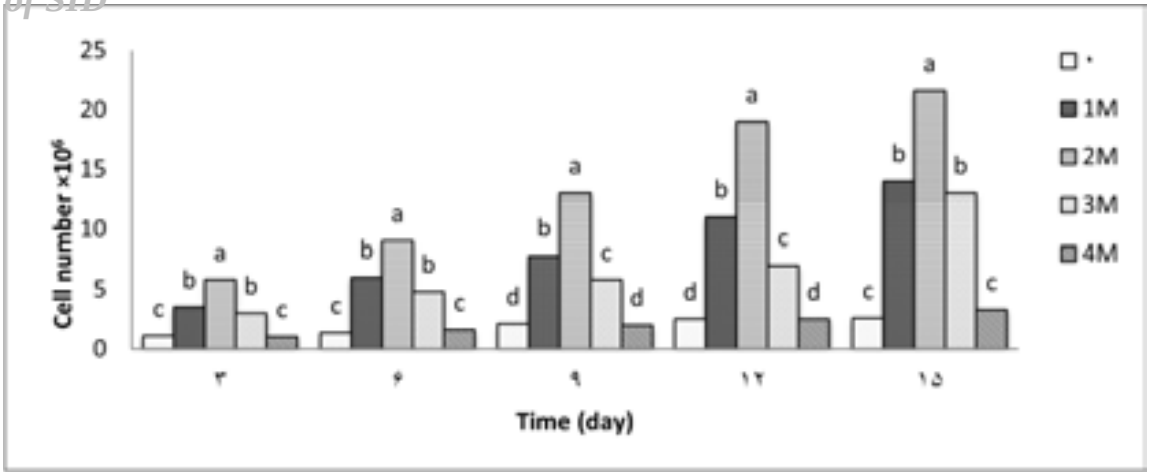
شکل ۲: میزان رشد *D. quartolecta* در محیط کشت حاوی غلظت‌های مختلف نمک از ۰ تا ٤ مولار NaCl طی ۱۵ روز.
(خطای استاندارد±میانگین)



شکل ۳ : میزان رشد *D. minutisima* در محیط کشت حاوی غلظت‌های مختلف نمک از ۰ تا ٤ مولار NaCl طی ۱۵ روز.
(خطای استاندارد±میانگین)

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ٤ : میزان رشد *D. viridis* در محیط کشت حاوی غلظت‌های مختلف نمک از ۰ تا ٤ مولار NaCl طی ۱۵ روز. (خطای استاندارد±میانگین)

جدول۱ : آنالیز واریانس تاثیر غلظت های ۱تا٤ مولارنمک برمیزان تولید گلیسرول در ٤ گونه جلبک دونالیلا

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

نتایج آنالیز واریانس در جدول ۱ نشان می دهد که تاثیرتیمارهای مختلف نمک(۱-۲-۳ و ۴مولار) بر شاخص غلظت گلیسرول سلولی در ۴ گونه جلبک دونالیلا در سطح ۰/۰۰۱ (P≥۰/۰۱) معنی دار است.

با استفاده از نتایج جدول۱، تفاوت میزان غلظت گلیسرول در سلول های جلبکی در تیمارهای ۱تا۴ مولار نمک به صورت نمودار در شکل های ۵تا۸ نشان داده شده است. حروف لاتین متفاوت روی ستون ها(a,b,c,d,e)نشان دهنده معنی داربودن تفاوت بین تیمارها (P≥۰/۰۵)می باشد.

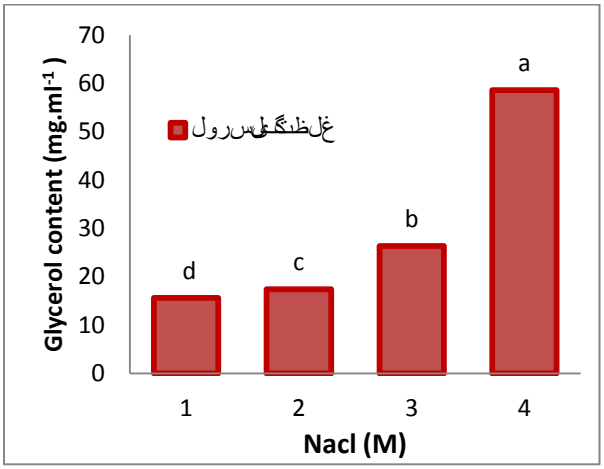
٤. بحث

یکی از ویژگی‌های جنس *Dunaliella* پاسخ به شوری از طریق تولیدگلیسرول می‌باشد که می‌تواند در شناسائی آن موثر

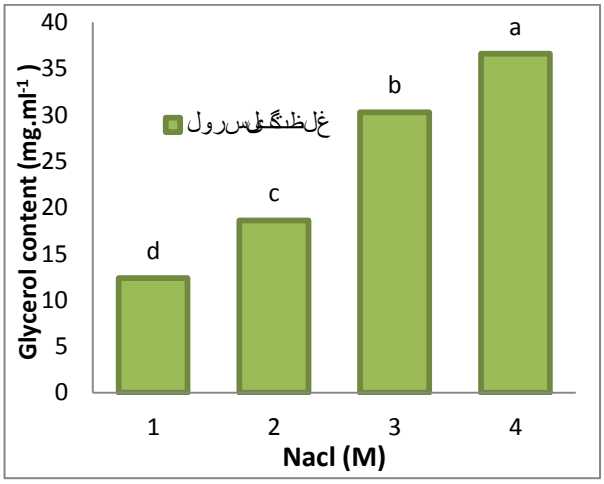
www.SID.ir

Archive of SID

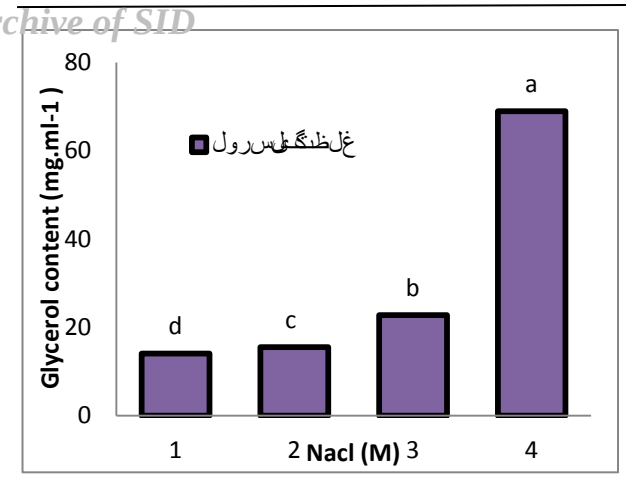
باشد (۵). با افزایش مقدار نمک در محیط کشت، مقدار گلیسرول نیز متناسب با آن افزایش نشان می‌دهد. این نتایج با مقادیر گلیسرول *Dunaliella* رشد یافته در غلظت‌های مختلف NaCl که توسط شریعتی و هادی(۱۳۷۹)(۳) و همچنین توسط Avron (۱۹۸۸) گزارش شده است (۷)، مطابقت می کند و نشان می‌دهد که جلبک‌های مذکور همانند گونه‌های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



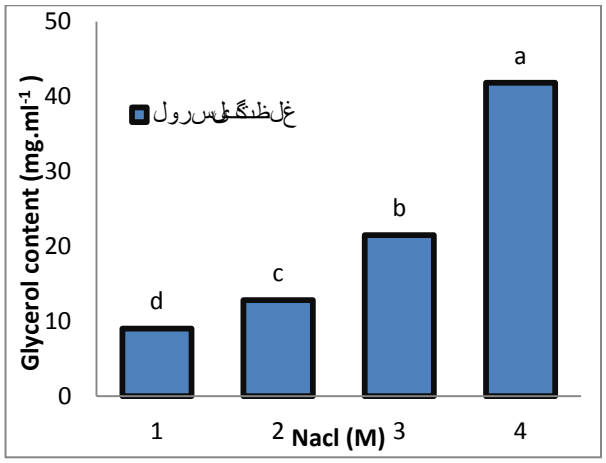
شکل ۵ : مقایسه میزان گلیسرول تولیدشده توسط گونه *D. maritima* در غلظت‌های مختلف نمک (NaCl) از ۱ تا ٤ مولار



شکل ٦ : مقایسه میزان گلیسرول تولیدشده توسط گونه *D. minutisima* در غلظت‌های مختلف نمک (NaCl) از ۱ تا ٤ مولار



شکل ۷ : مقایسه میزان گلیسرول تولیدشده توسط گونه *D. quartolecta* در غلظت‌های مختلف نمک (NaCl) از ۱ تا ٤ مولار



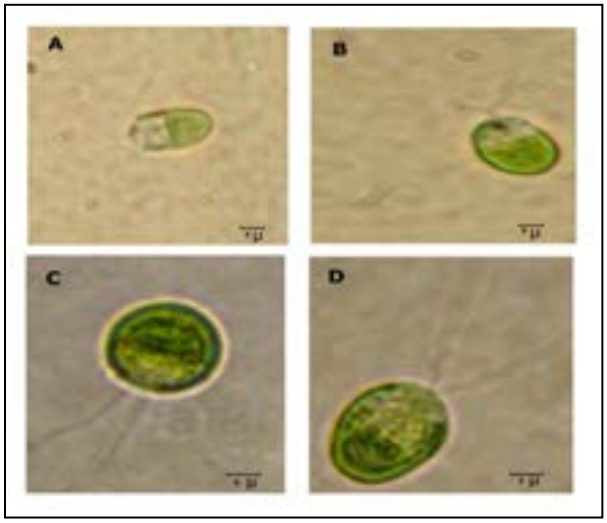
شکل ۸ : مقایسه میزان گلیسرول تولیدشده توسط گونه *D. viridis* در غلظت‌های مختلف نمک (NaCl) از ۱ تا ٤ مولار

شناسایی گونه‌های مختلف *Dunaliella*: سوسپانسیون‌های جلبکی حاصل از خالص‌سازی از لحاظ برخی خصوصیات ریخت شناسی و فیزیولوژیک از جمله غلظت نمک لازم برای بهینه رشد، شکل، اندازه و ابعاد سلول، توانایی تغییر رنگ از سبز به نارنجی- قرمز، داشتن یا نداشتن لکه چشمی و تعداد آن، تعداد و نوع پیرنوئید، تعداد و طول تاژک و مقایسه آن با کلید شناسایی Massjuk (۱۹۷۳)، گونه‌های مختلف *Dunaliella* شناسائی گردید(شکل۹). در رابطه با شناسائی گونه‌های *Dunaliella* در کشور ایران تاکنون مطالعات اندکی صورت گرفته است. به

www.SID.ir

Archive of SID

طـوری کـه Ginzburg در سـال ۱۹۸۵ جلبـک‌هـای *Dunaliella* را از آب‌های اطراف شیراز جدا کرده و بدون شناسائی، جداسازی، و خالص‌سازی آن‌ها را به طور کلی تحت نام Iran 6 نام گذاری کرده است و به بررسی غلظت‌های مختلف یون و گلیسرول در آن‌ها پرداخته است(۳). هادی درسال۱۳۷۵ چهار گونه *D. salina , D. psuedosalina , D. viridis* و *D. parva* را پس از جداسازی و خالص‌سازی براساس چندین فاکتور از جمله رشد بهینه در محیط کشت دارای غلظت ۲ مولار نمک، همچنین شکل وحجم سلول‌ها با کلید شناسایی Massjuk (۱۹۷۳) از حوضچه‌های تبخیر نمک در چند نقطه از مرداب گاوخونی در منطقه اصفهان شناسائی و گزارش کرده است(۳).



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

شناسایی گونه *D. maritima*: سوسپانسیون جلبکی خالصی که قابلیت تغییر رنگ را از سبز (در غلظت ۱ مولار نمک) به نارنجی- قرمز (در غلظت ۴ مولار نمک) دارا نبود، مورد بررسی میکروسکوپی قرار گرفت و مشاهده گردید که سلول‌ها در شرایط رشد بهینه (در غلظت ۱ مولار نمک) به صورت بیضی شکل و در دو انتها کمی کشیده، سبز رنگ، دارای دو تاژک بلند بدون دیواره ضخیم می‌باشند. همچنین مشاهده شده که سلول‌ها فاقد گرانول و کلروپلاست در کناره جلویی سلول تقسیم شده است. به علاوه، میانگین اندازه طول (۱۰ عدد جلبک به صورت تصادفی) جلبک‌ها ۸ میکرون و عرض آن‌ها ۵ میکرون بود. در مجموع با توجه به این که جلبک‌های مذکور در ۱ مولار نمک حداکثر رشد را دارند(شکل۱) و از طرفی در غلظت‌های بالای نمک قابلیت تغییر رنگ از سبز به قرمز- نارنجی را ندارند (جدول ۲) و با توجه به این که سلول‌های رویشی در آن‌ها بدون واکوئل‌های انقباضی بوده و همچنین سلول‌ها فاقد گرانول بوده و کلروپلاست در کناره جلویی سلول تقسیم شده بود، لذا طبق کلید شناسائی گونه‌های مختلف *Dunaliella* مربوط به Massjuk (۱۹۷۳) به عنوان گونه *D. maritima* شناسائی گردید(شکل۹بخش A).

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

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

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

www.SID.ir

Archive of SID

صورت تخم مرغی، سبز رنگ، دارای دو تاژک بلند و بدون دیواره ضخیم هستند که در انتهای جلویی کمی کشیده‌اند. همچنین مشاهده گردید که هر سلول دارای چند گرانول کوچک در بخش جلویی سلول هستند. میانگین اندازه طول (۱۰عدد جلبک به صورت تصادفی) سلول‌ها ۸ میکرون و عرض آن‌ها ۵/۶ میکرون بود . در مجموع با توجه به این که جلبک‌های مذکور درغلظت ۱ مولار نمک حداکثر رشد را دارند (شکل۲) و از طرفی در غلظت‌های بالای نمک قابلیت تغییر رنگ از سبز به قرمز- نارنجی را ندارند (جدول۲) و با توجه به این که سلول‌های رویشی در آن‌ها بدون واکوئل‌های انقباضی بوده و هر سلول دارای ۳ تا ۱۰ گرانول کوچک انکساری در بخش قدامی (جلوئی) سلول بدون یک باند خیلی مشخص بودند، لذا طبق کلید شناسائی گونه‌های مختلف *Dunaliella* مربوط به Massjuk (۱۹۷۳) به عنوان گونه *D. quartolecta* شناسائی گردید(شکل۹بخش B).

شناسایی گونه *D. minutisima* : سوسپانسیون جلبکی خالصی که قابلیت تغییر رنگ را از سبز (در غلظت ۲ مولار نمک) به نارنجی- قرمز (در غلظت ۴ مولار نمک) دارا نبود، مورد بررسی میکروسکوپی قرار گرفت و مشاهده گردید که سلول‌ها در شرایط رشد بهینه (در غلظت ۲ مولار نمک) به صورت تقریباً کروی، سبز رنگ، دارای دو تاژک بلند و بدون دیواره ضخیم می‌باشند و کلروپلاست آن‌ها غیرمنفذدار، سلول‌ها بدون گرانول و دارای یک لکه چشمی (eye spot) می‌باشند. میانگین اندازه طول (۱۰عدد جلبک به صورت تصادفی) سلول‌ها ۸ میکرون و عرض آن‌ها نیز ۸ میکرون بود . در مجموع با توجه به این که جلبک‌های مذکور در ۲ مولار نمک حداکثر رشد را دارند (شکل۳) و از طرفی در غلظت‌های بالای نمک قابلیت تغییر رنگ از سبز به قرمز- نارنجی را ندارند (جدول ۲) و با توجه به این که سلول‌های رویشی در آن‌ها بدون واکوئل‌های انقباضی و دارای تقارن شعاعی بوده و همچنین طول سلول‌ها کمتر از ۲۰ میکرومتر بود، به علاوه چون کلروپلاست در آن‌ها بدون سوراخ و بدون گرانول در کنار جلوئی بود و شکل تیپیک سلول‌ها به صورت کروی بود، لذا طبق کلید شناسائی گونه‌های مختلف *Dunaliella* مربوط به Massjuk (۱۹۷۳) به عنوان گونه *D. minutisima* شناسائی گردید(شکل۹بخش C).

شناسایی گونه *D. viridis* : سوسپانسیون جلبکی خالصی که قابلیت تغییر رنگ را از سبز (در غلظت ۲ مولار نمک) به نارنجی- قرمز (در غلظت ۴ مولار نمک) دارا نبود، مورد بررسی میکروسکوپی قرار گرفت و مشاهده گردید که سلول‌ها در شرایط رشد بهینه (در غلظت ۲ مولار نمک) به صورت بیضی، سبز رنگ، دارای دو تاژک بلند(باطول یکسان) و بدون دیواره ضخیم هستند. همچنین مشاهده گردید که سلول‌ها در انتهای عقبی پهن‌تر، کلروپلاست غیرمنفذدار و بدون گرانول است. میانگین اندازه طول (۱۰عدد جلبک به صورت تصادفی) سلول‌ها ۱۱ میکرون و عرض آن‌ها نیز ۹ میکرون بود . در مجموع با توجه به این که جلبک‌های مذکور در ۲ مولار نمک حداکثر رشد را دارند (شکل۴) و از طرفی در غلظت‌های بالای نمک قابلیت تغییر رنگ از سبز به قرمز- نارنجی را ندارند (جدول ۲) و با توجه به این که سلول‌های رویشی در آن‌ها بدون واکوئل‌های انقباضی و دارای تقارن شعاعی بوده و همچنین طول سلول‌ها کمتر از ۲۰ میکرومتر بود، به علاوه چون کلروپلاست در آن‌ها بدون سوراخ و بدون گرانول در کنار جلوئی بود و شکل تیپیک سلول‌ها به صورت بیضی یا گلابی بود، لذا طبق کلید شناسائی گونه‌های مختلف *Dunaliella* مربوط به Massjuk (۱۹۷۳) به عنوان گونه *D. viridis* شناسائی گردید(شکل۹بخش D). در این رابطه، Ilknur و همکاران در سال ۲۰۰۸ میلادی گزارش کرده‌اند که حداکثر رشد گونه *D. viridis* در غلظت ۲ مولار نمک (NaCl) و دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد است که با نتایج این تحقیق در خصوص رشد بهینه *D. viridis* جداسازی و شناسائی شده از آب‌های سواحل جزیره قشم در غلظت ۲ مولار نمک

www.SID.ir

Archive of SID

(NaCl) همخوانی دارد(۱۴). همچنین در این رابطه، هادی در سال ۱۳۷۵ و همچنین Hadi و همکاران در سال ۲۰۰۸ میلادی گزارش کرده‌اند که در گونه‌های جداسازی و خالص‌سازی شده از حوضچه‌های تبخیر نمک در مرداب گاوخونی در منطقه اصفهان، گونه *D. viridis* در غلظت ۱ تا ۲ مولار نمک (NaCl) حداکثر رشد را دارد ولی بهینه رشد آن در ۱ مولار نمک است و در غلظت‌های بالای نمک (۳ تا ۴ مولار نمک) قابلیت تغییر رنگ از سبز به قرمز- نارنجی را ندارند که با نتایج این تحقیق همخوانی نشان می‌دهد(۲،۳).هرچند که گونه *D. viridis* جداسازی و شناسائی شده از آب‌های سواحل جزیره قشم در غلظت ۱ مولار نمک نیز رشد مطلوبی دارد (شکل۴) ولی این احتمال نیز وجود دارد که این گونه از نظر فرم و یا واریته با گونه *D. viridis* از مرداب گاوخونی متفاوت باشد و به همین دلیل حداکثر رشد گونه *D. viridis* از آب‌های سواحل جزیره قشم با گونه *D. viridis* از آب‌های مرداب گاوخونی کمی متفاوت است. همچنین مشاهدات و نتایج این تحقیق با خصوصیات گونه *D. viridis* (اندازه ۷-۶ میکرون در عرض و ۱۲-۱۰ میکرون در طول، شکل تخم مرغی و نداشتن هماتوکرم، Hematochrome) مطابقت می‌کند. به علاوه، هادی درسال۱۳۷۵ میانگین ابعاد سلول‌های گونه *D. viridis* از آب‌های مرداب گاوخونی را ۲/۹۲ ± ۱۱/۶۷ میکرون در طول و ۱/۴۷ ± ۷/۸۳ میکرون در عرض گزارش کرده است که با نتایج این تحقیق در خصوص اندازه گونه *D. viridis* (۱۱ میکرون در طول ۹ میکرون در عرض) از آب‌های ساحلی جزیره قشم همخوانی نشان می‌دهد(۳).

سپاسگزاری

بدین وسیله از ریاست محترم پارک زیست فناوری جزیره قشم جناب آقای دکتر آقامیری و کلیه پرسنل آن مرکز به جهت همکاری بیدریغ‌شان و همچنین از جناب آقای سیدرضاحسینی، مهندس حمیدعبدالهی، سرکار خانم ام السلمه عبدالهی و مرضیه تقی‌پور که در بخشی از کارهای علمی این تحقیق همکاری داشته‌اند، تشکروقدردانی می‌گردد.

منابع

۱-رحیمیان، ح. ۱۳۵۷. جلبک شناسی، انتشارات دانشگاه شهید بهشتی،صفحه ۲۶۵-۲۷۳.

۲-شریعتی، م.، هادی، م.ر. ۱۳۷۹. جداسازی ، خالص سازی وشناسایی جلبک سبزتک سلولی گونه های دونالیلازحوضچه های تبخیرنمک درمرداب گاوخونی اصفهان،مجله زیست شناسی ایران جلد۹ صفحه۴-۱.

۳-هادی، م. ر. ۱۳۷۵. شناسائی، جدا سازی و خالص‌سازی گونه های مختلف جلبک سبز تک سلولی *Dunaliella* از حوضچه های تبخیر نمک در مرداب گاوخونی. پایان نامه کارشناسی ارشد- گروه زیست شناسی- دانشگاه اصفهان.

4-Abd El-Baky, H., El-Baroty, G. 2010. Enhancement of carotenoids in *Dunaliella salina* foruse as dietary supplements and in the preservation foods, Food Chemistry Toxicol, 59-65.

5-Al-Hasan, R.H., Ghannoum, M.A., Sallal, A.K., Abu- Elteen, K.H., Radwan, S.S. 1987. Correlative changes of growth, pigmentation and lipid composition of *Dunaliella salina* in respons to halostress, Journal General Microbiology, 133, 2607-2616.

6-Arash Rad, F., Aksoz, N., Hejazi, M.A. 2011.Effect of salinity on cell growth and β-carotene production in *Dunaliella* sp. isolates from Urmia Lake in northwest of Iran, Africa Journal of Biotechnology,10 (12), 2282-2289.

7-Avron, M., Ben-Amotz, A. 1992. Dunaliella: Physiology, Biochemistry, and Biotechnology, CRC Press, Boca Raton.

8-Celekli, A., Donmez, G., 2006. Effect of pH, light intensity, salt and nitrogen concentrations on growth and beta-carotene accumulation by a new isolate of *Dunaliella* sp, World Journal Microbiology.Biotechnology. 22, 183–189.

www.SID.ir

Archive of SID

9-Chidambara Murthy, K.N., Vanitha, A., Rajesha, J., Mahadeva Swamy, M., Sowmya, P.R. and Ravishankar, G.A., 2005,In vivo antioxidant activity of carotenoids from *Dunaliella salina* – a green microalga, Life Science, 76, 1381–1390.

10-Chitlaru. E., Pick. U. 1991.Regulation of glycerol synthesis in response to osmotic changes in Dunaliella, Plant Physiology, 96, 50–60.

11-Hadi, M. R., Shariati, M., Afsharzadeh. S. 2008. Microalgal biotechnology: carotenoid and glycerol production by Dunaliella sp. algae isolated from the Gave khooni salt marsh, Iran, Biotechnology Bioprocces Engineering, 13(5), 540-544.

12-Hosseini Tafreshi, A., Shariati, M. 2006. Pilot culture of three strains of *Dunaliella salina* for b-carotene production in open ponds in the central region of Iran, World Journal of Microbiology and Biotechnology,22,2-28.

13-Ghoshal. D., Mach. D., Agarwal .M., Goyal .A., Goyal. A. 2002. Osmoregulatory Isoform of Dihydroxyacetone Phosphate Reductase from *Dunaliella tertiolecta*, Purification and Characterization Protein, Expression and Purification 24,404–411.

14-Ilknur, AK., Semra, Cirik., Tolga, Gogksan. 2008. Effect of Light Intensity, Salinity and Temperture on Growth in Camalt1 Strain of *Dunaliella viridis* Teodoresco from Turkey,Jurnal of Biological Sciences 8(8),1356-1359.

15-Lamers, P., Janssen, M., De Vos, R., Bino, R., Wijffels, R., 2008 .Exploring and exploiting carotenoid accumulation in *Dunaliella salina* for cell-factory applications, Trends Biotechnology, 26 , 631–638.

16-Massjuk.1973.,Morphology, taxonomy, ecology and geographic distribution of the genus *Dunaliella* Teod. and prospects for its potential utilization, Kiev: Naukova Dumka. Massjuk., 312

17-Oren, A. 2005. A Hundred years of Dunaliella Research: 1905–2005, Saline Systems,35-42.

18-Shariati, M., Lilley, R. M., 1994, Lossof intracellular glycerol from Dunaliella by electroporation at constant osmotic pressure: Subsequent restoration of glycerol content and associated volume changes, Plant Cell Environmental, 17, 1295-1304.

19-Shariati, M., Hadi, M. R. 2010.Microalgal Biotechnology and Bioenergy in *Dunaliella*, Carpi, Angelo, Progress in Molecular and Environmental Bioengineering From Analysis and Modeling to Technology Applications, 483-506.

20-Takagi, M., Karseno , Yoshida, T. 2006. Effect of salt concentration on intracellular accumulation of lipids and triacylglyceride in marine microalgae *Dunaliella* cells, Journal Bioscience Bioengineering,101, 223–226.

21-Tornwall, M. E., Virtamo, J., Korhonen, P. A., Virtanen, M. J., Taylor, P. R., Albanes, D.,Huttunen, J. K. 2004. Effect of a-tocopherol and β-carotene supplementation oncoronary heart disease during the 6-year post-trial follow-up in the ATBC study.Europ Heart Journal,25, 1171–1178.

22-Wijffels, R. 2008.Potential of sponges and microalgae for marine biotechnology,Trends Biotechnology, 26 , 26–31.

www.SID.ir