تأثير سميت غلظتهاي مختلف برخي از عناصر ريزمغذي بر ميزان رشد و توليد آستاگزانتين در جلبك سبز هماتوكوكوس پلوويااليس *(Haematococcus pluvialis F.)*

محمد يزداني[1]، صادق فرهي آشتياني*[2]

۱- دانش‌آموخته، گروه علوم گياهي، دانشگاه تربيت مدرس، تهران
۲- استاد، گروه علوم گياهي، دانشگاه تربيت مدرس، تهران

چكيده

سیستهای قرمز رنگ جلبک سبز، *H. pluvialis* در محلول غذایی و تحت شرایط سترون در اتاقک رشد کشت داده شدند. پس از آنکه سیستها به سلولهای رویشی تبدیل شدند، تحت تأثیر افزایش غلظت برخی از عناصر ریزمغذی قرار گرفتند. پس از گذشت دو هفته نتایج نشان داد که با افزایش غلظت عناصر مس، روی، منگنز و آهن محیط کشت، میزان وزن خشک، غلظت کلروفیل و آستاگزانتین محتوی جلبک و اکسیژن محلول در محیط کشت جلبک کاهش می‌یابد که این کاهش ناشی از سمیت مصرف زیاد عناصر ذکر شده است. تأثیر سمیت عناصر ریزمغذی ذکرشده در کاهش وزن خشک جلبک احتمالاً به دلیل کاهش تقسیمات سلولی در سلولهای رویشی است. کاهش میزان کلروفیل محتوی جلبک، شاید به‌دلیل ممانعت از سنتزکلروفیل در غلظتهای بالای عناصر مصرف شده باشد، زیرا با افزایش غلظت عناصر محیط کشت، میزان اکسیژن محلول در آن نیز کاهش می‌یابد. در ضمن، مقدار آستاگزانتین محتوی جلبک نیز در تبعیت از زمان افزایش می‌یابد که این امر شاید به کاهش سنتز کلروفیل در اثر افزایش سن سلولهای رویشی و تبدیل آنها به سیستهای قرمز رنگ مربوط باشد.

کلید واژگان: هماتوکوکوس پلوویالیس، آستاگزانتین، اکسیژن محلول، عناصر ریزمغذی.

۱- مقدمه

جلبک سبز هماتوکوکوس پلوویالیس، جلبک تک سلولی آبهای شیرین و مهمترین تولید کننده آستاگزانتین[1] است [۱-۳]. آستاگزانتین کتوکاروتنوئید قرمزرنگ با نام شیمیایی ۳، ۳′ -دی‌هیدروکسی-β، β- کاروتن- ٤، ٤′ دی‌ان است[۴]. این ماده دارای نقشهای متعدد بیولوژیکی در موجودات زنده، از قبیل پیش‌ساز ویتامین A [۵]، دفع کننده رادیکالهای آزاد و اکسیژنهای فعال و خاصیت ضدسرطانی می‌باشد[۶]. امروزه از آستاگزانتین به عنوان مکمل غذایی و رنگ کننده طبیعی در تغذیهٔ آبزیان و طیور استفاده می‌شود[۷، ۸]. همچنین به دلیل فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالای آن در مقایسه با بتا-کاروتن و ویتامین E به مصارف درمانی آن نیز توجه فراوانی شده است [۵، ۹، ۱۰]. تاکنون مطالعاتی در مورد سمیت فلزات سنگین بر جلبکها انجام شده است [۱۱، ۱۲]؛ مانند ممانعت از رشد

---

* نویسندهٔ مسؤول مقاله: تلفن: ۸۰۱۱۰۰۱-۳٤۱۹، صندوق پستی: ۱٤۱۱۵-۱۷۵، E-mail: Farrahis@modares.ac.ir

[1] Astaxanthin

جلبک هماتوکوکوس در اثر جیوه [۱۳]، همچنین کاهش فرایندهای فتوسنتزی، به طور مثال تولید اکسیژن در اثر سمیت یونهای نیکل، منیزیم و مس در جلبک سیلیندروسپرموم[1] [۱۴]. مطالعات دیگری نیز نشان داده است که یون مس در جلبک هماتوکوکوس باعث ممانعت از تقسیم سلولی و آسیب به دستگاه فتوسنتزی در اثر پراکسیداسیون لیپیدها می‌شود[۱۲].

هدف از این مطالعه، بررسی اثر افزایش غلظت برخی از عناصر ریزمغذی محیط کشت مانند مس، روی، منگنز و آهن بر عکس‌العملهای مربوط به رشد و تولید کاروتنوئید آستاگزانتین در جلبک هماتوکوکوس پلوویالیس تحت شرایط کنترل شده اتاقک رشد می‌باشد.

۲-مواد و روش‌کار

به‌منظور بررسی تأثیر برخی از عناصر ریزمغذی بر میزان رشد و تولید آستاگزانتین در جلبک هماتوکوکوس پلوویالیس، ابتدا پس از تهیه محیط کشت بولد[۱۵] با ترکیبهای (۰/۴۳mM) NaCl؛ (۰/۳mM) Mg SO۴/۷H۲O؛ (۰/۱۷mM) $CaCl_۲$.۲H۲O؛ (۲/۹mM) NaNO۳؛ (۰/۴۳mM) $K_۲ HPO_۴$؛ (۱/۲۹mM) $KH_۲ PO_۴$؛ (۷/۳ μM) .۴H۲O $M_n Cl_۲$؛ (۳۰/۷۰μM) $ZnSO_۴$.۷H۲O؛ (٦/۳μM) .۵H۲۰ $Cu(SO_۴$؛ (۴/۹μM) $Mo\ O_۳$؛ (.۱۸μM) $H_۳\ BO_۳$؛ (۱/۷μM) .۶H۲۰؛ $CONO_۳$؛ (۰/۵۵mM) KOH؛ (۰/۱۷mM) EDTA؛ (۱۰μ) $H_۲\ SO_۴$؛ (۱۷/۹ μM) $FeSO_۴$.۷H۲O و استریل کردن آن، مقداری از سیستهای قرمز جلبک ذکر شده که در محیط کشت جامد در آزمایشگاه نگهداری می‌شدند، برداشت و تکثیر شدند. برای ساختن محیط کشت بولد از ارلنهای سه لیتری حاوی ۸۰۰mL محیط کشت مایع استفاده گردید. سپس این ارلنها به اتاقک کشت با دمای ۱۸- ۲۰ºC و شدت نور ۲۰-۳۰ میکروانیشتین[2] بر مترمربع بر ثانیه انتقال یافتند. سیستهای قرمز به دلیل قرارگرفتن در محیط کشت تازه بولد از حالت کیستی خارج و به سلولهای رویشی سبزرنگ تبدیل شدند. پس از گذشت حدود ۱۰ روز از شروع کشت، تعداد سلول رویشی سبزرنگ کافی برای ادامه آزمایش فراهم گردید. در مرحلهٔ بعد، در هر ارلن ۲۵۰mL، ۱۰۰mL از سوسپانسیون جلبکی حاوی سلولهای رویشی سبزرنگ اضافه شد و تحت تأثیر افزایش غلظت عناصر مس، روی، منگنز و آهن در چهار تکرار قرار گرفتند (غلظت عناصر در جدولهای مربوط دیده می‌شود). برای جلوگیری از آلوده شدن محیط کشت، تمام مراحل فوق در کنار شعله انجام گردید. در نهایت، ارلنها به اتاقک کشت دردمای ۲۰-۲۲ºC و شدت نور ۵۰-٦۰ میکروانیشتین بر مترمربع بر ثانیه منتقل شدند. پس از پایان آزمایش و برداشت جلبکهای محتوی محیط کشت، تعداد سلول، وزن خشک، میزان کلروفیل، میزان اکسیژن محلول و نیز میزان آستاگزانتین محتوی محیط کشت اندازه‌گیری شدند. نتایج حاصل از چهار تکرار، مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت. تعداد سلولهای جلبک به‌وسیله لام هماسیتومتر و میکروسکوپ نوری مدل اُلیمپوس[3] با بزرگنمایی ٦٦۰ شمارش و تعداد سلولها در هر میلی لیتر محیط کشت محاسبه شدند.

برای اندازه‌گیری وزن خشک جلبک، ابتدا۱۰mL از سوسپانسیون حاوی جلبک به وسیله فیلترهای میلی‌پور (اندازهٔ منفذ ۰/٤٥μ) فیلتر و در دمای ۸۰ºC به مدت ۱۲ ساعت خشک شدند. در نهایت وزن خشک برحسب گرم در لیتر محاسبه گردید [۱٦]. برای اندازه‌گیری میزان اکسیژن محلول در محیط کشت از دستگاه اکسیژن مترمدل Germany، A- Oxi۳۲۵ استفاده شد و میزان آن برحسب میلی‌گرم در لیتر محاسبه گردید. کلروفیل محتوی جلبک، پس از استخراج با دی‌متیل‌سولفوکسید[4] ٩٥/٥٪ در دمای ۷۰ºC در طول موج ٦۷۲nM و با استفاده از ضریب جذب $E^{۱cm}_{٪۱} = ۸۷۰$ برحسب mg/L محیط کشت محاسبه گردید [۱۷].

---

[1] Cylindrospermum
[2] Micro Einstein
[3] Olympus
[4] Dimethylsulfoxide

برای اندازه‌گیری مقدار آستاگزانتین، ابتدا به‌منظور تخریب کلروفیل، سلولهای جلبک به وسیله محلول ۵٪ KOH در۳۰٪ متانول تیمار شدند. سپس محلول رویی دور ریخته شد و رسوب آن به‌وسیله دی‌متیل‌سولفوکسید عصاره‌گیری شد [۲]. مقدار آستاگزانتین نیز در طول موج ٤۹۲nm و با استفاده از ضریب $E_{\%0.1}^{1cm} = 2220$ برحسب mg/L تعیین مقدار گردید [۱۶]. سرانجام مقایسه میانگینها با استفاده از آزمون دانکن در سطح ۵٪، با کمک نرم‌افزار آماری SPPS صورت گرفت.

۳- نتایج و بحث

عناصر مس، روی، منگنز و آهن جزء عناصر غذایی ریز مغذی می‌باشند و وجود آنها در محیط کشت گیاهان عالی و جلبکهای سبز به مقادیر کم ضروری است، اما مقادیر زیاد آنها در محیط کشت ایجاد سمیت می‌کند[۱۵]. مطالعه روی تغذیه هماتوکوکوس پلوویالیس با اشکال نیتروژن نیتراتی و آمونیومی نشان داد که روابط پیچیده‌ای میان شکل ازت، رشد جلبک و تشکیل آستاگزانتین وجود دارد [۱]. با مشاهداتی که در سوسپانسیون جلبکی در پایان هفته دوم در زیر میکروسکوپ انجام شد، معلوم گردید در پایان این دوره هیچ سلول رویشی در سوسپانسیون وجود نداشت و تمام سلولهای رویشی به کیست سبز و کیست قرمز تبدیل شدند و تعداد سیستهای قرمز بیشتر از سیستهای سبز بود. با افزایش غلظت عناصر مس، روی، منگنز و آهن محیط کشت بولد معلوم گردید حداکثر تعداد سیستهای سبز و قرمز در غلظت عناصر معدنی محیط کشت شاهد (محیط کشت بولد) دیده می‌شود. با دو برابر کردن غلظت هر یک از عناصر ذکرشدهٔ محیط کشت بولد، تعداد سیستها کاهش یافت، به طوری که با دو برابر کردن غلظت عناصر مس، روی، منگنز و آهن محیط کشت بولد، کاهش کیست سبز بترتیب ۲۹٪، ۲٦٪، ١٤٪ و ۸٪ و کاهش کیست قرمز نیز بترتیب ۲۲٪، ۲۷٪، ۲۹٪ و ٤۱٪ بود (جدولهای۱-۴). لازم به ذکر است که با ٤ یا ٦ برابر کردن غلظت عناصر ذکر شده محیط کشت بولد، کاهش تعداد سیستهای سبز و قرمز تشدید می‌گردد. به‌علاوه نتایج نشان داد که در پایان هفته دوم کشت، تعداد سیستهای قرمز بشدت و به طور معناداری کاهش یافت؛ یعنی تیمار شاهد دارای بیشترین کیست قرمز و سایر تیمارهای عناصر ریزمغذی دارای کمترین تعداد از این نوع سلول بودند. علت آن، کم‌شدن تعداد سلولهای رویشی اولیه، شاید به‌دلیل ممانعت از تقسیم سلولی در اثر سمیت غلظت عناصر ذکر شده باشد که پیامد آن کاهش تعداد سیستهای قرمز در پایان هفته دوم است.

با مصرف غلظتهای مختلف عناصر معدنی، میزان تولید بیوماس (وزن خشک جلبک) نیز متفاوت می‌شود. بیشترین وزن ماده خشک جلبک، در غلظت عناصر مس، روی، منگنز و آهن برابر غلظت این عناصر در محیط کشت بولد به دست می‌آید. با دوبرابر کردن عناصر ذکرشده، بیوماس کاهش می‌یابد و میزان کاهش وزن خشک جلبک در مقایسه با میزان بیوماس تولیدشده در تیمار شاهد (جدولهای ۱-٤) در مورد مس ۱۸٪، روی ٢٤٪، منگنز ۲۳٪ و آهن ۹٪ می‌باشد. با ٤ و ٦ برابر کردن غلظت عناصر ذکر شده در محیط کشت بولد، میزان کاهش تولید ماده خشک نیز تشدید می‌گردد. اُفت ماده خشک شاید به علت سمیت عناصر معدنی، بر تکثیر سلول و پائین آمدن دانسیته سلولی محیط کشت مربوط باشد. براساس مطالعات فرهی آشتیانی و مهدیه، تعداد سلولهای کل در روز دهم و دوازدهم کشت اُفت می‌کند [۱]. علت آن به دلیل ناکافی بودن اطلاعات در این زمینه فعلاً توجیه پذیر نیست.

جدول ١ تأثیر افزایش غلظت مس محیط کشت بر میزان رشد و برخی از خصوصیات فیزیولوژیکی جلبک هماتوکوکوس پلوویالیس در ظرف ١٤ روز

میزان مس محتوي محیط کشت	تعداد سلول (١٠^{٥}×)* در هر mL		وزن خشك** (g/L)	میزان‌کلروفیل محتوي جلبك ** (mg/L)		میزان اکسیژن محلول** (mg/L)		میزان آستاگزانتين محتوي جلبك ** (mg/L)	
	کیست سبز	کیست قرمز		روز هفتم	روز چهاردهم	روز هفتم	روز چهاردهم	روز هفتم	روز چهاردهم
برابر میزان مس محیط کشت بولد (شاهد)	*** ١/٠٥ ^{a} (١٠٠)	٣/٧٥ ^{a} (١٠٠)	٠/٩٤ ^{a} (١٠٠)	٢/٩٨ ^{a} (١٠٠)	٢/١٠ ^{a} (١٠٠)	٦/٣٧ ^{a} (١٠٠)	٣/٨٣ ^{a} (١٠٠)	٢/٤٥ ^{a} (١٠٠)	٦/٣٥ ^{a} (١٠٠)
٢برابر میزان مس محیط کشت بولد	٠/٧٥ ^{b} (٧١)	٢/٩٢ ^{b} (٧٨)	٠/٨٢ ^{b} (٨٧)	٢/٥٤ ^{b} (٨٥)	١/٦٥ ^{b} (٧٩)	٥/٨٢ ^{b} (٩١)	٣/٥٩ ^{b} (٩٤)	١/٨٥ ^{b} (٧٦)	٤/٩٩ ^{b} (٧٩)
٤ برابر میزان مس محیط کشت بولد	٠/٥٠ ^{c} (٤٨)	٢/٥١ ^{c} (٧٠)	٠/٧٦ ^{c} (٨١)	٢/٣٣ ^{c} (٧٨)	١/٤٢ ^{c} (٦٨)	٥/٤٢ ^{c} (٨٥)	٣/٢٤ ^{c} (٨٥)	١/٧٢ ^{c} (٧٠)	٤/١٤ ^{c} (٦٥)
٦ برابر میزان مس محیط کشت بولد	٠/٣ ^{d} (٢٩)	١/٩٤ ^{d} (٥٢)	٠/٦٨ ^{d} (٧٢)	٢/١٤ ^{d} (٧٢)	١/١٤ ^{d} (٥٤)	٥/٢٦ ^{d} (٨٣)	٣/٠٨ ^{d} (٨٠)	١/٥٠ ^{d} (٦١)	٣/٠٨ ^{d} (٤٩)

* تعداد سلولها در شروع آزمایش معادل ١٠^{٥}×٠/٧٨ سلول بود و تمام سلولها در شروع آزمایش در فاز رویشی بودند.

** وزن خشک جلبکها، میزان کلروفیل محتوی آنها، میزان اکسیژن محلول محیط کشت و میزان آستاگزانتین محتوی جلبکها، در شروع آزمایش بترتیب ٠/٢١g/L، ٠/٦٩mg/L، ٠/٤١mg/L و ٥/١٤mg/L بودند.

*** مقایسهٔ میانگینها در سطح ٥٪ انجام شده است و در هر ستون تیمارهایی که حروف مشترک ندارند از نظر آماری معنادارند (آزمون دانکن)، اعداد داخل پرانتز اعداد نسبی است.

جدول ٢ تأثیر افزایش غلظت روی محیط کشت بر میزان رشد و برخی از خصوصیات فیزیولوژیکی جلبک هماتوکوکوس پلوویالیس در ظرف ١٤ روز

غلظت روي محتوي محیط کشت	تعداد سلول (١٠^{٥}×)*در هر mL		وزن خشك** (g/L)	میزان‌کلروفیل محتوي جلبك ** (mg/L)		میزان اکسیژن محلول** (mg/L)		میزان آستاگزانتين محتوي جلبك ** (mg/L)	
	کیست سبز	کیست قرمز		روز هفتم	روز چهاردهم	روز هفتم	روز چهاردهم	روز هفتم	روز چهاردهم
برابرمیزان روي‌محیط کشت بولد (شاهد)	*** ١/٤٧ ^{a} (١٠٠)	٣/٣٠ ^{a} (١٠٠)	٠/.٨٨ ^{a} (١٠٠)	٢/٥٠ ^{a} (١٠٠)	١/٨٠ ^{a} (١٠٠)	٥/٦٧ ^{a} (١٠٠)	٣/٧٥ ^{a} (١٠٠)	٢/٠٠ ^{a} (١٠٠)	٥/٧٠ ^{a} (١٠٠)
٢ برابر میزان روي محیط کشت بولد	١/٠٨ ^{b} (٧٤)	٢/٤٠ ^{b} (٧٣)	٠/٧٦ ^{b} (٨٦)	١/٧٨ ^{b} (٧١)	١/٣٤ ^{b} (٧٥)	٥/٤٥ ^{b} (٩٦)	٣/٥٢ ^{b} (٩٤)	١/٨٠ ^{b} (٩٠)	٤/٥٠ ^{b} (٧٩)
٤ برابر میزان روي محیط کشت بولد	٠/٩٦ ^{c} (٦٥)	٢/٠١ ^{c} (٦١)	٠/٦٥ ^{c} (٧٤)	١/٦٥ ^{c} (٦٦)	١/٢٢ ^{c} (٦٨)	٥/٢٠ ^{c} (٩٢)	٣/٣٥ ^{c} (٨٩)	١/٥٠ ^{c} (٧٥)	٣/٧٠ ^{c} (٦٥)
٦ برابر میزان روي محیط کشت بولد	٠/٤١ ^{d} (٢٨)	١/٢٢ ^{d} (٣٧)	٠/٦٠ ^{d} (٦٨)	١/٥٤ ^{d} (٦٢)	١/١٦ ^{d} (٦٥)	٥/٠٨ ^{d} (١٩٠)	٣/٢٠ ^{d} (٨٥)	١/٤٠ ^{d} (٧٠)	٢/١٠ ^{d} (٣٧)

* تعداد سلولها در شروع آزمایش معادل ١٠^{٥}×٠/٦٩ سلول بود و تمام سلولها در شروع آزمایش در فاز رویشی بودند.

** وزن خشک جلبکها، میزان کلروفیل محتوی آنها، میزان اکسیژن محلول محیط کشت و میزان آستاگزانتین محتوی جلبکها، در شروع آزمایش بترتیب ٠/٢٠g/L، ٠/٥٩mg/L، ٠/٣٧mg/L و ٤/٨٣mg/L بودند.

*** مقایسهٔ میانگینها در سطح ٥٪ انجام شده است و در هر ستون تیمارهایی که حروف مشترک ندارند از نظر آماری معنادارند (آزمون دانکن)، اعداد داخل پرانتز اعداد نسبی است.

جدول ۳ تأثیر افزایش غلظت منگنز محیط کشت بر میزان رشد و برخی از خصوصیات فیزیولوژیکی جلبک هماتوکوکوس پلوویالیس در ظرف ١٤ روز

غلظت منگنز محتوي محیط کشت	تعداد سلول (۱۰^{5}×)*در هر mL		وزن خشك** (g/L)	میزان‌کلروفیل محتوي جلبك ** (mg/L)		میزان اکسیژن محلول** (mg/L)		میزان آستاگزانتین محتوي جلبك ** (mg/L)	
	کیست سبز	کیست قرمز		روز هفتم	روز چهاردهم	روز هفتم	روز چهاردهم	روز هفتم	روز چهاردهم
برابر میزان منگنز محیط کشت بولد (شاهد)	*** ۱/۱۱^{a} (۱۰۰)	۲/۸۳ ^{a} (۱۰۰)	۰/۸٤ ^{a} (۱۰۰)	۲/۱٦ ^{a} (۱۰۰)	۱/٦۰^{a} (۱۰۰)	۵/۳۱ ^{a} (۱۰۰)	۳/۹۰ ^{a} (۱۰۰)	۱/۹٦ ^{a} (۱۰۰)	۵/۰۹ ^{a} (۱۰۰)
۲برابر میزان منگنز محیط کشت بولد	۰/۹۵^{b} (۸٦)	۲/۰۱^{b} (۷۱)	۰/۷۳ ^{b} (۸۷)	۱/۷۳ ^{b} (۸۰)	۱/۲٤ ^{b} (۷۸)	٤/۷٤ ^{b} (۸۹)	۳/٦۰ ^{b} (۹۲)	۱/۸۸ ^{b} (۹٦)	٤/٤۳^{b} (۸۷)
٤ برابر میزان منگنز محیط کشت بولد	۰/۸۰ ^{c} (۷۲)	۱/۵۰^{c} (۵۳)	۰/٦٤^{c} (۷٦)	۱/٦٤ ^{c} (۷٦)	۱/۱٤ ^{c} (۷۱)	٤/٦۲^{c} (۸۷)	۳/٤٤ ^{c} (۸۸)	۱/۷۹ ^{c} (۹۱)	۳/۸٦ ^{c} (۷٦)
٦ برابر میزان منگنز محیط کشت بولد	۰/٦۵ ^{d} (۵۹)	۱/۲۱ ^{d} (٤۳)	۰/٦۱ ^{d} (۷۳)	۱/۵٦ ^{d} (۷۲)	۱/۰٤ ^{d} (٦۵)	٤/٤۲ ^{d} (۸۳)	۳/۳٤ ^{d} (۸٦)	۱/٦۸ ^{d} (۸٦)	۲/۹۹^{d} (۵۹)

* تعداد سلولها در شروع آزمایش معادل ۰/۷۲×۱۰۵ سلول بود و تمام سلولها در شروع آزمایش در فاز رویشی بودند.

** وزن خشک جلبکها، میزان کلروفیل محتوی آنها، میزان اکسیژن محلول محیط کشت و میزان آستاگزانتین محتوی جلبکها، در شروع آزمایش بترتیب ۰/۱۸g/L ، ۰/۵۱mg/L، ۰/۳۸ mg/L و ٤/۳۵ mg/L بودند.

*** مقایسهٔ میانگینها در سطح ۵٪ انجام شده است و در هر ستون تیمارهایی که حروف مشترک ندارند از نظر آماری معنادارند (آزمون دانکن)، اعداد داخل پرانتز اعداد نسبی است.

جدول ٤ تأثیر افزایش غلظت آهن محیط کشت بر میزان رشد و برخی از خصوصیات فیزیولوژیکی جلبک هماتوکوکوس پلوویالیس در ظرف ١٤ روز

غلظت آهن محتوي محیط کشت	تعداد سلول (۱۰^{5}×)*در هر mL		وزن خشك** (g/L)	میزان کلروفیل محتوي جلبك ** (mg/L)		میزان اکسیژن محلول** (mg/L)		میزان آستاگزانتین محتوي جلبك ** (mg/L)	
	کیست سبز	کیست قرمز		روز هفتم	روز چهاردهم	روز هفتم	روز چهاردهم	روز هفتم	روز چهاردهم
برابر میزان آهن محیط کشت بولد (شاهد)	*** ۱/۲۰^{a} (۱۰۰)	۲/۸۵ ^{a} (۱۰۰)	۰/۷۹ ^{a} (۱۰۰)	۲/۲۲ ^{a} (۱۰۰)	۱/٦٤^{a} (۱۰۰)	۵/٤۹ ^{a} (۱۰۰)	۳/۷٤ ^{a} (۱۰۰)	۱/۷٤ ^{a} (۱۰۰)	۵/۱۰^{a} (۱۰۰)
۲برابر میزان آهن محیط کشت بولد	۱/۱۰^{ab} (۹۲)	۱/٦۹^{b} (۵۹)	۰/۷۲ ^{b} (۹۱)	۱/۷۰ ^{b} (۷۷)	۱/۲٦ ^{b} (۷۷)	٤/۹۲ ^{b} (۹۰)	۳/۵۱ ^{b} (۹٤)	۱/۵۸ ^{b} (۹۱)	٤/۱۸^{b} (۸۱)
٤ برابر میزان آهن محیط کشت بولد	۰/۸٦ ^{bc} (۷۲)	۱/۳۵^{c} (٤۷)	۰/٦۸^{b} (۸٦)	۱/۵۹ ^{c} (۷۲)	۱/۱۷ ^{c} (۷۱)	٤/۸۲^{c} (۸۸)	۳/۳۱ ^{c} (۸۹)	۱/٤٤ ^{c} (۸۳)	۳/٦۰ ^{c} (۷۱)
٦ برابر میزان آهن محیط کشت بولد	۰/٦۰ ^{d} (۵۰)	۰/۹۰ ^{d} (۳۲)	۰/٦۱ ^{c} (۷۷)	۱/۵۱ ^{d} (٦۸)	۱/۱۰ ^{d} (٦۷)	۱/۳۷ ^{d} (۲۵)	۲/٤۷ ^{d} (٦٦)	۱/۳۷ ^{d} (۷۸)	۲/٤۷^{d} (٤۸)

* تعداد سلولها در شروع آزمایش معادل ۰/٦۹×۱۰۵ سلول بود و تمام سلولها در شروع آزمایش در فاز رویشی بودند.

** وزن خشک جلبکها، میزان کلروفیل محتوی آنها، میزان اکسیژن محلول محیط کشت و میزان آستاگزانتین محتوی جلبکها، در شروع آزمایش بترتیب ۰/۱۷g/L ، ۰/۵۷ mg/L، ۰/۳٦mg/L و ٤/۵٤mg/L بودند.

*** مقایسهٔ میانگینها در سطح ۵٪ انجام شده است و در هر ستون تیمارهایی که حروف مشترک ندارند از نظر آماری معنادارند (آزمون دانکن)، اعداد داخل پرانتز اعداد نسبی است.

مقدار کلروفیل محتوی جلبک در روز هفتم در مقایسه با روز اول افزایش یافت، افزایش کلروفیل در روز هفتم به دلیل تبدیل شدن سلولهای رویشی به کیست سبز رنگ است. تأثیر عناصر مس، روی، منگنز و آهن در مقدار کلروفیل محتوی جلبک در روز هفتم تفاوت معناداری را با میزان کلروفیل محتوی جلبکها در شروع آزمایش نشان می‌دهد، هر اندازه غلظت عناصر ذکرشده محتوی محیط کشت بیشتر شود، این افزایش کمتر بود به طوری که با دو برابر شدن غلظت عناصر مس، روی، منگنز و آهن محیط کشت، میزان کلروفیل محتوی محیط کشت نیز کاهش می‌یابد (جدولهای ۱-٤). علت اُفت کلروفیل در اثر افزایش غلظت عناصر ریزمغذی محتوی محیط کشت به دلیل ممانعت از سنتز کلروفیل و احتمالاً به دلیل آسیب‌دیدن سیستم فتوسنتزی در اثر پراکسیداسیون لیپیدها [۱۲] در اثر سمیت عناصر ذکرشده است. همچنین کاهش میزان کلروفیل محیط کشت در روز چهاردهم نسبت به روز هفتم در اثر سمیت عناصر ریز مغذی محیط کشت تشدید شد، که دلیل آن تبدیل سیستهای سبز به کیست قرمز رنگ است. اُفت کلروفیل محتوی محیط کشت جلبکهای ١٤ روزه نسبت به جلبکهای ۷ روزه در اثر مصرف زیاد عناصر ریزمغذی (٦ برابر عناصر ریزمغذی محیط کشت بولد) در اثر تیمارهای عنصر مس معادل ۱/۰۰mg/L، عنصر روی معادل ۰/۳۸mg/L، عنصر منگنز ۰/۵۲mg/L و عنصر آهن معادل ۰/٤۱mg/L بود. دلیل این کاهش شاید به سمیت عناصر ذکرشده بر سرعت تکوین سلولهای این جلبک مربوط باشد.

مقدار آستاگزانتین محتوی جلبک در شروع آزمایش برای تیمارهای مختلف یک اندازه و حدود ۰/٤۱mg/L تعیین شد که در روز هفتم و چهاردهم کشت به دلیل شروع بیوسنتز آستاگزانتین در سیستهای سبز، میزان آن افزایش یافت. نتایج مندرج در جدولهای ۱-٤ نشان می‌دهد، هر اندازه غلظت عناصر مس، روی، منگنز و آهن محتوی محیط کشت بیشتر شود، مقدار آستاگزانتین به طور معناداری کاهش می‌یابد، به گونه‌ای که نمونه‌های مربوط به تیمار غلظت عناصر ریز مغذی محیط کشت بولد نسبت به سایر تیمارها بیشترین میزان آستاگزانتین را دارا می‌باشد. به علاوه میزان آستاگزانتین در تبعیت از زمان کشت بشدت افزایش می‌یابد که احتمالاً به دلیل افزایش تقسیم سلولی در سلولهای رویشی اولیه و افزایش تعداد سلولهای تولیدکننده آستاگزانتین است. لازم به ذکر است که میزان آستاگزانتین محتوی جلبک در روز چهاردهم کشت نسبت به میزان آستاگزانتین در روز هفتم کشت نیز بشدت افزایش یافت. این افزایش بخصوص در تیمار شاهد قابل توجه است که میانگین آن در چهار آزمایش مجزای انجام شده معادل ٤/۳mg/L به‌مدت ۷ روز است. دلیل این افزایش نیز تبدیل شدن سیستهای سبزرنگ به سیستهای قرمزرنگ می‌باشد. با دو برابر شدن غلظت عناصر مس، روی، منگنز و آهن محیط کشت بولد، میزان تولید آستاگزانتین نیز کاهش یافت، این کاهش در مورد عناصر ذکرشده پس از هفت روز بترتیب ۲٤٪،۱۰٪، ٤٪ و ۹٪ و پس از ١٤ روز بترتیب ۲۱٪، ۲۱٪، ۲۳٪ و ۲۸٪ برآورد شد (جدولهای ۱-٤). با ٤ و ٦ برابر شدن غلظت عناصر ذکر شده محیط کشت بولد، میزان آستاگزانتین محتوی جلبک به طور شدید کاهش نشان داد. این کاهش در مورد ٦ برابر شدن عناصر مس، روی، منگنز و آهن در روز چهاردهم کشت بترتیب ٤۹٪، ۳۷٪، ۵۹٪ و ٤۸٪ به‌دست آمد.

میانگین میزان اکسیژن محلول محیط کشت چهار آزمایش مجزا در شروع آزمایش حدود ٤/۷ میلی‌گرم اکسیژن در لیتر بود که این مقدار در روز هفتم آزمایش افزایش یافت و به میانگین ۵/۷ رسید (میانگین میزان اکسیژن محلول محیط کشت از ارقام مندرج در پی‌نوشت جدولهای چهارگانه محاسبه شده است). علت این افزایش شاید ناشی از افزایش تعداد سلولهای رویشی باشد. با ملاحظه ارقام مندرج در جدولهای ۱-٤ معلوم می گردد که مقدار اکسیژن محلول در روز هفتم، با افزایش مقدار عناصر ریز مغذی محیط کشت به طور معناداری کاهش داشته است، علت این کاهش، ممانعت

از سنتز کلروفیل و احتمالاً آسیب دیدن سیستم فتوسنتزی در اثر پراکسیداسیون لیپیدها به وسیله غلظتهای سمی عناصر ریزمغذی مس، روی، منگنز و آهن است [۱۲]. در روز چهاردهم آزمایش نیز میزان اکسیژن محلول محیط کشت در هر چهار تیمار، تمام عناصر مورد مطالعه کاهش داشتند. کاهش اکسیژن محلول محیط کشت تیمار شاهد در روز چهاردهم نسبت به میزان اکسیژن محیط کشت همان تیمار در روز هفتم، در مورد سمیت مس ٤٠٪، سمیت روی ٣٤٪، سمیت منگنز ۲۷٪ و سمیت آهن ۳۲٪ برآورد شد (از تفاوت میزان اکسیژن محلول محیط کشت روز هفتم و روز چهاردهم محاسبه شده است). علت این کاهش شاید کم شدن ظرفیت فتوسنتزی [۱۸]، افزایش سرعت تنفس به علت تغییرات مورفولوژیکی و تشکیل آستاگزانتین باشد.

از آنجا که شدت تبدیل سلولهای رویشی دو تاژکه جلبک هماتوکوکوس پلوویالیس به سلولهای سبزرنگ و قرمز رنگ کلنیهای این جلبک، تابع غلظت عناصر معدنی محیط کشت است، بنابراین به‌نظر می‌رسد این جلبک بتواند در آزمون بیولوژیکی برای اندازه‌گیری عناصر معدنی کاربرد داشته باشد و از آنها بتوان به عنوان شاخصی برای تعیین آلودگی آب به‌وسیله فلزات سنگین استفاده کرد. به علاوه به نظر می رسد این جلبک بتواند ابزار مناسبی برای بررسی آثار سمی این فلزات بر سلولهای گیاهی باشد.

منابع

[۱] فرهی آشتیانی ص.، مهدیه م.؛ «تأثیر شکل ازت بر رشد و میزان آستاگزانتین محتوای جلبک سبز تک سلولی هماتوکوکوس پلوویالیس»؛ *مجله علوم دانشگاه تهران*؛ جلد ۲۸، شماره ۲؛ ۱۳۸۱؛ صص. ۲۱۵-۲۲٤.

[2] Boussiba S., Fan L., vonshake A.; Enhancement and determination of astaxanthin accumulation in the green alga *Haematococcus pluvialis*. Meth. Enzymol; 1992; 213: 386-391.

[3] Boussiba S., Vonshak A.; Astaxanthin accumulation in the green alga *Haematococcus pluvialis*. Plant Cell Physiol. 1991; 32: 1077-1082.

[4] Krinsky N. I., Mathews-Roth M., Taylor R. F. (eds); Carotenoids: Chemistry and Biology. Plenum Prees, Newyork. 1989.

[5] Matsuno T.; «Xanthophylls as precursors of retinoids». *Pure Appl. Chem*.; 1991; 63: 81-88.

[6] Tanaka T., Morishita Y., Suzui M., Kojima Tl., Okumura A., Mori H.; «Chemoprevention of mouse urinary bladder carcinogenesis by the naturally occurring carotenoid astaxanthin». *Carcinogenesis*; 1994; 15: 15-19.

[7] No H. K., Strorebakken T.; «Pigmentation of rainbow trout with astaxanthin and canthaxanthin in freshwater and saltwater». *Aquaculture*; 1992; 101: 123-134.

[8] Sommer T. R., Pous W. T., Morrissy N. M.; «Utiliztion of microalgal astaxanthin by rainbow trout (Oncorhynchus mykiss)»; *Aquaculture*; 1991; 94: 79-88.

[9] Terao J.; Antioxidant activity of ß-carotene related carotenoids in solution. *Lipid*. 1989; 24: 659-661.

[10] Nishigakj I., Dmitrovskii A., Miki W., Yagi K.; «Suppressive effect of astaxanthin on lipid peroxidation induced rats». *J. Clin. Biochem. Nutr*; 1994; 16: 161-166.

[11] De Filippis L. F., Hampp R., Ziegler H.; The effects of sublethal concentions of zine, cadmimum and mercury on Euglena growth and Pigments. Z. Pflanzenphysiol; *J. Phycol*. 1981; 30:829-833.

[12] Braune W., Hader D-P., Hagen C.; Copper toxicity in the green alga *Haematococcus lacustris*: Flagellates become blind by copper (II) ions. Cytobios. 1994; 77: 29-39.

[13] Xylaender M., Fischer W., Braune W.; Influence of Mercury on the Green alga *Haematococcus lacustris*, Inhibition effects and recovery of impact. *Bot. Acta*. 1998; 111: 467-473.

[14] Singh D. P., Khare P., Bisen P.S.; ((Effect of Ni^{2+}, Mg+ and Cu^{+} on growth, oxygen evolution and photosynthetic electron transport in Cylindrospermum IU 942; *J. Plant Physiol*. 1989; 134: 406-412.

[۱۵] یزدانی م.؛ «بررسی عکس‌العمل رشد جلبک سبزهماتوکوکوس (*Haematococcus pluvialis*) نسبت به غلظتهای مختلف منتخبی از عناصر معدنی»؛ *پایان‌نامه کارشناسی‌ارشد علوم گیاهی*؛ دانشگاه تربیت مدرس؛ ۱۳۸۲.

[16]Kobayashi M., Kakizono T., Navai S.; ((Astaxanthin production by a green alga, *Haematococcus pluvialis* accompanied with morphological changes in acetate media)); *J. Ferment. Bioengin*; 1991; 71: 335-339.

[17] Fam L., Vonshak A., Boassiba S.; ((Effect of temperature and irradiance on growth of *Haematococcs pluvialis*. *J. Phycol*; 1994; 30: 829-833.

[18] Zlotnik (Shmerler) I., Sukenik A., Dubinsky Z.; Physiological and photosynthetic changes during the formation of red aplanospores in the chlorophyte Haematococcus pluvialis; *J. Phycol;* 1993; 29: 463-469.