Archive of SID

علوم و تکنولوژی محیط زیست، دوره بیست و دوم، شماره سه، خرداد ماه ۹۹

تنوع زیستی سه جدایه ایرانی ریزجلبک *Dunaliella* و پتانسیل بالقوه آن‌ها برای کاربردهای بیوتکنولوژیکی

لیلا زرندی میاندوآب[۱]

محمدامین حجازی[۲*]

aminhejazi@abrii.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۵/۳/۱۸ **تاریخ پذیرش:۹۷/۲/۴**

چکیده

زمینه و هدف: کشور ایران زیستگاه‌های متنوعی برای ریزجلبک شورزی *Dunaliella* در دریاچه‌ها و تالاب‌های شور خود دارد. تا کنون مطالعات محدودی در زمینه رفتار فیزیولوژیکی جدایه‌های بومی ایران از جنس *Dunaliella*، در شرایط متفاوت محیطی از جمله شدت نور و غلظت نمک صورت گرفته است،

روش بررسی: پژوهش حاضر به صورت آزمایش فاکتوریل سه عاملی با دو سطح نور (۲۵ و ۵۰۰ میکرومول فوتون بر متر مربع بر ثانیه)، سه سطح شوری (۲، ۳ و ۴ مولار نمک NaCl)و چهار جدایه (SH1، M1، G28 و CCAP19/18) در قالب طرح کاملا تصادفی با سه تکرار اجرا شد. جدایه‌های مورد آزمایش از بندر شرفخانه دریاچه ارومیه (SH1)، مهارلو (M1) و تالاب گاوخونی (G28) انتخاب شدند. جدایه غیر بومی و استاندارد CCAP19/18 به منظور مقایسه رفتار جدایه‌های بومی استفاده گردید.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که رفتار فیزیولوژیک ریزجلبک نه تنها به عوامل محیطی، بلکه به ویژگی‌های ژنتیکی و پتانسیل‌های متابولیسمی ریزجلبک مذکور مرتبط می‌باشد. جدایه شرفخانه در نور ۲۵ میکرومول‌فوتون‌برمربع‌برثانیه و شوری ۳ مولار بیش‌ترین تعداد سلول در واحد حجم و محتوی کلروفیل کل در هر سلول را نشان داد. در حالی‌که بالاترین محتوی کاروتنویید در جدایه مهارلو در محیطی با شوری ۳ مولار نمک و تحت نور ۲۵ میکرومول‌فوتون‌برمترمربع‌برثانیه اندازه‌گیری شد.

بحث و نتیجه‌گیری: با بررسی نتایج می‌توان پیشنهاد کردکه الف) جدایه ارومیه (SH1) استعداد رشد و تکثیر بالایی داشته و برای تولید زیست توده بالا مناسب است ب) جدایه‌های دریاچه‌های ارومیه (SH1) و مهارلو (M1) برای استحصال کلروفیل و کاروتنویید مناسب‌ترند. ج) استفاده از جدایه مهارلو (M1) در مطالعات فتوسنتزی منطقی به‌نظر می‌رسد.

واژه‌های کلیدی: رشد، رنگدانه، شوری، نور.

۱- استادیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز، ایران

۲- دانشیار، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی شمالغرب و غرب، پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی.

* (مسوول مکاتبات)

www.SID.ir

Archive of SID

J. Env. Sci. Tech., Vol 22, No.3, May, 2020

Biodiversity of Three Iranian *Dunaliella* Isolates and Their Potential for Biotechnological Applications

Leila Zarandi-Miandoab[1]

Mohhamad-Amin Hejazi[2*]

aminhejazi@abrii.ac.ir

Admission Date:April 24, 2018 Date Received: June 7, 2016

Abstract

Background and Objective: Iran has various habitats in lakes and wetlands for microalgae *Dunaliella*. There are limited researches on the physiological behavior of Iranian *Dunaliella* in different environments including light intensity and salt concentration.

Method: The experiment was done based on completely randomized design with three replications and three factorials including two light levels (25 and 500 µmol photon $m^{-2}s^{-1}$), three salinity levels (2, 3 and 4 M NaCl) and three isolates (SH1, M1, G28) and CCAP19/18 strain.

The isolates SH1, M1 and G28 were selected from Urmia Lake, Maharloo Lake and Gavkhoni wetlands, respectively. A non-native and standard strain, CCAP19/18, was used to compare the behavior of the native isolates.

Findings: The results showed that microalgae physiological behavior affected not only by environmental factors but also by genetic characteristics and the metabolic potential of microalgae. Under 25 µmol photon $m^{-2}s^{-1}$ and 3 M NaCl condition, Urmia isolate (SH1) had high cell number and chlorophyll content. However, Maharloo isolate (M1) was showed high carotenoids contents under above mentioned condition.

Discussion and Conclusions : The results are showing that: a) isolate with Urmia lake origin (SH1) has good potential for high growth and reproduction and it is the proper candidate for high biomass production.With measuring traits such as growth and cell number, content and photosynthetic pigment ratios may suggest that b) isolates with Urmia (SH1) and Maharloo (M1) lakes origin are suitable for the extraction of chlorophyll and carotenoids and c) it seems reasonable to expect that the Maharloo isolate (M1) is proper for photosynthetic studies.

Key words: Growth, Light, Pigment, Salinity.

1- Assistant Professor, Department of Biology, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran

2- Associate Professor, Department of Food Biotechnology, Branch for Northwest & West region, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tabriz, Iran. * (Corresponding Author)

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

جلبک‌ها (به‌خصوص ریزجلبک‌ها) جزء قدیمی‌ترین جانداران روی زمین به‌شمار می‌روند. به دلیل تنوع تکاملی که طی میلیون‌ها سال حاصل شده است جلبک‌ها قادرند در زیستگاه‌های بسیار متنوع از لحاظ دما (مناطق قطبی تا چشمه‌های آب گرم)، نور تابشی (اعماق ۵ متری آب‌ها تا نقاط مرتفع کوهستانی)، اسیدیته (در محدوده ۱ تا ۱۱) و شوری (آب‌های شیرین تا فوق اشباع از نمک) رشد کنند. نیاز و یا تحمل ریزجلبک‌ها به شوری آن‌ها را به گروه‌های مختلف گلیکوفیل و یا هالوفیل تقسیم می‌کند. جلبک‌های سرده *Dunaliella* به شاخه کلروفیتا[1]، راسته کلامیدوموندالز[2] و خانواده دونالیلاسه[3] تعلق دارند (۱). زیستگاه طبیعی این جلبک‌ها دریاچه‌ها و برکه‌های شور است. در ایران *Dunaliella* در دریاچه‌های ارومیه، مهارلو، گاوخونی و قم یافت می‌شود و می‌تواند شوری‌های تا حد اشباع را نیز تحمل نمایید. *Dunaliella* از نظر فیزیولوژیک بسیار منعطف بوده و به سرعت قابلیت انطباق با شرایط محیطی جدید (از جمله تغییرات غلظت شوری در محیط، تغییرات شدت نور، دما و غلظت مواد معدنی محیط) را بدست می‌آورد (۲). مطالعات نشان داده که هر جلبک با سطح بیشینه‌ای از شدت نور اشباع شده و عمل فتوسنتز را انجام نخواهد داد. از طرف دیگر هر جلبک برای شروع فتوسنتز نیاز به یک کمینه شدت تابش دارد. بنابراین محدوده بهینه نور برای رشد در مورد هر موجود فتوسنتز کننده ویژه خودش می‌باشد. هرگونه افزایش و یا کاهش در شدت نور بهینه تا حدودی توسط جلبک ها تحمل و در صورت افزایش بیش از حد تنش تلقی خواهد شد. از آنجا که ریزجلبک *Dunaliella*به‌خوبی توانایی تحمل شرایط سخت محیطی را دارد ولی جهت جلوگیری از ابهام، اغلب از اصطلاح تنش برای تغییر شرایط محیطی استفاده می‌شود. غلظت نمک کلریدسدیم در محیط کشت ریزجلبک‌ها تحت عنوان شوری مورد بررسی قرار می‌گیرد. شوری و یا تنش اسمزی باعث مهار فتوسنتز در جلبک‌ها می‌شود که ممکن است با مهار فعالیت فتوسیستم II همراه باشد. *Dunaliella salina* اساساً ساکن اکوسیستم‌های آب‌شور است ولی غلظت‌های متفاوت نمک اثرات مختلفی بر فیزیولوژی آن می‌گذارد (۳).

ایران بخشی از سرزمین‌های خشک و نیمه خشک آسیا با بارش سالانه‌ی نسبتاً کم (در حدود۴۰۰ میلی‌متر در سال) است (۴). از همین‌رو، دریاچه‌های آن کم و اغلب در فروافتادگی‌های زمین‌ساختی جوان، قرار دارند (۵). با این وجود بیش از ۱۱۰ تالاب و ۸۰ دریاچه دارد که برخی از آن‌ها دارای آب شور و برخی دارای آب شیرین هستند. محیط‌های آب شور ایران در مناطق جغرافیایی متنوعی واقع شده‌اند و تفاوت‌های زیادی از نظر ویژگی‌های محیطی دارند (شکل ۱).

از جمله این دریاچه‌ها می‌توان به دریاچه‌های ارومیه (رضائیه)، قم، بختگان و مهارلو و... و از جمله تالاب‌ها می‌توان به انزلی، هامون، گاوخونی، شورگل و... اشاره کرد. بزرگ‌ترین و شورترین آبگیر دایمی داخلی ایران دریاچه ارومیه است که در گذشته «چی‌چست» و «کبودان» نام داشته، و وسعتی نزدیک به ۵۵۰۰ کیلومتر مربع دارد. از نظر اقلیمی این دریاچه در منطقه‌ای نیمه خشک و در ارتفاع ۱۲۸۷ متری از سطح دریا قرار دارد. ترکیب شیمیایی آب این دریاچه طی فصول مختلف متغییر می‌باشد. میزان ورودی بارش‌های جوی و رودخانه‌ها مستقیماً ترکیب آب را تحت تاثیر قرار می‌دهند. به طور متوسط شوری آب دریاچه ارومیه حدود ۲۱۷ گرم در لیتر (در تابستان ۱۳۹۳ به ۵۰۰ گرم‌درلیتر رسید) است که از این لحاظ جزو دریاچه‌های فوق اشباع از نمک جهان می‌باشد (۶). آب دریاچه‌ی ارومیه با pH حدود ۷/۲ تا ۷/۶ و شوری از نوع کلریدسدیم، منیزیم و سولفات سدیم است. به رغم شوری زیاد زیستگاه طبیعی جلبک سبز *Dunaliella salina* ، سخت‌پوست *Artemia salina* و انواع باکتری‌های شورپسند می‌باشد. این جانداران در دوام اکوسیستم دریاچه نقش مؤثر دارند و از نابودی آن جلوگیری می‌کنند. دریاچه ارومیه قابل کشتیرانی بوده و بنادر متعددی نظیر بندر شرفخانه و گلمانخانه در اطراف آن وجود دارد.

1- Chlorophyta
2- Clamidomonas
3- Dunaliellacea

www.SID.ir

دریاچه‌ی مهارلو در حدود ۱۸ کیلومتری جنوب شرقی شیراز قرار دارد. در ارتفاع ۱۴۶۰ متری از سطح دریا جای دارد و در عمیق ترین نقطه ۳ متر عمق دارد. به همین دلیل میزان تبخیر آن بالاست و بخشی از بستر آن توسط لایه‌ای از نمک پوشانده شده است. تنها در بخش‌های شمالی و مرکزی دریاچه آب وجود دارد که دارای ژرفای خیلی کم (حداکثر ۵۰ سانتی‌متر) و شوری زیاد است. تأمین کننده‌ی اصلی آب این دریاچه رودها و آبراهه‌هایی هستند که از شمال غربی و جنوب شرقی در آن تخلیه می‌شوند. مساحت آن در فصول مختلف متفاوت و تابع بارش‌های جوی است. جدا از تبخیر زیاد، نهشته‌های گچی سازند ساچون و دو گنبد نمکی واقع در شرق این دریاچه، در شوری بی‌اندازه‌ی آن تأثیر به سزایی دارند. آب این دریاچه از نوع کلریدسدیم، کلرید منیزیم و سولفات سدیم است. از نمک این دریاچه برای صنایع پتروشیمی استفاده می‌شود. زیرا بالابودن پتاسیم و به ویژه منیزیم در شورابه‌های دریاچه ی مهارلو، امکان استحصال اقتصادی نمک‌های منیزیم به عنوان فرآورده‌ی اصلی و پتاسیم به عنوان محصول فرعی را امکان‌پذیر کرده است.

همچنین باتلاق گاوخونی معروف‌ترین تالاب فلات مرکزی ایران است. این باتلاق با ۴۷۶ کیلومتر مربع‌مساحت، در ۱۶۷ کیلومتری جنوب شرقی اصفهان قرار دارد. حداکثر عمق آن ۱۵۰ سانتی‌متر است. ارتفاع آن ازسطح دریای آزاد ۱۴۷۰ متر است. دریاچه مهارلو و باتلاق گاو خونی با دارا بودن شوری بالا زیستگاه طبیعی جلبک سبز *Dunaliella* می‌باشند (۶).

استفاده از ریزجلبک‌ها برای کاربردهای بیوتکنولوژیکی (به‌ویژه کاربردهای زیست پالایی، اهداف تغذیه‌ای و دارویی و تولید انرژی زیستی) در سال‌های اخیر افزایش یافته است. از حدود ۲۰۰۰ گونه جلبک‌های سبز فقط ۷ یا ۸ گونه مورد بهره‌برداری قرار گرفته‌اند که ***Dunaliella salina*** یکی از آن‌هاست (۷).

نتایج بسیاری از آزمایشات نشان می‌دهد که رشد، فیزیولوژی و بیوشیمی به‌شدت با متغییرهای محیطی از جمله دما، شوری، اسیدیته، عناصر غذایی و نور کنترل می‌شود. بهبود شرایط کشت به سلول‌ها اجازه خواهد داد تا کارایی آن‌ها در زمینه رشد، فتوسنتز و سنتز متابولیت‌های اولیه افزایش یابد. چون رشد نتیجه تعادل پویای انرژی بین تولید و مصرف می‌باشد (۸). بهره‌برداری بیوتکنولوژی از *D. salina* برای تولید بتاکاروتن دانش عمیقی از فیزیولوژی و بیوشیمی این ریزجلبک را در اختیار ما قرار داده است. با این حال، اطلاعات نسبتاً کمی درباره جنبه‌های اکولوژی اعضای جنس *Dunaliella* در محیط‌های فوق شور در دست است. علی رغم این واقعیت که *Dunaliella* اغلب اصلی‌ترین و یا حتی تنها تولید کننده چنین اکوسیستم‌هایی می‌باشد (جایی که سایر فتوسنتزکننده‌های اکسیژنی قادر به رشد نیستند)، در اکوسیستم‌های آبی فوق شور، وابستگی زیادی به تثبیت کربن توسط این جلبک وجود دارد (۳). کشف و درک بهتر غنای تنوع زیستی و ویژگی‌های اکوفیزیولوژیکی ریزجلبک برای افزایش استفاده در جهت اهداف عملی بسیار ضروری و مهم است. از این رو پژوهش حاضر با دو هدف ۱: مقایسه فعالیت جدایه‌های بومی و سویه استاندارد*D. salina* CCAP 19/18 (این جدایه به‌عنوان ارگانیسم مدل برای مطالعات فیزیولوژی مورد استفاده قرار می‌گیرد) در شدت‌های نوری متفاوت و سطوح مختلف شوری و ۲: کشف پتانسیل تنوع زیستی و اکولوژیکی *Dunaliella* موجود در ایران برای مصارف بیوتکنولوژیکی می‌باشد، انجام و نتایج به‌صورت زیر بدست آمد.

مواد و روش‌ها

جلبک مورد استفاده و شرایط کشت ساحل شرقی دریاچه ارومیه (بندرشرفخانه) (شمالی ´۱۶۸۹۰۳ °۳۸،غربی- ´۴۳۵۵۹۰ °۴۵) با نام (*Dunaliella sp.* ABRIINW-SH1) SH1 ، دریاچه مهارلو شیراز (شمالی ´۴۷۲۷۳۱ °۲۹, غربی ´۷۶۸۳۸۵ °۵۲) با نام(*Dunaliella sp.* ABRIINW-M1) M1 و تالاب گاوخونی اصفهان (شمالی ´۱۴۳۰۷۳ °۳۲, غربی ´۸۵۸۶۱۳ °۵۲)با نام (*Dunaliella sp.* ABRIINW-G28) G28 که زیستگاه طبیعی *Dunaliella* می‌باشند، برای انتخاب جدایه‌های بومی انتخاب شدند (شکل ۱).

www.SID.ir

Archive of SID

شکل ۱- موقعیت دریاچه ارومیه (بندر شرفخانه●)، تالاب گاوخونی ▲ و دریاچه مهارلو ■ روی نقشه

Figure 1. Lake Uremia position (Sharafkhaneh Port ●, Wetlands Gavkhoni and ▲ Maharloo lake ■on IRAN geographic map.

سویه استاندارد غیربومی CCAP19/18 (*Dunaliella salina* CCAP 19/18) نیز از کلکسیون پژوهش‌کده بیوتکنولوژی کشاورزی شمال‌غرب و غرب کشور واقع در تبریز جهت مقایسه رفتار فیزیولوژیک جلبک های تک‌سلولی تحت شدت‌های نوری و شوری‌های متفاوت تهیه گردید. جلبک‌ها در محیط کشت تغییر یافته جانسون (۹) کشت و نگهداری شدند. اسیدیته محیط‌های کشت با استفاده از بافر تریس در حدود ۷/۵ تنظیم شد. کشت جلبک درون ارلن‌مایرهای ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۱۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت در دمای $25\pm2^{\circ}C$ به مدت یک هفته (که جلبک‌ها در مرحله لگاریتمی رشد قرار داشتند) انجام گرفت. به منظور بررسی برهمکنش جدایه‌ها، نور و شوری آزمایشی به‌صورت فاکتوریل سه عاملی با سه سطح شوری (۲، ۳ و ۴ مولار NaCl) و دو سطح نور با شدت‌های ۲۵ و ۵۰۰ میکرومول‌فوتون‌برمترمربع‌برثانیه و چهار جدایه شامل سه جدایه بومی SH1، M1 و G28 و یک سویه استاندارد غیر بومی CCAP19/18 در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۲ تکرار اجرا شد. برای تامین نور از لامپ‌های فلورسنت استفاده شد و شدت نور با استفاده از دستگاه LI-250A Light meter اندازه‌گیری شد.

اندازه‌گیری رشد و تعداد سلولی

شمارش مستقیم تعداد سلول‌های ریزجلبکی در هر میلی‌لیتر از محیط کشت با استفاده از محلول لوگول، لام هموسایتومتر و میکروسکوپ نوری انجام شد (۱۰).

سنجش رنگ‌دانه‌های فتوسنتزی

جهت تعیین غلظت رنگ‌دانه‌های موجود در هر سلول از روش اسپکتروفتومتری استفاده شد (۱۱) به این ترتیب که پس از رسوب‌گیری از محیط حاوی سلول‌ها از استون۸۰٪ برای استخراج رنگ‌دانه‌ها استفاده شد. عصاره حاصل با استفاده از سانتریفیوژ صاف گردید. میزان جذب محلول رنگین و شفاف رویی در طول‌موج‌های ۶۶۳/۲ و ۶۴۶/۸، ۴۷۰ نانومتر با اسپکتروفتومتر تعیین شد. سپس با قرار دادن جذب‌های خوانده شده در روابط و فرمول‌های زیر میزان کلروفیل a، کلروفیل b و کاروتنویید کل به صورت پیکوگرم بر 10^{6} سلول محاسبه گردید.

$$c_a\,(\mu g/ml) = 12.25\,A_{663.2} - 2.79\,A_{646.8}$$

$$c_b\,(\mu g/ml) = 21.50\,A_{646.8} - 5.10\,A_{663.2}$$

$$c_{(x+c)}\,(\mu g/ml) = \left(1000\,A_{470} - 1.82\,c_a - 85.02\,c_b\right)/198$$

در روابط فوق ca: کلروفیل a ، cb: کلروفیل b و $c\ (x+c)$ کاروتنویید‌های کل شامل گزانتوفیل‌ها و کاروتن‌ها می‌باشد. A میزان جذب در طول موج مورد نظر می باشد.

برای محاسبه محتوی کلروفیل کل، محتوی کلروفیل a و b هر نمونه جمع گردید.

جهت محاسبه نسبت کلروفیل a/کلروفیل b محتوی کلروفیل a هر نمونه بر محتوی کلروفیل b همان نمونه تقسیم شد. همچنین نسبت کلروفیل‌کل/ کاروتنویید‌کل از تقسیم محتوی کلروفیل کل بر محتوی کاروتنویید کل همان نمونه حاصل گردید.

www.SID.ir

Arch

تجزیه‌های آماری

مقایسه میانگین‌ها توسط آزمون دانکن در سطح احتمال ۱٪ صورت گرفت. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS16 انجام شد.

نتایج

چنان‌چه اطلاعات موجود در جدول ۱ نشان می‌دهد اثرات اصلی و اثرات متقابل بین سه عامل مورد بررسی (شدت نور، شوری و نوع جدایه انتخاب شده *Dunaliella*) در تمامی صفات مورد مطالعه در سطح احتمال۱٪ معنی‌دار شده است. با دقت در داده‌ها تاثیر بیش‌تر شدت نور و نوع جدایه نسبت به شوری محیط نمایان می‌گردد.

جدول ۱- تجزیه واریانس صفات مورد سنجش در جدایه‌های مختلف *Dunaliella* تحت تاثیر سطوح مختلف شدت نور و شوری (اعداد ارایه شده در جدول میانگین مربعات می‌باشند.)

Table 1. The ANOVA in different isolates of *Dunaliella* under different levels of light and salinity (Mean Squares illustrated in the Table)

منابع تغییر	درجه آزادی	تعداد سلول بر سلول	مقدار کلروفیل *a*(پیکوگرم بر سلول)	مقدار کلروفیل *b*(پیکوگرم بر سلول)	مقدار کاروتنویید کل (پیکوگرم بر سلول)	کلروفیل *a*/کلروفیل *b*	کلروفیل کل	کلروفیل کل / کاروتنویید کل
نور	۱	$۱۰^{۱۴}\times$۱/۵۰	۰/۶۶۰	۰/۲۷۶	۰/۲۵۲	۱۵/۲۱۵	۱/۷۹۱	۵/۶۷۲
شوری	۲	$۱۰^{۱۳}\times$۳/۰۷	۰/۰۰۹	۰/۰۱۵	۰/۰۲۳	۰/۵۷۲	۰/۰۰۱	۱۲/۷
جدایه	۳	$۱۰^{۱۳}\times$۲/۴	۰/۵۹۱	۰/۰۸۳	۰/۲۹۷	۷۶/۴۷۲	۰/۶	۲۵/۶۹۹
نور× شوری	۲	$۱۰^{۱۳}\times$۱/۴۸	۰/۰۰۲	۰/۰۱۱	۰/۰۰۱	۲/۵۵۴	۰/۰۱	۱/۸۴۷
نور× جدایه	۳	$۱۰^{۱۳}\times$۳/۴	۰/۰۶۲	۰/۰۱۱	۰/۰۰۳	۱۱/۸۴	۰/۰۵۲	۶/۰۹۳
شوری× جدایه	۶	$۱۰^{۱۳}\times$۱/۵۶	۰/۰۸۸	۰/۰۳۶	۰/۰۴۴	۶/۷۹۲	۰/۲۰۳	۸/۶۹۹
نور×شوری×جدایه	۶	$۱۰^{۱۲}\times$۸/۶۳	۰/۰۰۳	۰/۰۰۶	۰/۰۱۶	۰/۶۳۸	۰/۰۱	۱/۷۵۸
خطای‌آزمایش	۲۴	$۱۰^{۷}\times$۳/۲۲۵	۰/۰۰۰۰۵	۰/۰۰۰۰۰۱۷۹	۰/۰۰۰۰۰۲۲۱	۰/۰۰۲	۰/۰۰۰۰۵۲۲	۰/۰۰۶
درصدضریب تغییرات		۵۳/۹	۴۵/۶	۵۶/۹	۶۰/۸	۸۱/۶	۴۰/۵	۵۷/۹

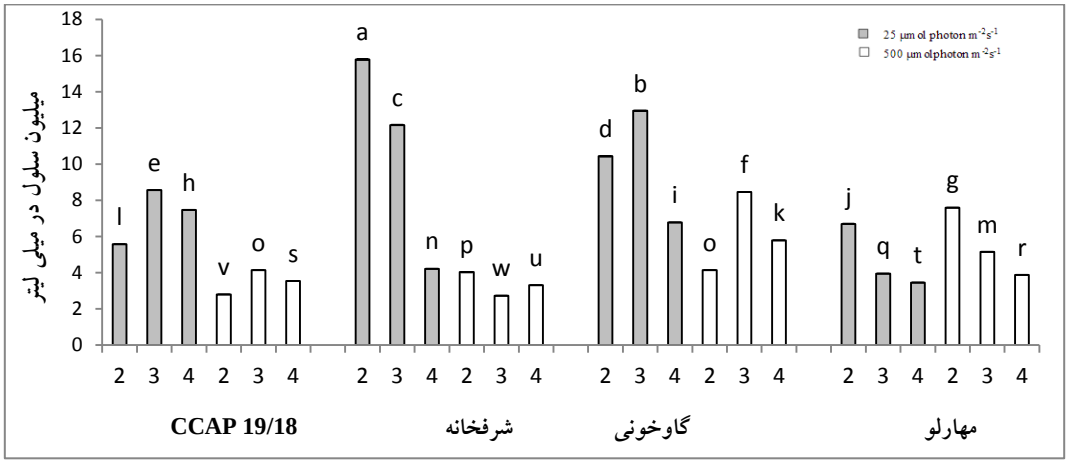
همه اثرات اصلی و اثرات متقابل بین عوامل مورد بررسی در سطح احتمال ۱٪ معنی‌دار می‌باشند.

رشد و تعداد سلولی

شکل ۲ تعداد سلول‌های *Dunaliella* در تیمارهای مختلف را نشان می‌دهد. در همه شکل‌ها، داده‌ها میانگین ± انحراف استاندارد می‌باشند. حروف مشابه نشان‌گر عدم اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌هاست. حروف یکسان بیان‌گر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۰/۰۱ می‌باشد. با توجه به شکل بیش‌ترین تعداد سلول در واحد حجم (۱ میلی‌لیتر) در نمونه مربوط به جدایه شرفخانه و در شرایط نور کم و شوری کم بدست آمده-است. جدایه گاوخونی تحت شوری ۳ مولار و نور کم در رتبه دوم و جدایه شرفخانه تحت شوری ۳ مولار و نور کم در رتبه سوم قرار گرفته‌اند..

www.SID.ir

Archive of SID



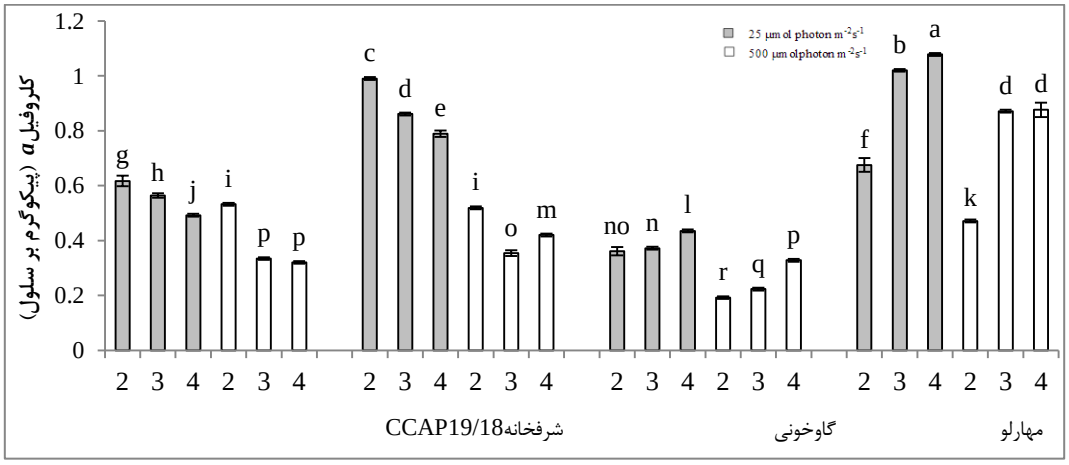
شکل ۲- تاثیر برهم‌کنش نور و شوری بر رشد و تعداد سلول‌های *Dunaliella*. اعداد زیر ستون‌ها نشان‌دهنده غلظت شوری (مولار) می‌باشند.

Figure 2. The interaction effect of light and salinity on growth and cell number of *Dunaliella*. Numbers under the columns indicates salinity concentration (moles.L^{-1}).

محتوی و نسبت‌های رنگ‌دانه‌های فتوسنتزی

محتوی کلروفیل *a*

مقدار کلروفیل *a* (رنگ‌دانه اصلی فتوسنتزی) یک صفت به‌شدت وابسته به شرایط محیطی می‌باشد که اختلافات معنی‌داری را بین تیمارهای مختلف نور و شوری در یک جدایه و بین جدایه‌های متفاوت نشان می‌دهد. با دقت در داده‌های شکل ۳ می‌توان متوجه شد که مقدار رنگ‌دانه در جدایه جداشده از دریاچه گاوخونی کم‌ترین و در جدایه جداشده از دریاچه مهارلو و بندر شرفخانه بیش‌ترین مقدار را به خود اختصاص داده‌اند و این نشان‌گر تفاوت‌های ذاتی دستگاه فتوسنتزی در جدایه‌های مختلف ریزجلبک می‌باشد. با افزایش غلظت شوری رفتارهای متفاوت جدایه‌های مختلف بیش‌تر نمایان می‌شود. با افزایش شوری مقدار رنگ‌دانه در جدایه تالاب گاو خونی و دریاچه مهارلو افزایش ولی در سویه CCAP19/18 و بندر شرفخانه کاهش یافته است. ولی بدون استثناء افزایش نور محیط منجر به کاهش مقدار رنگ‌دانه در هر ۴ جدایه شده است.



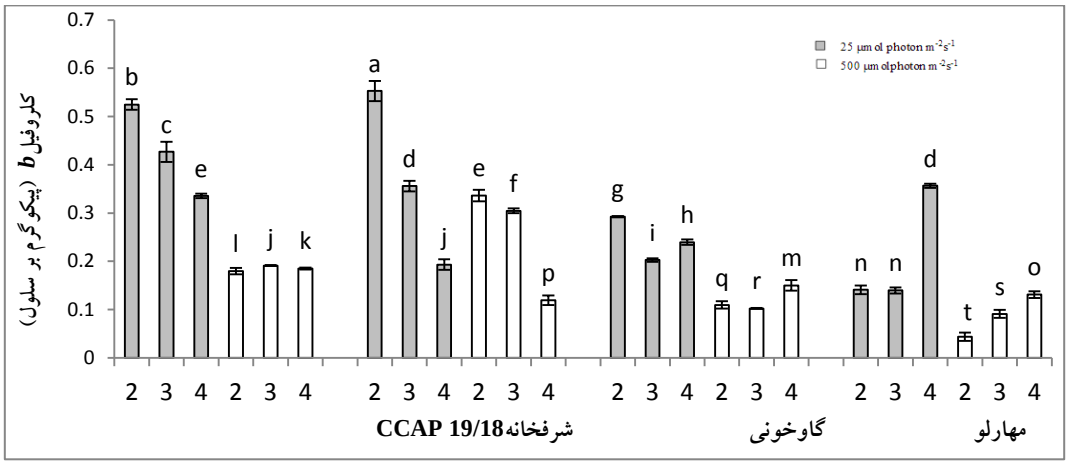
شکل ۳-تاثیر برهم‌کنش نور و شوری بر محتوی کلروفیل *a* سلول‌های *Dunaliella*. اعداد زیر ستون‌ها نشان‌دهنده غلظت شوری (مولار) می‌باشند.

Figure 3. The interaction effect of light and salinity on the chlorophyll *a* content in *Dunaliella* cells. Numbers under the columns indicates salinity concentration (moles.L^{-1}).

www.SID.ir

محتوی کلروفیل *b*

این رنگ‌دانه به‌عنوان مهم‌ترین رنگ‌دانه کمکی برای جذب امواج موثر برای فتوسنتز در نظر گرفته می‌شود و مقدار آن می‌تواند نشانی از گستردگی آنتن فتوسنتزی باشد. شکل ۴ تفاوت بین میانگین مقادیر کلروفیل *b* را در تیمارهای متفاوت نشان می‌دهد. مقدار کلروفیل *b* در سویه CCAP19/18 و شرفخانه نسبت به دو جدایه دیگر بیش‌تر است. عموماً با افزایش غلظت شوری و شدت نور مقدار این رنگ‌دانه در هر ۴ جدایه کاهش نشان می‌دهد.



شکل ۴- تاثیر برهم‌کنش نور و شوری بر محتوی کلروفیل*b* سلول‌های *Dunaliella*. اعداد زیر ستون‌ها نشان‌دهنده غلظت شوری (مولار) می‌باشند.

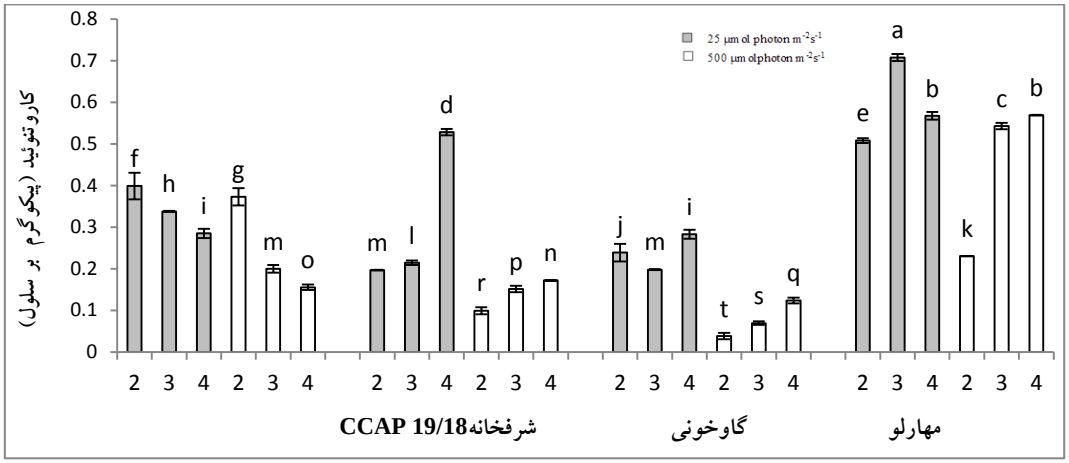
Figure 4. The interaction effect of light and salinity on the chlorophyll *b* content in *Dunaliella* cells. Numbers under the columns indicates salinity concentration (moles.L^{-1}).

محتوی کاروتنویید کل

داده‌های مندرج در شکل ۵ نشان‌دهنده تفاوت اولیه معنی‌دار مقدار کاروتنوییدها در بین جدایه‌های مورد آزمایش می‌باشد. افزایش شوری در سه جدایه گاوخونی، مهارلو و شرفخانه تا حدودی موجب افزایش مقدار کاروتنوییدها شده است (در جدایه مهارلو افزایش شوری از ۳ به ۴ مولار باعث کاهش مقدار کاروتنوییدها شده‌است) درحالی‌که افزایش نور از ۲۵photon $m^{-2}s^{-1}$ به ۵۰۰µmol photon $m^{-2}s^{-1}$ تقریباً در همه تیمارها منجر به کاهش مقدار رنگ‌دانه‌های هر سلول *Dunaliella* شده است.

www.SID.ir

Archive of SID

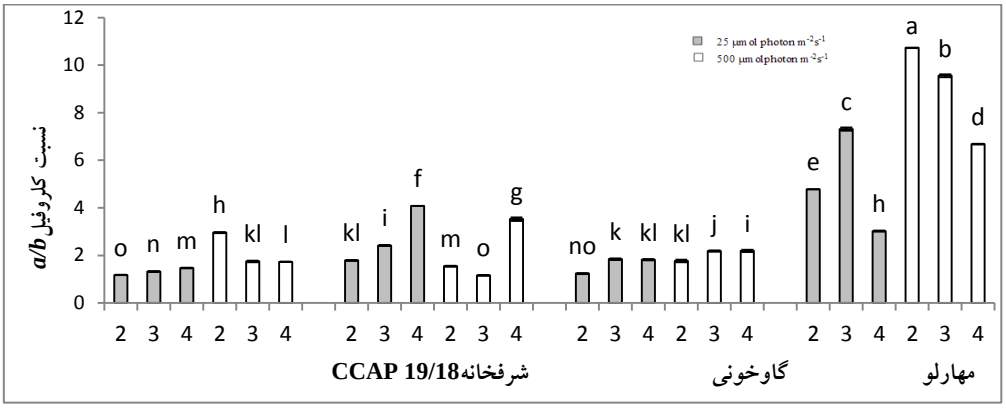


شکل ۵- تاثیر برهم‌کنش نور و شوری بر محتوی کاروتنویید کل سلول‌های *Dunaliella*. اعداد زیر ستون‌ها نشان‌دهنده غلظت شوری (مولار) می‌باشند.

Figure 5.The interaction effect of light and salinity on the total carotenoid content in *Dunaliella* cells. Numbers under the columns indicates salinity concentration (moles.L^{-1}).

نسبت کلروفیل *a/b*

با دقت در شکل ۶ می‌توان مشاهده نمود که اساساً اندازه آنتن در جدایه مهارلو از بقیه جدایه‌ها کوچک‌تر است زیرا نسبت کلروفیل *a/b* نمادی از اندازه آنتن‌های جمع کننده نور در فتوسیستم‌های کلروپلاست می‌باشد (نسبت بزرگ‌تر کلروفیل *a/b* نشان‌دهنده اندازه کوچک آنتن و بالعکس می‌باشد). ولی در سایر جدایه‌ها آندازه آنتن تقریباً برابر بوده و طی تیمارهای اعمال شده تغییرات جدّی را متحمل نمی‌شود، به‌جز تاثیر معنی‌دار شوری در کوچک کردن اندازه آنتن جدایه شرفخانه. به‌ویژه تاثیر شوری در شدت نور ۵۰۰ µmol photon $m^{-2}s^{-1}$ بر جدایه مهارلو و سویه CCAP19/18 برخلاف شرفخانه بوده و افزایش شوری باعث بزرگ‌تر شدن اندازه آنتن شده است. شدت بالای نور موجب تغییرات جزئی ولی معنی‌دار در جدایه‌های گاوخونی، CCAP19/18 و شرفخانه شده است در حالی‌که تاثیر نور بالا بر جدایه مهارلو منجر به کوچک‌تر شدن اندازه آنتن در این جدایه شده است. همچنین داده‌های جدول ۱ تاکید می‌کنند که جدایه مهم‌ترین تاثیر را بر اندازه آنتن در ریز جلبک *Dunaliella* دارد.



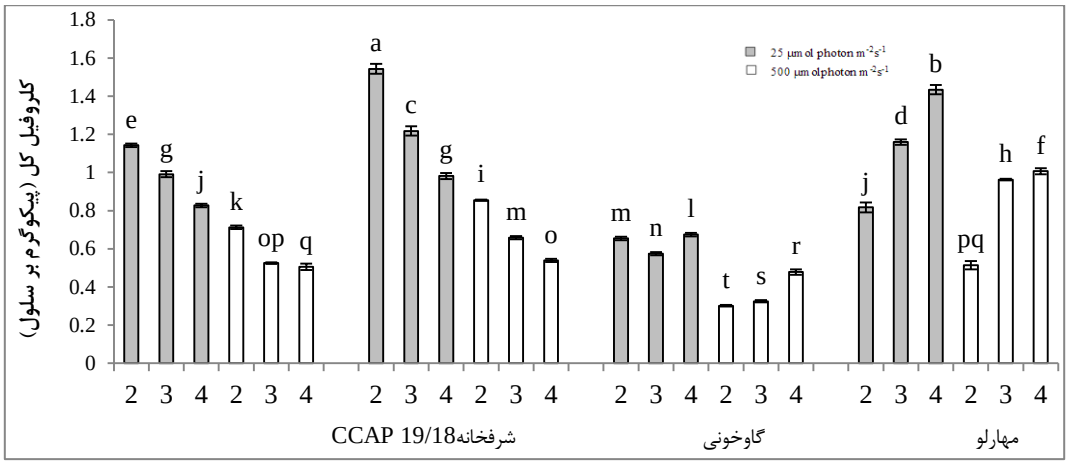
شکل ۶- تاثیر برهم‌کنش نور و شوری بر نسبت رنگ‌دانه کلروفیل *a* بر کلروفیل *b* سلول‌های *Dunaliella*. اعداد زیر ستون‌ها نشان‌دهنده غلظت شوری (مولار) می‌باشند.

Figure 6.The interaction effect of light and salinity on the chlorophyll *a* per chlorophyll *b* in *Dunaliella* cells. Numbers under the columns indicates salinity concentration (moles.L^{-1}).

www.SID.ir

محتوی کلروفیل کل

اندازه‌گیری و تجزیه آماری مقدار کلروفیل کل جدایه‌های متفاوت *Dunaliella* نشان می‌دهد که هر جدایه رفتار متفاوتی تحت تیمارهای مختلف شدت نور و شوری دارد. چنان‌چه از شکل ۷ برمی‌آید مقدار کلروفیل کل جدایه ساکن دریاچه گاوخونی با افزایش غلظت شوری تغییر معنی‌داری را متحمل نمی‌شود. ولی استفاده از شدت نور $\mu mol\ photon\ m^{-2}s^{-1}$ ۵۰۰ برای کشت جلبکی منجر به کاهش معنی‌دار مقدار کلروفیل کل شده است. در حالی‌که جدایه ساکن دریاچه مهارلو با افزایش شوری مقدار کلروفیل بیش‌تری را در کلروپلاست خود انباشته می‌کند و تحت شدت نور بالا مقدار کلروفیل کاهش معنی‌داری را نشان می‌دهد. حداکثر مقدار کلروفیل کل این جدایه در تیمار با شوری۴ و در شدت نور μmol^{-1} $photon\ m^{-2}s$ ۲۵ اندازه‌گیری شده است. سویه CCAP19/18 و جدایه ساکن بندر شرفخانه دریاچه ارومیه رفتار مشابهی را از نظر سنتز و یا تجزیه کلروفیل کل در شوری‌ها و شدت‌های نور مختلف نشان می‌دهند. در هر دو مورد با افزایش شوری مقدار کلروفیل با افزایش شوری و نور کاهش نشان می‌دهد. به عبارت بهتر در هر دو مورد کم‌ترین مقدار کلروفیل در تیمار با شوری ۴ و شدت نور $\mu mol\ photon^{-1}$ $m^{-2}s$ ۵۰۰ مشاهده می‌شود.



شکل ۷- تاثیر برهم‌کنش نور و شوری بر محتوی کلروفیل کل سلول‌های *Dunaliella*. اعداد زیر ستون‌ها نشان‌دهنده غلظت شوری (مولار) می‌باشند.

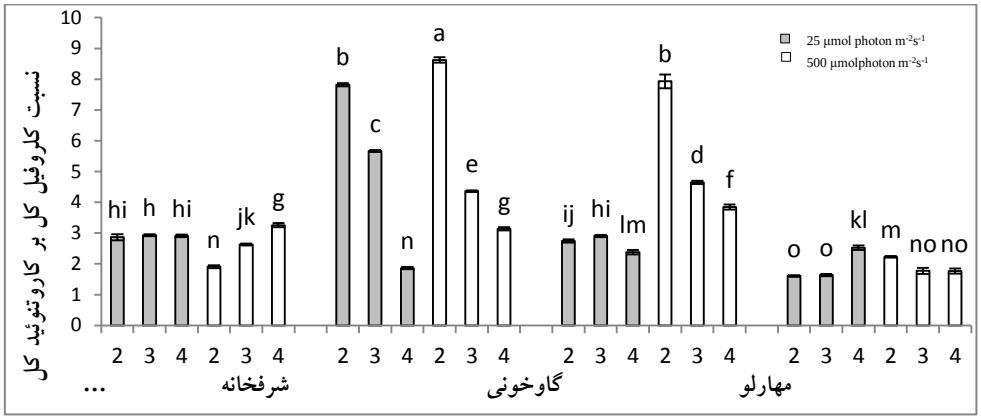
Figure 7. The interaction effect of light and salinity on total chlorophyll content in *Dunaliella* cells. Numbers under the columns indicates salinity concentration ($moles.L^{-1}$).

نسبت کلروفیل کل /کاروتنویید کل

از نظر نسبت کلروفیل به کاروتنویید دو جدایه ساکن دریاچه گاوخونی و بندر شرفخانه مشابه رفتار کرده‌اند. یعنی افزایش شوری محیط و شدت نور باعث کاهش نسبت کلروفیل/ کاروتنویید شده است که نشان‌گر افزایش سنتز و انباشتگی بیش‌تر کاروتنویید نسبت به کلروفیل در این تیمارها می‌باشد. در جدایه مهارلو و سویه CCAP19/18 تغییرات این صفت ناچیز می‌باشد که این موضوع در شکل ۸ به خوبی مشهود است. داده‌های جدول ۱ نیز حاکی از اثر بیش‌تر جدایه، شوری و برهم‌کنش جدایه و شوری بر این صفت می‌باشد.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۸- تاثیر برهم‌کنش نور و شوری بر نسبت کلروفیل کل بر کاروتنویید کل سلول‌های *Dunaliella*. اعداد زیر ستون‌ها نشان‌دهنده غلظت شوری (مولار) می‌باشند.

Figure 8. The interaction effect of light and salinity on the ratio of total chlorophylls per total carotenoids in *Dunaliella* cells. Numbers under the columns indicates salinity concentration (moles.L^{-1}).

بحث

با تامل اجمالی در اطلاعات موجود در جدول ۱ می‌توان چنین برداشت کرد که جدایه‌های *Dunaliella* که منشاءهای متفاوتی دارند، در سطوح مختلف مهم‌ترین عوامل محیطی متغیر و تاثیرگزار در اکوسیستم‌های طبیعی *Dunaliella* (شدت نور و شوری محیط که روزانه و فصلی تغییر می‌یابند) تفاوت‌های فیزیولوژیک فاحش دارند. در حالی‌که بزرگی اعداد مربوط به میانگین مربعات در مورد هر صفت اندازه‌گیری شده نشان‌دهنده تاثیر پذیری بیش‌تر اغلب صفات از نور و نوع جدایه می‌باشد.

رشد و تعداد سلولی

به‌دلیل این‌که در زیستگاه‌های طبیعی (آب‌های فوق شور) اغلب ریزجلبک‌های متعلق به جنس *Dunaliella* تمام انرژی مورد استفاده اکوسیستم را از طریق فتوسنتز تامین می‌نمایند، از این رو تخمین زیست‌توده ریزجلبک‌ها از اهمیت خاصی در مطالعات اکولوژی آبی برخوردار است (۱۲). این یکی از ویژگی‌های فیزیولوژیک خاص هر گونه و یا جدایه می‌باشد. ارزیابی مستقیم محتوای کربن جلبکی ساده نیست، بنابراین روش‌های دیگری مانند شمارش سلولی و ارزیابی حجم سلول‌ها و اندازه‌گیری غلظت رنگ‌دانه‌ها در سطح گسترده برای تخمین زیست توده جلبکی استفاده می‌شوند (۱۳و۱۴). گزارش‌هایی از برآورد زیست‌توده *Dunaliella* در دریاچه ارومیه و دریاچه مهارلو بر اساس شمارش تعداد سلول‌ها در واحد حجم وجود دارد (۱۵). با این‌حال در اغلب مطالعات ارزیابی زیست توده ریزجلبک از کلروفیل که فراوان‌ترین رنگ‌دانه فتوسنتزی و مشترک میان تمامی موجودات فتوسنتزی بوده و روش ارزیابی آن نیز ساده و سریع است استفاده می‌شود (۱۶ و۱۷). همچنین به نظر می‌رسد در گزینش جدایه‌های جلبک به منظور استفاده بیوتکنولوژیکی، برخی اطلاعات مانند نوسانات رشد و محتوای کلروفیلی و نسبت‌های رنگ‌دانه‌ای در رویارویی با تنش‌های محیطی می‌تواند بسیار مفید باشد.

چنان‌چه مشاهده می‌شود بیش‌ترین تعداد سلول در محیط کشت تیمار شدت نور۲۵ میکرومول‌فوتون بر مترمربع درثانیه، شوری ۲ مولار نمک و در جدایه شرفخانه پس از یک هفته (در حدود ۱۶ میلیون سلول در میلی‌لیتر محیط کشت) بدست آمده است، که این اختلاف با سایر تیمارها و جدایه‌ها معنی‌دار است. جدایه گاوخونی از این نظر در رتبه دوم قرار دارد. در هر سه جدایه گاوخونی، CCAP19/18 و شرفخانه شدت نور کم منجر به تقسیمات سلولی بیش‌تری شده است درحالی‌که جدایه مهارلو از این امر مستثنی بوده و در شدت نور بالا تکثیر بیش-تری داشته است. در هر ۳ جدایه مورد آزمایش به جز جدایه مهارلو، افزایش غلظت شوری محیط تاثیر منفی بر تکثیر و تعداد سلول‌های ریزجلبکی داشته است. شرایط محیطی مورد

www.SID.ir

آزمایش و نوع جدایه بر سرعت تقسیم و تعداد سلول‌ها اثر گذار هستند به‌طوری‌که تنش نور و شوری موجب کاهش تعداد سلولی در اغلب تیمارها شده است. نتایج برخی گزارشات، حاکی از تاثیر مثبت و یا منفی نور بر تقسیم سلولی در سویه‌های مختلف *Dunaliella* است (۱۸). احتمالاً در شوری‌های بالاتر به خاطر سنتز گلیسرول، محصولات فتوسنتزی به جای صرف در رشد و تقسیم، صرف سازگاری اسمزی می‌شود (۱۹).

بنابراین می‌توان چنین برداشت نمود که اگر هدف فقط افزایش تعداد سلول و تولید زیست‌توده باشد کشت ایزوله جداسازی شده از بندر شرفخانه دریاچه ارومیه در شوری ۲ مولار نمک و شدت نور پایین ۲۵ $\mu mol\ photon\ m^{-2}s^{-1}$ بسیار مناسب خواهد بود.

محتوی و نسبت‌های رنگ‌دانه‌های فتوسنتزی

چون ارایه میزان کلروفیل بر حسب میلی‌لیتر محیط کشت نمونه که به تعداد سلول‌ها وابسته است، نمی‌تواند مقایسه درستی میان شرایط شاهد و تیمار را به دست دهد، لذا مقدار کلروفیل بر سلول مورد مقایسه و بررسی قرار می‌گیرد. بنابراین در پژوهش حاضر محتوی رنگ‌دانه‌ها بر حسب پیکوگرم در هر سلول *Dunaliella* ارایه گردید. بررسی وضعیت رنگدانه‌ها نشان می‌دهد که افزایش نور تاثیر کاهشی بر مقدار کلروفیل و به تبع آن کاروتنوییدها در سه جدایه گاوخونی، سویه CCAP19/18و شرفخانه داشته است. همچنین با مقایسه شکل ۳ و ۷ مشاهده می‌شود، چون کلروفیل a بخش اعظم کلروفیل کل را تشکیل می‌دهد، تغییرات ایندو الگوی مشابهی را در ارتباط با رفتارجدایه‌ها به نمایش می‌گذارند. کاهش میزان کلروفیل در هر سلول ریزجلبک در واقع به صورت یک مکانیسم تنظیمی سبب کاهش انرژی نوری جذب شده و تخفیف اثرات مضر نور می‌شود. بررسی وضعیت جدایه مهارلو در شرایط نور بالا مبین کاهش سرعت تقسیم و به تبع آن تعداد کم‌تر سلول (به استثنای شوری ۲ مولار نمک) در این شرایط می‌باشد که منجر به کاهش نسبی کلروفیل کل (کلروفیلa وb) و ثبات نسبی مقدار کاروتنوییدها بویژه در شوری‌های بالاتر شده است. نتایج نشان داد که نسبت کلروفیل a بر b در اغلب تیمارها دارای ثبات نسبی و تغییرات در محدوده ۲ الی۴ بوده در حالی که این نسبت در جدایه مهارلو در شوری ۲ مولار و شدت نور بالا به حدود ۱۰ افزایش یافته است. این نسبت در گیاهان در معرض تابش شدید نور خورشید در حدود ۴ الی۵ و در گیاهان در سایه کامل در حدود ۲/۶ تا ۲/۸ گزارش شده است (۲۰). محاسبه این ویژگی به‌دلیل این‌که نمادی از اندازه آنتن‌های جمع کننده نور در فتوسیستم‌های کلروپلاست می‌باشد از اهمّیت ویژه‌ای برخوردار است. هر چقدر این نسبت عدد بزرگ‌تری باشد یعنی آنتن‌های فتوسنتزی کوچک‌ترند و عدد کوچک‌تر که نتیجه مقدار بیش‌تر کلروفیل b می‌باشد نشان‌گر اندازه آنتن بزرگ‌تر خواهد بود.

عموماً کلروفیل برگ یکی از مهم‌ترین شاخص‌های نشان دهنده فشار محیطی وارد بر گیاه است. مقدار کلروفیل‌ها در گیاهان تحت تنش تغییر یافته و سبب تغییر در میزان نور جذب شده توسط گیاه می‌گردد که به سازگاری با شرایط تنش کمک می‌کند. کلروفیل a رنگ‌دانه اصلی در مرکز واکنشی بوده اما کلروفیل b نه تنها یک رنگ‌دانه کمکی است بلکه در واقع به عنوان یک تنظیم کننده سایر گیرنده‌های نوری نیز عمل می‌کند که با تعدیل جذب نور در شرایط تنش، سلول را از آسیب محافظت می‌نماید (۲۱). بطور کلی تنش‌های اعمال شده در اغلب حالات سبب کاهش مقدار هر دو کلروفیل شده‌اند به جز جدایه مهارلو که افزایش نور سبب تحریک افزایش کلروفیل‌ها شده است. به‌نظر می‌رسد این شدت نور برای این جدایه آسیب اکسیداتیو رنگ‌دانه‌ها را به همراه ندارد. به عبارت دیگر تغییر شوری و نور در محیط نسبت کلروفیل به کاروتنویید را زیاد تغییر نداده است و در شرایط مختلف محیطی دستگاه فتوسنتزی از تعادل و ثبات نسبی برخوردار است.

اساساً تقسیم سلولی سریع با این‌که موجب افزایش تعداد سلول‌ها می‌شود ولی به دلیل کاهش زمان بین تقسیمات سلولی و در نتیجه کاهش فرصت تولید و تجمع رنگ‌دانه‌ها میزان آن‌ها در سلول را می کاهد (۲۲). بنابراین اگر جدایه‌ای در عین دارا بودن سرعت تقسیم بالا مقدار کلروفیل بر سلول بالایی نیز داشته باشد از ارجحیت خاصی برخوردار است. چنین رفتاری در جدایه بندر شرفخانه دیده می‌شود.

www.SID.ir

Archive of SID

همچنین براساس نظر Guendouz و Maamari (۲۳) تغییرات در فتوسنتز اغلب تا حد زیادی به‌صورت همگام و موازی با محتوای کلروفیلی صورت می‌گیرند. علاوه بر آن Houtو همکاران (۱۷) مقدار کلروفیل *a* را بهترین معیار سرعت فتوسنتزی بیشینه معرفی کرده‌اند. در عین حال Marini عقیده دارد که همبستگی بالایی میان محتوای کلروفیلی و سرعت فتوسنتزی یافت نشده است (۲۴). از این‌رو پیشنهاد می‌شود ویژگی‌های فتوسنتزی جدایه‌های مورد مطالعه نیز مورد بررسی قرار گیرد.

نتیجه‌گیری نهایی

از توصیف تفاوت‌های اکوفیزیولوژیکی جدایه‌های موجود در ایران، می‌توان‌در راستای بهره‌برداری‌های بیوتکنولوژیکی استفاده نمود. از این طریق می‌توان با روش‌های ساده و کم‌هزینه مانند تغییر شدت نور و یا تغییر شوری محیط به اهدافی‌هم‌چون افزایش رشد برای تغذیه آبزیان، سنتز و استحصال محصولات مفید، باارزش و مواد موثره دارویی و همچنین مطالعات فتوسنتزی دست یافت. در این راستا انتخاب جدایه مناسب و واجد پتانسیل بیش‌تر، عملی و مقرون به صرفه خواهد بود.

به نظر نگارندگان جدایه‌های شرفخانه و مهارلو برای استحصال کلروفیل و کاروتنویید مناسب‌ترند. درحالی‌که برای رشد سریع در یک هفته به منظور به دست آوردن تعداد سلول بیش‌تر و تغذیه آبزیان جدایه شرفخانه توانایی بهتری دارد. همچنین استفاده از جدایه مهارلو در مطالعات فتوسنتزی منطقی به‌نظر می‌رسد.

Reference

1. Ben-Amotz, A., Polle, J.E., and Rao, D.S., 2009. The alga *Dunaliella*: biodiversity, physiology, genomics and biotechnology (Science Publishers Enfield, New Hampshire, United States of America). Cambridge.
2. Oren, A., 2014. The ecology of *Dunaliella* in high-salt environments. Journal of Biological Research-Thessaloniki, 21:1-8.
3. Zarandi-Miandoab, L., 2015. The effects of some abiotic factors on function of key genes in carotenoid biosynthesis pathway in *Dunaliella salina*. PhD thesis in Biology(Plant Phisiology), Golestan University, Faculty of Sciences, pp: 7-8.(In Persian)
4. Ghahraman, B. Taghvaeian, S., 2010. Investigation of annual rainfall trends in Iran. Journal of Agricultural Science and Technology, 10:93-97.
5. Aghanabati, A., 2004. Geology of Iran, Geological Survey of Iran, 622 p. (In Persian)
6. Iranian National Institute for Oceanography and Atmospheric Science (INIOAS), http://www.inio.ac.ir/default.aspx?tabid=2144. (In Persian)
7. Barra, L. Chandrasekaran, R. Corato F. and Brunet C., 2014. The challenge of ecophysiological biodiversity for biotechnological applications of marine microalgae. Marine drugs, 12: 1641-1675.
8. Zarandi-Miandoab, L. Hejazi, M.A. Bagherieh-Najjar, M.B. Chaparzadeh, N., 2015. Light intensity effects on some molecular and biochemical characteristics of *Dunaliella salina*. Iranian Journal of Plant Physiology, 5: 1311-1321.
9. Hejazi, M., and Wijffels, R., 2003. Effect of light intensity on β-carotene production and extraction by *Dunaliella salina* in two-phase bioreactors. Biomolecular Engineering, 20: 171-175.
10. Schoen, M., 1988. Cell counting In *Dunaliella* :Experimental phycology

www.SID.ir

(eds. Labban, C., Chapnoon, D., and Kermer, B. P.). Cambridge University press .Cambridge.

11. Lichtenthaler, H.K., and Buschmann, C., 2001. Chlorophylls and Carotenoids: Measurement and Characterization by UV VIS Spectroscopy. Methods in Enzymology, 148: 349–382.
12. Harris, G., 2012. Phytoplankton ecology: structure, function and fluctuation, Springer Science and Business Media.
13. Smayda, T. J., 1978. From phytoplankters to biomass. Phytoplankton Manual. Unesco, Paris: 273-279.
14. Wright, S. W., Jeffrey S. W and Mantoura, R. F. C., 2005. Phytoplankton pigments in oceanography: guidelines to modern methods, Unesco Pub.
15. Soltani, N. Shokravi, Sh. and Fotovat, A., 2004. Isolation, identification and environmental studies of green algae *Dunaliella* species. Jihade Daneshgahi Research Project Database (SID), https://www.sid.ir/fa/Plan/ViewPaper.aspx?ID=122. (In Persian)
16. Felip, M. and Catalan J., 2000. The relationship between phytoplankton biovolume and chlorophyll in a deep oligotrophic lake: decoupling in their spatial and temporal maxima. Journal of Plankton Research, 22: 91-106.
17. Huot, Y., M. Babin, F. Bruyant, C. Grob, M. Twardowski and H. Claustre., 2007. Does chlorophyll *a* provide the best index of phytoplankton biomass for primary productivity studies? Biogeosciences discussions, 4: 707-745.
18. Madadkar Haghjou, M., 2013. Comparative study of some physiological characteristics (chlorophyll content, photosynthetic activity…) in selection of *Dunaliella* sp. strains (isolated from iranian waters). Journal of Cell & Tissue, 4: 85-102. (In Persian)
19. Arun, N. and Singh D., 2013. Differential response of *Dunaliella salina* and *Dunaliella tertiolecta* isolated from brines of Sambhar Salt Lake of Rajasthan (India) to salinities: a study on growth, pigment and glycerol synthesis. Journal of the Marine Biological Association of India, 55: 65-70.
20. Baker, N. R., Davies W. and Ong C. K., 1985. Control of leaf growth, CUP Archive.
21. Tanaka, R. and Tanaka A., 2000. Chlorophyll *b* is not just an accessory pigment but a regulator of the photosynthetic antenna. Porphyrins, 9: 240-245.
22. Alvarado, C., Álvarez, P. Puerto, M. Gausserès, N. Jiménez L. and De la Fuente M., 2006. Dietary supplementation with antioxidants improves functions and decreases oxidative stress of leukocytes from prematurely aging mice. Nutrition, 22: 767-777.
23. Guendouz, A. and Maamari K., 2012. Grain-filling, chlorophyll content in relation with grain yield component of durum wheat in a Mediterranean environment. African Crop Science Journal, 20:31-37
24. Marini, R. P., 1986. Do net gas exchange rates of green and red peach leaves differ? HortScience. 21: 118-120.

www.SID.ir