

## بررسی مقایسه‌ای برخی شاخص‌های فیزیولوژیک (محتوای کلروفیلی، فعالیت فتوسنتزی ...) در گزینش سویه‌های جلبک *Dunaliella* sp. (جداسازی شده از آب‌های ایران)

مریم مددکار حق جو Ph.D.

- گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران  
\* پست الکترونیک نویسنده مسئول: m\_madadkar@yahoo.com, madadkar.m@lu.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۱۱/۱۷

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۶/۲۵

### چکیده:

**هدف:** *Dunaliella* به‌عنوان یک جلبک تک‌سلولی فیتوپلانکتونی در تغذیه جانوران آبزی (به‌ویژه آب شور) اهمیت دارد. به منظور گزینش سویه‌های برتر، محتوای کلروفیلی در ارتباط با سایر شاخص‌های بیوماس جلبکی، در شرایط متفاوت محیط کشت مطالعه شد.

**مواد و روش‌ها:** سویه‌های مختلف ایرانی و خارجی جلبک تحت تاثیر تیمارهای کمبود نیترا، افزایش نور، آهن و شوری قرار گرفتند. سپس برخی شاخص‌های فیزیولوژیک مانند مقدار کلروفیل‌ها، تعداد سلول‌ها، وزن خشک، فتوسنتز و تنفس در نمونه‌های شاهد و تیمارها اندازه‌گیری شدند.

**نتایج:** تنش‌های مختلف سبب کاهش تعداد سلول‌ها، میزان کلروفیل‌ها و تغییر نسبت chl<sub>a</sub>/chl<sub>b</sub> از حدود ۵ به ۱۵ گردید. میزان کلروفیل *a* و کلروفیل کل در  $10^{-6}$  سلول، در همه شرایط و مقدار کلروفیل *a* در میلی‌لیتر تنها در نمونه شاهد، با وزن خشک سویه‌ها همبستگی معنی‌دار مثبت نشان داد. میان کلروفیل *a* یا کلروفیل کل در سلول با تعداد سلول‌ها در میلی‌لیتر در کلیه حالات همبستگی معنی‌دار منفی وجود داشت.

**نتیجه‌گیری:** بیوماس جلبکی غالباً از طریق مقدار کلروفیل *a* مورد ارزیابی قرار می‌گیرد، اما، همواره با تعداد سلول، یا وزن خشک و یا فعالیت‌های فتوسنتزی، رابطه مستقیمی ندارد. بنابراین وزن خشک بیشتر، محتوای کلروفیلی بالاتر و سرعت تکثیر سلولی نسبی، ویژگی‌های مناسب‌تری جهت انتخاب سویه فیتوپلانکتونی معرفی شدند. نمونه‌های ۱۰ و ۱۱ با وزن خشک بیشتر در هر دو شرایط شاهد و تیمار و محتوای کلروفیلی نسبتاً بالا و سپس ۴، ۶ و ۱۳ در این رابطه قابل معرفی‌اند.

**واژگان کلیدی:** *Dunaliella*، زیادبود آهن، فتوسنتز، نیترا، کلروفیل

## مقدمه

جلبک‌های میکروسکوپی (microalgae) یا فیتوپلانکتون‌ها که از قدیمی‌ترین ساکنان اقیانوس‌ها و آب‌های شیرین می‌باشند، در آب‌های سطحی و مناطقی که نور خورشید وجود دارد، رشد و فتوسنتز نموده و نقشی بسیار مهم و کلیدی را به‌عنوان موجودات تولیدکننده در زنجیره غذایی و اکوسیستم ایفا می‌کنند (۱).

جلبک تک سلولی *Dunaliella* یک جلبک سبز بدون دیواره از تیره کلروفیسه (Chlorophyceae) و در واقع یک موجود بسیار ابتدائی، متعلق به شاخه یوکاریوت‌ها می‌باشد که از حدود ۱/۵ میلیارد سال پیش تا کنون تکامل یافته است. این جلبک منحصر به فرد، به‌خوبی برای زیست و فتوسنتز در شرایط دشوار و افراطی نظیر نور زیاد، شوری و کمبود مواد غذایی، سازگاری یافته و یکی از مهم‌ترین موجودات تولیدکننده در زنجیره غذایی است که با استفاده از انرژی خورشید قادر به تولید محصولات فتوسنتزی در حدود سه برابر بیشتر از گیاهان می‌باشد. گونه‌های جنس *Dunaliella* همگی فتوسنتز کننده بوده و صرفاً دارای کلروفیل‌های *a* و *b* می‌باشند. *Dunaliella* منبع اساسی کلروفیل‌ها، آنتی‌اکسیدان‌ها، کاروتنوئیدها، ویتامین‌ها، ترکیبات معدنی، آمینواسیدها، پلی‌ساکاریدها و اسیدهای چرب ضروری و گلیسرول است (۲). این جلبک مستقیماً در تغذیه جانداران فیلترکننده آب نظیر مرجان‌ها و اسفنج‌ها و نیز به‌عنوان یک غذای بسیار مقوی برای ماهی‌های تزئینی آکواریومی که رنگ و تزئینات آن‌ها حائز اهمیت است، به‌کار می‌رود. دانالیه‌لا نه تنها از طریق فتوسنتز مواد ضروری برای تغذیه آبزیان را فراهم می‌کند، بلکه به علت دارا بودن کاروتنوئیدها، میزان رنگ موجوداتی نظیر میگو و ماهی‌ها که در مشتری پسندی آنها موثر است را نیز افزایش می‌دهد (۳). این جلبک سبز تک سلولی همچنین توسط زئوپلانکتون‌هایی نظیر دافنی، روتیفرها و آرتمیا مصرف می‌شود که به‌عنوان غذای زنده مناسبی در اغلب مراحل پرورشی آبزیان بکار برده می‌شوند (۴). استفاده مستقیم از این جلبک به همراه صدف‌ها در غنی کردن غذای ماهی و لاروهای سخت پوستان و ماهی‌های پرورشی در استخرها و حوضچه‌های پرورش آبزیان گزارش شده است (۵).

آنتی‌اکسیدانتی و نقش آنتی‌باکتریال بوده و در واقع یک آنتی‌بیوتیک طبیعی است که قادر است فلزات سنگین و نیز سموم بدن موجود زنده را به خود متصل و خنثی نماید. کلروفیلین که یک ماده فعال و از مشتقات نیمه‌سنتزی کلروفیل می‌باشد، دارای خواص آنتی‌اکسیدانی، آنتی‌توموری و آنتی‌موتازنی است (۶).

در انتخاب یک فیتوپلانکتون برای تغذیه و پرورش موجودات آبزی، میزان بیوماس تولید شده توسط فیتوپلانکتون یکی از موارد حائز اهمیت بوده و معمولاً از طریق مقدار کلروفیل *a* در واحد حجم محیط مایع اندازه‌گیری می‌گردد. برخی تحقیقات در این رابطه برای ارزیابی میزان مغذی بودن محیط کشت برای تحریک تکثیر سلولی جلبک *Dunaliella* با استفاده از مقدار کلروفیل بر میلی‌لیتر محیط مایع، به‌عنوان شاخص تکثیر صورت گرفته است (۷). کلروفیل یک ماده رنگی بوده که به سادگی قابل اندازه‌گیری است و نه تنها از این نظر مورد مناسبی برای ارزیابی و تخمین سرعت تولیدات اولیه توسط تولیدکنندگان آبزی است، بلکه دارای خواص دارویی مهمی می‌باشد که به نظر می‌رسد سویه‌هایی که قادر به تولید مقدار بیشتری کلروفیل باشند بیشتر مورد توجه‌اند. همانگونه که ذکر شد، جلبک تک‌سلولی *Dunaliella* به‌عنوان یک فیتوپلانکتون در تغذیه جانوران آبزی (به‌ویژه آب شور) حائز اهمیت بوده و بنابراین در این تحقیق، مقایسه سویه‌های جمع آوری شده جلبک مزبور از نقاط مختلف به همراه سه سویه خارجی نام‌گذاری شده، از نظر میزان کلروفیل‌های *a* و *b* تولید شده و فعالیت فتوسنتزی، تحت شرایط کنترل و نیز تنشی متفاوت صورت گرفت. نیز رابطه مقدار کلروفیل (در سلول و در واحد حجم محیط مایع) با وزن خشک جلبک و نیز تعداد سلول‌ها بررسی شد تا بهترین شاخص بیوماس جلبکی در این شرایط معرفی گردد. از آنجا که تنش‌های کمبود نیتрат، افزایش نور و افزایش مقدار آهن محیط بر میزان کلروفیل سلول موثر بوده ولی اعمال همه آن‌ها بطور هم‌زمان ممکن است که حیات سلول را به خطر اندازد، لذا از تنش‌های مزبور بصورت متوالی در بررسی مقایسه‌ای پتانسیل سویه‌ها در تولید کلروفیل استفاده گردید.

## مواد و روش‌ها

**نمونه‌گیری، جداسازی و خالص‌سازی جلبک تک سلولی *Dunaliella*** نمونه‌گیری از آب‌های شور مرداب گاوخونی اصفهان، دریاچه ارومیه، دریاچه مهارلو شیراز و نیز خلیج فارس

انجام شد. همچنین یک نمونه از کلکسیون جلبکی پروفیسور R. McC Lilley گروه زیست‌شناسی دانشگاه Wollongong استرالیا و دو نمونه *D. bardawil* (UTEX 2538) و *D. Salina* (UTEX 200) از کلکسیون جلبکی دانشگاه تگزاس تهیه شدند، (جهت سهولت، شماره‌های ۱ و ۲ به نمونه‌های جداسازی شده از دریاچه ارومیه، ۳، ۴، ۵ و ۶ به نمونه‌های مرداب گاوخونی، ۷ برای دریاچه مهارلو و ۸، ۹ و ۱۰ به نمونه‌های استخراج شده از خلیج فارس اختصاص یافتند. نمونه‌های خارجی فوق‌الذکر، به‌عنوان شاهد به ترتیب با شماره‌های ۱۱، ۱۲ و ۱۳ شماره‌گذاری شدند. پس از نمونه‌گیری، مراحل جداسازی و خالص‌سازی جلبک در شرایط کاملاً استریل و با استفاده از روش کشت تک‌کلنی بر روی محیط‌های کشت جامد انجام شد و سپس تلقیح و انتقال تک‌کلنی‌ها به محیط‌های کشت مایع صورت گرفت. محیط کشت جامد، محیط اصلاح شده جانسون و همکاران (۸ و ۹) با ۱/۵ درصد آگار، pH برابر ۷/۵ و مولاریته ۱/۷ نمک NaCl بوده و محیط مایع، به‌شرح فوق و تنها فاقد آگار بوده است. کلیه مواد شیمیایی مورد استفاده در این تحقیق از شرکت‌های Sigma و Merk تهیه گردید.

**طراحی شرایط پایه کشت سوسپانسیون‌های جلبکی:** تهیه محیط کشت پایه جلبک‌ها (شرایط شاهد) به روش Shaish و همکاران (۱۰) صورت گرفت. تحت شرایط استریل به ارلن‌مایره‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری اتوکلاو شده، ۱۰۰ میلی‌لیتر از محیط کشت فوق‌الذکر وارد شد. سپس سوسپانسیون‌های جلبکی هر ایزوله جلبکی به درون ارلن‌های مجزا اضافه شد، طوری که تعداد سلول اولیه درون هر ارلن تقریباً  $10^5 \times (1 \text{ تا } 2)$  سلول در هر میلی‌لیتر باشد. پس از این مرحله، کلیه کشت‌ها در شرایط نوری  $40 \mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ، شرایط فتوپریودیک ۱۶ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی و شرایط دمایی  $27/24 \pm 0/5$  درجه سانتی‌گراد (شب/روز)، به‌عنوان شرایط شاهد، قرار گرفتند. برای تامین نور سفید از لامپ‌های فلوروسنت استفاده شد و میزان نور با دستگاه فوتون متر مدل Hansatech QSPAR-U.K. اندازه‌گیری گردید. برداشت نمونه از هر یک از ارلن‌ها به‌منظور اندازه‌گیری مقدار رنگدانه‌های کلروفیلی و نیز شمارش سلولی هر ۳ یا ۴ روز یک بار تحت شرایط استریل انجام شد.

#### طراحی شرایط اعمال تنش:

**الف) تنش کمبود نیترات:** نظر به کم بودن تعداد اولیه

سلول‌های تلقیح شده در شرایط پایه، تنش نیترات پس از گذشت هفت روز از رشد اولیه کشت‌های سلولی اعمال شد و سلول‌های برداشت شده در یک محیط کشت مایع با کمبود نیترات یعنی معادل ۰/۵ میلی‌مولار  $\text{NaNO}_3$  (۱۰)، مولاریته نمک NaCl معادل ۱/۷ مولار و pH معادل ۷ تلقیح شدند. مراحل تلقیح سلول‌ها با سانتیفریوژ نمودن سوسپانسیون‌های جلبکی در  $1500 \text{ g}$  به مدت ۱/۵ دقیقه صورت گرفت و پس از دور ریختن محلول روپی، سلول‌ها به آرامی در ۵ میلی‌لیتر محیط کشت با کمبود نیترات شناور شدند. این مرحله دو بار انجام گرفت و هر بار پس از سانتیفریوژ در  $1500 \text{ g}$  به مدت ۱/۵ دقیقه، محلول روئی دور ریخته شد. سپس سلول‌ها در درون ارلن‌مایره‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری اتوکلاو شده که حاوی ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت مایع کمبود نیترات بود، تلقیح شدند. پس از انجام مراحل تلقیح، کشت‌ها در  $40 \mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$  شرایط فتوپریودیک ۱۶ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی و شرایط دمایی  $27/23 \pm 0/5$  درجه سانتی‌گراد (شب/روز)، قرار گرفتند. بخشی از سوسپانسیون سلولی که در طی این مراحل و نیز تنش‌ها و تیمارهای بعدی، در شرایط پایه و بدون اعمال هر گونه تیمار قرار گرفت (نیترات به میزان ۳/۰۶ میلی‌مولار)، به‌عنوان شاهد یا کنترل در نظر گرفته شد. اندازه‌گیری فاکتورهای مورد نظر در روزهای بعد نیز مطابق روش‌های ذکر شده انجام گرفت و نتایج ارائه گردید.

**ب) تیمار افزایش شدت نور:** در ادامه آزمایش (یک هفته بعد در روز ۱۱۳م)، شرایط نور شدید به صورت افزایش شدت نور به  $200 \mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$  میکرو مول فوتون بر متر مربع در شرایط دمایی و فتوپریودیک ذکر شده قبلی صورت گرفت.

**پ) تیمار افزایش مقدار آهن:** در روز ۲۱ کشت، شرایط زیادبود آهن به گونه‌ای اعمال شد که مولاریته نهایی آهن در هر یک از ارلن‌ها به میزان ۱۲۸ میکرومولار برسد.

**اندازه‌گیری رنگدانه‌ها:** به‌منظور اندازه‌گیری مقدار رنگدانه‌های کلروفیل *a*، کلروفیل *b*، مقدار ۱ میلی‌لیتر سوسپانسیون از هر ارلن برداشت شده و به مدت ۵ دقیقه در  $13000 \text{ g}$  سانتیفریوژ گردید. اندازه‌گیری به روش اسپکتروفتومتری-UV (Shimatzu, UV-160)، مطابق روش Dekker و Eijkelhoff (۱۱)، با استفاده از استون ۸۵ درصد انجام شد و مقدار رنگدانه‌ها بر حسب میکروگرم رنگدانه بر سلول و نیز میکروگرم رنگدانه در میلی‌لیتر محیط کشت محاسبه گردیدند. مقدار کلروفیل کل از مجموع

مقادیر کلروفیل‌های  $a$  و  $b$  به دست آمد.

بررسی فتوسنتز و تنفس سوسپانسیون جلبکی با استفاده از دستگاه پلاروگراف، نیاز به شرایط مناسب و کاملاً کنترل شده از نظر دما، حجم نمونه و به‌ویژه نور دارد. لذا از تنش شوری که اعمال آن در این شرایط بخوبی امکان پذیر بوده و اخذ نتایج آن نیز سریعاً میسر است، به منظور بررسی و مقایسه پتانسیل فتوسنتزی و تنفسی نمونه‌ها در شرایط تنش، استفاده گردید.

**آنالیز آماری داده‌ها:** بررسی آماری داده‌ها با استفاده از تحلیل واریانس Univariate، در قالب یک طرح کاملاً تصادفی در دو تکرار انجام شد و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه Tukey و T-test (در سطح معنی‌داری ۰/۰۵) و نیز محاسبه ضرائب همبستگی، با استفاده از نرم افزار SPSS (ورژن ۱۶) صورت گرفت.

### نتایج

مقادیر کلروفیل‌های اندازه‌گیری شده بر اساس دو معیار، میکروگرم بر میلی‌لیتر سوسپانسیون سلولی و نیز میکروگرم بر  $10^6$  سلول ارائه شده است که در بخش الف نمونه‌ها در حالت شاهد و در بخش ب، نمونه‌ها در شرایط تیمار قرار دارند. شکل‌های سه بخشی، میزان تغییرات ترکیبات مورد نظر در نمونه‌های تیمار شده (شکل ب) را یک هفته پس از تیمار، نسبت به زمان قبل از تیمار، در مقایسه با حالت شاهد نشان می‌دهد که بر حسب درصد تغییرات شاهد در مدت یک هفته بیان شده است. سه بخش I، II و III مربوط به نتایج اعمال تنش‌های متوالی کمبود نیترات، افزایش نور و زیادبود آهن می‌باشند.

### بررسی منحنی رشد سلولی

همانگونه که در شکل ۱-الف، (شرایط شاهد)، مشاهده می‌شود، تعداد سلول‌ها تقریباً در همگی نمونه‌ها از پس از تلقیح در محیط کشت تا روز هفتم افزایش یافته و سیر منحنی به‌صورت صعودی می‌باشد. از روز هفتم روند منحنی با نوسانات افزایشی دنبال می‌شود در حالیکه نقطه ماکزیمم (بیشینه) منحنی رشد برای نمونه‌های مختلف متفاوت است. برای نمونه‌های شماره ۲، ۵، ۶، ۷، ۹ و ۱۱ در روز ۱۳ام، نمونه ۴ روز ۷ و برای نمونه‌های شماره ۳، ۸، ۱۰، ۱۲ و ۱۳ در روز ۲۸ام می‌باشد. نمونه شماره ۱، روند تغییراتی متفاوت‌تر از سایر سویه‌ها با بالاترین تعداد سلولی در روز ۲۸ام نشان می‌دهد که پس از آن با یک سیر نزولی کند ادامه می‌یابد. پس از این زمان که بنظر می‌رسد مرحله پیر شدن کشت باشد تعداد سلول‌ها تقریباً ثابت باقی مانده و یا تغییرات

**بررسی مورفولوژیک سلول‌ها و شمارش سلولی:** برای حصول اطمینان از تشخیص نمونه‌ها، با استفاده از تکنیک فیلم‌برداری ویدئو-میکروسکوپی (میکروسکوپ نوری مجهز به دوربین فیلم برداری)، سلول‌های نمونه‌های مختلف در مقایسه با نمونه‌های شاهد، از نظر ویژگی‌های ظاهری نظیر دارا بودن کلروپلاست فنجانی شکل و لکه چشمی قرمز رنگ، نحوه حرکت، دارا بودن دو تاژک و مورفولوژی کلی *Dunaliella* با استفاده از کلید شناسایی Masjuk در سال ۱۹۷۳، (به نقل از ۱۲) مورد بررسی و تایید قرار گرفتند.

**شمارش سلولی:** شمارش سلول‌ها با استفاده از لام آینه‌ای هموسایتومتر انجام گرفت و هر بار تعداد سلول‌ها با استفاده از بزرگنمایی  $40\times$  میکروسکوپ نوری در هر میلی‌لیتر از سوسپانسیون جلبکی شمارش گردید (۱۳).

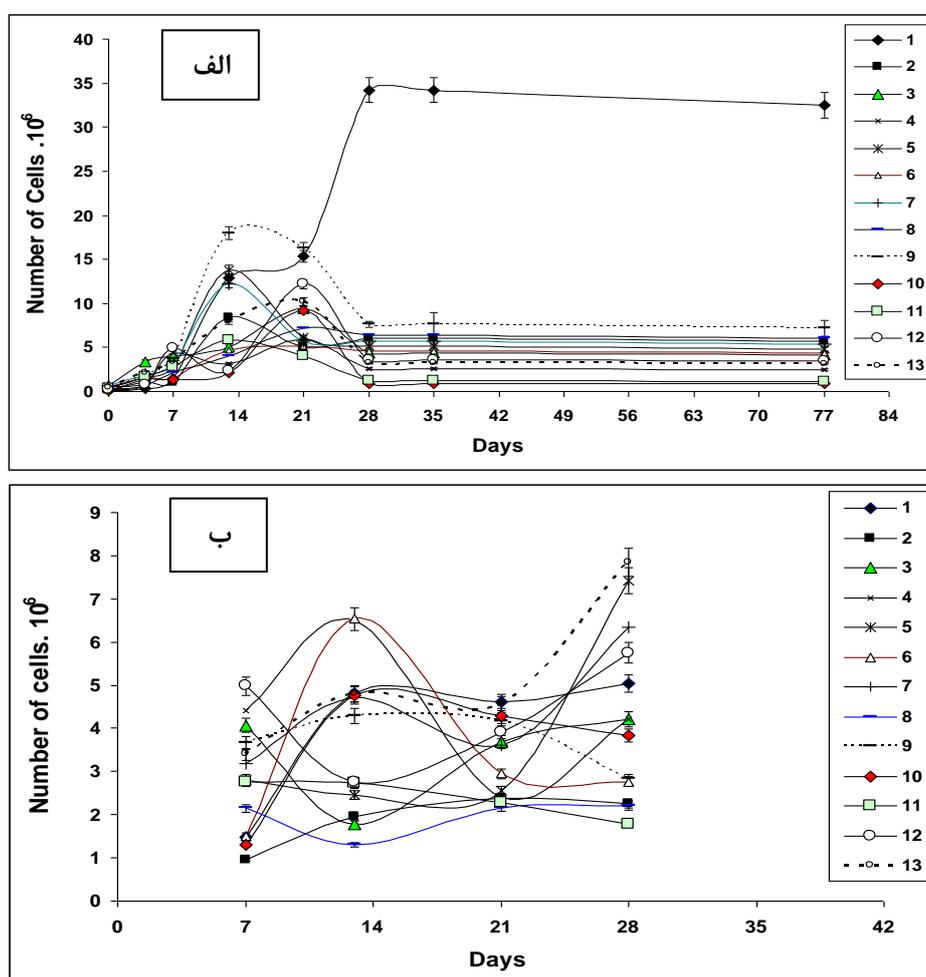
**اندازه‌گیری وزن خشک نمونه‌ها:** در روز ۲۸ام آزمون در هر دو شرایط شاهد و تیمار (زمان پایان تنش‌ها)، یک میلی‌لیتر از هر نمونه برداشت و به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد در درون آون خشک گردید و سپس محاسبه وزن خشک سلول‌ها انجام گرفت و نتایج بر حسب میلی‌گرم بر  $10^6$  سلول ارائه شد.

**اندازه‌گیری میزان فتوسنتز و تنفس:** بررسی میزان فتوسنتز خالص، تنفس و فتوسنتز کل برای کلیه نمونه‌ها در شرایط طراحی شده پایه (شاهد) و نیز در تیمار شوری ۱/۷ به ۳/۵ مولار نمک با استفاده از دستگاه پلاروگراف (Hansatech, U. K.) هر یک در دو تکرار انجام شد (۱۴) و نتایج بر حسب نانومول اکسیژن تولید شده بر میکروگرم کلروفیل بر دقیقه برای فتوسنتز و نانومول اکسیژن مصرف شده بر میکروگرم کلروفیل بر دقیقه برای تنفس ارائه گردید. در این رابطه مقادیر مشخصی از سوسپانسیون سلولی برداشت و به لوله آزمایش منتقل گردید و به مدت ۵ دقیقه در ۵۰۰ g سانتی‌فوژ شد. رسوب نرم حاصل در بافر فسفات شامل  $0.25$  میلی‌مولار  $KH_2PO_4$  و  $0.25$  میلی‌مولار  $K_2HPO_4$  و  $0.2$  میلی‌مولار  $MgCl_2$  با pH ۷/۴، مجدداً به حالت سوسپانسیون در آمده و به شرایط طراحی شده بازگردانیده شد. پس از کالیبره کردن دستگاه، اندازه‌گیری فتوسنتز و تنفس برای هر یک از نمونه‌ها، هر بار با برداشت و انتقال یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون سلولی در محلول بافر به دستگاه پلاروگراف انجام شد.

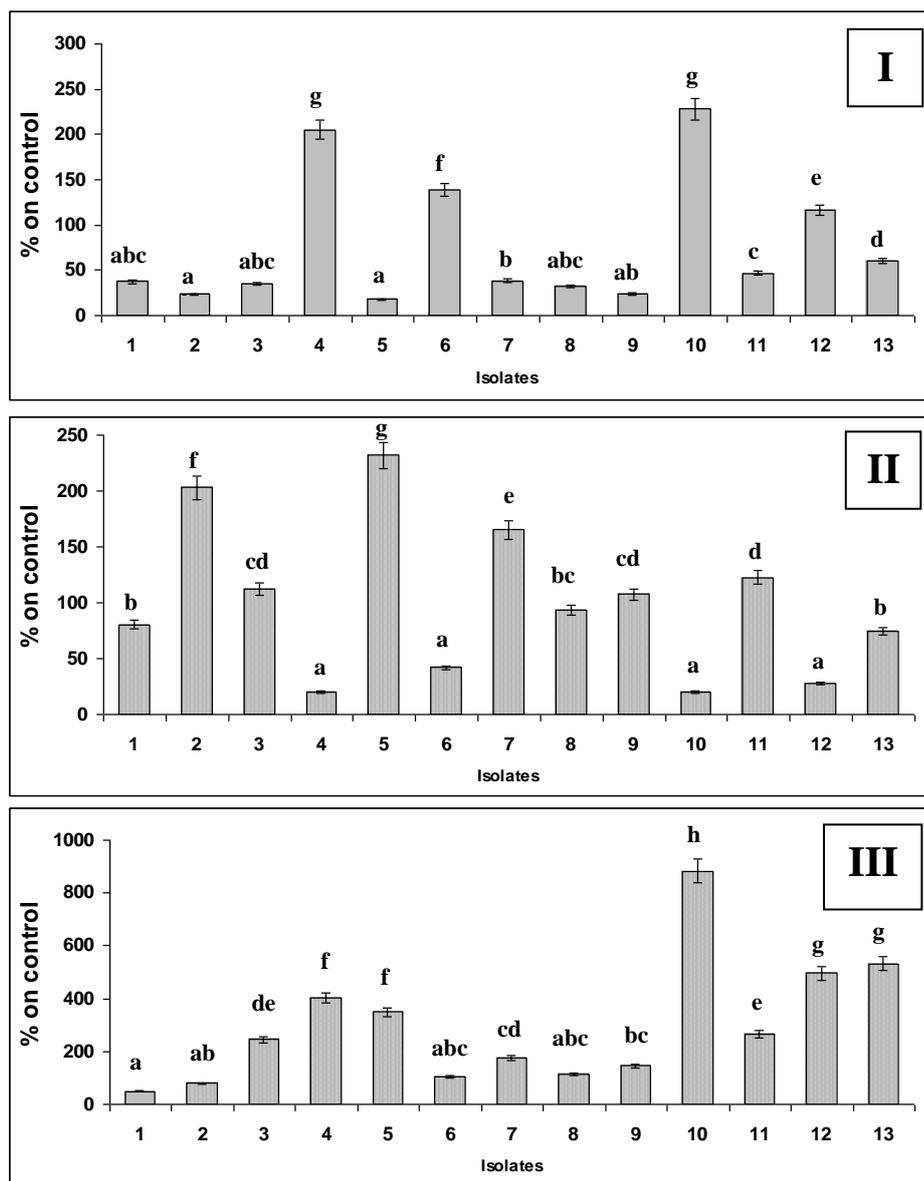
کاهش نشان می‌دهد.

نمونه‌های مورد مطالعه گردید. تنها نمونه ۱۳ در این دو تیمار تغییرات بطئی تری را نشان داد (شکل ۲-I و II). افزایش آهن در محیط کشت سلول‌ها در روز ۲۱ ام، نیز نظیر تیمارهای پیشین، تفاوت در پاسخ نمونه‌های مختلف را نشان داد به‌صورتی که روند افزایشی در تقسیمات سلولی در نمونه‌های ۳، ۴، ۵، ۷، ۱۰، ۱۱، ۱۲ و ۱۳ و بالعکس روند کاهشی در نمونه‌های ۱، ۲، ۶، ۸ و ۹ مشاهده گردید. نمونه‌های ۳ و ۵ روند افزایشی قبلی را ادامه داده و نمونه‌های ۱۰، ۱۲ و ۱۳ روند افزایشی سریعی را به نمایش گذارند (شکل‌های ۱-ب و ۲-III).

در نمونه‌های تیمار شده (شکل ۱-ب و شکل ۲-I)، اعمال شرایط جدید در روز هفتم یعنی کمبود نیترات، در برخی نمونه‌ها (۴، ۶ و ۱۰) سبب تحریک تقسیم سلولی و نتیجتاً افزایش تعداد سلول‌ها و در برخی دیگر (۱، ۲، ۳، ۵، ۷، ۸، ۹، ۱۱، ۱۲ و ۱۳) سبب کاهش تعداد سلول‌ها و مرگ سلولی گردید که به ترتیب نقاط ماکزیمم و یا می‌نیمی را در روز ۱۳ام موجب شد. افزایش شدت نور به ۲۰۰ میکرومول فوتون پس از این مرحله سبب عکس شدن جهت تغییرات تقریباً در تمامی



شکل ۱: (الف و ب) منحنی رشد بر اساس تقسیم سلولی *Dunaliella salina* UTEX 200 در نمونه‌های ۱ تا ۱۰ جداسازی شده از مناطق مختلف ایران و نمونه‌های غیر ایرانی: (۱۱)، *D. bardawil* UTEX 2538 (نمونه ۱۲) و *D. salina* UTEX 200 (نمونه ۱۳). الف) در شرایط بدون تیمار (شاهد یا کنترل) به مدت ۷۷ روز. ب) در شرایط تیمار، به ترتیب اعمال تنش کمبود نیترات در روز هفتم، افزایش شدت نور در روز سیزدهم و زیادبود آهن در روز بیستم و یکم. اطلاعات روز اول تا هفتم مشابه نمودار الف بوده و مقادیر میانگین دو تکرار  $\pm SD$  می‌باشند.



شکل ۲: تغییرات تعداد سلول‌های *Dunaliella* در شرایط تیمار بر اساس درصد تغییرات تیمار نسبت به شرایط شاهد یا کنترل، از روز هفتم تا بیست و هشتم، در نمونه‌های ۱ تا ۱۰ جداسازی شده از مناطق مختلف ایران و نمونه‌های غیر ایرانی: ۱۱، *D. bardawil* UTEX 2538 (نمونه ۱۲) و *D. salina* UTEX 200 (نمونه ۱۳). I - کمبود نیترات اعمال شده در روز هفتم رشد. II - افزایش میزان نور، اعمال شده در روز سیزدهم رشد. III - زیادبود آهن اعمال شده در روز بیست و یکم رشد. مقادیر میانگین دو تکرار  $\pm SD$  بوده و حروف غیرهمسان بر اساس آزمون *Tukey*، نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار میان ۱۳ نمونه، در  $P < 0.05$  می‌باشند.

### بررسی تغییرات کلروفیل a

بر اساس شکل ۳-الف، مقدار کلروفیل a در میلی‌لیتر سوسپانسیون جلبکی در شرایط شاهد، با افزایش تعداد سلول‌ها، به تدریج تا روز ۲۸ و ۳۵م افزایش و پس از آن به آرامی کاهش یافته. تغییرات این رنگدانه در میلی‌لیتر سوسپانسیون‌های تیمار شده، به‌طور کلی در اغلب نمونه‌ها پس از تلقیح در محیط حاوی نیترات روند کاهشی داشته و در عین اعمال تیمارهای متفاوت با

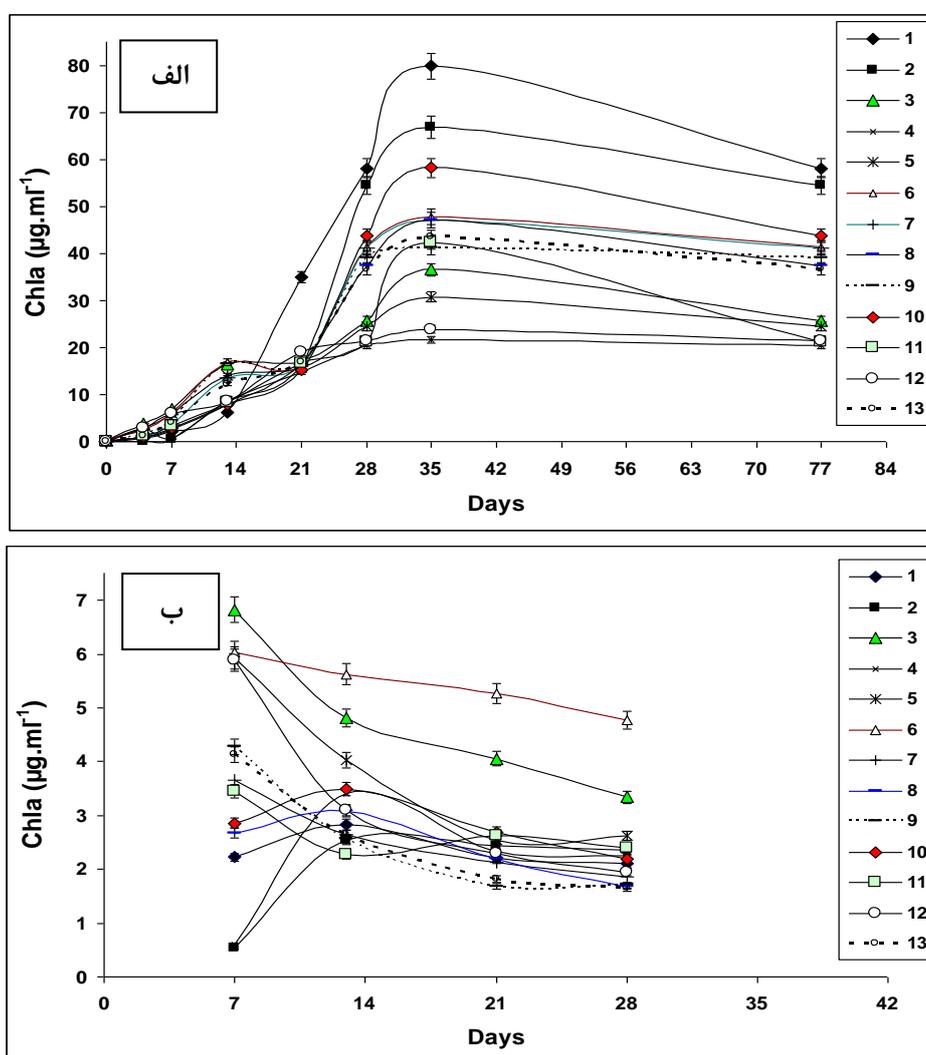
افت و خیز بطئی، مسیری نزولی را طی نموده است (شکل ۳-ب).

مقدار کلروفیل a در سلول، در شرایط شاهد (شکل ۴-الف) تقریباً تا روز ۲۱م که دوره رشد و تقسیم سریع است، ثبات بیشتری را نسبت به زمان پس از آن نشان داد. اما از این پس و با افزایش سن سوسپانسیون که تعداد تقسیمات را کاهش می‌دهد، افزایش یافت. نمونه شماره ۱ که از نظر تکثیر سلولی، افزایش تعداد سلول را نشان داده بود (شکل ۱-الف)، از نظر

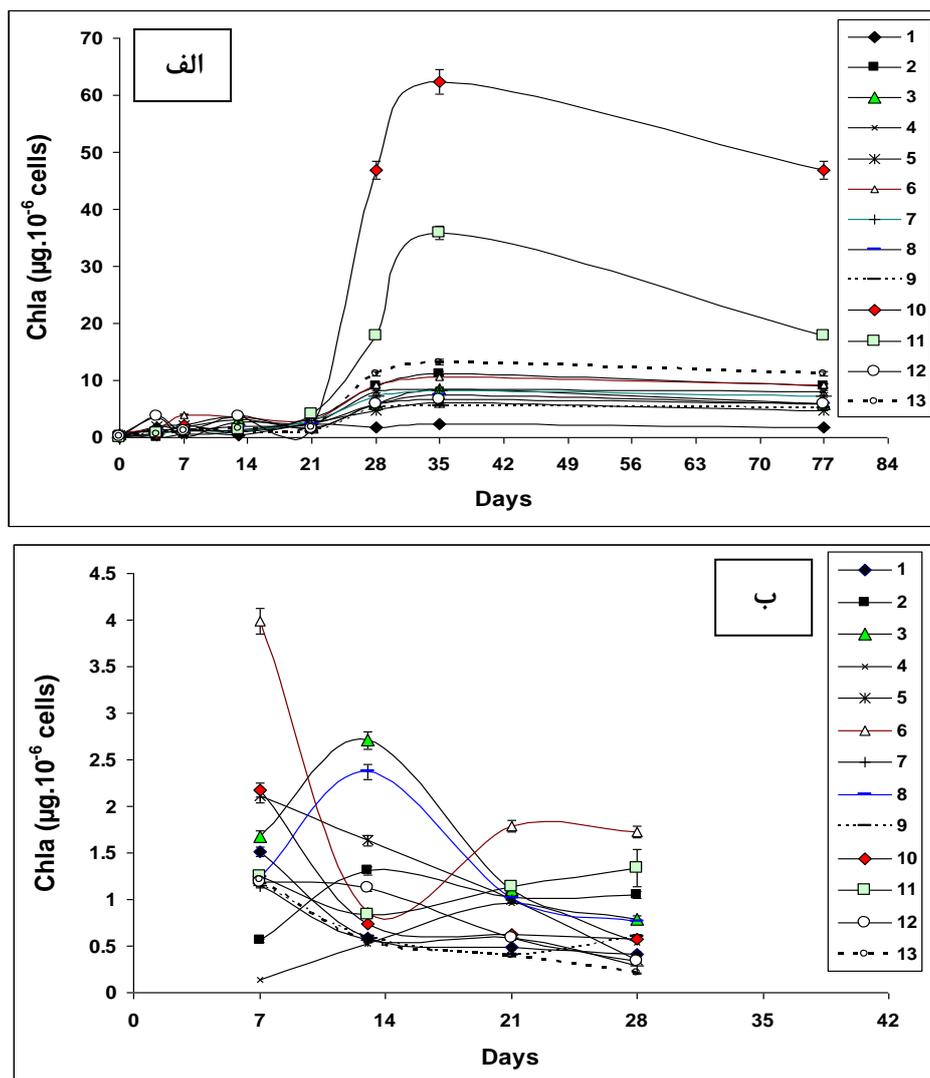
تغییرات کلروفیل  $a$  سلول را در نمونه‌های تیمار شده از روز هفتم تا روز بیست و هشتم در سه بخش بر اساس درصد از نمونه شاهد نشان می‌دهد، اعمال کمبود نیترات (شکل ۵- I) سبب افزایش قابل توجهی در کلروفیل  $a$  نمونه ۵ و کاهش در اغلب نمونه‌ها می‌گردد. به همین ترتیب افزایش نور سبب افزایش رنگدانه مزبور در نمونه‌های ۴، ۶، ۱۰ و ۱۲ شده و در این میان باقی نمونه‌ها کاهش را نشان می‌دهند (شکل ۵- II). در ارتباط با زیادبود آهن، تنها رنگدانه مزبور در نمونه شماره ۱ اندکی افزایش نشان داده و باقی نمونه‌ها کاهش نشان می‌دهند (شکل ۵- III).

مقدار کلروفیل  $a$  در سلول، در حداقل مقدار بود (شکل ۴- الف). این مورد نشان می‌دهد که در اثر تقسیمات پایایی، میزان کلروفیل در هر سلول کاهش یافته با این وجود به خاطر تعداد زیاد سلول‌ها، مقدار کلروفیل در میلی‌لیتر آن افزایش نشان می‌دهد (شکل ۳- الف).

میزان کلروفیل در هر سلول از نمونه‌های تیمار شده (شکل ۴- ب) نیز رفتاری عکس با آنچه برای منحنی رشدش ذکر شد، نشان می‌دهد. بدین معنی که نقطه‌ای که در منحنی رشد و تقسیمات سلولی در اوج است از نظر میزان رنگدانه در هر سلول در حداقل قرار گرفته است. بر اساس شکل ۵ که جزئیات



شکل ۳: (الف و ب) میزان کلروفیل  $a$  در واحد حجم سوسپانسیون *Dunaliella* در نمونه‌های ۱ تا ۱۰ جداسازی شده از مناطق مختلف ایران و نمونه‌های غیر ایرانی: ۱۱، *D. bardawil* UTEX 2538 (نمونه ۱۲) و *D. salina* UTEX 200 (نمونه ۱۳). (الف) در شرایط بدون تیمار (شاهد) به مدت ۷۷ روز. (ب) در شرایط تیمار، به ترتیب اعمال تنش کمبود نیترات در روز هفتم، افزایش شدت نور در روز سیزدهم و زیادبود آهن در روز بیست و یکم. اطلاعات روز اول تا هفتم مشابه نمودار الف بوده و مقادیر میانگین دو تکرار  $\pm SD$  می‌باشند.



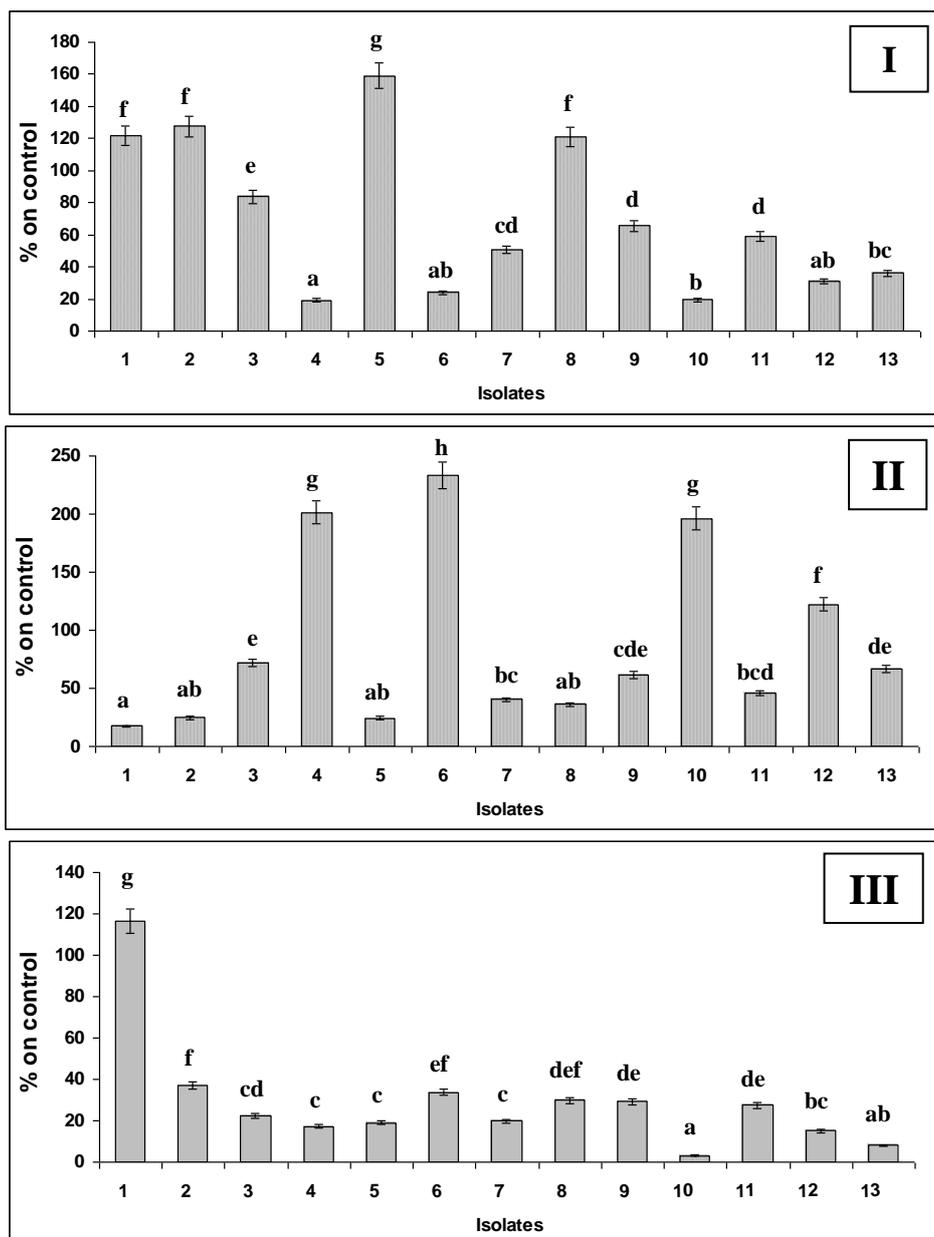
شکل ۴: (الف و ب) میزان کلروفیل *a* در سلول *Dunaliella* در نمونه‌های ۱ تا ۱۰ جداسازی شده از مناطق مختلف ایران و نمونه‌های غیر ایرانی: ۱۱، *D. bardawil* UTEX 2538 (نمونه ۱۲) و *D. salina* UTEX 200 (نمونه ۱۳). (الف) در شرایط بدون تیمار (شاهد) به مدت ۷۷ روز. (ب) در شرایط تیمار، به ترتیب اعمال تنش کمبود نیترات در روز هفتم، افزایش شدت نور در روز سیزدهم و زیادبود آهن در روز بیست و یکم. اطلاعات روز اول تا هفتم مشابه نمودار الف بوده و مقادیر میانگین دو تکرار  $\pm SD$  می‌باشند.

#### بررسی تغییرات کلروفیل *b*

بر اساس نتایج، مقدار کلروفیل *b* در سلول *Dunaliella* در حدود یک سوم مقدار کلروفیل *a* بود. با آنکه روند تغییرات کلروفیل *b* مشابهت‌های زیادی با کلروفیل *a* نشان می‌دهد، اما شدت افزایش یا کاهش‌ها متغیر است (شکل ۶). از نمونه‌های ۱، ۲، ۵ و ۸ با کلروفیل *a* افزایش یافته در روز ۱۳ام، تنها نمونه ۵ دارای افزایش مقدار رنگدانه *b* بود (۶- I). در اثر تیمار افزایش نور، مقدار رنگدانه کلروفیل *b* در نمونه‌های ۶ و ۱۰ به میزان کمتری در مقایسه با کلروفیل *a* افزایش یافته بود (۶- II) و در تیمار زیادبود آهن، کلروفیل *b* در برخی نمونه‌ها به شدت کاهش یافته و به مقادیر غیر قابل اندازه‌گیری نزدیک شد (۶- III).

#### بررسی تغییرات نسبت کلروفیل *a/b*

تغییرات نسبت کلروفیل *a/b* در نمونه‌های شاهد اندک بوده و ثبات بیشتری را نشان داد (۷- الف)، در عین حال بررسی تغییرات این نسبت در شرایط تیمار، از نظر تعادل مقدار کلروفیل‌ها و میزان کارایی در فتوسنتز، بیشتر حائز اهمیت است (۷- ب). بررسی این تغییرات در سلول نشان داد که میزان تغییرات این نسبت در فاصله روز هفتم (اعمال کمبود نیترات) تا روز ۱۳ام (افزایش شدت نور) بسیار کمتر از بعد از این زمان تا روز ۲۱ می‌باشد. بر اساس شکل ۷، مقدار تغییر کلروفیل *a/b* در روز هفتم به روز سیزدهم در نمونه‌های تیمار شده، به صورت افزایشی و در نمونه‌های شاهد به صورت کاهشی بود.

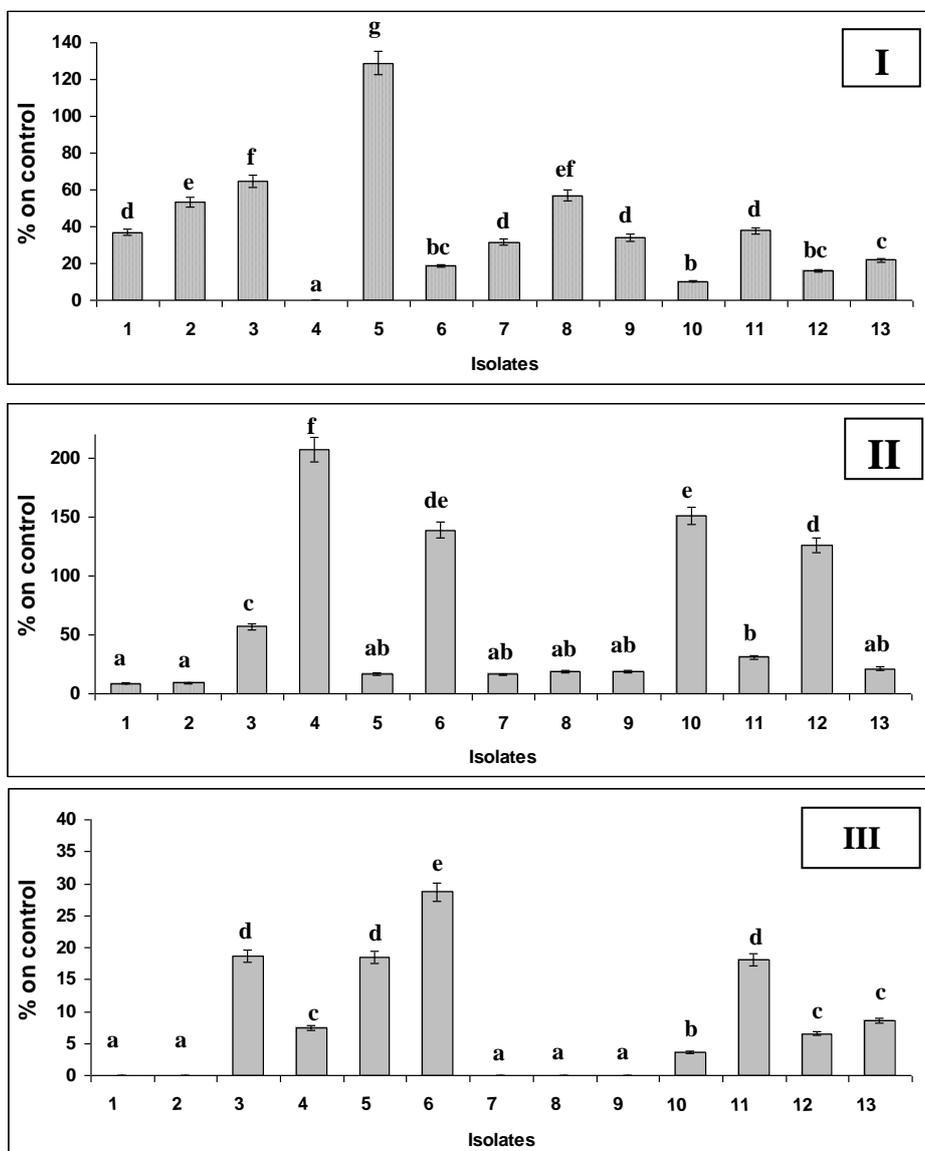


شکل ۵: تغییرات میزان کلروفیل *a* در سلول *Dunaliella* در شرایط تیمار بر اساس درصد تغییرات تیمار نسبت به شرایط شاهد یا کنترل (میکروگرم کلروفیل *a* در یک میلیون سلول) از روز هفتم تا بیست و هشتم، در نمونه‌های ۱ تا ۱۰ جداسازی شده از مناطق مختلف ایران و نمونه‌های غیر ایرانی: ۱۱) *D. bardawil* UTEX 2538 (نمونه ۱۲) و *D. salina* UTEX 200 (نمونه ۱۳). I - کمبود نیترات اعمال شده در روز هفتم رشد. II - افزایش میزان نور، اعمال شده در روز سیزدهم رشد. III - زیادبود آهن اعمال شده در روز بیست و یکم رشد. مقادیر میانگین دو تکرار  $\pm SD$  بوده و حروف غیرهمسان بر اساس آزمون *Tukey*، نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار میان ۱۳ نمونه، در  $P < 0.05$  می‌باشند.

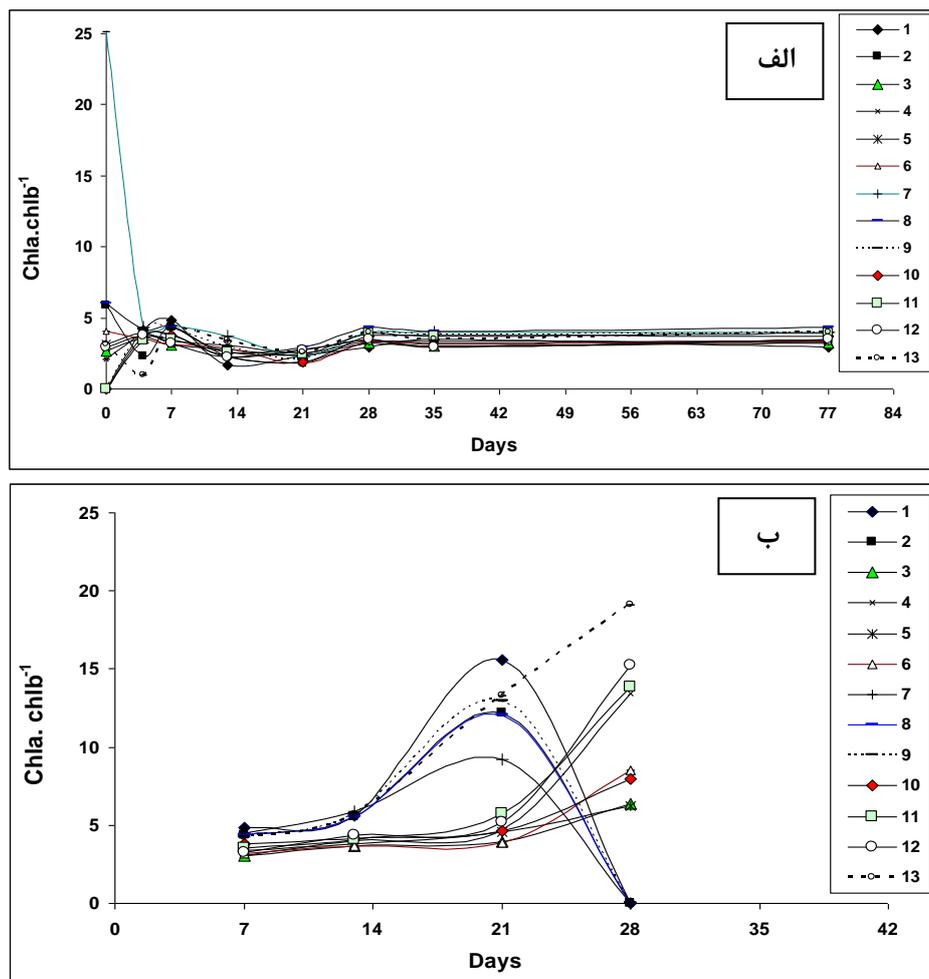
کلروفیل *a/b* ثابت و بی‌تغییر مانده است. اما بطور کلی تحت تاثیر تنش نیترات نسبت *a/b* در اغلب گونه‌ها افزایش یافته است. بررسی تغییرات نسبت *a/b* در اثر افزایش شدت نور حاکی از آن بود که در اغلب نمونه‌ها نسبت کلروفیل *a/b* با زیاد شدن نور به مقدار زیادی افزایش یافته در حالی‌که این نسبت در نمونه‌هایی نظیر ۴ و ۱۲ اندکی کاهش یافته یا بی‌تغییر مانده بود. بررسی مقدار کلروفیل‌ها همچنین نشان داد که میزان

توجیه نسبت کلروفیل *a/b* می‌بایست از روی مقدار کلروفیل‌های *a* و *b* صورت گیرد. بررسی وضعیت کلروفیل‌های *a* و *b* نمونه‌ها در طی تنش نیترات نشان داد که اکثر نمونه‌ها، میزان هر دو کلروفیل را بر اثر تنش نیترات کاهش داده‌اند درحالی‌که در همین شرایط در نمونه‌های ۱، ۲ و ۸ مقدار کلروفیل *a* افزایش و کلروفیل *b* کاهش یافته بود. در نمونه ۴، کلروفیل *a* بسیار زیاد کاهش و کلروفیل *b* خیلی افزایش داشت، در نتیجه نسبت

کلروفیل *a*، که تاثیر بیشتری در مقدار این کسر دارد، با تاثیر دادن تیمار افزایش نور، در برخی موارد حالت افزایشی نشان داده است. افزودن آهن محیط نیز سبب افزایش نسبت مزبور در نمونه‌های ۴، ۱۱ و ۱۲ شده است.



شکل ۶: تغییرات میزان کلروفیل *b* در سلول *Dunaliella* در شرایط تیمار بر اساس درصد تغییرات تیمار نسبت به شرایط شاهد یا کنترل (میکروگرم کلروفیل *b* در یک میلیون سلول) از روز هفتم تا بیست و یکم، در نمونه‌های ۱ تا ۱۰ جداسازی شده از مناطق مختلف ایران و نمونه‌های غیر ایرانی: ۱۱ *D. bardawil* UTEX 2538 (نمونه ۱۲) و *D. salina* UTEX 200 (نمونه ۱۳). I - کمبود نیترات اعمال شده در روز هفتم رشد. II - افزایش میزان نور، اعمال شده در روز سیزدهم رشد. III - زیادبود آهن اعمال شده در روز بیست و یکم رشد. مقادیر میانگین دو تکرار  $\pm SD$  بوده و حروف غیرهمسان بر اساس آزمون *Tukey* نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار میان ۱۳ نمونه، در  $P < 0.05$  می‌باشند.



شکل ۷: الف و ب) نسبت کلروفیل *a/b* در *Dunaliella*، نمونه‌های ۱ تا ۱۰ جداسازی شده از مناطق مختلف ایران و نمونه‌های غیر ایرانی: ۱۱، *D. bardawil* UTEX 2538 (نمونه ۱۲) و *D. salina* UTEX 200 (نمونه ۱۳). الف) در شرایط بدون تیمار (شاهد) به مدت ۷۷ روز. ب) در شرایط تیمار، به ترتیب اعمال تنش کمبود نیترات در روز هفتم، افزایش شدت نور در روز سیزدهم و زیادبود آهن در روز بیست و یکم، اطلاعات روز اول تا هفتم مشابه نمودار الف بوده و مقادیر میانگین دو تکرار  $\pm SD$  می‌باشند.

### بررسی تغییرات کلروفیل کل

از آنجا که بیشتر کلروفیل کل از کلروفیل *a* تشکیل شده الگوی رفتاری کلروفیل کل تا حدود زیادی مشابه با کلروفیل *a* بوده و موارد اختلاف جزئی اند (شکل ۸).

### بررسی میزان تنفس و فتوسنتز

بررسی مقدار فتوسنتز خالص نمونه‌های شاهد، نمونه‌های ۱، ۴ و ۱۳ را از نظر بالاتر بودن و نمونه‌های ۲، ۷، ۸ و ۱۱ را دارای کمترین فتوسنتز خالص در شرایط شاهد معرفی می‌نماید (شکل ۹-الف). در رابطه با تنفس، میزان تنفس در شرایط شاهد، در نمونه‌های ۱، ۴، ۵، ۹ و ۱۳ بیشترین مقدار و در نمونه‌های ۶، ۷، ۸ و ۱۰ کمترین مقدار بود (شکل ۹-ب). نمودار مقدار فتوسنتز کل یا حقیقی، با میزان فتوسنتز خالص تا حدود زیادی تشابه و

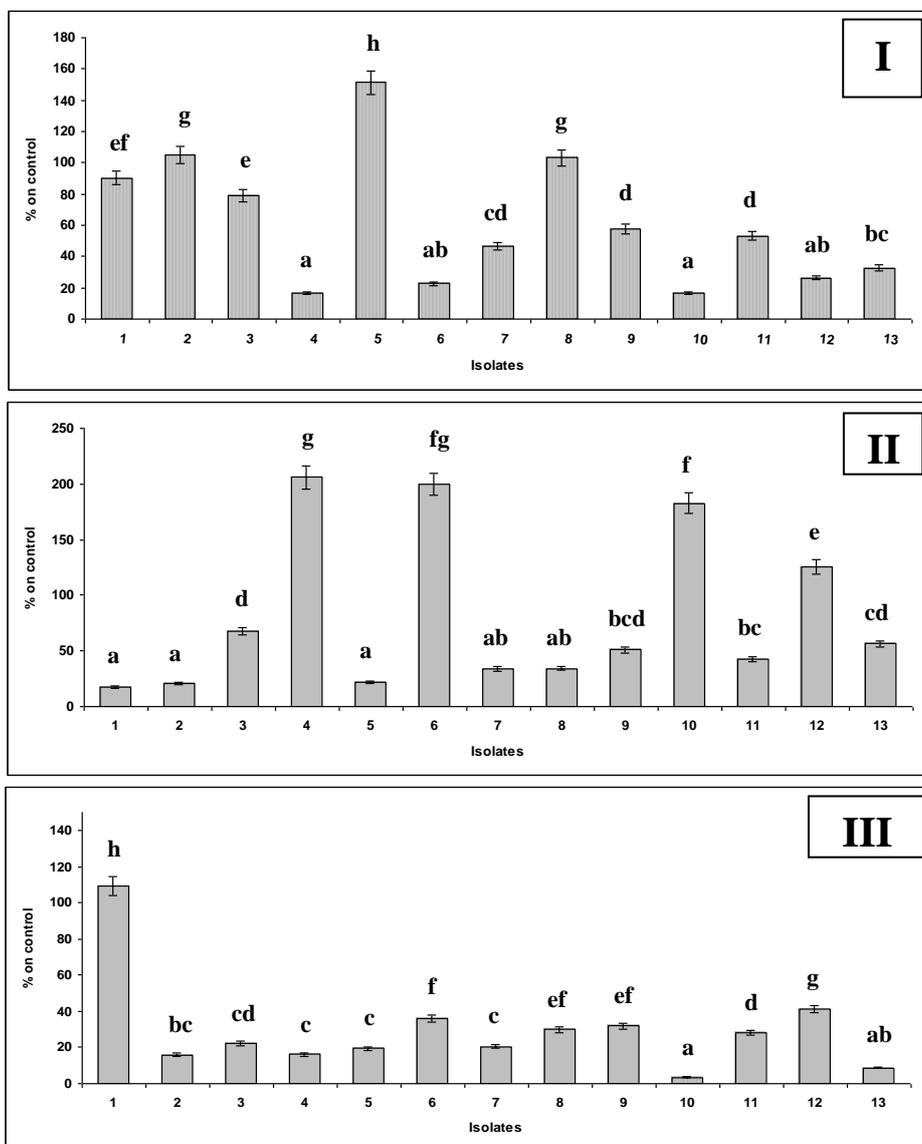
همخوانی داشته و بنابراین در شرایط شاهد، نمونه‌های ۱، ۴ و ۱۳ دارای بیشترین مقدار فتوسنتز کل می‌باشند (شکل ۱۰). در پاسخ به تنش شوری، میزان فتوسنتز خالص همه نمونه‌ها کاهش یافت (شکل ۹-الف). اما این تغییر کاهشی در نمونه ۴، از بقیه کمتر و در نمونه ۷ از همه بیشتر بود. پس از تنش بر شدت تنفس افزوده می‌شود. نمونه ۸ و ۱۳ بیشترین میزان افزایش و ۲ کمترین مقدار افزایش نسبت به حالت شاهد را نشان دادند. مقدار فتوسنتز کل پس از تنش کاهش یافته و نمونه ۶ با بیشترین و ۹ با کمترین میزان کاهش قابل مشاهده بود (شکل ۱۰).

### بررسی وزن خشک نمونه‌ها

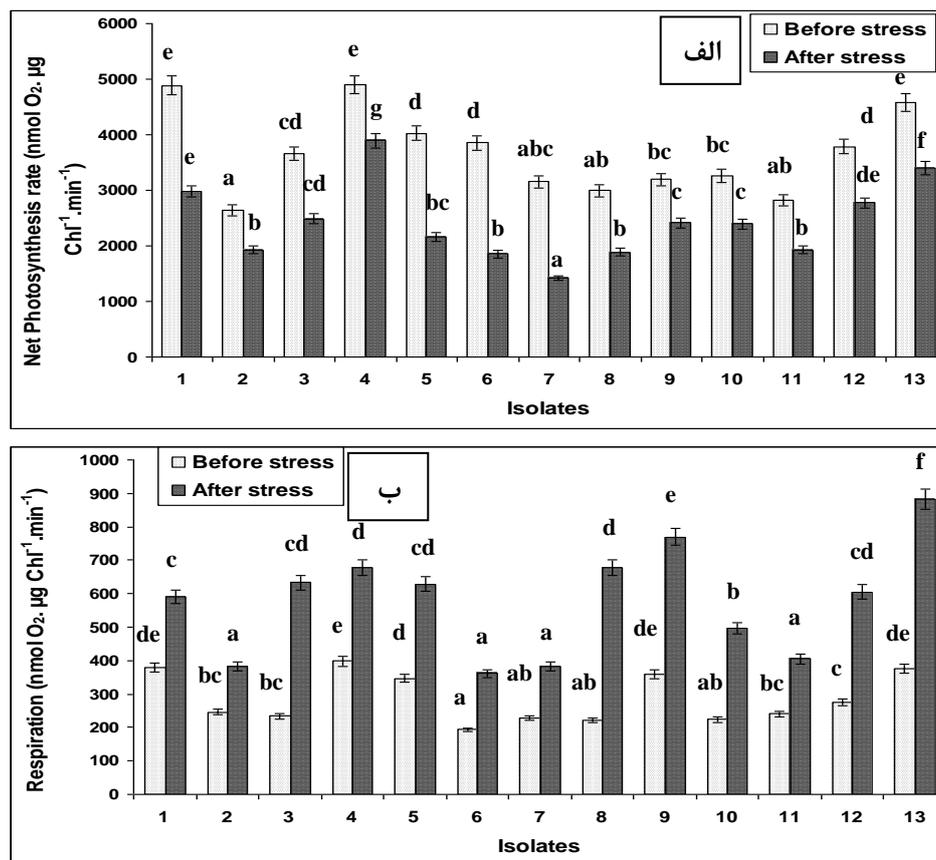
وزن خشک نمونه‌های جلبکی بر حسب میلی‌گرم بر  $10^6$  سلول، که در روز ۲۸ام آزمون در دو شرایط شاهد و تیمار اندازه‌گیری

و کمترین آن برای نمونه ۵ اندازه‌گیری شد. قابل ذکر آنکه حداقل وزن خشک نمونه‌ها در شرایط تنش بالاتر از این مقدار در شرایط شاهد بوده و حداکثر آن نیز در مقایسه اندکی بیشتر بود.

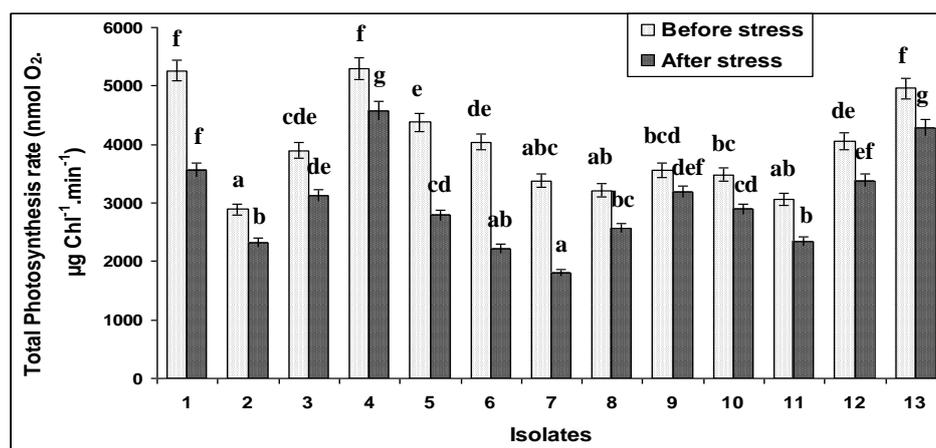
شده بود، نشان‌دهنده بالاترین مقدار در شرایط شاهد برای نمونه شماره ۱۰ و سپس ۱۱ و کمترین مقدار برای نمونه شماره ۱ می‌باشد (جدول ۱). در شرایط تیمار و یک هفته پس از اعمال آخرین تنش، بالاترین وزن خشک برای نمونه ۱۱ و سپس ۸ و ۲



شکل ۸: تغییرات میزان کلروفیل کل در سلول *Dunaliella* در شرایط تیمار بر اساس تغییرات تیمار نسبت به شرایط شاهد یا کنترل (میکروگرم کلروفیل کل در یک میلیون سلول) از روز هفتم تا بیست و هشتم، در نمونه‌های ۱ تا ۱۰ جداسازی شده از مناطق مختلف ایران و نمونه‌های غیر ایرانی: ۱۱، *D. bardawil* UTEX 2538 (نمونه ۱۲) و *D. salina* UTEX 200 (نمونه ۱۳). I- کمبود نیترات اعمال شده در روز هفتم رشد. II- افزایش میزان نور، اعمال شده در روز سیزدهم رشد. III- زیادبود آهن اعمال شده در روز بیست و یکم رشد. مقادیر میانگین دو تکرار  $\pm SD$  بوده و حروف غیرهمسان بر اساس آزمون *Tukey*، نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار میان ۱۳ نمونه، در  $P < 0.05$  می‌باشند.



شکل ۹: (الف و ب) میزان فتوسنتز خالص و تنفس در *Dunaliella* بر حسب نانو گرم اکسیژن بر میکروگرم کلروفیل کل در دقیقه، قبل از تنش در شوری ۱/۷ مولار نمک NaCl و پس از تنش ۳/۵ مولار نمک، برای نمونه‌های ۱ تا ۱۰ جداسازی شده از مناطق مختلف ایران و نمونه‌های غیر ایرانی: ۱۱) *D. bardawil* UTEX 2538 (نمونه ۱۲) و *D. salina* UTEX 200 (نمونه ۱۳). الف- فتوسنتز خالص ب- تنفس. مقادیر میانگین دو تکرار  $\pm SD$  بوده و حروف غیرهمسان بر اساس آزمون Tukey، نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار میان ۱۳ نمونه در شرایط کنترل و یا تیمار، در  $P < 0.05$  می‌باشند. بر اساس آزمون *T-test* میان کنترل و تیمار در همگی نمونه‌ها اختلاف معنی‌دار وجود دارد.



شکل ۱۰: میزان فتوسنتز کل در *Dunaliella* بر حسب نانو گرم اکسیژن بر میکروگرم کلروفیل کل در دقیقه، قبل از تنش در شوری ۱/۷ مولار نمک NaCl و پس از تنش ۳/۵ مولار نمک، برای نمونه‌های ۱ تا ۱۰ جداسازی شده از مناطق مختلف ایران و نمونه‌های غیر ایرانی: ۱۱) *D. bardawil* UTEX 2538 (نمونه ۱۲) و *D. salina* UTEX 200 (نمونه ۱۳). مقادیر میانگین دو تکرار  $\pm SD$  بوده و حروف غیرهمسان بر اساس آزمون Tukey نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار میان ۱۳ نمونه در شرایط کنترل و یا تیمار، در  $P < 0.05$  می‌باشند. بر اساس آزمون *T-test* میان کنترل و تیمار در همگی نمونه‌ها اختلاف معنی‌دار وجود دارد.

شده، ضروری باشد که در اندازه‌گیری بیوماس از روی میزان کلروفیل بایستی به آن‌ها توجه داشت.

بررسی نتایج حاصل از این تحقیق در رابطه با نرخ رشد سویه‌ها نشان داد که سرعت تقسیمات سلولی در میان سویه‌ها متفاوت بوده و نیز بسته به زمان و شرایط محیط تغییر می‌کند، به‌صورتی که بیشترین سرعت تقسیمات سلولی برای اغلب سویه‌ها تا روز ۲۱ منحنی رشد بوده و پس از آن کاهش می‌یابد. با این حال سویه ۱ تا روز ۲۸ منحنی رشد، افزایش تعداد خود را ادامه می‌دهد و در این مرحله دارای بیشترین تعداد سلول نسبت به بقیه سویه‌ها می‌باشد. بنابراین نوع سویه و زمان برداشت سلول‌ها، هر دو در انتخاب سویه حائز اهمیت‌اند. بر اساس نتایج حاصل از بررسی آماری، تاثیر نوع سویه و نیز زمان بر روی شاخص‌های فیزیولوژیک نمونه‌های جلبکی در سطح معنی‌داری ۰/۰۱، معنی‌دار بوده است.

شرایط محیطی نیز همان‌گونه که آزمون نشان می‌دهد بر سرعت تقسیم و تعداد سلول‌ها اثر گذارند، به‌طوری‌که تنش کمبود نیترات در اغلب سویه‌ها سبب کاهش تعداد سلول گردید که با تاثیر نیترات بر روی رشد و تقسیم سلولی همخوانی دارد (۲۱ و ۲۲)، در حالی‌که نمونه ۴، ۶ و ۱۰ بالعکس افزایش تعداد سلول‌ها تحت تاثیر این تنش را نشان می‌دهند. این ویژگی در شرایط کمبود نیترات محیط ممکن است یک مزیت به حساب آید. همین‌طور افزایش نور محیط سبب تحریک تقسیمات سلولی تنها در نمونه‌های ۲، ۵، ۷ و ۱۱ شده ولی افزایش آهن محیط قادر به تحریک اغلب سویه‌ها به‌ویژه نمونه‌های ۱۰، ۱۱ و ۱۲ می‌باشد. نتایج بررسی آماری، معنی‌دار بودن تاثیر تیمارهای اعمال شده بر روی شاخص‌های فیزیولوژیک نمونه‌های جلبکی را در سطح معنی‌داری ۰/۰۱، نشان می‌دهد.

از آنجا که تعداد سلول در میلی‌لیتر نمونه‌های شاهد با نمونه‌های تیمار متفاوت بوده و در نمونه‌های تیمار شده به‌دلیل کاهش رشد و تقسیمات سلولی در اثر تنش، تعداد سلول‌ها مشخصاً کمتر است، لذا میزان کلروفیل بر میلی‌لیتر سوسپانسیون نمونه که به تعداد سلول‌ها وابسته است، نمی‌تواند مقایسه درستی میان شرایط شاهد و تیمار را به‌دست دهد. لذا در گام اول مقدار کلروفیل بر سلول نمونه‌ها، مورد مقایسه و بررسی قرار می‌گیرد.

به‌دلیل آنکه قسمت اعظم کلروفیل کل از کلروفیل *a* تشکیل شده، تغییرات کلروفیل *a* و نیز کلروفیل کل، تقریباً یک‌گوارا در ارتباط با رفتار سویه‌ها به نمایش می‌گذارند، به‌طوری‌که در

جدول ۱: وزن خشک جلبک *Dunaliella* در شرایط شاهد و تیمار در سویه‌های مختلف تحت آزمون در روز ۲۸م.

وزن خشک جلبک (میلی گرم بر ۱۰ <sup>۶</sup> سلول)		
سویه	شرایط شاهد	شرایط تیمار
۱	۶/۸۰±۰/۱۸ <sup>a</sup>	۳۱/۴±۰/۹۷ <sup>cd</sup>
۲	۳۷/۲±۱/۰۳ <sup>ef</sup>	۶۹/۳±۱/۷۲ <sup>g</sup>
۳	۳۳/۹±۰/۸۶ <sup>de</sup>	۳۶/۶±۱/۰۱ <sup>de</sup>
۴	۵۵/۵±۱/۵۲ <sup>g</sup>	۳۷/۸±۰/۰۵ <sup>e</sup>
۵	۲۹/۳±۰/۸۱ <sup>cd</sup>	۱۹/۹±۰/۷۵ <sup>a</sup>
۶	۳۸/۳±۱/۰۰ <sup>ef</sup>	۵۷/۲±۱/۵۲ <sup>f</sup>
۷	۲۵/۹±۰/۷۲ <sup>c</sup>	۲۴/۶±۰/۳۸ <sup>ab</sup>
۸	۲۸/۸±۰/۸۰ <sup>c</sup>	۷۰/۵±۱/۹۵ <sup>g</sup>
۹	۱۹/۶±۰/۷۴ <sup>b</sup>	۵۵/۲±۱/۵۰ <sup>f</sup>
۱۰	۸۱/۶±۱/۹۶ <sup>i</sup>	۴۱/۲±۱/۰۴ <sup>e</sup>
۱۱	۶۱/۲±۱/۷۰ <sup>h</sup>	۸۶/۲±۲/۲۹ <sup>h</sup>
۱۲	۳۹/۲±۱/۰۴ <sup>f</sup>	۲۷/۱±۰/۷۱ <sup>bc</sup>
۱۳	۵۷/۱±۱/۵۳ <sup>gh</sup>	۲۰/۱±۱/۰۶ <sup>a</sup>

مقادیر میانگین دو تکرار  $\pm SD$  بوده و حروف غیرهمسان بر اساس آزمون *Tukey*، نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار میان ۱۳ نمونه در هر یک از شرایط، در  $P < ۰/۰۵$  می‌باشند.

## بحث

از آنجا که در یک اکوسیستم آبی، تقریباً تمام انرژی استفاده شده توسط مجموعه، بوسیله فیتوپلانکتون‌های آن به دام می‌افتد، بنابراین تخمین بیوماس فیتوپلانکتونی از اهمیت خاصی در مطالعات اکولوژی آبی برخوردار است (۱۵). ارزیابی مستقیم محتوای کربن جلبکی ساده نیست، از این‌رو روش‌های دیگری نظیر شمارش سلولی و ارزیابی حجم سلول‌ها و اندازه‌گیری غلظت رنگدانه‌ها، در سطح گسترده‌ای برای تخمین بیوماس جلبکی استفاده می‌شوند (۱۶ و ۱۷). گزارش‌هایی از برآورد بیوماس *Dunaliella* در دریاچه ارومیه و دریاچه مهارلو بر اساس شمارش تعداد سلول‌ها در واحد حجم وجود دارد (۱۸). با این حال در اغلب مطالعات ارزیابی بیوماس فیتوپلانکتونی، از کلروفیل که فراوانترین رنگدانه فتوسنتزی و مشترک میان تمامی موجودات فتوسنتز کننده بوده و روش ارزیابی آن نیز ساده و سریع است، استفاده می‌شود (۱۹ و ۲۰). اما به نظر می‌رسد، در گزینش سویه‌های جلبک به منظور تغذیه در پرورش آبزیان، برخی اطلاعات نظیر نرخ رشد جلبک، وزن خشک تولید شده توسط جلبک، محتوای کلروفیلی جلبک و نوسانات آن در رویارویی با تنش‌های محیطی و نیز رابطه آن با وزن خشک تولید

قرار گرفته است و الزاماً نمی‌توان در هر شرایط، با انتخاب سویه‌ای که محتوای کلروفیل آن در واحد حجم بالاست، نمونه‌ای داشت که دارای وزن خشک زیاد است.

بررسی وزن خشک در ارتباط با میزان کلروفیل  $a$  و کلروفیل کل در سلول ( $10^{-6}$  cells) همبستگی‌های معنی‌دار و بالاتری را نشان داد. (با ضریب  $0/86$  ( $p < 0/01$ ) برای هر دو در شرایط شاهد و ضرایب  $0/85$  ( $p < 0/01$ ) و  $0/61$  ( $p < 0/05$ ) به ترتیب در شرایط تیمار). بنابراین مقدار کلروفیل  $a$  در سلول می‌تواند تخمین بهتری در ارتباط با وضعیت وزن خشک سلول نسبت به کلروفیل  $a$  در هر میلی‌لیتر سوسپانسیون جلبکی بدست دهد.

همبستگی میان کلروفیل  $a$  یا کلروفیل کل در سلول ( $10^{-6}$  cells) با تعداد سلول‌ها در میلی‌لیتر در شرایط شاهد معنی‌دار، منفی و معادل  $-0/74$  و در شرایط تیمار بترتیب معادل  $-0/88$  و  $-0/63$  ( $p < 0/05$ ) بود، که در ارتباط با کلروفیل  $a$  یک همبستگی معنی‌دار بالاتر را نشان می‌دهد. بدین معنی که با تقسیم و افزایش تعداد سلول‌ها در میلی‌لیتر، مقدار کلروفیل  $a$  در هر سلول کاهش یافته است. در ارتباط با مقادیر کلروفیل بر میلی‌لیتر ( $ml^{-1}$ ) و همبستگی آن با تعداد سلول‌ها، در هیچ‌یک از حالات، همبستگی معنی‌داری مشاهده نشد. زیرا میزان کلروفیل در میلی‌لیتر هر سویه می‌تواند تاثیر پذیر از دو عامل مقدار رنگدانه در هر سلول و نیز تعداد سلول‌ها باشد. با این همه بایستی در نظر داشت که این اطلاعات مربوط به اوزان خشک و نیز سایر داده‌ها در پایان یک دوره رشدی ۲۸ روزه بوده و در سایر زمان‌ها این ارتباطات احتمالاً می‌توانند به شکل‌های دیگری قابل بحث باشند.

به نظر می‌رسد سرعت فتوسنتز نیز بتواند در رابطه با میزان کلروفیل موجود مورد بررسی قرار گیرد. در این مورد نظرات مختلفی ارائه شده است. بر اساس نظر *Guendouz* و همکاران (۲۴)، تغییرات در فتوسنتز اغلب تا حد زیادی به صورت همگام و موازی با محتوای کلروفیلی صورت می‌گیرند. در حالی که *Murthy* و همکاران (۲۵)، وجود روابط معکوس را در طی افزایش سن گیاه خاطر نشان شده‌اند. *Huot* و همکاران (۲۰)، مقدار کلروفیل  $a$  را بهترین معیار سرعت فتوسنتزی بیشینه معرفی کرده‌اند ولی *Marini* خاطر نشان می‌شود که همبستگی بالائی میان محتوای کلروفیلی و سرعت فتوسنتزی یافت نشده (۲۶). نهایتاً *Ghobadi* و همکاران (۲۷)، عدم وجود یک همبستگی معنی‌دار میان محتوای کلروفیلی برگ‌ها و محصول

شرایط شاهد و طی روزهای ابتدایی (دو هفته اول منحنی رشد)، نمونه‌های ۴، ۶، ۱۰ و ۱۲ و در روزهای بعدی تا روز ۱۷۷م رشد، نمونه‌های ۱۰، ۱۱ و سپس ۱۳، به ترتیب دارای بیشترین مقدار کلروفیل  $a$  بر سلول ( $10^6$  سلول) بود. بنابراین محتوای کلروفیل  $a$  سلول‌ها در شرایط شاهد در طول دوره رشد نیز متفاوت بوده و بسته به زمان برداشت سلول‌ها، در سویه‌های مختلف می‌تواند مقادیر مختلفی را به خود اختصاص دهد. اما بررسی وضعیت کلروفیل بر میلی‌لیتر سویه‌ها در این شرایط، به طرز جالبی نشان داد که سویه ۱، ۲ و سپس ۱۰، و در شرایط تیمار سویه‌های ۳، ۵ و ۶ دارای بیشترین مقدار رنگدانه بر میلی‌لیتر می‌باشند. با توجه به منحنی رشد، درمی‌یابیم آنچه که به‌طور مثال در باره نمونه شماره ۱ سبب بالا بودن مقدار کلروفیل بر میلی‌لیتر شده، در واقع تعداد زیاد سلول‌ها در این نمونه بوده، در حالی که در مورد نمونه ۱۰، مقدار زیاد رنگدانه در سلول با وجود پایین بودن تعداد سلول‌ها در میلی‌لیتر، باعث افزایش میزان رنگدانه در میلی‌لیتر شده است (تغییرات کلروفیل  $b$  بر میلی‌لیتر نیز روند تقریباً مشابهی را با برتری سویه‌های نامبرده داراست).

به‌طور کلی، تقسیم سلولی سریع با این که بر تعداد سلول‌ها در واحد حجم می‌افزاید، ولی به خاطر کاهش زمان میان تقسیمات و در نتیجه کاهش فرصت تولید و تجمع رنگدانه‌ها، میزان آن‌ها را در سلول‌ها کاهش می‌دهد (۲). بنابراین نمونه‌ایکه در عین دارا بودن سرعت تقسیم سلولی بالا، محتوای سلولی کلروفیلی نسبی بالائی نیز داشته باشد، بیشتر حائز اهمیت است. با این حال آنچه که غالباً در ارزیابی بیوماس جلبکی، اندازه‌گیری شده و مورد توجه قرار می‌گیرد، مقدار کلروفیل  $a$  بر میلی‌لیتر است که بنابراین می‌تواند همیشه و در مورد هر سویه الزاماً تخمین درستی از تعداد سلول‌های موجود نباشد، در حالی که سرعت تکثیر سلولی بالا برای تداوم نسل فیتوپلانکتون‌ها در حضور تغذیه کنندگان آبی، ضرورت دارد (۲۳).

از سویی دیگر بررسی همبستگی میان مقدار کلروفیل  $a$  در میلی‌لیتر ( $ml^{-1}$ ) و وزن خشک سویه‌ها در شرایط شاهد، یک رابطه مستقیم و معنی‌دار ( $r=0/7$ ،  $p < 0/01$ ) را نشان داده، ولی برای کلروفیل کل در شرایط شاهد معنی‌دار نبود. در شرایط تیمار یا تنش، برای هر دو مورد، یعنی کلروفیل  $a$  و کلروفیل کل بر میلی‌لیتر، همبستگی معنی‌داری مشاهده نشد. بنابراین رابطه میان محتوای کلروفیلی و وزن خشک در میلی‌لیتر سوسپانسیون جلبکی به شدت بستگی به شرایط محیطی دارد که جلبک در آن

روابط همبستگی که با شدت‌های متفاوتی میان شاخص‌های فیزیولوژیک سویه‌ها برقرار است، مجموعه‌ای از صفات و شاخص‌ها را در پیش روی می‌گذارد که در انتخاب سویه بهتر برای مقاصد تغذیه آبیان می‌توانند مورد توجه قرار گرفته و نقاط قوت و ضعف سنجش بیوماس جلبکی می‌تواند با توجه به آن‌ها ارزیابی گردد.

در یک جمع‌بندی، محتوای کلروفیل  $a$  بر سلول، تخمین بهتری از میزان وزن خشک جلبک در مقایسه با محتوای کلروفیل  $a$  بر میلی‌لیتر را در همه حالات به دست داده و نیز نمونه‌ایکه در عین دارا بودن سرعت تقسیم بالا، محتوای کلروفیلی بالایی را نیز دارا باشد، نمونه مناسب‌تری جهت کشت به نظر می‌رسد. بطور کلی، نمونه‌های شماره ۱۰ و ۱۱ (مربوط به خلیج فارس و نمونه استرالیایی) که دارای وزن خشک بیشتر در شرایط شاهد و تیمار و محتوای کلروفیلی نسبتاً بالایی بوده و سپس نمونه‌های ۴ و ۶ (استخراج شده از مرداب گاو خونی) و نمونه ۱۳ (UTEX 2538, *D. bardawil*)، در این رابطه قابل معرفی‌اند. بایستی متذکر شد که در شرایطی که غنی بودن از نظر برخی ترکیبات ویژه نظیر برخی اسیدهای چرب خاص و یا مقادیر پروتئین، مثلاً به‌عنوان افزودنی‌های علوفه دامی، مد نظر است، بررسی‌ها و اندازه‌گیری‌های مربوطه در این ارتباط نیز می‌بایست لحاظ گردد.

### تشکر و قدردانی

بدین وسیله از دکتر منصور شریعتی به خاطر نظرات و پیشنهادات ارزنده و سودمندشان قدردانی می‌شود. همچنین از معاونت پژوهشی دانشگاه لرستان، به جهت تامین هزینه و امکانات لازم برای انجام این پژوهش سپاسگزاری می‌گردد.

### منابع

1. Chesapeake Bay Program. Science restoration partnership. Why are plankton important? 2012. Available from: <http://www.chesapeakebay.net/discover/bayecosystem/plankton>
2. Alvarado C, Alvarez P, Puerto M, Gausserès N, et al. Dietary supplementation with antioxidants improves functions and decreases oxidative stress of leukocytes from prematurely ageing mice. *Nutr.* 2006; 27(7-8): 767-777.
3. Nutra-Kol, Nutrition solutions. Western Australia. *Dunaliella* the red evolution. Available From: <http://nutrakolusa.com/media/Dunaliella%20A4.pdf>

دانه در گندم را که حاصل فعالیت فتوسنتزی است، گزارش نمودند. نتایج حاصل از این تحقیق وجود یک همبستگی معنی‌دار و نسبتاً بالا ( $r = 0.81$ ,  $p < 0.01$ ) میان محتوای کلروفیلی بر میلی‌لیتر و سرعت فتوسنتزی را تنها در شرایط شاهد نشان داد.

در رابطه با نسبت کلروفیل‌ها، نتایج همچنین نشان داد که نسبت کلروفیل  $a$  به  $b$  در شرایط شاهد دارای ثبات نسبی و تغییرات در محدوده کمتر از ۵ بوده، در حالی که با اعمال تنش‌ها این نسبت به عدد ۱۵ یا بیشتر افزایش یافته است. این نسبت در گیاهان در معرض تابش شدید خورشید در حدود ۴ تا ۵ و در گیاهان در سایه کامل در حدود ۲/۶ تا ۲/۸ گزارش شده است (۲۸).

بطور کلی، 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 واکنش بوده اما کلروفیل  $b$  نه تنها یک رنگدانه کمکی است بلکه در واقع به‌عنوان یک تنظیم‌کننده سایر گیرنده‌های نوری عمل می‌کند (۲۹) که با تعدیل جذب نور در شرایط تنش، سلول را از آسیب محافظت می‌نماید. بطور کلی تنش‌های اعمال شده در اغلب حالات سبب کاهش مقدار هر دو کلروفیل شده‌اند، تنها در کمبود نیتروژن، سویه ۵ از نظر کلروفیل  $b$  افزایش نشان داده است. از آنجا که نیتروژن یک فاکتور ساختمانی در ساختمان کلروفیل و پروتئین‌ها محسوب می‌شود، در صورت کمبود، ساختمان کلروپلاست‌ها و نیز محتوای کلروفیلی آن‌ها را تحت تاثیر قرار می‌دهد (۳۰ و ۳۱). افزایش نور سبب تحریک افزایش کلروفیل‌ها در نمونه‌های ۴، ۶ و ۱۰ می‌شود و بنابراین به نظر می‌رسد این شدت نوری برای این سویه‌ها، آسیب اکسیداتیو رنگدانه‌ها را به همراه ندارد و نهایتاً زیاده‌بود آهن تنها سبب افزایش کلروفیل  $b$  در نمونه ۱ شده است. گرچه آهن یک عنصر ضروری در فعالیت‌های سلول به حساب می‌آید، اما زیاده‌بود آهن می‌تواند سبب بروز آسیب اکسیداتیو در سلول گردد (۳۲).

### نتیجه‌گیری

در این تحقیق، اعمال شرایط متفاوت محیطی از جمله برخی تنش‌ها و نیز یک دوره کشت که فاکتور زمان را نیز دخیل می‌نماید، تفاوت میان رفتارها و ویژگی‌های سویه‌ها و همچنین

4. Brown MR, Jeffrey SW, Garland CD. Nutritional aspects of microalgae used in mariculture; a literature review, CSIRO Marine Laboratories Report. 1989; 205: 29-44.
5. Abdul-Rahman A, Jeyalakshmi R. Integration of *artemia* in Indian salt works-economic opportunities. Proceedings of the 2<sup>nd</sup> International Conference on the Ecological Importance of Solar Saltworks (CEISSA2009) Merida, Yucatan, Mexico: 2009; 51-56.
6. Higdon JD. Chlorophyll, its many wonders and benefits, 2008-2009, Available from: <http://www.lowchensaustralia.com/health/chlorophyll.htm>
7. Albuquerque RA, Costa MD, Koenig ML, Macedo SGD. Urban secondary sewage: an alternative medium for the culture of *Tetraselmis chuii* (Prasinophyceae) and *Dunaliella viridis* (Chlorophyceae). Braz Arch Biol Technol. 2004; 47(3): 451-459.
8. Johnson MK, Johnson EJ, McElroy RD, Speer HL, et al. Effect of salt on the Halophilic alga *Dunaliella viridis*. J Bacteriol. 1968; 95(4): 1461-1468.
9. Shariati M, Lilley RMCC. Loss of intracellular glycerol from *Dunaliella* by electroporation at constant osmotic pressure: subsequent restoration of glycerol content and associated volume changes. Plant Cell Environ. 1994; 17(12): 1295-1304.
10. Shaish A, Ben-Amotz A, Avron M. Biosynthesis of beta carotene in *Dunaliella*. Method of Enzymol. 1992; 213: 439-444.
11. Eijkelhoff C, Dekker JP. A routine method to determine the chlorophyll a, pheophytin a and b-carotene contents of isolated photosystem II reaction center complexes. Photosynth Res. 1997; 52(1): 69-73.
12. Avron M, Ben-Amotz A. *Dunaliella*: Physiology, Biochemistry, and Biotechnology. CRC Press, Boca Raton, FL, USA; 1992.
13. Martines MP, Chakroff JBP. Direct phytoplankton counting technique using the hemocytometer. Philipp Agric Sci. 1975; 59(1/2):43-50.
14. Walker DA. The use of oxygen electrode and fluorescence probes in simple measurements of photo synthesis. Robert Hill Institute, Uni, Sheffield. 1990.
15. Harris, G.P. Phytoplankton Ecology: Structure, Function and Fluctuation, 1<sup>th</sup>Ed. Chapman & Hall, London; 1986.
16. Smayda TJ. From phytoplankters to biomass. In Sour-nia A. Phytoplankton Manual. UNESCO, Paris. 1978; 273-279.
17. Jeffrey SW, Mantoura RFC. Wright SW. Phytoplankton pigments in oceanography : guidelines to modern methods. UNESCO, Paris; 1997.
18. Soltani N, Shokravi S, Fotovat A. [ Isolation, identification and ecological studies of green alga *Dunaliella*]. ACECR's Research Project Data base. 2005. Persian
19. Mariso F, Jordi C. The relationship between phytoplankton biovolume and chlorophyll in a deep oligotrophic lake: decoupling in their spatial and temporal maxima. J Plankton Res. 2000; 22(1): 91-105.
20. Huot Y, Babin M, Bruyant F, Grob C, et al. Does chlorophyll a provide the best index of phytoplankton biomass for primary productivity studies? Biogeosciences Discuss. 2007; 4: 707-745.
21. Duli Zhao A, Reddy KR, Kakani VG, Reddy VR. Nitrogen deficiency effects on plant growth, leaf photosynthesis, and hyper spectral reflectance properties of sorghum. Europe. J. Agronomy. 2005; 22(4): 391-403.
22. Kavanová M, Lattanzi FA, Schnyder H. Nitrogen deficiency inhibits leaf blade growth in *Lolium perenne* by increasing cell cycle duration and decreasing mitotic and post-mitotic growth rates. Plant Cell Environ. 2008; 31(6): 727-737.
23. Litaker CS, Duke BE, Kenney J. Ramus. Short-term environmental variability and phytoplankton abundance in a shallow tidal estuary. Marine Biol. 1987; 96(1): 115-121.
24. Guendouz A, Mamari K. Grain-filling, chlorophyll content in relation with grain yield component of durum wheat in a Mediterranean environment. Afri Crop Sci J. 2012; 20(1): 31-37.
25. Murthy KK, Singh M. Chlorophyll content and enzymatic activity increased in plant leaves with advancing age while apparent rates of photosynthesis decreased. Photosynthesis, chlorophyll content and ribulose diphosphate carboxylase activity in relation to yield in wheat genotypes. J Agric Sci. 1979; 93(1): 7-11.
26. Marini RP. "Do net gas exchange rates of green and red peach leaves differ?" Horticulture, 1987; 21(2): 118-120.
27. Ghobadi M, Khosravi S, Kahrizi D, Shirvani F. Study of water relations, chlorophyll and their correlations with grain yield in wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes. World Acad Sci Eng Technol. 2011; 78: 582-585.
28. Baker NR, Davies WJ, Ong CK. Control of leaf growth. Cambridge shire; New York: Cambridge University Press; 1985.

29. Tanaka R, Tanaka A. Chlorophyll *b* is not just an accessory pigment but a regulator of the photosynthetic antenna. *Porphyryns*; 2000; 9(3/4): 240-245.
30. Tucker M. Primary nutrients and plant growth. In essential plant nutrients (SCRIBD, Ed.). North Carolina Department of Agriculture. 2004.
31. Daughtry CST, Walthall CI, Kim MS, Brown de, et al. Estimating corn leaf chlorophyll concentration from leaf and canopy reflectance. *Rem. Sens. Environ.* 2000; 74(3): 229-239.
32. Shcolnick S, Summerfield TC, Reytman L, Sherman LA, et al. The mechanism of iron homeostasis in the unicellular *Cyanobacterium* *Synechocystis* sp. PCC 6803 and its relationship to oxidative stress. *Plant Physiol.* 2009; 150(4): 2045-2056.

## Comparative Study of Some Physiological Characteristics (Chlorophyll Content, Photosynthetic Activity...) in Selection of *Dunaliella* sp. Strains (Isolated from Iranian Waters)

Madadkar Haghjou M. Ph.D.

- Department of Biology, Faculty of Sciences, Lorestan University, Khorramabad, Iran

\* Email corresponding author: madadkar.m@lu.ac.ir, m\_madadkar@yahoo.com

Received: 15 Sep. 2012

Accepted: 5 Feb. 2013

---

### Abstract

**Aim:** *Dunaliella* as a phytoplanktonic unicellular alga is important in aquatic organism nutrition (special in salinity waters). Chlorophyll (chl) content in relation to other algal biomass characteristics was studied under different culture media conditions for better strain selection.

**Material and methods:** Different Iranian and foreign strains alga were exposed to nitrate deficiency, light, iron and salt increasing treatments. Then some physiological characters such as *chls* contents, cell number, dry weight, photosynthesis and respiration were measured in control and treated samples.

**Results:** Different stresses caused decreasing cell number, *chls* contents and also changing in *chl a/chl b* ratio from 5 to 15. The amount of *chl a* and total chl on a per cell basis ( $10^6$  cells), at all conditions and the *chl a* amount per ml, only at control showed positive or positive is correct significant correlation with strains dry weight. *Chl a* or total chl per  $10^6$  cells had negative significant correlation with cell numbers per ml in all of conditions.

**Conclusion:** Algal biomass evaluation that almost is assessed by *chl a* content, do not have a direct relationship with the cell number or dry weight at all cases. Therefore, the higher dry weight, chl content and also cell divisions introduced as better and more suitable indicators for strain selection than others. Strains 10 and 11, having more dry weight at both conditions (control and treatments) nearly with the higher chl content, then 4, 6 and 13 could be introduced.

**Key words:** Chlorophyll, *Dunaliella*, Iron increscent, Nitrate, Photosynthesis