بررسی اثر کمبود نیترات بر تقسیم سلولی و سنتز رنگیزهای بتا کاروتن و کلروفیل در جلبک سبز تک سلولی *Dunaliella salina* جدا سازی شده از مرداب شور گاو خونی اصفهان

• **منصور شریعتی**، عضو هیات علمی گروه زیست‌شناسی دانشگاه اصفهان **و** • **پرژک ذوفن**،
عضو هیات علمی گروه زیست شناسی دانشگاه شهید چمران اهواز

تاریخ دریافت: دی ماه ۱۳۸۱ تاریخ پذیرش: مرداد ماه ۱۳۸۲

چکیده

تاثیر پنج غلظت پتاسیم نیترات (۰، ۰/۵، ۱/۵، ۵ (شاهد) و ۱۰ میلی مولار) در شوری ۱ مولار NaCl، روی میزان تراکم سلولی و تجمع رنگدانه های بتاکاروتن و کلروفیل در سویه ایرانی *Dunaliella salina* مورد بررسی قرار گرفت. محیط کشت های جلبکی جهت رشد به اتاقک رشد با دمای شبانه روزی ۲± ۲۶ درجه سانتیگراد و متوسط شدت نور ۱۰۰ میکرومول فوتون بر متر مربع بر ثانیه با ۱۶ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی انتقال داده شدند. نتایج بیانگر آن بود که غلظت ۰/۵ میلی مولار نیترات با کاهش محتوای کلروفیلی و تراکم سلولی، موجبات افزایش بتاکاروتن درون سلولی را در این سویه فراهم می نماید. در حالی که در غلظتهای بالاتر از لحاظ تاثیر بر این شاخص ها، تفاوت معنی داری مشاهده نگردید. همچنین، نتایج حاکی از آن بود که به استثنای محیط کشتهای فاقد نیترات، میان سایر غلظتها به لحاظ تاثیر بر شاخص نرخ رشد ویژه (μ) در مرحله نمایی رشد اختلاف معنی داری وجود ندارد. غلظت ۱۰ میلی مولار نیترات، هیچگونه اثرات منفی و زیانباری بر روی رشد این سویه نداشت. با توجه به نتایج حاصل، به نظر می رسد که این سویه در شرایط محدودیت نیترات (۰/۵ میلی مولار) در قیاس با گونه های مستعد تولید بتا کاروتن، توانایی بسیار بالایی جهت تجمع بتاکاروتن فراوان نداشته باشد و از راهکارهای دیگری برای حذف رادیکال های آزاد درون سلولی استفاده نماید.

کلمات کلیدی: نیترات پتاسیم بتاکاروتن- کلروفیل *Dunaliella saling*، تراکم سلولی، نرخ رشد ویژه

Pajouhesh & Sazandegi, No: 59 pp: 7-13.

The effect of nitrate deficiency on cell division and beta-carotene and chlorophyll synthesis in unicellular green alga *Dunaliella salina* isolated from salt marsh of Gavkhoni, Isfahan

By: Shariati , M. Isphahan University , Dept. of Biology Iran. , Zoufan , P. Shahid Chamran University , Dept. of Biology. Iran.

Effect of five concentrations of KNO3 (zero, 0.5, 1.5, 5 as a control, 10 mM) in 1 M NaCl on the cell density and content of pigments (betacarotene and chlorophyll) was investigated in Iranian strain of *D. salina.* The cultures were kept at light intensity of 100 μ mol photon. m^{-2} . s^{-1} , light / dark regime of 16/8 hours at 26± 2°. The result illustrated, 0.5 mM nitrate in the medium is caused to decreasing of growth, increasing of intracellular beta-carotene. However, at higher concentration of nitrate in the medium no significant changes were observed. In addition, it was revealed that except the medium with no nitrate, at all concentration there is no significant difference in specific growth rate (μ) of cultures and 10 mm nitrate in the medium had no any negative effect on growth of this strain. As a result, it appeared that nitrate limitation (0.5 mM) arises content of beta-caroten in Iranian strain of *D. salina*, but this accumulation is lesser than other strains were reported in the literatures. Therefore, it seems, this strain uses replacement pathways for scavenging of free radicals, which probably is produced by nitrate deficiency.

Keywords: Kno3 , Beta - carotene , Chlorophyll , Dunaliella salina , Cell density , Specific growth.

مقدمه

سرده Dunaliella ، شامل گونه هایی از جلبک های سبز تک سلولی و تاژکدار متعلق به رده Chlorophyceae بوده که در گذشته در تیره Polyblepharidacea و در حال حاضر در تیره Chlamydomonaceae طبقه‌بندی شده‌اند(۱۸). جلبک Dunaliella ، یک میکروارگانیسم یوکاریوت و یک فتواتوتروف اجباری و هوازی است که اکثر گونه های متعلق به آن قادر هستند در محدوده وسیعی از شوری ، از غلظت پایین نمک (کمتر از ۰/۱ مولار NaCl) ، تا حد اشباع (بیشتر از ۵ مولار NaCl) زنده باقی بمانند . گونه‌هایی از این جلبک نظیر *D . salina* به‌عنوان نخستین و تنها مولد در زیستگاه‌های شور اکثر نقاط جهان شناخته می شوند(۷). قابلیت و توانایی منحصر به فرد این جلبک در ارائه پاسخهای بیوشیمیایی مناسب به انواع تنش های فیزیولوژیکی ،فقدان دیواره ساده بودن ساختار سلولی ،از آن یک مدل بسیار ارزشمند و مفید جهت مطالعات جذب و انتقال و فرایند های متابولیسمی ایجاد نموده است (۳). جلبک Dunaliella فاقد یک دیواره پلی ساکاریدی است و این موضوع به یاخته های جلبکی اجازه می دهد تا در برابر فشارهای اسمزی محیط خارج، به‌سهولت شکل و حجم خود را تغییر دهند. پاسخ ویژه این جلبک به تنش های اسمزی پس از تغییرات حجمی و شکلی ، تنظیم غلظت گلیسرول داخلی از طریق کنترل جریان کربن بین متابولیسم نشاسته در کلروپلاست و متابولیسم گلیسرول در سیتوپلاسم می باشد(۵). علاوه بر این ،برخی از گونه های آن نظیر *D . salina* و *D . bardowil* قادر هستند که در شرایط نامناسب محیطی نظیر شوری بالا ،نور شدید و یا محدودیت های غذایی مقادیر فراوانی بتاکاروتن تولید نمایند(۶، ۷، ۹). سویه‌های غنی از بتا کاروتن Dunaliella پراکندگی بسیار وسیع و گسترده‌ای از خود در اکثر آب های شور جهان نشان می دهند و رنگ قرمز، نارنجی بسیاری از این زیستگاه ها که از تابش نور شدید خورشید برخوردار هستند، معمولا ناشی از بتا کاروتن تولیدی توسط این جلبک می باشد. سنتز گلیسرول و بتا کاروتن توسط این جلبک ، توجه زیادی را به سمت کشت آن در ابعاد وسیع، به‌عنوان یک بیوتکنولوژی نوین جلب نموده است و با توجه به هزینه‌های سنگین سنتز بتاکاروتن مصنوعی کشت وسیع گونه‌های Dunaliella مستعد تولید بتاکاروتن در برخی از نقاط جهان در دست اجرا است . بتاکاروتن بعنوان یک ترکیب رنگ دهنده به مواد غذایی ،پیش ساز ویتامین A و همچنین کاهش دهنده احتمال ابتلاء به برخی از سرطان ها در صنایع غذایی ،علوم داروسازی وپزشکی از جایگاه ویژه ای برخوردار می باشد . در حال حاضر ، تحقیقات زیادی بر روی عملکرد و زیست شناسی این جلبک در شرایط تنش زا، متمرکز شده است. بنابراین، با توجه به این که گزارشهای متناقض و متفاوتی در ارتباط بامحدودیت نیترات و تاثیر آن بر تجمع بتاکاروتن (۴، ۲۱) گونه های مستعد وجود دارد و نظر به اینکه تاکنون هیچگونه مطالعه‌ای در رابطه با اعمال محدودیت غذایی به‌صورت کمبود نیترات بر روی سویه ایرانی *D . salina* (جدا شده از مرداب شور گاوخونی اصفهان) انجام نشده بود ، به منظور تعیین توانایی این سویه در تولید بتاکاروتن در شرایط کمبود نیترات،این تحقیق انجام شد تا به‌عنوان یک بررسی بنیادی آزمایشگاهی جهت اهداف بعدی قابل توسعه باشد.

مواد و روشها

کشت جلبک

جهت کشت جلبک Dunaliella ، محیط کشتهای غذایی جامد و مایع بر اساس ترکیب شیمیایی اصلاح شده(۲۴) محیط کشت Johnson و همکاران (۱۶) با شوری ۱ مولار NaCl و با حجم کلی ۱ لیتر تهیه (جدول-۱) و pH محیط کشتها در حدود ۷/۵ تنظیم گردید . در یک کشت مقدماتی ، ابتدا میزان معینی از محیط کشتهای جلبکی سویه ایرانی *D . salina* جدا شده از مرداب گاوخونی اصفهان (۲، ۲۵)، برداشت و به منظور دستیابی به پرگنه های تک یاخته ای سویه ، بر روی محیط کشتهای جامد غنی از مواد غذایی و با شوری ۱ مولار (جدول-۱) منتقل شدند. سپس این محیط کشتها به اتاقک رشد (مدل Heraeus-VOTSCH .Germany) با دمای شبانه روزی ۲ ۲۶ درجه سانتیگراد، دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و متوسط شدت نور ۱۰۰ میکرومول فوتون بر متر مربع بر ثانیه انتقال یافتند. پس از ظهور پرگنه‌ها ،در شرایط کاملا سترون ، پرگنه ها به محیط کشت های غذایی مایع مطابق با ترکیب جدول ۱ و با شوری ۱ مولار NaCl تلقیح و جهت رشد به اتاقک رشد با شرایط فوق الذکر منتقل شدند . با شروع مرحله ایستایی رشد[1] در سوسپانسیون‌ها، میزان مشخصی از آنها در شرایط کاملاً سترون، به محیط کشتهای غذایی مایع با شوری ۱ مولار نمک ولی فاقد نیترات تلقیح گردیدند. این مرحله، با هدف افزایش دقت آزمایش و برای آن که میزان نیترات در محیط به حداقل برسد انجام گرفت. به محیط کشتهای جلبکی فاقد نیترات اجازه داده شد تا در شرایط ذکر شده ،مرحله نمایی رشد[2] را طی نمایند و سپس در انتهای این دوره ،حجم معینی از این نمونه ها به محیط کشتهای غذایی با شوری ۱ مولار ولی با پنج غلظت پتاسیم نیترات صفر، ۱/۵، ۱/۵، ۵(شاهد)، و ۱۰ میلی مولار به نحوی تلقیح شدند که در روز اول آزمایش ،تعداد سلولها در همه محیطها تقریباً برابر $25 \pm 1\times10^4$ سلول در هر میلی لیتر باشد . به منظور جبران کمبود پتاسیم در غلظتهای کمتر از شاهد ،KCL[1] مولار متناسب با غلظت پتاسیم نیترات به محلول های غذایی اضافه گردید .

سنجش میزان رنگدانه و تقسیم سلولی

جهت بررسی تاثیر غلظتهای مختلف نیترات ، میزان تولید رنگدانه و روند تقسیمات سلولی در مدت ۳۸ روز متوالی مورد تحقیق واقع شد . تعداد سلولها با استفاده از لام شمارش سلولی Neobar و با بزرگنمایی ۱۰۰X میکروسکوپ نوری (مدل OLYPMPUS, Ch ۳۰) تعیین (۲۲) و همچنین با مشخص شدن مرحله نمایی تقسیمات سلولی، نرخ رشد ویژه[3] به‌صورت (μ) محاسبه گردید. (۱۲). همچنین با استفاده از روش اسپکتروفتومتری (مدل LKB Novaspec II, U . K .Pharmacia) و استون ۸۰٪ جذب نمونه ها در طول موج های ۴۱۲، ۴۳۱، ۴۶۰ و ۴۸۰ نانومتر قرائت و سپس میزان بتاکاروتن و کلروفیل بر حسب پیکوگرم در سلول($pg.cell^{-1}$) با استفاده از روابط مربوطه تعیین شد(۱۱).

تجزیه و تحلیل آماری

جهت بررسی اثر اصلی پنج غلظت نیترات، هرکدام در چهار تکرار و در قالب طرحهای کاملا تصادفی با اندازه های تکراری[4] طراحی شدند. داده های حاصل

جدول ۱- عناصر و مواد غذایی مورد نیاز برای رشد جلبک *D . salina* جهت تهیه ۱ لیتر محلول غذایی (اقتباس از Shariati and Lillely ۱۹۹۴) ۱۹۹۴

غلظت در محیط کشت	عناصر غذایی مورد نیاز
۵ میلی مولار	KNO_3
۵ میلی مولار	$MgSO_4.7H_2O$
۰/۲میلی مولار	$CaCl_2.2H_2O$
۰/۲میلی مولار	KH_2PO_4
۴میکرو مولار + ۱۰میکرو مولار	$FeCl_3+Na_2$-EDTA
۷میکرو مولار	$MnCl_2.2H_2O$
۱میکرو مولار	$CuCl_2.2H_2O$
۱میکرو مولار	$ZnCl_2$
۱میکرو مولار	$CoCl_2.6H_2O$
۱میکرو مولار	$(NH_4)_6MoO_{24}.4H_2O$
۱ مولار	NaCl
۲۰میلی مولار	$NaHCO_3$

از این تحقیق با استفاده از نرم افزار آماری مینی تب (Minitab) ،تحلیل واریانس چند متغیره(MANOVA) شدند و همچنین ،با انجام پس از آزمون های ویژه مقایسه میانگین اثر اصلی نیترات در سطح معنی دار ۱٪ و ۵٪ صورت پذیرفت (۱۷).

نتایج

نمودار -۱، روند تراکم سلولی سویه ایرانی *D . salina* را در غلظتهای مختلف نیترات نشان میدهد. همانطور که در جدول آماری ۲ مشاهده می‌گردد، تفاوت معنی داری میان این غلظتها از لحاظ تاثیر بر روند رشد سلولی و میزان تجمع رنگدانه های بتاکاروتن و کلروفیل وجود دارد. بر اساس نمودار۱، محیط کشتهای جلبکی فاقد نیترات اختلاف قابل توجهی را (در سطح ۰/۰۱ $>$ p)، جدول -۲) با سایر غلظت‌ها از خود نشان می‌دهند،ضمن این که تعداد سلول‌ها در نهایت از یک روند نزولی تبعیت می‌نمایند. در غلظت‌های بالاتر نیترات(۰/۵ ، ۱/۵، ۵ و ۱۰ میلی مولار)، تقریبا از روز ششم به بعد سلولها با طی مرحله تصاعدی رشد وارد مرحله رشد خطی می‌شوند و به‌علت مصرف سریع نیترات در غلظت ۰/۵ میلی مولار و به دلیل کمتر بودن میزان آن در مقایسه با غلظت‌های بالاتر، میزان نیترات محیط سریعا کاهش یافته، بنابراین از روز دوازدهم به بعد مرحله ایستایی رشد در این غلظت حاصل می آید . در حالی که در غلظتهای بالاتر (۱/۵، ۵ و ۱۰ میلی مولار) رسیدن به مرحله ایستایی کندتر بوده و روند رشد تقریبا با یک شیب ملایم و به صورت هم پوشان تا پایان دوره ادامه می یابد و اختلاف معنی داری (جدول آماری ۲) از لحاظ تراکم سلولی میان غلظتهای مذکور تا انتهای دوره آزمایشی ملاحظه نمی‌شود. علیرغم اینکه مدت زمان مرحله نمایی رشد در این سویه، با برخی گزارشهای ارائه شده مطابقت دارد (۱۵، ۲۰) ولی گزارشهایی وجود دارد که حاکی از آنست که در شرایط کمبود نیترات، تعداد سلولهای جلبکی از یک روند نزولی با شیب تند تبعیت می نمایند (۲۰). این در حالیست که در محیط کشتهای جلبکی سویه ایرانی حاوی ۰/۵ میلی مولار نیترات ،این مرحله حداقل تا روزهای پایانی آزمایش مشاهده نشد. نمودار۲، نرخ رشد ویژه (μ) را در طی شش روز اول که منطبق با دوره نمایی رشد می باشد، نشان می دهد. همانطور که ملاحظه می گردد،به استثنای محیط کشتهای فاقد نیترات که در آن تقسیمات سلولی سریعا متوقف می شود ، این شاخص برای سایر محیطها تقریبا یکسان است واختلافی را نشان نمی دهد . این نتیجه بیانگر آن است که در اوایل دوره رشد حتی در غلظت ۱۰ میلی مولار نیترات ،این سویه بصورت تنظیم شده نیترات را جذب می نماید و حضور نیترات بیشتر در محیط باعث جذب بیشتر آن نمی گردد . نمودار ۳ ، تغییرات محتوای کلروفیلی سلولهای جلبکی را در غلظتهای مختلف نیترات نشان می دهد. نتایج آماری (جدول آماری ۲) حاکی از آن است که غلظت نیترات از تاثیر مهم و قویا معنی داری بر این شاخص برخوردار می باشد. همانطور که در

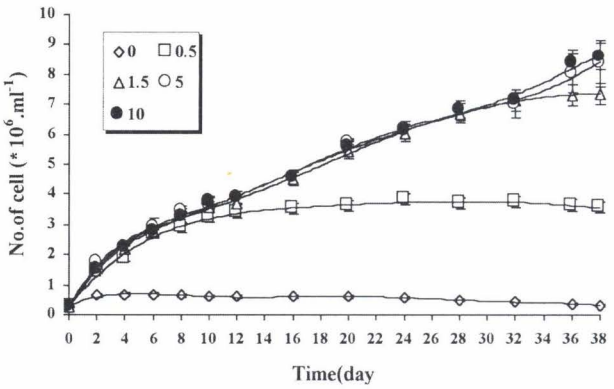
نمودار۳ مشاهده می شود، در محیط کشت های جلبکی فاقد نیترات از روز دوم و در محیط های حاوی ۰/۵ میلی مولار نیترات ، تقریبا از روز ششم به بعد کاهش قابل توجهی در محتوای کلروفیلی سلول ایجاد می گردد،در حالی که در غلظتهای بالاتر در تمام دوره آزمایش ، این شاخص تغییرات مهمی را از خود نشان نمی دهد و از یک روند نسبتا ثابت و مشابه تبعیت می کند. کاهش میزان کلروفیل سلولی در شرایط محدودیت نیتروژن در این سویه ، با بسیاری از مطالعات انجام شده مطابقت دارد (۱۴، ۱۵). نمودار۴، روند تغییرات بتاکاروتنی درون سلولی را در پنج غلظت نیترات نشان می دهد. بر اساس نتایج بدست آمده از تجزیه و تحلیل آماری (جدول آماری ۲) ،در غلظت ۰/۵ میلی مولار نیترات محدودیت غذایی باعث افزایش معنی داری در محتوای بتاکاروتنی سلولها در مقایسه با چهار غلظت دیگر می گردد. در نمودار ۴، میزان بتاکاروتن سلولی برای همه غلظتها در روز دوم ابتدا کاهش و سپس افزایش می‌یابد. در محیط کشت فاقد نیترات و همچنین محیط کشتهای حاوی ۱/۵، ۵ و ۱۰ میلی مولار نیترات ،این افزایش از روز دوازدهم به بعد با یک روند نسبتا ثابتی دنبال می شود،در حالی که در غلظت ۰/۵ میلی مولار، کمبود نیتروژن منجر به افزایش معنی داری در محتوای بتاکاروتن سلولی در مقایسه با چهار غلظت دیگر می گردد(جدول آماری ۲) که این افزایش به وضوح از روز بیستم به بعد آشکار می گردد، ضمن اینکه میان چهار غلظت صفر ، ۱/۵، ۵ و ۱۰ میلی مولار اختلاف معنی داری از لحاظ تاثیر بر این شاخص مشاهده نمی شود و علیرغم فقر شدید نیتروژن در محیط بدون نیترات ، بتاکاروتن درون سلولی افزایش قابل توجهی از خود نشان نمی دهد. بنابراین بر اساس این نتایج غلظت ۰/۵ میلی مولار نیترات به عنوان غلظتی که با ایجاد محدودیت غذایی منجر به تجمع بتاکاروتن در سویه ایرانی *D. salina* می‌گردد در نظر گرفته شد. برخی تحقیقات حاکی از آن است که در گونه‌های Dunaliella مستعد تولید بتاکاروتن تحت شرایط کمبود نیترات مقادیر فراوانی بتاکاروتن تجمع می یابد و در چنین وضعیتی میزان بتاکاروتن سلولی ممکن است ۱۵ تا ۳۰ پیکوگرم افزایش نشان دهد (۴، ۷، ۲۰، ۲۶). بنابراین نوع سویه در گونه های *D. salina* و *D. bardawil* که به عنوان گونه هایی با قابلیت فراوان در تولید بتاکاروتن مطرح می باشند بسیار حائز اهمیت است به طوری که برخی از این سویه ها فاقد توانایی و ظرفیت کافی جهت سنتز بتاکاروتن در سطح تجاری هستند(۱۰، ۱۹).

بحث

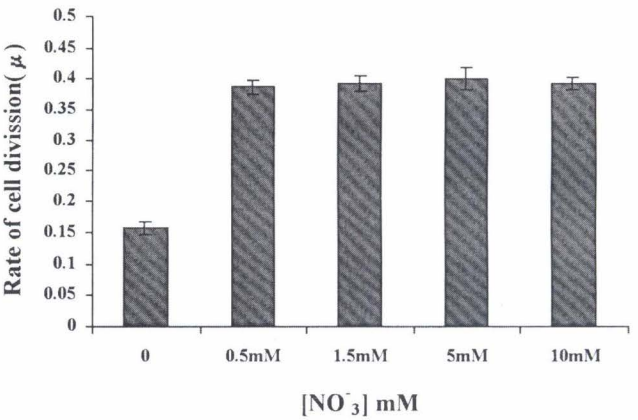
نیتروژن یک عنصر مهم و پر مصرف برای تمامی گیاهان و جلبکها است و رشد و تولید گیاهی تا حد فراوانی وابسته به تغذیه نیتروژنی می‌باشد. کمبود نیتروژن با کاهش سنتز پروتئین و نوکلئیک اسیدها ،منجر به ایجاد اختلال و آشفتگیهای فراوانی در متابولیسم عمومی سلول می گردد. ایجاد تغییراتی در شکل ظاهری ، تجمع کربوهیدراتها ،کاهش فعالیتهای فتوسنتزی ، اصلاح فرآیندهای متابولیسمی جهت سازگاری با شرایط کمبود مواد غذایی و تولید متابولیتهای ثانوی، پاسخ های عمومی گیاهان در برابر محدودیتهای غذایی می باشد (۱۳) . با توجه به نمودار ۱ ،به وضوح مشخص می شود که نیتروژن از نقش بسیار مهم و کلیدی در رشد و تقسیمات سلولی برخوردار است . با بررسی منحنی رشد سویه ایرانی *D. salina* مرحله تاخیری رشد[5] مشاهده

جدول-۲ مقدار به دست آمده لاندای ویلکس و F در تحلیل واریانس چند متغیره(MANOVA) برای مقایسه دو به دویی پنج غلظت نیترات پتاسیم (۰، ۰/۵، ۱/۵، ۵ و ۱۰ میلی مولار) بر شاخص های اندازه گیری شده در جلبک *D. salina*. نتایج بر اساس چهار تکرار محاسبه شده اند . علائم (**) و (*) به ترتیب ، بیانگر معنی دار بودن اثر عامل در سطح ۱٪= p و ۵٪=p می باشند و NS = Not signification بیانگر عدم وجود اختلاف معنی دار در سطح p≥۰/۰۵ است .

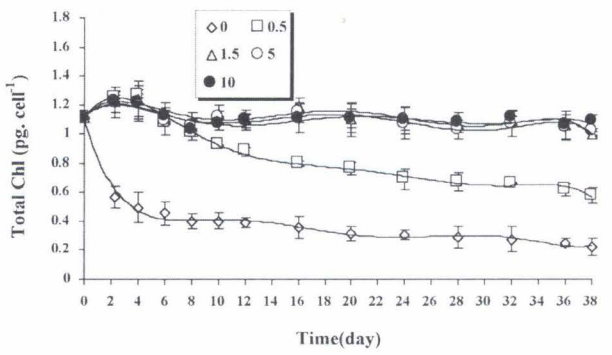
غلظت نیترات (mM)	تعداد سلول در ml		بتاکاروتن pg.cell^{-1}		کلروفیل کل pg.cell^{-1}	
	F	Wilk's λ	F	Wilk's λ	F	Wilk's λ
۰/۵ و ۰	۱۹۴۵/۱۰۷	۰/۰۰۰۳۹**	۱۹/۲۸۶	۰/۰۳۷۴۳*	۵۱/۵۸۴	۰/۰۱۴۳۳**
۱/۵ و ۰	۱۵۰۴/۷۰۸	۰/۰۰۰۵**	۴/۱۸۲	۰/۱۵۲۰۷ NS	۱۶۹/۱۴۰	۰/۰۰۴۴۱ **
۵ و ۰	۵۰۳/۸۸۳	۰/۰۰۱۴۹**	۲/۹۹۴	۰/۲۰۰۳۴ NS	۲۰۷/۶۷۲	۰/۰۰۳۶**
۱۰ و ۰	۱۰۱۶۸/۵۵۲	۰/۰۰۰۰۷**	۱/۸۴۲	۰/۲۸۹۳۴ NS	۸۵/۱۱۷	۰/۰۰۸۷۳**
۱/۵ و ۰/۵	۴۵/۴۷۹	۰/۰۱۶۲۲**	۵۹/۸۲۳	۰/۰۱۲۳۸**	۱۳۰۱/۳۲۶	۰/۰۰۰۵۸**
۵ و ۰/۵	۳۴/۸۷۰	۰/۰۲۱۰۶**	۵۵/۷۷۳	۰/۰۱۳۲۷**	۸۷/۷۱۴	۰/۰۰۸۴۸**
۱۰ و ۰/۵	۱۲۰/۳۵۱	۰/۰۰۶۱۹**	۱۵۴/۱۶۲	۰/۰۰۴۸۴**	۹۷/۹۰۳	۰/۰۰۷۶**
۵ و ۱/۵	۲/۷۱۸	۰/۲۱۶۲۶ NS	۱/۳۸۲	۰/۳۵۱۸ NS	۰/۸۲۵	۰/۴۷۵۲۳ NS
۱۰ و ۱/۵	۰/۲۱۲	۰/۷۷۹۷۳ NS	۱/۲۱۱	۰/۳۵۲۴۰ NS	۱/۴۹۶	۰/۳۳۳۹ NS
۱۰ و ۵	۰/۲۱۶	۰/۷۷۶۰۸ NS	۰/۲۳۵	۰/۷۶۱۱۴ NS	۱/۱۸۳	۰/۳۸۸۰۶ NS



نمودار شماره ۱- تاثیر غلظت‌های مختلف نیترات پتاسیم بر حسب میلی مولار بر روی روند تراکم سلولی در جلبک *D. salina* در قیاس با شاهد (۵ میلی مولار) در شوری ۱ مولار و در شدت نور ۱۰۰ میکرومول فوتون بر متر مربع بر ثانیه. مقادیر میانگین چهار تکرار انحراف معیار می باشد.

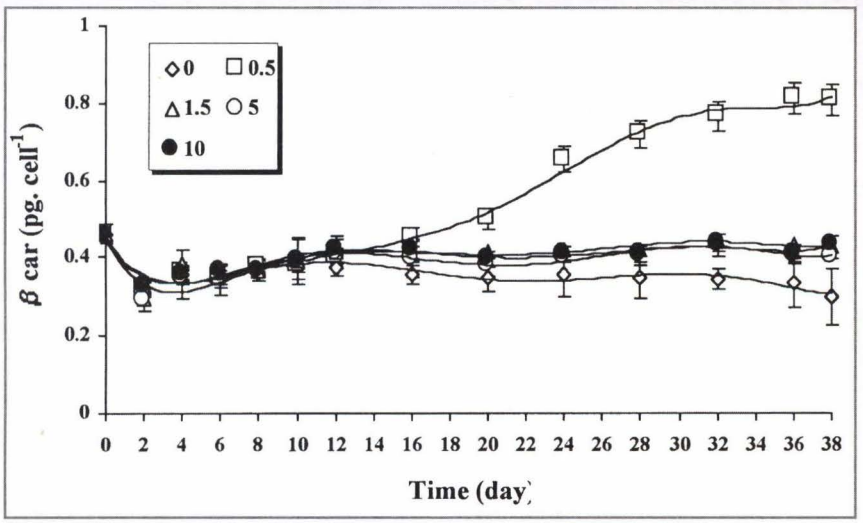


نمودار شماره ۲- بررسی اثر پنج غلظت مختلف نیترات بر روی نرخ رشد ویژه (μ) در مرحله تصاعدی تقسیمات سلولی در شوری ۱ مولار و شدت نور ۱۰۰ میکرومول فوتون بر متر مربع بر ثانیه در سوسپانسیون‌های جلبکی *D. salina* مقادیر میانگین چهار تکرار انحراف معیار می‌باشد.



نمودار شماره ۳- تاثیر غلظت‌های مختلف نیترات پتاسیم بر حسب میلی مولار بر روی میزان کلروفیل کل درون سلولی (پیکوگرم بر سلول) جلبک *D. salina* در قیاس با شاهد (۵ میلی مولار) در شوری ۱ مولار و در شدت نور ۱۰۰ میکرومول فوتون بر متر مربع بر ثانیه. مقادیر میانگین چهار تکرار انحراف معیار می‌باشد.

نشد . این موضوع حکایت از آن دارد که سویه فوق از قدرت سازگاری بالایی برخوردار بوده و بسرعت خود را با شرایط جدید منطبق می نماید . علاوه بر این تصور می شود که کشت مقدماتی جلبکها در محیط فاقد نیترات ،توانایی سلولها را جهت جذب نیترات افزایش دهد. بنابراین سلولها پس از کشت در محیط‌هایی با غلظتهای مختلف نیترات، مستقیما و بدون طی مرحله تاخیری وارد مرحله نمایی رشد می گردند. با توجه به عدم تفاوت معنی دار بین غلظتهای ۱/۵، ۵ و ۱۰ میلی مولار از لحاظ تاثیر بر تراکم سلولی (جدول آماری ۲) ،احتمالا می‌توان پیش بینی نمود که غلظت ۱/۵ میلی مولار (در کنار غلظت شاهد) می‌توان تا بیش از یک ماه پاسخگوی نیازهای نیتروژنی این سویه در متوسط شدت نور ۱۰۰ میکرومول فوتون بر متر مربع بر ثانیه باشد و این موضوع به لحاظ مصرف نیترات به‌عنوان یک منبع نیتروژنی معدنی بسیار مقرون به صرفه تر خواهد بود. همچنین بر اساس نتایج حاصل، غلظت ۰/۵ میلی مولار نیترات به عنوان غلظتی که منجر به ایجاد شرایط کمبود نیتروژن ،کاهش سنتز کلروفیل و تجمع بتاکاروتن در این سویه می شود ، مشخص گردید. عدم مشاهده اختلاف معنی دار میان غلظتهای مختلف نیترات (به استثنای محیط فاقد نیترات)از لحاظ تاثیر بر شاخص نرخ رشد ویژه (نمودار ۲)، بیانگر آن است که علیرغم تاثیر مهم و قابل توجه بر سنتز کلروفیل (نمودار ۳) و فرآیند تقسیم سلولی (نمودار ۱)، افزایش قابلیت دسترسی به نیتروژن باعث سریع تر شدن نرخ رشد در مرحله تصاعدی رشد نمی گردد و بنابراین به نظر می رسد که نرخ جذب نیترات در چنین غلظتهایی در طی این دوره کمتر تابع میزان نیترات موجود در محیط باشد. با توجه به نمودار ۳، تصور می شود که محتوای کلروفیلی در غلظتهای مختلف نیترات بطور غیر مستقیم وابسته به تراکم سلولی و به‌طور مستقیم وابسته به میزان نیتروژن محیط باشد. به نظر می رسد که در غلظتهای بالای نیترات (۱/۵، ۵ و ۱۰ میلی مولار) ،تداوم تقسیمات سلولی مانع از تغلیظ کلروفیل در داخل سلولها می گردد. علاوه بر این ،نقش نیتروژن به‌عنوان یک عنصر کلیدی در ایجاد حلقه پورفیرین و پروتئینهای حاوی کلروفیل باید مد نظر قرار گیرد . زیرا با کاهش قابلیت دسترسی به نیتروژن در محیط کشتهای فاقد نیترات یا حاوی ۰/۵ میلی مولار (نمودار ۳)، اسکلت اصلی ساختمان کلروفیل ناقص و همچنین از سنتز پروتئینهای در بر گیرنده کلروفیل کاسته می شود و این موضوع سنتز کلروفیل را کاهش خواهد داد. با توجه به نمودار۴ ،تصور می گردد که عدم افزایش قابل توجه در بتاکاروتن سلولی در محیط کشتهای جلبکی فاقد نیترات (با وجود محدودیت شدید نیتروژن)، خاموش سازی و توقف کلیه فعالیت های متابولیکی و از جمله مسیر سنتز بتاکاروتن باشد. همچنین ، افزایش تراکم سلولی مانع از تجمع بتاکاروتن در غلظتهای ۱/۵، ۵ و ۱۰ میلی مولار نیترات می‌شود . تاکنون علت واقعی افزایش محتوای بتاکاروتن سلولی در شرایط محدودیت غذایی نظیر کمبود نیترات در جلبکDunaliella مشخص نشده است. پیشنهاد گردیده است که بتاکاروتن نقش بسیار مهمی در حفاظت کلروفیل از اثرات مخرب اکسیداسیون و ممانعت نوری در این جلبک ایفاء می نماید (۴). همچنین بر اساس یک نظریه ، ارتباط معکوسی بین تراکم سلولی و سنتز بتاکاروتن در این جلبک برقرار است و شرایطی که باعث کاهش نرخ تقسیمات سلولی می‌گردد، منجر به افزایش محتوای بتاکاروتنی سلولها می شود (۸). به عبارت دیگر به نظر می رسد که عواملی نظیر افزایش شوری و یا کمبود مواد غذایی محیط به طور غیر مستقیم و از طریق کاهش نرخ رشد



نمودار شماره ۴- تاثیر غلظت‌های مختلف نیترات پتاسیم بر حسب میلی مولار بر روی میزان بتاکاروتن درون سلولی (پیکوگرم بر سلول) جلبک *D. salina* در قیاس با شاهد (۵ میلی مولار) در شوری ۱ مولار و در شدت نور ۱۰۰ میکرومول فوتون بر متر مربع بر ثانیه . مقادیر میانگین چهار تکرار انحراف معیار می‌باشد.

،شرایط لازم را برای اعمال اثر نور (به‌عنوان یک عامل اصلی در القای سنتز بتاکاروتن) ایجاد می‌نمایند. با این وجود، تصور می شود که این نظریه چندان در رابطه با افزایش بتاکاروتن در سویه ایرانی *D. salina* حداقل در برخی شرایط مصداق نداشته باشد . به نظر می رسد که در سلولهای محروم از نیتروژن سویه ایرانی

D. salina با توقف رشد ،مصرف عوامل احیاء کننده و ترکیبات پر انرژی حاصل از فتوسنتز محدود شود و بنابراین در چنین شرایطی با احیاء باقی ماندن زنجیره انتقال الکترون فتوسنتزی، پتانسیل ردوکس سلولی افزایش می یابد و این موضوع اثرات مهمی بر متابولیسم عمومی سلول و از جمله مسیر سنتز کاروتنوئیدها داشته باشد. پیشنهاد شده است که کاهش مصرف عوامل احیاء کننده در سلولهای مواجه با کمبود مواد غذایی ،منجر به انحراف الکترونها از زنجیره انتقال الکترون فتوسنتزی و در نهایت ایجاد اشکال مختلفی از اکسیژن فعال می گردد که علاوه بر آسیبهای جبران ناپذیر ، ممکن است که به عنوان پیامهای تنظیم کننده ، سنتز متابولیتهای ثانوی را کنترل نمایند (۱۳). اثرات القایی اکسیژن رادیکالی در افزایش بیان ژنهای دخیل در مسیر سنتز بتاکاروتن در جلبکDunaliella به اثبات رسیده است(۲۳). با این وجود ،در مقایسه با نتایج حاصل از برخی از تحقیقات (۴، ۱۴)، افزایش محتوای بتاکاروتن سلولی در سویه ایرانی *D. salina* چندان قابل توجه نیست. همچنین، مطالعات انجام شده در این سویه بیانگر آن است که اعمال نور شدید همراه با شوری بالا، باعث تجمع بتاکاروتن فراوان نمی شود (۱). این نتایج حاکی از آن است که احتمالا یه فوق جهت حفاظت کلروفیل و سلول از اثرات زیانبار اکسیداسیون نوری از مکانیسمهای دیگری نظیر افزایش فعالیت سایر آنتی اکسیدانت ها و عوامل احیاء کننده استفاده می نماید . این مسیرها می توانند جایگزین عمل بتاکاروتن در خاموش سازی ترکیبات رادیکالی ایجاد شده باشند.

پاورقی‌ها

1- Stationary phase
2-Exponential phase
3- Specific growth rate
4- Repeated measuer completely
5- Lag phase

منابع مورد استفاده

۱- شریعتی، م . و مددکار حقجو، م. ۱۳۷۷. بررسی رابطه بین میزان بتاکاروتن و محتوای کلروفیلی سلول در جلبک سبز *Dunaliella salina* در پاسخ به نور شدید. مجله زیست شناسی ایران ،جلد ۷،شماره ۴-۳،صفحات ۱۳۲-۱۱۲.

۲- شریعتی،م . و هادی،م. ۱۳۷۹. جداسازی،خالص سازی و شناسایی جلبکpsrudosalina *Dunaliella* از حوضچه های تبخیر نمک در مرداب گاوخونی اصفهان. مجله زیست شناسی ایران ،جلد ۹، شماره ۴-۱،صفحات ۵۴-۳۹.

J. Appl. Phycol. 3, 319-327.
16-Johnson, M. K. & Johnson, E. J., McElroy, R. D.,
Speer, H. L. & Braff, B. S. 1986. Effects of salt on the halophilic alga *Dunaliella viridis*. J. Bacteriol. 95, 1461-1468.
17-Johnson, R. A. & Wichern, D. W. 1992. Applied multivariate statistical analysis. (Third edition). Prentice Hall, U. K.
18- Lee, R. E. 1989. Chlorophyta. In : Phycology. (ed,Lee, R. E.).2nd edition, Cambridge University Press, Cambridge, 188-307.
19- Lers, A. , Biener, Y. & Zamir, A. 1990. Photoinduction of massive beta-carotene accumulation by the alga *Dunaliella bardawil*. Plant Physiol. 93, 389-395.
20- Marin, N., Morales, F., Lodeiros, C. & Tamigneaux, E. 1998. Effect of nitrate concentration on growth and pigment synthesis of *Dunaliella salina* cultivated under low illumination and preadapted to different salinities. J. Appl. Phycol. 10, 405-411.
21-Powtongsook, S., Wisessang, S. & Menasveta, P. (1995). Effects of light intensity, nitrate and phosphate concentration and pH on growth and caotenoid content of *Dunaliella salina*, Thai. J. Aqua. Sci. 1, 177-184.
22-Schoen, S.1988. Cell counting. In; Lobban, C. S., Chapmans, D. J. and Kremer, B. P. (eds). Experimental physiology: A laboratory manual. Cambridge University Press. Cambridge. PP. 16-22
23-Shaish, A., Avron, M., Pick, U. & Ben-Amotz, A.1993. Are active oxygen species involved in induction of beta-carotene in *Dunaliella bardawil* ? Planta, 190, 363-368.
24-Shariati, M. & Lilley, R. McC.1994. Loss of intracellular glycerol from Dunaliella by electroporation at constant osmotic pressure : Subsequent restoration of glycerol *content* associated volum changes. Plant Cell Environ. 17, 1295-1304.
25- Shariati, M. (2003). Characterization of three species of *Dunaliella salina*, Dunaliella parva and Dunaliella pseudosalina isolated from salt marsh of Gavekhoni of Isfahan - Iran. Iranian J. Sci. Technol. Transection A, 27, No (A1). 185-190.
26-Tan, C. K., Lee, Y. K. & Ho, K. K.1993. Effect of light intensity and ammonium - N on cartenogenesis of *Trentepolia odorata* and *Dunaliella bardowil*. J. Appl. Phycol. 5, 547-549.
3-Avron, M. & Ben -Amotz, A. 1992. Dunaliella: physiology, biochemistry and biotechnology. CRC press, Boca Raton, 240.
4- Ben-Amotz, A. 1987. Effect of irradiance and nutrient deficiency on the chemical composition of *Dunaliella bardawil* Ben- Amotz and Avron (Volvocales, Chlorophyta). J. Plant Physiol. 131,479-487.
5- Ben-Amotz, A. & Avron, M. 1981. Glycerol and beta-carotene metabolism in the halotolerant alga Dunaliella: a modle system for biosolar energy conversion. Trends Biochem. Sci. 6, 297-299.
6 -Ben-Amotz A. & Avron, M. 1983. On the factors which determine massive beta-carotene accumulation in the halotolerant alga *Dunaliella bardawil*. Plant Physiol. 72,593-597.
7- Ben-Amotz, A. & Avron, M. 1990. The biotechnology cultivating the halotolerant alga Dunaliella. TIBTECH. 8, 12-19.
8- Browizka, L. J. & Borowitzka, M. A. 1989. Beta-carotene (provitamin A) production with algae. In: Biotechnology of vitamins, pigments and growth factors. (ed, Vandamme, E. J.). Elsevier Applied Science, London, 15-26.
9- Borowitzka, M. A. 1999. Commerical production of microalgae: ponds, tanks,tubes and fermenters. J. Biotech. 70, 313-321.
10-Cifuentes, A. S., Gonzales, M., Conejeros, M., Dellarossa, V. & Parra, D. 1992. Growth and carotenogenesis in eight strains of *Dunaliella salina* Teodoresco from Chile. J. Appl. Phycol. 4, 111-118.
11-Eijckelhoff, C. & Dekker, J. P. 1997. A routine method to determine the chlorophyll a, pheophytin a and beta-carotene contents of isolated photosystem II reaction center complexes. Photosynth. Res. 52, 69-73.
12-Fan, L., Vonshak,A. & Boussiba, S. 1994. Effect of temprature and irradiance on growth of *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae). J. Phycol. 30, 829-833.
13-Grobbelaar, J. U. 1995. Influence of algal density on beta-carotene production by *Dunaliella salina*. J. Appl. Phycol. 7,69-73.
14-Grossman, A. & Takahashi, H. 2001 . Macronutrient utilization by photosynthesis eukaryotes and the fabric of interactions. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 52, 163-210.
15-Jimenez, C. & Niell, F. X. 1991. Growth of *Dunaliella viridis* Teodoresco: Effect of salinity, temprature and nitrogen concentration.