

مقایسه اثر غلظت‌های مختلف کلرور سدیم بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، اسمولیت‌ها و رنگیزه‌های فتوسنتزی در *Dunaliella salina*

افضل سادات برهانی سبزواری^{۱*}، ارین ساطعی^۲ و مه‌لقا قربانلی^۳

۱ دانشکده علوم، دانشگاه گلستان، گرگان

۲ و ۳ گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرگان

تاریخ دریافت: ۹۰/۴/۱۵

تاریخ پذیرش: ۹۰/۶/۲۶

چکیده

در پژوهش حاضر، تأثیر غلظت نمک کلرور سدیم در محیط کشت بر تغییرات فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان (کاتالازی، اسکوربات پراکسیدازی، پراکسیدازی، سوپراکسیددیسموتازی)، تغییرات محتوای اسمولیت‌ها (گلیسین بتائین و پرولین) و تغییر در میزان رنگیزه‌ها، مورد بررسی قرار گرفت. در تیمارهای ۲/۵، ۷/۵ و ۱۲/۵ درصد نمک طعام، سویه مورد آزمایش رشد نموده و، امکان سنجش سایر پارامترهای مورد نظر فراهم شد. بیشترین رشد در تیمار ۷/۵ درصد مشاهده شد. بیشترین مقدار رنگیزه‌های کلروفیل a (۱۰/۳ میلی گرم بر گرم وزن تر جلبک)، کلروفیل b (۰/۷۳۵ میلی گرم بر گرم وزن تر جلبک) و بتا کاروتن (۰/۲۱۱ میلی گرم بر گرم وزن تر جلبک) در تیمار ۷/۵ درصد دیده شد اما افزایش درصد کلروفیل b در سایر تیمارها اتفاق افتاد. نتایج بررسی آنزیمی، نشان داد که در شرایط مربوط به سایر تیمارها میزان نمک در محیط کشت، فعالیت پراکسیدازی و اسکوربات پراکسیدازی به طور معنی داری افزایش یافت ($P < 0/05$). علاوه بر این، در شرایط بهینه میزان گلیسین بتائین به طور معنی داری ($P < 0/05$) بیش از دو تیمار دیگر بود. در شرایط غیر بهینه مورد آزمایش، مقدار پرولین افزایش معنی داری داشت ($P < 0/05$). به نظر می‌رسد در تیمار ۷/۵ درصد بیشترین رشد مشاهده می‌شود و سلول برای رفع تنش به تغییر ترکیب آنتن‌های فتوسنتزی، در جهت افزایش فتوسیستم ۲ همراه با سنتز پرولین و پروتئین‌های آنزیمی آنتی‌اکسیداتیو به مقابله با اثرات شوری و یا به عبارتی سازش با آن می‌پردازد.

واژگان کلیدی: اسمولیت‌ها، آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، پرولین، دونالیا، کلرور سدیم، گلیسین بتائین

*نگارنده پاسخگو: Afzalborhani@yahoo.com

مقدمه

گونه *Dunaliella salina*، نوعی جلبک سبز تک سلولی است که توانایی منحصر به فردی در سازش با نامساعدترین محیط‌های شناخته شده روی کره زمین دارد. این گونه، در شرایط متنوعی از ۰/۵ تا ۵ مول نمک طعام رشد می‌کند و در این دامنه نمک، مقدار نمک داخلی را پایین نگه می‌دارد (Fisher et al., 1994). این جلبک مکانیسم‌های موثری برای تنظیم یون سدیم داخل سلولی دارد (Katz, 2001). دونالیا یوکاریوت و فتوسنتز کننده است و می‌تواند در شرایط مناسب بتا کاروتن را در سطح وسیعی در خود جمع کند (Ben Amotz et al., 1987). کاروتنوئیدها اکنون به عنوان عوامل حفاظتی موثر علیه بیماری‌های متنوع بشر از جمله آب مروارید و تخریب رتینال مرتبط با پیری محسوب می‌گردند. ترکیب لوتئین به عنوان افزودنی غذا در امریکا در هر سال حدود ۱۵۰ میلیون دلار فروش دارد (Jin et al., 2003). بنابر این پژوهش پیرامون این جلبک، به عنوان یک منبع ارزشمند غذایی، دارویی و بهداشتی و آرایشی، مورد توجه می‌باشد (Richmond et al., 1986).

با توجه به اینکه از جمله پاسخ‌های سلولی گیاهان به شرایط تنش، تولید ترکیبات آنتی‌اکسیدان (از جمله آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان) و اسمولیت‌ها و تغییر در ترکیب رنگیزه‌های فتوسنتزی می‌باشد لذا در این پژوهش، این پارامترها تحت اثر غلظت بهینه نمک (۷/۵ درصد) و غلظت‌های بالا و پایین تراز آن (۱۲/۵ و ۲/۵ درصد) مورد بررسی قرار گرفت. مواد و روش‌ها: شرایط اتاق کشت:

اتاق کشت لازم متناسب با گونه جلبک و امکانات در دسترس طراحی گردید. امکان نوردهی مناسب، هوادهی و مکان مناسب برای قرارگیری ظروف حاوی محیط کشت از مواردی است که در این طراحی مدنظر قرار گرفت. (R) قفسه‌ها در یک اتاق به دیوارها عمود شدند. فاصله طبقات ۳۰ سانتیمتر تنظیم شد. شدت نور در هر طبقه به وسیله دو لامپ فلور سنت سفید و یک لامپ زرد (۲۰ وات)، حدود ۵۰۰۰ لوکس تامین گردید. زمان نوردهی به صورت وسیله دستگاه تنظیم‌کننده به مدت زمان انجام مطالعات، تعداد تیمارها و تعداد تکراردر سنجش متغیرها در هر تیمار توضیح داده شود. تنظیم شد (حسینی و ساطعی، ۱۳۸۵). دمای اتاق کشت بین ۲۵-۳۰ درجه سانتی‌گراد تنظیم گردید. مینیمم و ماگزیمم دما در ۲۴ ساعت به وسیله دماسنج بررسی، و سپس تنظیم گردید. هوادهی کشت‌ها، روزانه یک ساعت و معمولاً، صبح‌ها انجام شد. این کار توسط پمپ‌های هوادهی اکواریوم انجام گرفت. محیط کشت جانسون در ارلن‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری در حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر با اضافه کردن ۲/۵، ۷/۵ و ۱۲/۵ درصد کلرور سدیم (هر غلظت ۳ ارلن جداگانه) ساخته شد. اسیدیته این محیط در حد ۷/۵، به کمک pH متر تنظیم گردید. در طی ۱۲ روز شمارش روزانه تعداد جلبک در واحد حجم محیط کشت بطور روزانه با کمک میکروسکوپ اولیمپوس و لام شمارش تومانیانجام شد. پس از دوازده روز سنجش آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، اسمولیت‌ها و رنگیزه‌های فتوسنتزی در جلبک انجام گردید.

تهیه نمونه و انتقال به محیط مایع:

نمونه جلبک از پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی شهید بهشتی تهیه شد. این جلبک به منظور خوگیری با شرایط حاضر، پیش از آغاز پژوهش، چند دوره واکشت گردید. جلبک در شرایط استریل به محیط کشت جدید انتقال یافت. برای این کار پانزده میلی‌لیتر از محیط کشت واجد جلبک در لوله‌های آزمایش در ۴۰۰ دور و مدت زمان ۳۰ دقیقه سانتریفوژ شد. سپس لایه رویی دور ریخته شده و بر روی جلبک‌ها ۱۰ میلی‌لیتر از محیط جدید ریخته و آنها به یک ارلن ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۹۰ میلی‌لیتر محیط کشت تازه جانسون منتقل گردیدند. تعداد جلبک در واحد حجم محیط کشت جدید در آغاز حدود 2×10^4 جلبک در میلی‌لیتر بود. سنجش‌ها پس از دوازده روز، انجام گرفت. به منظور سنجش پرولین ده میلی‌لیتر سوسپانسیون جلبکی در لوله‌های توزین شده، در ۱۰۰۰ دور سانتریفوژ شد و با محاسبه وزن جلبک، رسوب جلبکی در ۱۰ میلی‌لیتر محلول ۳ درصد اسید سولفوسالسیلیک ساییده شد و سپس مخلوط، دوباره در ۱۰۰۰ دور سانتریفوژ، و ۲ میلی‌لیتر از محلول رویی به ۳ میلی‌لیتر نین‌هیدرین (حاصل از حل کردن ۱/۲۵ گرم نین‌هیدرین در ۳۰ میلی‌لیتر اسید استیک خالص و ۲۰ میلی‌لیتر اسید فسفریک ۶ مولار) و ۳ میلی‌لیتر اسید استیک خالص اضافه شد. لوله‌ها یک ساعت در بن‌ماری جوش و پس از آن نیم ساعت در حمام یخ قرار گرفتند. سپس ۴ میلی‌لیتر تولوئن به هر لوله اضافه شد و پس از کمی هم زدن و تشکیل دو لایه رنگی مجزا، جذب لایه رنگی فوقانی در ۵۲۰ نانومتر خوانده شد و غلظت پرولین (Bates, 1973) با مقایسه با محلول‌های استاندارد محاسبه شد. به منظور سنجش گلیسین بتائین، حجمی از محیط مورد نظر واجد جلبک در لوله‌های توزین شده در ۱۰۰۰ دور سانتریفوژ شد و پس از توزین جلبک، رسوب جلبکی در ۲۰ میلی‌لیتر آب مقطر ساییده و دوباره در ۱۰۰۰ دور سانتریفوژ گردید. لایه رویی به نسبت یک به یک با اسید سولفوریک ۲ نرمال رقیق شد و سپس ۰/۸ میلی‌لیتر معرف یدیدین سرد اضافه و پس از ۱۶ ساعت نگهداری در دمای صفر و سانتریفوژ در ۱۰۰۰۰ دور، یک میلی‌لیتر از محلول فوقانی با ۹ میلی‌لیتر ۲۰ دی‌کلرو اتان مخلوط و پس از ورتکس شدید، جذب محلول تحتانی بعد از ۳ ساعت در طول موج ۳۶۵ نانو متر تعیین و با استفاده از محلول‌های استاندارد، غلظت گلیسین بتائین محاسبه گردید (Sairam, 2002).

تهیه عصاره جلبکی جهت سنجش های آنزیمی:

الف- تهیه محلول عصاره گیری با مخلوط کردن ۱/۲ گرم تریس و ۲ گرم اسید اسکوربیک و ۳٫۸ گرم بوراکس (Disodium tetraborate) و ۲ گرم Na_2EDTA و ۵۰ گرم پلی اتیلن گلیکول ۲۰۰۰ و رساندن حجم با آب مقطر به ۱۰۰ میلی لیتر (PH7 و نگهداری در یخچال) انجام گردید.

ب- پس از استخراج عصاره جلبکی حاوی آنزیم به وسیله ساییدن وزن مشخصی از رسوب حاصل از سانتریفیوژ سوسپانسیون جلبکی با چهار میلی لیتر محلول عصاره گیری به مدت نیم ساعت، محلول به مدت ۲۴ ساعت در یخچال (دمای ۴ درجه سانتی گراد)، قرار گرفت. مخلوط به مدت سی دقیقه در ۴۰۰ گرم سانتریفیوژ گردیده و لایه فوقانی در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری گردید.

اندازه گیری فعالیت پراکسیدازی

پس از مخلوط کردن یک میلی لیتر تامپون استات (PH=5) M ۰/۱ با ۰/۴ میلی لیتر آب اکسیژنه ۳ درصد و ۰/۲ میلی لیتر بنزیدین محلول در الکل ۵۰ درجه و اضافه کردن ۰/۱ میلی لیتر عصاره آنزیمی و خواندن جذب در طول موج ۵۳۰ nm پس از ۱ دقیقه و محاسبه آن به ازای ۱ گرم وزن تر جلبک فعالیت پراکسیدازی مورد سنجش قرار گرفت (Koroi, 1989).

اندازه گیری فعالیت اسکوربات پراکسیدازی

در این سنجش ۲ میلی لیتر بافر فسفات (PH۶/۵) M ۰/۰۵ با ۲ میلی لیتر آب اکسیژنه سه درصد و ۰/۲ میلی لیتر اسکوربات ۵۰ میکرو مولار در حمام یخ مخلوط شد و بلافاصله ۰/۱ میلی لیتر عصاره آنزیمی به آن اضافه شد. سپس جذب نوری را پس از در ۶۲۵nm خوانده شده و به ازای ۱ گرم جلبک، فعالیت آنزیمی معرفی شد (Arrigoni, 1992).

اندازه گیری فعالیت کاتالازی

۲/۵ میلی لیتر بافر فسفات (PH7) M ۰/۵ را و ۰/۲ میلی لیتر آب اکسیژنه سه درصد با هم در یخ مخلوط شده و سپس ۲/۰ میلی لیتر عصاره آنزیمی تازه استخراج شده به آن گردید. سپس تغییرات جذب در ۲۴۰nm خوانده و فعالیت کاتالازی را به ازای ۱ گرم جلبک، محاسبه گردید (Maehly & Chence, 1995).

اندازه گیری فعالیت سوپر اکسید دیسموتازی:

محلول واکنش برای اندازه گیری فعالیت آنزیم شامل بافر فسفات (PH۷/۵) ۵۰ میلی مولار، NBT (نیترو بلو تترا زولیوم) (۷۵ میکرو مولار)، ریبو فلاوین (۲ میکرو مولار) و EDTA (۰/۱ میلی مولار) بود که در تاریکی کامل نگهداری شد. بلافاصله پس از اضافه کردن ریبو فلاوین، ۳ میلی لیتر از آن را در یک لوله آزمایش ریخته و به هر یک ۱۰۰ میکرو لیتر عصاره آنزیمی اضافه شد. در ۳۰ سانتیمتری لامپ ها قرار داده و پس از ۱۶ دقیقه جذب آن در طول موج ۵۶۰ نانومتر خوانده شد. جذب محلول تاریک نیز به عنوان شاهد، تعیین گردید و میزان کاهش جذب نوری نسبت به محلولهای فاقد آنزیم به عنوان فعالیت آنزیم محاسبه شد (Gianantolis & Ries, 1977).

سنجش کلروفیل a و b و بتا کاروتن (Jensen, 1978)

برای سنجش کلروفیل a و کلروفیل b و بتا کاروتن از سوسپانسیون جلبک واستن ۸۰ درصد استفاده گردید. ابتدا به هر لوله سانتریفیوژ ۱۰ میلی لیتر از سوسپانسیون جلبک انتقال داده شد و سپس توسط دستگاه سانتریفیوژ به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۲۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید. محلول فوقانی را به آرامی جدا کرده و پس از توزین رسوب جلبکی حاصل، به آن ۳ میلی لیتر استن ۸۰ درصد اضافه گردید. پس از هم زدن کامل توسط دستگاه همزن (vortex) مجدداً به مدت ۱۰ دقیقه عمل سانتریفیوژ تکرار گردید. محلول فوقانی جدا شده و جذب آن در طول موجهای ۴۱۲، ۴۸۰، ۴۶۰، ۴۳۱، ۶۶۳، ۶۴۵، ۶۶۵، ۴۱۲ و ۴۸۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه گیری گردید. با استفاده از فرمولهای ذیل میزان بتا کاروتن، کلروفیل a و b بر حسب میکرو گرم در میلی لیتر سوسپانسیون جلبکی محاسبه شد (Jensen, 1978):

$$C_{chl a}(\text{mg/ml}) = 0/0127A_{663} - 0/00269A_{645}$$

$$C_{chl b}(\text{mg/ml}) = 0/0229A_{645} - 0/00468A_{663}$$

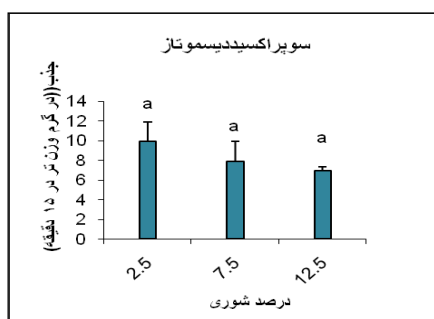
$$C(chla+chlb)=0/0202A_{665}-0/00802A_{663}$$

$$Carotene(\mu g/ml)=-0/430A_{412}+0/251A_{431}-0/376A_{460}+13.216A_{480}\beta-$$

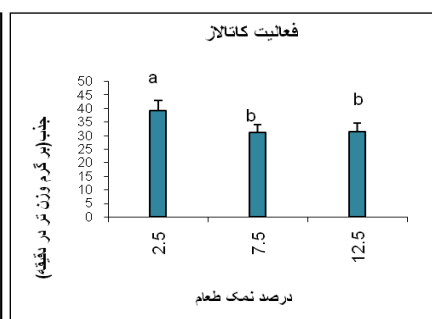
رسم نمودارها با نرم افزار Excel 2003 انجام گرفت. بررسی آماری با استفاده از نرم افزار Spss 11.5 انجام، و آزمون آنالیز واریانس یک طرفه در سطح معناداری ۰/۰۵ صورت گرفت.

نتایج

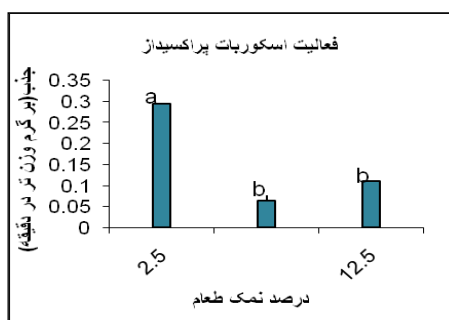
تغییرات فعالیت آنزیم‌ها و محتوای اسمولیت هادرشکل‌های (۱ تا ۶) نشان داده شده است. در تمام شکل‌ها آنتنک‌ها نشان دهنده انحراف معیار است.



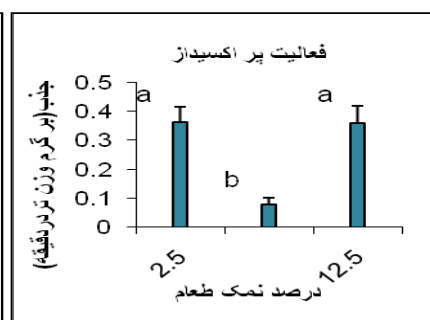
شکل ۲- اثر تیمارهای ۲/۵، ۷/۵ و ۱۲/۵ درصد نمک بر تغییرات فعالیت سوپراکسید دیسموتازی جلبک *Dunaliella salina*



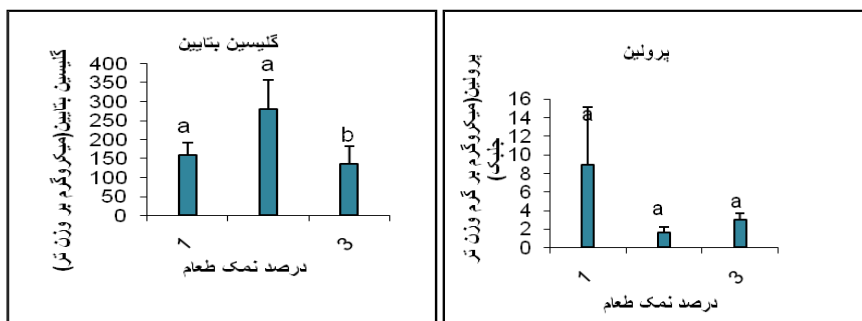
شکل ۱- اثر تیمارهای ۲/۵، ۷/۵ و ۱۲/۵ درصد نمک بر تغییرات فعالیت کاتالازی جلبک *Dunaliella salina*



شکل ۴- اثر تیمارهای ۲/۵، ۷/۵ و ۱۲/۵ درصد نمک بر تغییرات فعالیت اسکوربات پراکسیدازی جلبک *Dunaliella salina*

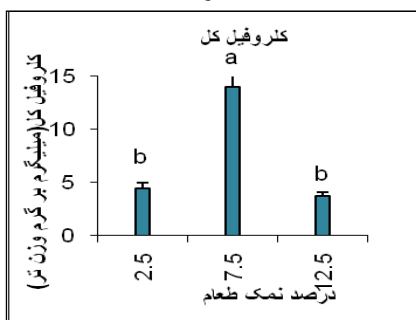


شکل ۳- اثر تیمارهای ۲/۵، ۷/۵ و ۱۲/۵ درصد نمک بر تغییرات فعالیت پراکسیدازی جلبک *Dunaliella salina*



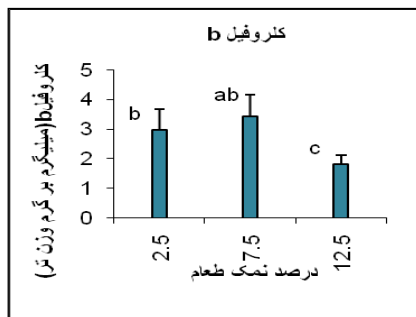
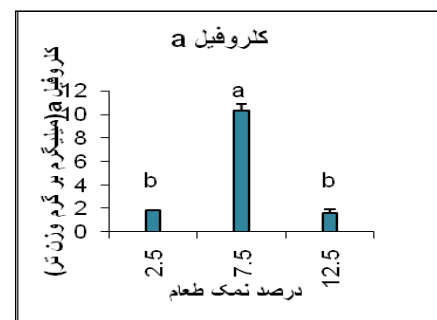
شکل ۵- اثر تیمارهای ۲/۵، ۷/۵ و ۱۲/۵ درصد نمک بر برتغییرات محتوای پروتئین جلبک *Dunaliella salina*

شکل ۶- اثر تیمارهای ۲/۵، ۷/۵ و ۱۲/۵ درصد نمک بر تغییرات مقدار گلیسین بتائین (میکروگرم بر گرم وزن تر جلبک) در جلبک *Dunaliella salina*

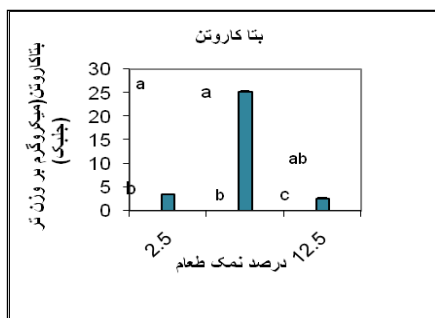


شکل ۷- اثر تیمارهای ۲/۵، ۷/۵ و ۱۲/۵ درصد نمک بر تغییرات مقدار کلروفیل a در جلبک *Dunaliella salina*

شکل ۸- اثر تیمارهای ۲/۵، ۷/۵ و ۱۲/۵ درصد نمک بر تغییرات مقدار کلروفیل b در جلبک *Dunaliella salina*

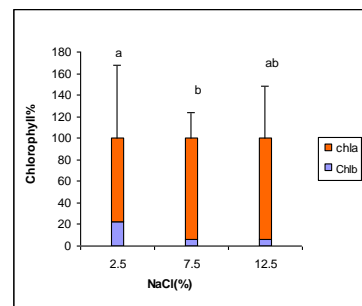


شکل ۹- اثر تیمارهای ۲/۵، ۷/۵ و ۱۲/۵ درصد نمک بر تغییرات مقدار کلروفیل کل در جلبک *Dunaliella salina*



شکل ۱۱ - اثر تیمارهای ۲/۵، ۷/۵ و ۱۲/۵ درصد نمک

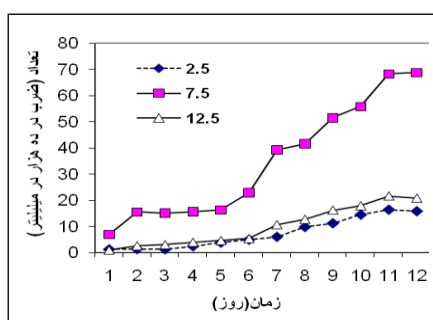
بر تغییرات مقدار بتا کاروتن در جلبک *Dunaliella salina*



شکل ۱۰ - اثر تیمارهای ۲/۵، ۷/۵ و ۱۲/۵ درصد نمک

بر تغییرات درصد کلروفیل a و b در جلبک *Dunaliella salina*

*انحراف معیار، مربوط به کلروفیل b می باشد.



شکل ۱۲ - مقایسه منحنی رشد جلبک *Dunaliella salina* در فاز لگاریتمی در سه تیمار ۲/۵، ۷/۵ و ۱۲/۵ درصد نمک

اثر کلی تیمارها بر فعالیت کاتالازی معنی دار ($P < 0.05$) بود. فعالیت کاتالازی در تیمار ۲/۵ درصد نسبت به دو تیمار دیگر افزایش معنی داری نشان داد. این مقدار در تیمار ۱۲/۵ درصد بیش از تیمار ۷/۵ درصد بود (شکل ۱). ولی این تفاوت معنی دار نبود ($P \geq 0.05$). اثر کلی تیمار بر فعالیت سوپر اکسید دیسموتازی معنی دار ($P < 0.05$) نبود. میزان فعالیت سوپر اکسید دیسموتازی در تیمارهای مختلف با افزایش شوری، کاهش یافت (شکل ۲)، ولی این کاهش در هیچ تیماری معنی دار نبود ($P \geq 0.05$). اثر کلی تیمار بر فعالیت پراکسیدازی معنی دار ($P < 0.05$) بود. میزان فعالیت پراکسیدازی در تیمار ۷/۵ درصد کاهش معنی داری نسبت به دو تیمار دیگر داشت (شکل ۳). اثر کلی تیمار بر فعالیت اسکوربات پراکسیدازی معنی دار ($P < 0.05$) بود. میزان فعالیت اسکوربات پراکسیداز در تیمار ۲/۵ درصد شوری افزایش معنی داری نسبت به دو تیمار دیگر داشت (شکل ۴). اثر کلی تیمار بر محتوای پرولین معنی دار ($P < 0.05$) بود. محتوای پرولین در تیمار ۲/۵ درصد بیش از تیمارهای ۷/۵ و ۱۲/۵ درصد بود، این تفاوت نسبت به تیمار ۷/۵ درصد معنی دار ($P < 0.05$) بوده ولی نسبت به تیمار ۱۲/۵ درصد معنی دار نبود (شکل ۵). اثر کلی تیمار بر محتوای گلیسین بتائین معنی دار ($P < 0.05$) بود. مقدار گلیسین بتائین در تیمار ۷/۵ از دو تیمار دیگر بیشتر بود. این تفاوت بین دو تیمار ۲/۵ و ۷/۵ درصد معنی دار نبود (شکل ۶). اثر کلی تیمار بر درصد کلروفیل a معنی دار ($P < 0.05$) بود. مقدار کلروفیل a در تیمار ۲/۵ درصد کاهش معنی داری نسبت به مقدار آن در تیمار ۷/۵ درصد داشت. این مقدار در تیمار ۱۲/۵ درصد نسبت به ۲/۵ درصد کمی بیشتر بود اما تفاوت معنی دار نبود ($P \geq 0.05$) (شکل ۷). اثر کلی تیمار بر مقدار کلروفیل b معنی دار بود ($P < 0.05$). مقدار کلروفیل b در تیمار ۱۲/۵ درصد نسبت به تیمار ۷/۵ درصد اختلاف معنی داری نشان داد ($P < 0.05$) (شکل ۸). اثر کلی تیمار بر مقدار کلروفیل معنی دار بود ($P < 0.05$). مقدار کلروفیل کل در تیمار ۷/۵ درصد نسبت به دو تیمار دیگر افزایش نشان داده و این افزایش معنی دار بود ($P < 0.05$) (شکل ۹). اثر کلی تیمار بر تغییرات درصد کلروفیل b معنی دار بود ($P < 0.05$). درصد کلروفیل b در تیمار ۲/۵ درصد به طور معنی دار ($P < 0.05$) بیش از مقدار در صد آن در تیمار ۷/۵ درصد بود. این مقدار هم چنین کمی بیشتر از درصد این پارامتر در تیمار ۱۲/۵ بود. ولی تفاوت آن‌ها معنی دار نبود (شکل ۱۰). اثر کلی تیمار بر مقدار بتا کاروتن معنی دار بود ($P < 0.05$).

مقدار بتا کاروتن نیز در سطح ۵ درصد معناداری در سه تیمار تفاوت آشکار و معنی داری نشان داد ($P < 0.05$) (شکل ۱۱). در دوازده روز شمارش در سه تیمار مختلف نمکی. جلبک در فاز لگاریمی رشد بود. اما تکثیر جلبک به شکل معنی داری در محیط کشت ۷/۵ درصد بیشتر بوده و این غلظت از نمک طعام برای جلبک *Dunaliella salina* بهینه بنظر می‌رسید.

بحث و نتیجه‌گیری

نتایج این تحقیق افزایش معنی داری ($P < 0.05$) در فعالیت پراکسیدازی در تیمار ۲/۵ و ۱۲/۵ درصد نسبت به تیمار ۷/۵ درصد را نشان داد (شکل ۳). به نظر می‌رسد دور شدن از وضعیت بهینه (۷/۵ درصد)، تنش است که سلول برای مقابله با آن فعالیت پراکسیدازی خود را افزایش می‌دهد (Jahnkel, 2004). این تنش احتمالاً در نتیجه عدم توازن در مبادله آنیون‌ها و کاتیون‌هایی است که نقل و انتقالات آنها به شکلی، به یون سدیم و یا کلر مربوط است.

تغییرات فعالیت آسکوربات پراکسیدازی و تغییرات فعالیت کاتالازی با آزمون‌های مختلف انجام شده معنی دار بود ($P < 0.05$). این آزمون‌ها در شرایط تنش اکسیداتیو فعال هستند. بنا بر این افزایش فعالیت آنها می‌تواند مبین مقابله آنتی اکسیداتیو آنیمی، هم‌سو با سایر آزمون‌های آنتی اکسیداتیو باشد.

تغییرات فعالیت سوپر اکسید دیسموتازی در سه تیمار مورد سنجش با آزمون‌های مختلف انجام شده معنی دار ($P < 0.05$) نبود. میزان آزمون سوپر اکسید دیسموتاز با افزایش شوری کاهش یافت. ولی این کاهش معنی دار نبود. احتمالاً سلول از سایر آزمون‌های آنتی اکسیداتیو برای رفع تنش استفاده می‌کند.

گلیسین بتائین (اسمیت‌ها) موجب افزایش فعالیت فتوسنتزی از طریق تجمع کلروفیل، افزایش جذب CO_2 ، تسهیل انتقال الکترون، محافظت از فعالیت پروتئین‌ها و لیپیدهای غشاء تیلاکوئیدی در PSII می‌شود (William, 1992). در تیمار ۷/۵ درصد این پارامتر بیشترین مقدار را دارد و افزایش آن نسبت به دو تیمار دیگر معنی دار ($P < 0.05$) بود. لذا به نظر می‌رسد در شرایط پایدار سلول از گلیسین بتائین (علاوه بر گلیسرول) برای دستیابی به هموستازی استفاده می‌کند. سنتز گلیسین بتائین می‌تواند توسط هر دو عامل خشکی و شوری بوسیله بیان بالایی از کولین منواکسیژناز و بتائین آلدئید دهیدروژناز القا شود. گلیسین بتائین با رشد گیاهان در محیط‌های خشک و شور همبستگی بالایی دارد. به علاوه تاثیرات گلیسین بتائین بیش از دیگر محلول‌های سازگار در پایداری ساختمان آزمون‌ها و ترکیبات پروتئینی و پایداری غشاها در شرایط خشکی، شوری و دماهای بالاست، به علاوه با تثبیت ترکیبات پروتئینی فتوسنتز را حفظ می‌کند. حفاظت کننده‌های اسمزی از جمله گلیسین بتائین بیشتر در سیتوپلاسم انباشته می‌شوند (Reddy, 2004).

در تیمار ۷/۵ درصد بیشترین رشد مشاهده می‌شود (شکل ۱۲). افزایش معنی دار گلیسین بتائین در این شرایط نشان می‌دهد که گلیسرول تنها عاملی نیست که سلول دونالیلا برای تنظیم اسمزی از آن سود می‌برد. کاهش توانایی سلول دونالیلا در تولید این عامل به هر دلیلی که رخ دهد، رشد را کاهش خواهد داد.

مقدار پرولین در ۲/۵ و ۱۲/۵ درصد افزایش معنی داری نسبت به تیمار ۷/۵ درصد می‌یابد ($P < 0.05$). به نظر می‌رسد اگرچه سلول دونالیلا برای تنظیم اسمزی از گلیسرول استفاده می‌کند، در شرایط مناسب گلیسین بتائین نیز در این جلبک کاربرد دارد (احتمالاً برای تنظیم اسمزی). اما در شرایط تنش (به همراه کاهش سنتز گلیسین بتائین)، سنتز پرولین افزایش می‌یابد. پرولین، پایداری بعضی از آزمون‌های سیتوپلاسمی و میتوکندریایی را بهبود می‌بخشد و حلالیت پروتئین را افزایش می‌دهد (Kazuko, 2001). بنا بر این افزایش آن، به همراه افزایش آزمون‌های آنتی اکسیدان، با نظر Kazuko در سال ۲۰۰۱ همخوانی دارد.

پذیرفته شده است که پرولین در مکانیسم‌های بردباری به تنش دخیل می‌باشد (Lutts, 1999). ظاهراً این پدیده تایید می‌کند که کمبود نمک در محیط کشت نسبت به شرایط بهینه نیز، برای جلبک دونالیلا نوعی تنش محسوب می‌گردد. سنتز پرولین تحت تنش‌های محیطی مانند خشکی، شوری بالا، دمای بالا، یخزدگی، تابش اشعه ماورا بنفش، اثرات آلودگی هوا و فلزات سنگین افزایش می‌یابد (Kazuko, 2001) با توجه به آنکه پرولین به عنوان محلول سازشی در حفظ اسمز و کاهش اسیدیته سیتوپلاسمی نقش دارد و همچنین در شرایط تنش به عنوان بخش ضروری ساختار پروتئین‌های ساختمانی دیواره سلول‌های گیاهی و پایدار کننده ماشین سنتز پروتئین‌ها محسوب می‌شود و نیز در پاکسازی رادیکال‌های آزاد و

هیدروکسی رادیکال‌ها موثر است و به عنوان منبع ذخیره کننده نیتروزن و کربن (Fukutaku, 1984) به کار می‌رود، افزایش آن در شرایط غیر بهینه، احتمالاً بیانگر راهکار سلول دونالیلا برای رفع تنش می‌باشد. بیشترین مقدار رنگیزه‌های کلروفیل a، کلروفیل b و بتا کاروتن در تیمار بهینه دیده می‌شود. اما افزایش درصد کلروفیل b در تیمارهای غیر بهینه، نشان می‌دهد سلول برای رفع تنش اقدام به تغییر ترکیب آنتن‌های فتوسنتزی، در جهت افزایش فتوسیستم ۲ می‌نماید. حضور مقدار زیاد بتا کاروتن، می‌تواند به تعبیری، یاریگر توفیق در رفع تنش و تکثیر بیشتر باشد. آنالیز آماری نشان داد که فعالیت کاتالازی با فعالیت اسکوربات پر اکسیدازی و پرولین در سطح معنی داری همبستگی مثبت نشان می‌دهد. سایر تحقیقات نشان داده است که پرولین می‌تواند صدمات ناشی از خشکی و شوری را بر غشا سلولی کاهش دهد. لازم به ذکر است که کاهش و افزایش نمک نسبت به غلظت بهینه برای دونالیلا سالینا تنش محسوب می‌گردد. بین تغییرات پرولین و فعالیت آنزیم‌های انتی اکسیدان نیز همبستگی مثبت مشاهده شد. این امر می‌تواند تایید کند که جلبک دونالیلا سالینا از طریق سنتز پروتئین‌های انزیمی انتی اکسیداتیو به مقابله با اثرات شوری و یا به عبارتی سازش با آن می‌پردازد.

در این پژوهش بین مقادیر کلروفیل a و گلیسین بتائین و بتا کاروتن همبستگی مثبت مشاهده شد. اما بین مقدار بتا کاروتن و کلروفیل a همبستگی منفی مشاهده شد. این نتیجه در سایر مطالعات نیز دیده شده است (Nikookar, 2004). میتوان گفت در شرایط غیر بهینه آنتن‌های فتوسنتزی در این جلبک ترکیب متفاوتی پیدا می‌کند (افزایش مقدار کلروفیل b نسبت به کلروفیل a).

منابع

حسینی ز. و ساطعی، آ. ۱۳۸۵. تغییرات رشد، برون ریزش آمونیم، فعالیت نیترات ردوکتازی و محتوای رنگیزه‌های فتوسنتزی در جلبک دونالیلا سالینا، تحت تاثیر شوری، نور ممتدو تناوب نور، پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرگان.

Arrigoni, 1992. Ascorbate system in plant development J. Bionergy. Biomember. 26:407-409.

Ben-Amotz, A., Gressel, J. & Avron, M. 1987. Massive accumulation of phytoene induced by norflurozon in *Dunaliella bardawil* (Chlorophyceae) prevents recovery from photoinhibition. Journal of phycology, 23:176-181.

Bates, I. S., Waldereen, R. P. & Trear, I.D. 1973. Rapid determination of free proline in water stress. Studies Plant of Soil, 34:205-207.

Chance, B. & Maehley, A. 1955. Assay of Catalases and Peroxidases. Meth. Enzymol., 2: 764.

Fisher, M., Pick, U. & Zamir, A. 1994, A salt-induced 60-kilodalton plasma membrane protein plays a potential role in the extreme halotolerance of the alga *Dunaliella*. Plant Physiol., 106:1359-1365.

Fukutaku, Y. & Yamada, Y. 1984. Sources of proline nitrogen in water-stressed soybean

- (*Glycine max*). II. Fate of ^{15}N -labelled protein. *Physiol. Plant.*, 61:622-628.
- quantitative **Ginannoto, C.N. & Ries, S.K. 1977.** Superoxid dismutase: II. Purification and relationship with water-soluble protein in seedlings. *Plant Physiol.*, 95:315-318.
- Jahnkel, L., S. & White, A. L. 2004.** Long term hypo saline and hyper saline stresses produce distinct antioxidant responses in the marine alga *Dunaliella Salina*, *J. of Plant Phsiol.*, 160: 1193-1202.
- Jensen, A. 1978.** Chlorophyll and carotenoid: Hand book of physiological and biochemical method. Cambridge Univ. Press.
- Jin, E., Jurgen, E. W., Polle, Hong Kum L., Sang Min H. & Man C. 2003.** Xanthophylls in Microalgae: From Biosynthesis to Biotechnological Mass Production and Application. *J. Microbiol. Biotechnol.* , 13(2): 165-174.
- Johnson, M. K., Johnson, E. J., Mac Elory, R.D., speer, H.L. & Bruff, B.S. 1968.** Effects of salt on the hemophilic alga *Dunaliella viridis* .*J. Bacteriol.*, 95: 1461-1468.
- Katz, A. & Pick U. 2001.** Plasma membrane electron transport coupled to Na^+ extrusion in the halotolerant alga *Dunaliella*. *Biochim Biophys. Acta*, 1504423-31.
- Kazuko, Y.S. 2001.** Biological function of proline in osmotolerance revealed in Antisense transgenic plants. *J. IRCAS, new letter*, no.27.
- Koroi, S. A. A. 1989.** Gel elektropheres tisch and spephotometris echoe unter.uchangen zomeinfluss der temperature auf straktur and aktritat der amylase and peroxidase isoenzyme. *Physiol. Veg.*, 20:15-23.
- Lutts, S., Majerus, V. & Kinet, J. M. 1999.** NaCl effect on proline metabolism in rice (*Oryza Sativa*) seedlings. *Physiologia Plantrum*, 105:450-458.
- . Influence of salinity on the growth, **M. 2004 Nikokar, k., Moradshahi, A. & Kharati,** pigmentation and ascorbat peroxidase activity of *Dunaliella salina*, *Iranian journal of technology, Transaction A*, 28, No. A1.
- Richmond, A. 1986.** Handbook of microalgae mass culture. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Sairam, R. L., Rao, K.V. & Srivastava, G.C. 2002.** Differential response of wheat genotypes to long term salinity stress in relation oxidative stress, antioxidant activity and osmolyte concentration. *Plant Sci.*, 163:1037-1049.
- William, W.P., Brain, A.P.R. & Dominy, P.J. 1992.** Induction of non-bilayer lipid phase in chloroplast thylakoid membranes by compatible solutes and its relation to separation stability of photosystem II. *Biochem. Biophys. Acta.*, 1099: 137-141. the thermal