بررسی رشد، برون ریزش آمونیوم و فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز در جلبک سبز *Dunaliella salina* طی تنش‌های شوری در شرایط محدودیت نور و دی اکسید کربن

*زهرا حسینی کلبادی[۱]، آرین ساطعی[۲]، شادمان شکروی[۲]، فریبا امیرلطیفی[۱]، مریم صفایی[۱]، عماد حسینی کلبادی[۳]

۱. عضو باشگاه پژوهشگران جوان، دانشگاه آزاد اسلامی گرگان
۲. گروه زیست شناسی، عضو هیئت علمی دانشگاه آزاد گرگان
۳. دانشجوی کارشناسی ارشد پژوهش دانشگاه آزاد رودهن

چکیده

امکان استفاده از کلروفیت *Dunaliella* sp. در بیوتکنولوژی کشاورزی مورد بررسی قرار گرفته است. برای دستیابی به این منظور قابلیت بقا، رشد و برون ریزش آمونیوم که از شاخص‌های مهم استفاده در بیوتکنولوژی می‌باشد و همچنین فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز در رابطه با محدودیت دی اکسید کربن بررسی شده است. نمونه پس از شناسایی در محیط کشت جانسون تحت شدت نور پایین در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد و روشنایی سفید مداوم قرار گرفت. تیمارهای شوری از نوع کلرورسدیم و به میزان ۷/۵٪، ۱۵٪، ۳۰٪، ۵۰٪ بود و یک تیمار هم محیط کشت بدون نمک در نظر گرفته شد. رشد بر اساس کدورت‌سنجی در طول موج ۷۵۰ نانومتر به کمک دستگاه اسپکتروفتومتر تعیین گردید. هوادهی به کمک پمپ‌های اکواریومی انجام شد. در مرحله بعد میزان برون‌ریزش آمونیوم و فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز در تیمارهای نامبرده مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که بیشترین رشد مربوط به شوری ۷/۵٪ در مدت زمان طولانی بوده است، در حالی که که نمونه توانایی بالایی برای رشد در شوری اشباع در مدت زمان کوتاه را نیز دارد. همچنین برون ریزش آمونیوم نیز در این شوری (۵۰٪) در شرایط هوادهی بیشترین میزان می‌باشد. در صورتی که کمترین میزان فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز مربوط به این شوری (۵۰٪) است. از سویی دیگر یافته‌های آماری بیان می‌دارد که بین برون ریزش آمونیوم و فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز همبستگی وجود ندارد. نتایج کلی نشان داد که در مقایسه با ریز جلبک‌های دیگر، *Dunaliella* sp. به علت توانایی آن در برون ریزش آمونیوم و رشد در دامنه‌های وسیعی از شوری‌های بالا و پایین می‌تواند یک کاندید جدی برای استفاده به عنوان کود بیولوژیک باشد.

کلمات کلیدی: برون ریزش آمونیوم، جلبک سبز، دونالیلا، شوری، نیترات ردوکتاز

*e.mail: Zahra.hosseini@yahoo.com

مقدمه

یک صد سال از شناسایی جلبک سبز تک سلولی جنس *Dunaliella*، که توانایی سازگاری به محیط‌های بسیار شور را دارد، می‌گذرد. نخستین بار در سال ۱۸۳۸ در فرانسه توسط Michel Felix Dunal شناسایی شد که بعدها در سال ۱۹۰۵ توسط Teodoresco به نام همین کاشف نامگذاری گردید (Teodoresco، ۱۹۰۵). دونالیلا موجودی مطرح برای مطالعه سازگار شدن به شوری در جلبک‌ها می‌باشد. طور کلی می‌توان گفت که جلبک سبز دونالیلا دارای دو خاصیت غیر معمول می‌باشد. اول اینکه این جلبک‌ها می‌توانند در غلظت‌هایی از ۰/۵ M تا ۵ M رشد کنند. دوم اینکه این جلبک‌ها محدوده گسترده‌ای از شوری را از طریق سنتز گلیسرول که آن را در سلول‌هایشان ذخیره می‌کنند می‌توانند تحمل کنند (Ben-Amotz & Avron, 1973؛ Ginzburg, 1978).

اندازه سلول با توجه به شدت نور و شرایط رشد تغییر می‌کند (Riisgard, 1987; Einspahr, 1981). بسیاری از گیاهان می‌توانند به شوری‌های پایین یا متوسط سازگار شوند اما رشدشان شدیداً در ۲۰۰ میلی مولار (200mM) NaCl محدود می‌شود (Hasegawa et al. 2000). در شوری‌های زیاد در آب‌های طبیعی تنها عامل اصلی که تعداد دونالیلا را محدود می‌کند، غلظت مواد غذایی و CO_2 می‌باشد. البته باید در نظر داشت که شوری‌های زیاد رشد را کاهش می‌دهند، اما آن را متوقف نمی کند. نیترات ردوکتاز یکی از آنزیم‌های کلیدی در فرایندهای مربوط به مصرف نیترات می‌باشد. در یوکاریوت‌ها سه شکل از نیترات ردوکتاز شناسایی شده است که دو مورد از آنها در جلبک‌های یوکاریوت و گیاهان آلی وجود دارد (Berges, 1997). مطالعات نشان می‌دهد که آمونیوم می‌تواند بر روی جذب نیترات اثر بگذارد، همچنین در مواردی پیشنهاد می‌شود که فعالیت نیترات ردوکتاز به وسیله آمونیوم بازداشته نمی شود که این مورد در دوتاژکی‌ها دیده شده است (Harrison, 1976; Hochman, 1982). در اینجا به بررسی فعالیت این آنزیم در نمونه مورد مطالعه در شرایط استرس و بهینه پرداخته شد.

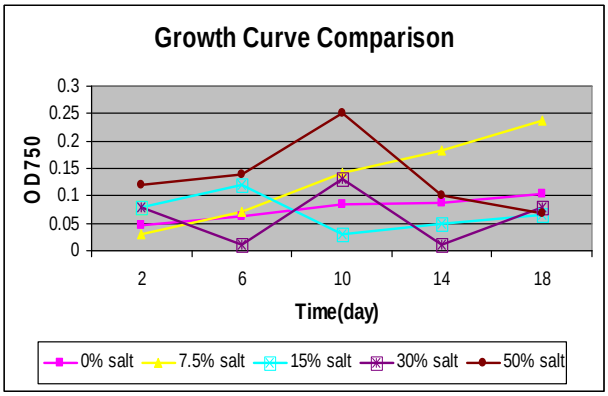
مواد و روش‌ها

نمونه پس از شناسایی در محیط کشت جانسون با pH ۷/۵ (جانسون و همکاران، ۱۹٦۸) تلقیح وکشت داده شد. شدت نور پایین بوده است (٤ میکرو مول کوانتا بر متر مربع در ثانیه). تیمار های شوری ۷/۵٪، ۱۵٪، ۳۰٪، ۵۰٪ به نمونه داده شد و یک تیمار هم محیط کشت بدون نمک در نظر گرفته شد. رشد به کمک دستگاه اسپکتروفتومتر بر اساس کدورت سنجی (Thiel & Pratte, 2001) در طول موج ۷۵۰ نانومتر (Ernest et al. 2005) اندازه‌گیری شد. در این مرحله هوادهی نیز صورت گرفته است. تست برون ریزش آمونیوم (Solarzano, 1969) نیز در مرحله بعد در این تیمار ها انجام شد. در این مرحله برون ریزش آمونیوم در دو شرایط هوادهی و بدون هوادهی مورد بررسی قرار گرفت. در مرحله آخر فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز در نمونه هایی که به صورت روزانه هوادهی می‌شدند (هر ۵ مورد تیمار) نیز اندازه‌گیری شد (Sym, 1984). نتایج حاصل سه بار تکرار می‌باشد. رسم نمودارها توسط نرم‌افزار Excel و تفاوت های تیماری در سطح معنی‌داری P=0.05 آنالیز شدند.

نتایج

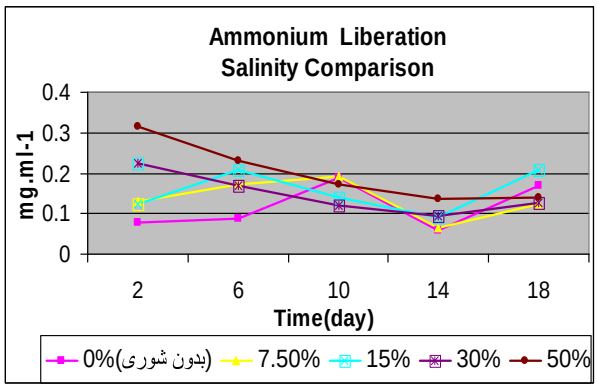
در شوری ۵۰٪ (شکل ۱) دیده می‌شود که نمونه رشد خود را از روز اول شروع می‌کند. در این شوری رشد نمونه در روز ۱۰ به بیشترین مقدار می‌رسد که در مقایسه با شوری‌های پایین (شوری ۷/۵٪) متفاوت می‌باشد. در شوری‌های پایین دیده شده است که نمونه در روز هشتم به اوج رشد خود می‌رسد (شکل ۱). در شوری ۵۰٪ مشاهده می‌گرددکه نمونه پس از به اوج رسیدن رشد در روز دهم

کاهش رشدی را تا روز دوازدهم نشان می‌دهد. از روز دوازدهم تا روز هیجدهم رشد کم می‌شود. همچنین به نظر می‌رسد زمانی که نمونه را به محیطی با ۱۰٪ نمک یا بیشتر وارد کنیم دچار نوعی تنش اولیه می‌شود و بنابراین رشد تا روز ششم کاهش پیدا می‌کند (شوری ۱۵٪).



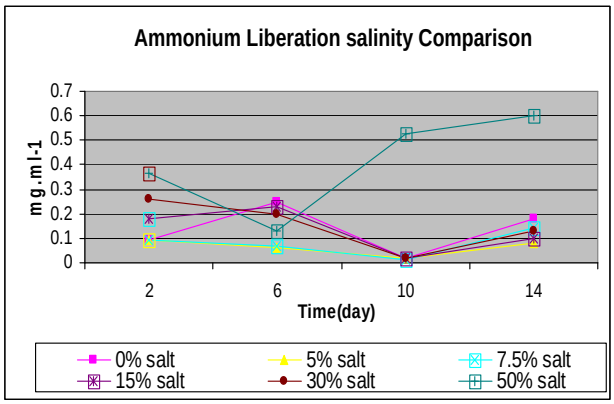
شکل ۱: مقایسه رشد جلبک *Dunaliella salina* در تیمارهای با شوری‌های ۰٪، ۷/۵٪، ۱۵٪، ۳۰٪ و ۵۰٪ با هوادهی

مقایسه شکل برون ریزش آمونیوم (شکل ۲) در این نمونه با شکل رشد آن (شکل ۱).نشان می‌دهد زمانی که نمونه رشد می‌کند به صورت هم زمان برون ریزش آمونیوم آن نیز آغاز می‌گردد. در روز هشتم که نمونه بیشترین رشد را دارد شکل برون ریزش آمونیوم نیز در همان روز به بیشترین مقدار می‌رسد. که بعد از یک کاهش دوباره برون ریزش اوج می‌گیرد و این بار در روز دوازدهم می‌باشد.



شکل ۲: مقایسه برون ریزش آمونیوم جلبک *Dunaliella salina* در شوری ۰٪، ۷/۵٪، ۱۵٪، ۳۰٪ و ۵۰٪ با هوادهی

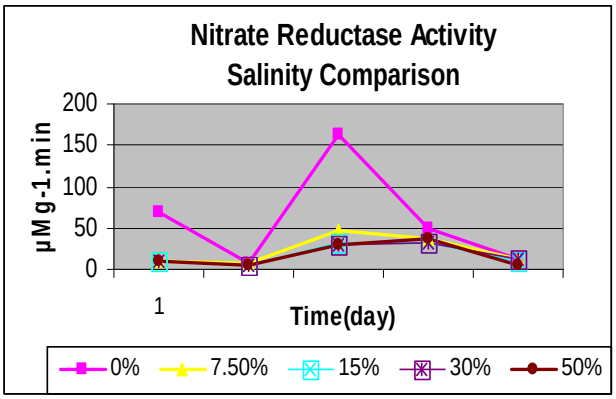
مقایسه برون ریزش آمونیوم در دو شرایط هوادهی و بدون هوادهی نشان می‌دهد که الگوی برون ریزش آمونیوم در این دو شرایط تغییر می‌کند. به بیانی دیگر همانگونه که در دو شکل ۱ و ۲ مشاهده می‌گردد میزان برون ریزش آمونیوم در شرایط هوادهی و بدون هوادهی تفاوت معنی داری ندارند. اما الگوی برون ریزش آمونیوم در شوری ۵۰٪ در دو شرایط نامبرده متفاوت می‌باشد. میزان برون ریزش آمونیوم در شرایط بدون هوادهی در شوری ۵۰٪ بیشتر می‌باشد.



شکل ۳: مقایسه برون ریزش آمونیوم جلبک *Dunaliella salina* در شوری های۰٪، ۵٪، ۷/۵٪، ۱۵٪، ۳۰٪ و۵۰٪ در شرایط بدون هوادهی

مقایسه برون ریزش آمونیوم نمونه در شوری ۷/۵٪ و ۰٪ (نمودار۲) اختلاف آشکار برون ریزش آمونیوم در این دو شرایط محیطی را نشان می‌دهد.

به نظر می‌رسد که در تمامی تیمارها و نیز شاهد نمونه از روز دوم تا روز ششم کاهشی در فعالیت این آنزیم نشان می‌دهد و از روز ششم نمونه فعالیت آنزیم را افزایش می‌دهد. آنچه که از نمودارها مشخص می‌گردد این است که نمونه زمانی که در محیط کشت بدون نمک (شوری۰٪) قرار دارد میزان فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز در آن زیاد است و در واقع نسبت به دیگر تیمارها بیشترین میزان فعالیت را داراست.



نمودار۲: مقایسه فعالیت نیترات ردوکتاز در جلبک *Dunaliella salina* در شوری‌های ۰٪، ۷/۵٪، ۱۵٪، ۳۰٪ و ۵۰٪ با هوادهی

بحث

نمونه زمانی که در محیط‌های کشت با شوری بالا قرار می‌گیرد (بالاتر از ۱۰٪) به مانند شوری‌های پایین توانایی خوبی برای رشد دارد. در واقع می‌توان گفت که نمونه توانایی خوبی برای رشد در محدوده وسیعی از صفر تا شوری اشباع را دارد، ولی میزان رشد و آهنگ رشد کمی متفاوت از هم می‌باشد. با مقایسه نمودارها آنچه که قابل توجه می‌باشد رشد نمونه در شوری ۰٪ می‌باشد. اگر چه این رشد در مقایسه با شوری‌های اعمال شده مثل ۷/۵٪ بسیار کمتر است، اما این میزان رشد نمونه در شرایطی که نمونه سازگاری به شوری دارد قابل توجه است. از سویی دیگر یافته‌های آماری حاکی از آن است که بین رشد نمونه در محیط کشت بدون نمک (۰٪) و دیگر تیمارها اختلاف معنی داری در حد ۰/۰۵ وجود دارد. به طور کلی می‌توان گفت که نمونه توانایی رشد را هم در شوری‌های بالا و هم در شوری‌های پایین دارد. ولی رشد نمونه در شوری پایین (۷/۵٪) نسبت به بقیه موارد بیشتر و بهتر است. از سویی دیگر رشد نمونه در شوری ۷/۵٪ در مقایسه با شوری ۵۰٪ بهتر بوده و اختلاف معنی‌دار می‌باشد. به نظر می‌رسد که شوری ۵۰٪ سبب تحریک مطلوب رشد در شرایط آزمایشگاهی گردیده است. به این ترتیب با نمونه ای مواجه هستیم که در شوری پایین (در حد و حدود متعارف زیستگاه‌های خشکی) با آهنگی مشابه به شرایط شوری بالا و بسیار بالا رشد می‌کند (سلطانی و همکاران، ۱۳۸۱).

قابلیت سازگاری در این سویه ممکن است ناشی از نوترکیبی یا پدید آمدن انعطاف و تغییر در محتوای متابولیسم باشد. اختلاف در الگوهای رشد سویه‌های مختلفی که از نقاط مختلف جمع آوری شدند این فرضیه را تایید می‌کند که دونالیلا نمی تواند به شوری خاصی سازگار شود، اما می تواند به دامنه وسیعی از شوری مقاوم شود (Garsia et al. 2007). Johnson et al. 1968 اعلام کردند که دونالیلا توانایی رشد در شوری اشباع را دارد (این مورد در محیط طبیعی اتفاق می‌افتد)، در حالی که بهینه رشد همیشه در شوری‌های کمتر اتفاق می‌افتد، که این مورد با یافته‌های ما در مورد توانایی این نمونه برای رشد در شوری اشباع مطابق است. از سویی دیگر بهینه رشد برای نمونه مورد مطالعه ۷/۵٪ اعلام شد. در واقع می‌توان ادعا کرد که گرایش به شوری[1]، چه شوری‌های بالا و چه شوری پایین برای هر سویه به صورت ذاتی است و در سویه‌های مختلف متفاوت می‌باشد. به نظر می‌رسد که نمونه در زمان رشد به آمونیوم تولید شده در داخل سلول احتیاج داشته و بنابراین آنرا صرف فعالیت‌های متابولیسمی خود می‌کند و بنابراین میزان برون ریزش آمونیوم آن کمتر می‌گردد.

در فاز لگاریتمی رشد نمونه وهمچنین در اولین مرحله فاز ایستایی، در شاهد و تیمارهای شوری، افزایش فعالیت نیترات ردوکتاز و برون ریزش آمونیوم دیده می‌شود. همچنین در آخر مرحله ایستایی رشد، برون ریزش آمونیوم بدون افزایش در فعالیت نیترات ردوکتازی بیشتر می‌شود. افزایش شوری ابتدا باعث افزایش برون ریزش آمونیوم می‌گردد ولی به تدریج و با رسیدن به انتهای فاز ایستایی، اختلافات کاهش می‌یابد. همچنین شوری باعث کاهش فعالیت نیترات ردوکتاز به ویژه در آخر فاز مزبور می‌شود.

[1]. Halophytism

بررسی نمودارهای رشد و فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز به صورت هم زمان نشان می‌دهد زمانی که نمونه در فاز رشد خود قرار دارد بین رشد و فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز همبستگی وجود دارد. به طور کلی می‌توان گفت که برون ریزش آمونیوم اگر به عنوان شاخصی برای توانمندی متابولیسم نیتروژن در نظر گرفته شود (سلطانی و همکاران ۱۳۸۱)، در سویه مورد مطالعه از نظر میزان و آهنگ قابل توجه است به نظر می‌رسد که شوری به طور کلی در شرایط نور محدود و محدودیت دی اکسید کربن، سبب کاهش برون ریزش آمونیوم می‌گردد. این مسئله می‌تواند ناشی از این باشد که فعالیت متابولیسم گلیسرول در این سویه، نیازمند ذخایر کربن و نیتروژن است و از این رو نمونه در هنگام قرار گرفتن در شوری (چه اندک و چه بالا)، با کاهش برون ریزش (در مقایسه با شرایط بدون نمک)، به نوعی صرفه‌جویی[1] در حفظ منابع نیتروژن خود دست زده است. حداقل برون ریزش (بر مبنای زمان روزانه) در شوری بالا (۵۰٪) مشاهده می‌شود و این مشاهده تاییدی بر فرض مذکور است.

نتیجه‌گیری

روی هم رفته، سویه مورد مطالعه دارای خواصی است که در یک نگرش کلی آنرا از نظر بیوتکنولوژی کشاورزی ارزشمند جلوه می‌دهد. این سویه قادر است در شوری‌های متفاوت و با اختلاف زیاد، بقا و رشد خود را حفظ نماید. سوای این قادر است آمونیوم را به طور نسبی در همه شوری‌های اعمال شده برون ریزش نماید. دارای مکانیسم تراکمی فعال دی اکسید کربن است که محدودیت نورمانع از القای آن ـ حداقل به طور نسبی ـ نمی‌گردد. سوای این، اثر توام محدودیت نور، دی اکسید کربن و شوری نمی تواند مانع از بقاء و فعالیت‌های متداول فیزیولوژیک و متابولیک آن گردد. این عوامل مجموعاً بکار گیری کامل یا نسبی نمونه را در کشاورزی سنتی معقول جلوه می‌دهد.

[1]. starvation

سپاسگزاری

نویسنده بر خود لازم می‌داند که از خانم ها میرکریمی و کیایی به جهت همکاری صمیمانه شان در محیط آزمایشگاه تشکر و قدردانی نماید.

منابع

سلطانی، ن.، شکروی، ش. و فتوت احمدی، ع، (۱۳۸۱). جمع آوری، شناسایی و بررسی اکولوژیک جلبک سبزدونالیلا. گزارش پایانی طرح پژوهشکده علوم پایه کاربردی. جهاد دانشگاهی شهید بهشتی.

Ben- Amotz, A. and Avron, M. (1973). The rode of glycerol in the osmotic regulation of the halophilic alga *Dunaliella Parva*. *Plant physiol*, 51: 875-878.

Berges, J. A. (1997). Algal nitrate reductases. Exr.J.*Phycol*, 32: 3-8.

Einspahr, K.J., Peeler, T.C and G.A.Jr. Thompson. (1988). Rapid changes in polyphosphoinositide metabolism associated with the response of *Dunaliella salina* to hypoosmotic shock. Journal of *Biological Chemistry*, 263: 5775-5779.

Ernest, I., Deicher, M., Herman, P.M.J. and Vollenzien, U.I.A. (2005). Nitrate and Phosphat effect cultiviability of Cyanobacteria from inverment with low nitriant levels, applied and invoermental microbiology,Vol.71,no.6 pp :3379-3383

Garsia, F., Freile-Pelegrin, Y. and Robledo, D. (2007). Physiologycal characterization of *Dunaliella* sp. (*Chlorophyta*, *Volvocales* from Yucatan, Mexico. *Bioresource Technology*, 98:1359-1365.

Ginzburg, B.Z. (1978). In Energitics and Structure of Halophilic Microorganisms (Kaplan, S.R. and Ginz-burg, M., eds.), Elsevier/North-Holland Biomedical press. Amesterdam. PP, 543-560

Harrison, W.G. (1976). Nitrate metabolism of the red tide dino?agellate *Gonyaulax polyedra* Stein. J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 21: 199-209.

Hasegawa, P.M., Bressan, R.A., Zhu, J. and Bohner, H.J. (2000). Plant Cellular an Molecular Responses to high Salinity. Annu Rev *Plant Physiol Plant Mol Biol*, 51: 463-499.

Hochman, A. (1982). Studies of nitrate reductase in the fresh water dino? agellate *Peridinium cinctum*. Arch. *Microbi*o., 133: 62-65.

Johnson, M.K., Johnson, E.J., Mac Elroy, R.D., Speer, H.L. and Bruff, B.S. (1968). Effects of Salt on the halophilic alga *Dunaliella Viridis*. J *Bacteriol*, 95: 1461-1468.

Riisgard, H.U. (1981). Cell volume responses in the naked marine flagellate *Dunaliella* marina transferred from darkness to light of different intensities. Bot.Mar, 24, 657.

Solarzano, L. (1969). Determination of ammonia in natural waters by the phenol-hypochlorite method. Limno oceanogr, 14: 799-801

Sym, G.J. (1984). Optimisation of the in vivo assay conditions for nitrate reductase in barley (Hordeum Vulgar L.V.Igri). J. Sci. Food Agric, 725-730.

Teodoresco, E.C. (1905). Organization et developpement du *Dunaliella.* Nouveau genre de Volvocacee- Polyblepharidee. Beh Z Bot centralbl. Bd, XV.215-232.

Thiel, T and Protte, B. (2001). Effect on Heterosist differentiation of nitrogen fixation invegtetive cell of the Cyanobacterium *Anabeba* variable, ATCC 29413, Jornal of *bacteriology*, vol. 183, NO, 1 pp:280-286.

Study of growth, ammonium release and nitrate reductase activity of green algae *Dunaliella salina* in salinity stress, low light and CO_2 conditions

Z. Hosseini K.,[1] A. Sateei.,[2] Sh. Shokravi.,[2] F. Amirlatifi[1]., M. Safaei.[1] and E. Hosseini K[3]

1- Department of Biology, Islamic Azad University, Gorgan, Iran Member of Young Reaserchers Club
2- Department of Biology, Islamic Azad University, Gorgan, Iran

Abstract

The ability of green microalgae, *Dunaliella salina* for existence, growth, nitrat reductase activity and ammonium release in low light, ambient CO_2 and saline condition was studied for a better understanding of it is biotechnological importance. Samples were cultivated in Johnson medium whit NaCl, 7.5, 15, 30 and 50% or without NaCl(control), 30˚C±1˚C, continious white light, 1500 lux, provided by fluorescent lamps and were aerated continiously using aquarium pumps. Based on the results of the present research, the best growth obtained in NaCl 7.5% for along term period, although in short term, a very high growth rate was obtained in NaCl 50% (Saturated salinity). Ammonium release was maximum in NaCl 50% and the nitrate reductase activity was minimum in the same salinity but there was no statistically significant correlation between ammonium release and nitrate reductase activity. The ability of *Dunaliella salina* in releasing high amount of ammonium and growth in low and high salinity makes it an important candidate as a new biofertilizer.

Keywords: Ammonium release, *Dunaliella*, Green algae, Nitrate reductase, Salinity