تأثیر نوع منبع نیتروژنی بر برخی خصوصیات فیزیولوژیک دو سویه جلبک آب شور *Dunaliella*

رؤیا محمدخانی پردنجانی و *مریم مددکار حق‌جو
گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه لرستان، خرم آباد
(تاریخ دریافت: ٩٣/٠٤/٢١، تاریخ پذیرش نهایی: ١٣٩٣/١٠/١٣)

چکیده:

با توجه به نقش مهم منبع نیتروژنی در رشد و حیات جلبک‌ها، بررسی مقایسه‌ای اثر سه منبع نیتروژنی KNO_3، NH_4Cl و KNO_3+NH_4Cl، بر خصوصیات رشدی و فیزیولوژیک دو سویه *Dunaliella* (جلبک آب شور)، شامل یک سویه استخراج شده از باتلاق گاوخونی اصفهان و یک سویه غیر بومی*D. bardawil*-UTEX 2538، در غلظت‌های متفاوت نمک NaCl انجام شد. بیشترین سرعت رشد و تقسیم سلولی مربوط به سویه *D. bardawil* بوده و بالاترین نرخ رشد برای هر دو سویه، در غلظت ٠/٥ مولار نمک و در منبع نیتروژنی KNO_3 مشاهده شد. اکثر کاهش‌ها در روز ٨ ام آزمون‌ها مشاهده گردید و افزایش مقادیر کلروفیل‌های *a* ، *b* و کلروفیل کل در تیمار KNO_3 در غلظت‌های بالاتر نمک (٠/٥ و ٣ مولار) مشاهده شد. کمترین اوزان تر در غلظت ٠/٥ مولار با سرعت تقسیم زیاد مشاهده شد. تیمار NH_4Cl سبب کاهش سرعت رشد سلول‌ها در دو غلظت ٠/١ و ٣ مولار در روز هشتم در سویه *D. bardawil* گردید. اما کاهش‌های قابل توجه در هر دو سویه در میزان کلروفیل‌های *a*، *b* کلروفیل کل، بتاکاروتن و کاروتنوئید کل به همراه افزایش شدید پروتئین، صرفا در شوری بیشتر یعنی غلظت M ٣ نمک مشاهده شد. افزایش قابل توجه کلیه رنگدانه‌ها و پروتئین از روز هشتم به بعد در غلظت مذکور مشاهده گردید. تیمار KNO_3+NH_4Cl، سبب بهبود وضعیت سلول‌ها نسبت به تیمار NH_4Cl شد. بر اساس نتایج بدست آمده تفاوت پاسخ‌ها به منابع نیتروژنی در *D. bardawil*، از سویه ایرانی بیشتر بوده و افزایش‌ها در برخی ترکیبات اندازه گیری شده در این سویه در روز ١٦ ام رشد ملاحظه می‌شود. بطور کلی به نظر می‌رسد که در هر دو سویه، تیمار آمونیوم سلول‌ها را نسبت به مقادیر زیاد نمک حساس نموده و پس از یک دوره پاسخهای اولیه با افت مقدار رنگدانه‌ها و افزایش تولید پروتئین، روند افزایشی ترکیبات مورد نظر را می‌توان نوعی سازگاری سلول‌ها با محیط تلقی کرد.

واژه‌های کلیدی: پروتئین، *Dunaliella*، رنگدانه، شوری، منبع نیترات، منبع آمونیوم.

مقدمه:

نیتروژن یکی از عناصر مهمی است که در متابولیسم و رشد گیاهان و بسیاری از فرایندهای شیمیایی دخیل بوده و به طور مستقیم در سنتز آمینواسیدها، پروتئین‌ها، اسیدهای نوکلئیک، کلروفیل و سایر ترکیبات سلولی که برای رشد و تکوین گیاه ضروری‌اند، مشارکت می‌نماید (Novoa and Loomis, 1981). تثبیت نیتروژن توسط گیاهان نیازمند جذب NO_3^- است. این ترکیب سپس به NO_2^- و NH_4^+ تبدیل شده و در نهایت NH_4^+ در ساخت ترکیبات آلی شرکت می‌کند (Sivasankar and Oaks, 1996; Stitt, 1999). گیاهان عالی قادرند از نیترات و آمونیوم به عنوان منابع نیتروژن استفاده کنند. برخی از آن‌ها نیتروژن را به شکل نیترات و برخی به شکل آمونیوم ترجیح می‌دهند و در بیشتر گیاهان برتری جذب یکی از آن‌ها بسته به مرحله رشد گیاه ممکن است متفاوت باشد (Baligar and

*نویسنده مسؤل، نشانی پست الکترونیکی: madadkar.m@lu.ac.ir

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-12-12]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1394.4.13.12.4]

Schanffert, 1993). استفاده از آمونیوم به عنوان منبع نیتروژنی واحد، سبب سمیت در گیاه شده و نرخ رشد را کاهش می‌دهد. در مقابل، اکثر گیاهان مقادیر نیترات را تحمل کرده و آن را درون بافت‌هایشان انباشته می‌کنند (Roosta and Schjoerring, 2007).

انباشت آمونیوم در محیط‌های پرورش ماهی که بصورت آکواریوم بوده و آب آنها مرتبا عوض نمی‌شود، در اثر تجزیه پسماند غذای ماهی‌ها و یا فضولات آنها و یا تخلیه مستقیم از طریق آبشش ماهی‌ها صورت گرفته و به خاطر سمیت زیاد، شرایط را برای پرورش و رشد آنها نامساعد می‌سازد. در این رابطه گاهی از برخی باکتری‌های غیر مضر که تجزیه کننده آمونیوم می‌باشند، برای برطرف کردن این مشکل کمک گرفته می‌شود. در واقع اکثر ماهی‌ها می‌توانند مقادیر قابل توجهی نیترات را در محیط تحمل کنند ولی آمونیوم دارای سمیت بیشتری است. فیلتر کردن آب با استفاده از رشد دادن جلبک‌ها به منظور مصرف نیترات نیز در موارد مختلفی به کار گرفته شده، اگرچه در موارد مدیریت نشده، کاهش اکسیژن آب به جهت رشد سریع و شکوفایی جلبک‌ها، می‌تواند تاثیر عکس بر حیات آبزیان اعمال نماید (Hallman, 1997).

امروزه از آمونیوم به عنوان یک پاک کننده و تمیز کننده نیز به طور گسترده در صنایع شیمیایی استفاده می‌شود، که نتیجتا پساب و آب فاضلاب صنایع مزبور نیز حاوی مقادیر بسیار زیادی آمونیوم بوده و قابل تخلیه در محیط طبیعی نمی‌باشد (Oligae, 2014).

جلبک تک سلولی *Dunaliella* قادر است از هر دو منبع NO_3^- یا NH_4^+ به عنوان منابع نیتروژن غیرآلی استفاده نماید و در این رابطه وجود یک همبستگی میان پراکندگی سویه‌های *Dunaliella* در مناطق مختلف و نوع نیتروژن موجود در محیط، به اثبات رسیده است (Stephens and Gillespie, 1976; Post, 1977). انجام تحقیقات بر روی گیاه برنج حاکی از آن است که جذب آمونیوم در حضور نیترات بهتر صورت می‌گیرد (Duan *et al.*, 2006)، اما نتایج آزمایش بر روی جلبک *Dunaliella* نشان داده که در صورت وجود NH_4^+ در محیط رشد جلبک، رونویسی ژن‌های نیترات ردوکتاز که برای احیای نیتروژن به فرم نیتراتی مورد نیاز است، متوقف شده و NH_4^+ به عنوان تنها منبع نیتروژن معدنی، مورد استفاده قرار می‌گیرد. برخی گزارش‌های دیگر، توانایی استفاده جلبک از منابع نیتروژن آلی نظیر هیپوگزانتین، هیستیدین و اوره را نیز نشان داده‌اند (Oliveria and Huinh, 1989; Hellio and Le Gal, 1999).

بر اساس رده بندی، جلبک *Dunaliella*، یک جلبک سبز تک سلولی بدون دیواره از شاخه کلروفیسه بوده (Leliaert *et al*., 2012) که ۵ گونه از آن مربوط به آب‌های شیرین و ۲۳ گونه مربوط به محیط‌های دریایی و شور می‌باشند (Avron and Ben-Amotz, 1992). نظر به توانایی فراوان جلبک در سازگاری با نمک و شوری محیط زیست، پراکنش نسبتا وسیع آن در زیستگاه‌های طبیعی مشاهده شده (Pick, 2004) و همان گونه که گفته شد رابطه‌ای نیز میان پراکنش سویه‌ها و نوع منبع نیتروژنی موجود در محیط نیز وجود دارد. جلبک مورد نظر به خوبی قادر به زیست در شرایط بسیار دشوار بوده و می‌تواند منبع غذایی مهمی از نظر کلروفیل‌ها، آنتی‌اکسیدان‌ها، کاروتنوئیدها، ویتامین‌ها، مواد معدنی، آمینواسیدها، پلی‌ساکاریدها و اسیدهای چرب ضروری و گلیسرول در پرورش آبزیان و دام‌ها باشد (Alvarado *et al*., 2006; Halama, 1990; Phang, 1992). بنابراین کشت این جلبک به منظور استخراج ترکیبات فوق به منظور کاربردهای صنعتی، پزشکی و غیره نیز می‌تواند مورد توجه قرار گیرد. بهره‌گیری از سویه‌های بومی به عنوان ذخایر ژنتیکی که بعضاً ممکن است دارای برخی ویژگی‌های مفید بوده و ضمناً با شرایط آب و هوایی مناطق مختلف نیز بخوبی سازگاری یافته‌اند، حائز اهمیت بوده، اما منوط به شناخت هر چه بهتر و دقیق‌تر ویژگی‌ها و رفتار فیزیولوژیک جلبک در شرایط محیطی مختلف است. در این رابطه، ارزیابی برخی شاخص‌های مهم نظیر سرعت و میزان تقسیمات سلولی از نظر تولید بیومس بالا، وزن تر سلول، میزان پروتئین، رنگدانه‌های آنتی‌اکسیدانی مفید نظیر کاروتنوئیدها و کلروفیل در انتخاب سویه مورد نظر برای کشت در شرایط تعریف شده، اساسی و تعیین کننده است. بر اساس گزارش‌ها، شوری می‌تواند بصورت منفی رشد، متابولیسم و تعادل یونی را در سلول تحت تاثیر قرار داده (Hue and McCall, 1989) و نیتروژن نیز قادر است مقاومت به نمک را تحت تاثیر قرار دهد (Lewis *et al*., 1989). بنابراین

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-12-12]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1394.4.13.12.4]

نظر به مسائل محیطی فراوان ذکر شده در ارتباط با آمونیوم و نیترات و نیز با توجه به اینکه جلبک‌ها به عنوان فیتوپلانکتون و اولین حلقه زنجیر غذایی موجودات زنده در اکوسیستم‌های آبی، بویژه آب‌های شور نقش بسزائی دارند، بررسی مقایسه‌ای فاکتورهای رشدی دو سویه جلبک تک سلولی دانالیه‌لا به همراه برخی خصوصیات فیزیولوژیک، نظیر مقدار پروتئین و کلروفیل که می‌توانند تحت تاثیر منبع نیتروژن واقع شوند، در غلظت‌های متفاوت شوری، دستور کار این تحقیق قرار گرفت. در این بررسی اثر سه منبع مختلف نیتروژن در تیمار با مقادیر متفاوت شوری، بعنوان دو عامل بسیار مهم و تاثیرگذار بر خصوصیات و رفتار فیزیولوژیک دو سویه جلبک دانالیه‌لا (تهیه شده از ایران و نیز دانشگاه تگزاس) طی یک دوره رشدی ۲٤ روزه مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها:

دو سویه جلبک *Dunaliella* تحت عنوان، (UTEX2538) *D. bardawil* تهیه شده از کلکسیون جلبکی دانشگاه تگزاس و یک سویه ایرانی *Dunaliella* sp. استخراج شده از مرداب گاوخونی اصفهان، بصورت کشت تک‌کلنی بر روی محیط کشت جامد (۱/۵ درصد آگار) تلقیح شده و پس از گذشت چند روز و پدیدار شدن کلنی‌ها، انتقال آنها به ml ۱ محیط کشت مایع (M ۱، بعنوان شرایط پایه) انجام شد. این مراحل جهت اطمینان از خلوص نمونه سه بار انجام گرفت. طراحی شرایط آزمون با تهیه محیط کشت‌های مایع بر اساس محیط کشت اصلاح شده جانسون و همکاران (Johnson *et al*., 1968) با pH معادل با ۷/۲ و در غلظت‌های مختلف نمکی ۰/۱M، ۰/۵M و ۳M نمک NaCl انجام شد که غلظت‌های مزبور پس از بررسی نتایج انجام آزمونی با ۷ غلظت مختلف نمکی شامل ۰/۱، ۰/۵، ۱، ۱/۵، ۲، ۳ و ٤ M انتخاب گردیدند. غلظت‌های ۰/۱ M و ۰/۵ M به جهت دارا بودن بیشترین میزان رشد در هر دو سویه و نیز بررسی رفتار فیزیولوژیک سویه‌ها در شرایط شوری پایین انتخاب شدند و غلظت نمکی ۳M به منظور بررسی رفتار سویه‌ها در یک غلظت نمکی بالا به طوری که سرعت رشد و تقسیمات سلولی در آن متوقف نشود، گزینش شدند. شرایط منبع نیتروژنی در سه سری مجزا و با استفاده از ۳ منبع نیتروژنی مختلف شامل KNO_3 (۲/۵ mM)، NH_4Cl (۲/۵mM) و نیز مخلوطی از هر دو (KNO_3+NH_4Cl) (mM ۱/۲۵ از هر یک)، طراحی گردید. مقدار ml ۲۳۰ از محیط‌های کشت مایع آماده شده، تحت شرایط استریل به ارلن‌مایرهای mM ۲۵۰ اتوکلاو شده انتقال یافت و تلقیح دو سویه جلبکی در محیط‌های کشت مایع به نحوی صورت گرفت که تعداد سلول اولیه در هر ارلن تقریبا معادل ۲×۱۰^{۵} سلول در ml ۱ از محیط کشت باشد. ارلن‌های مذکور به شرایط آزمایش با دمای ۲۵/۲۳ درجه سانتی گراد (شب/روز) و شدت نوری μ molm^{-2}s^{-1} ۱۰ ±۵۰ با فتوپریود (۱٦/۸ ساعت، تاریکی/نور) منتقل شدند. دوره آزمون به مدت ۲٤ روز ادامه یافت و در این مدت برداشت نمونه‌ها به منظور شمارش سلول‌ها، اندازه‌گیری رنگدانه‌های کلروفیل، کاروتنوئید کل، بتاکاروتن وزن تر و میزان پروتئین، بترتیب در روزهای صفر، ۸، ۱٦ و ۲٤ انجام گرفت. زمان‌های نمونه‌برداری و اندازه‌گیری شاخص‌ها به صورتی انتخاب گردید که هم مراحل آغاز رشد و بخش لگاریتمی منحنی رشد و هم مرحله ایستایی رشد سلول‌ها را شامل گردد. شمارش سلولی با استفاده از لام آینه‌ای هموسایتومتر انجام شد و تعداد سلول‌ها در هر میلی‌لیتر از سوسپانسیون جلبکی محاسبه گردید. اندازه‌گیری میزان بتاکاروتن به روش Eijckelhoff and Dekker (۱۹۹۷)، مقدار کاروتنوئید کل و کلروفیل به روش Hartmut و همکاران در سال ۲۰۰۱ و نیز اندازه‌گیری مقدار پروتئین به روش Bradford (۱۹۷٦)، با استفاده از محلول پروتئین استاندارد آلبومین گاوی بر اساس اندازه‌گیری جذب نمونه‌ها با بهره‌گیری از دستگاه اسپکتروفتومتر (مدلShimatzu, UV-160) انجام شد و بصورت $\mu g.10^{-6}$ سلول گزارش گردید. برای اندازه‌گیری وزن تر نمونه‌ها، ml ۱ سوسپانسیون در یک میکروویال توزین شده ریخته شد و سپس به مدت ۵ دقیقه در g۱۳۰۰۰ سانتریفوژ گردید. محلول رویی خارج و دوباره میکروویال توزین شد، از تفاوت وزن میکروویال خالی و میکروویال حاوی رسوب، وزن

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-12-12]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1394.4.13.12.4]

تر یک میلی‌لیتر سوسپانسون محاسبه گردید. سطح فوقانی رسوب سلولی بدست آمده، به منظور برطرف نمودن نمک، با افزودن محیط کشت حاوی ۰/۲ M نمک NaCl، سریعا شستشو شد. نرخ رشد ویژه سلولی (Specific growth rate, SGR) (Ricker, 1975) و زمان دو برابر شدن (Doubling time, DT) سلول‌ها نیز برای نمونه‌ها در زمان ٢٤ روز برای هر تکرار محاسبه گردید. کلیه آزمون‌ها بصورت فاکتوریل و در قالب طرح کاملا تصادفی در سه تکرار انجام گرفت و نتایج با استفاده از نرم افزار SPSS (16) تحلیل شد. کلیه مواد شیمیایی مورد استفاده از شرکت سیگما تهیه گردید.

نتایج:

بر اساس نتایج آماری داده‌های شکل ۱، مناسب‌ترین غلظت نمکی برای رشد هر دو سویه، غلظت ۰/۵ M نمک می‌باشد که بیشترین نرخ رشد ویژه و کمترین زمان دو برابر شدن سلولها نیز برای هر دو سویه، در غلظت نمکی مذکور و منبع نیتروژنی KNO_3 مشاهده گردیده است (جداول ۱ و ۲). بررسی‌ها همچنین حکایت از کمتر بودن مقادیر رشد سویه *D. bardawil* در محیط حاوی آمونیوم نسبت به رشد در دو منبع نیتروژنی دیگر دارد. در منحنی‌های ۰/۱ و تا حدودی ۳ M نمک، یک فاز تاخیری تقریبا تا روز ۸ ام اندازه‌گیری‌ها در شرایط مزبور مشاهده شد و از آنجا که اندازه‌گیری‌ها هر ۸ روز یک بار صورت گرفته است، محتمل است که این مرحله بیش از این مدت هم به طول انجامیده باشد. این در حالی است که سلول‌های هر دو سویه در غلظت ۳ M نمک و در منبع KNO_3+NH_4Cl، رشد بهتری را نسبت به هردو تیمار نیتروژنی دیگر نشان می‌دهند. سلول‌های *D. bardawil* همچنین در غلظت ۰/۵ M نمک در دو محیط حاوی KNO_3 و KNO_3+NH_4Cl از روز ١٦ام به بعد یک جهش رشدی را نشان می‌دهند. در یک ارزیابی کلی می‌توان گفت سویه ایرانی الگوهای رشدی مشابه‌تری را در غلظت‌های مختلف نمک و تیمارهای نیتروژن نسبت به سویه *D. bardawil* به نمایش گذاشته، در حالی که *D. bardawil* تفاوت‌های بیشتری را در روند منحنی‌های رشد نشان می‌دهد. با توجه به شکل ۲، در سویه ایرانی کاهش مقدار کلروفیل *a* سلول در غلظت ۳ M نمک و در همه منابع نیتروژنی، در روز ۸ ام آزمون مشهود بود، در حالیکه در خصوص دو غلظت دیگر، کاهش چندانی در مقدار این رنگدانه طی روزهای مختلف، تا انتهای دوره آزمون مشاهده نشد. در *D. bardawil*، افزایش مقدار رنگدانه مزبور در روز ١٦ام در تیمار منبع نیتروژنی KNO_3 و نیز NH_4Cl مشاهده گردید و منحنی مربوط به آن در تیمار آمونیومی، تا انتهای آزمون با شیب نسبتا تند، سیر صعودی نشان داد. در تیمار NH_4Cl، منحنی‌های مربوط به

غلظت‌های ۰/۱ M (برای هر دو سویه) و ۰/۵ M (صرفا برای سویه ایرانی) تا روز ۸ ام سیر نزولی نشان دادند و در تیمار منبع نیتروژنی KNO_3+NH_4Cl، به جز کاهش اندکی که در روز ۸ ام برای اکثر غلظت‌ها روی داد، تغییرات چندانی تا انتهای آزمون مشاهده نشد.

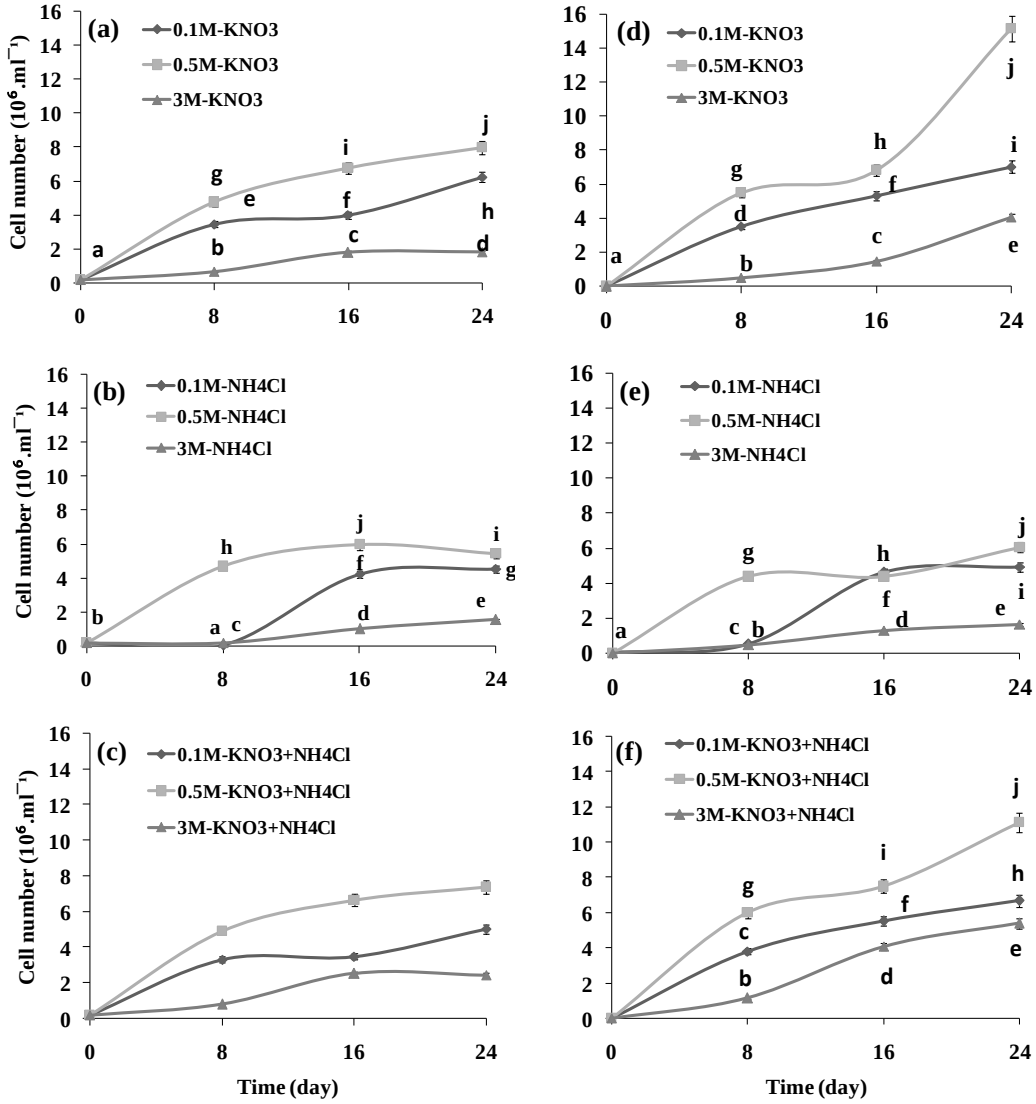
نتایج، معنی‌دار بودن اثر منبع نیتروژن بر مقدار کلروفیل *b* را نشان دادند. مقدار کلروفیل *b* در روز ۸ ام آزمون غالبا کاهش و در روز ١٦ ام و در برخی موارد پس از آن روند افزایشی نشان داد. افزایش زیاد کلروفیل *b* در تیمار با منبع آمونیوم در غلظت ۰/۱ M نیز، در سویه ایرانی مشاهده گردید. در هر دو سویه منحنی مربوط به غلظت ۳ M در محیط‌های حاوی NH_4Cl و KNO_3+NH_4Cl، پس از کاهش در روز ۸ ام تا پایان آزمون روند افزایشی نشان داد (شکل ۳).

بررسی تغییرات کلروفیل کل، نشان می‌دهد که سویه *D. bardawil* کاهش‌های بیشتری را در مقدار این رنگدانه در غلظت ۳ M در منابع NH_4Cl و KNO_3+NH_4Cl، نسبت به سویه ایرانی که این مورد را تنها در تیمار NH_4Cl نشان می‌دهد، نمایان می‌سازد. کاهش مورد نظر در روز ۸ ام اتفاق افتاده و میزان کلروفیل کل پس از آن افزایش می‌یابد.

در منبع نیتروژنی KNO_3+NH_4Cl به غیر از کاهش اندکی که در روز ۸ ام برای اغلب غلظت‌ها روی داد، تغییرات چندانی تا انتهای دوره آزمون مشاهده نشد (شکل ٤). در یک جمع بندی می‌توان گفت که تاثیر منابع مختلف نیتروژنی بر

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-12-12]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1394.4.13.12.4]



شکل ۱- روند منحنی‌های رشد بر اساس تقسیم سلولی در دو سویه جلبک *Dunaliella* sp. و *D. bardawil* در تیمار منابع نیتروژنی متفاوت و غلظت‌های ۰/۱، ۰/۵ و ۳ M نمک NaCl در نور ۵۰ $\mu mol.m^{-2}s^{-1}$ و دمای ۲۵/۲۳±۲°C، شب/روز a) *Dunaliella* sp. در منبع نیتروژنی KNO_3 b) *Dunaliella* sp. در منبع نیتروژنی NH_4Cl c) *Dunaliella* sp. در منبع نیتروژنی KNO_3+NH_4Cl d) *D. bardawil* در منبع نیتروژنی KNO_3 e) *D. bardawil* در منبع نیتروژنی NH_4Cl و f) *D. bardawil* در منبع نیتروژنی KNO_3+NH_4Cl.

جدول ۱- نرخ رشد ویژه (μ, SGR) در دو سویه جلبک *Dunaliella* در تیمار منابع نیتروژنی مختلف در یک دوره رشدی ۲۴ روزه

سویه	*D. Dunaliella* sp.			*D. bardawil*		
منبع نیتروژنی	KNO_3+NH_4Cl	NH_4Cl	KNO_3	KNO_3+NH_4Cl	NH_4Cl	KNO_3
غلظت نمک (M)						
۰/۱	۰/۱۳±۰/۰۰۷^{b,B}	۰/۱۳±۰/۰۰۷^{b,A}	۰/۱٤±۰/۰۰۷^{b,C}	۰/۱۵±۰/۰۰۷^{b,B}	۰/۱۳±۰/۰۰٦^{b,A}	۰/۱۵±۰/۰۰۷^{b,C}
۰/۵	۰/۱۵±۰/۰۰۷^{c,B}	۰/۱٤±۰/۰۰۷^{c,A}	۰/۱٦±۰/۰۰۸^{c,C}	۰/۱۷±۰/۰۰۸^{c,B}	۰/۱٤±۰/۰۰۷^{c,A}	۰/۱۸±۰/۰۰۹^{c,C}
۳	۰/۱۱±۰/۰۰۵^{a,C}	۰/۰۹±۰/۰۰٤^{a,A}	۰/۰۹±۰/۰۰۷^{a,B}	۰/۱٤±۰/۰۰٦^{a,C}	۰/۰۹±۰/۰۰٤^{a,A}	۰/۱۳±۰/۰۰۷^{a,B}

مقادیر میانگین سه تکرار ± SD بوده و حروف کوچک و بزرگ غیرمشابه بر اساس آزمون Tukey، به ترتیب نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار میان نمونه‌های هر ستون و هر سطر در P<۰/۰۵ می‌باشند.

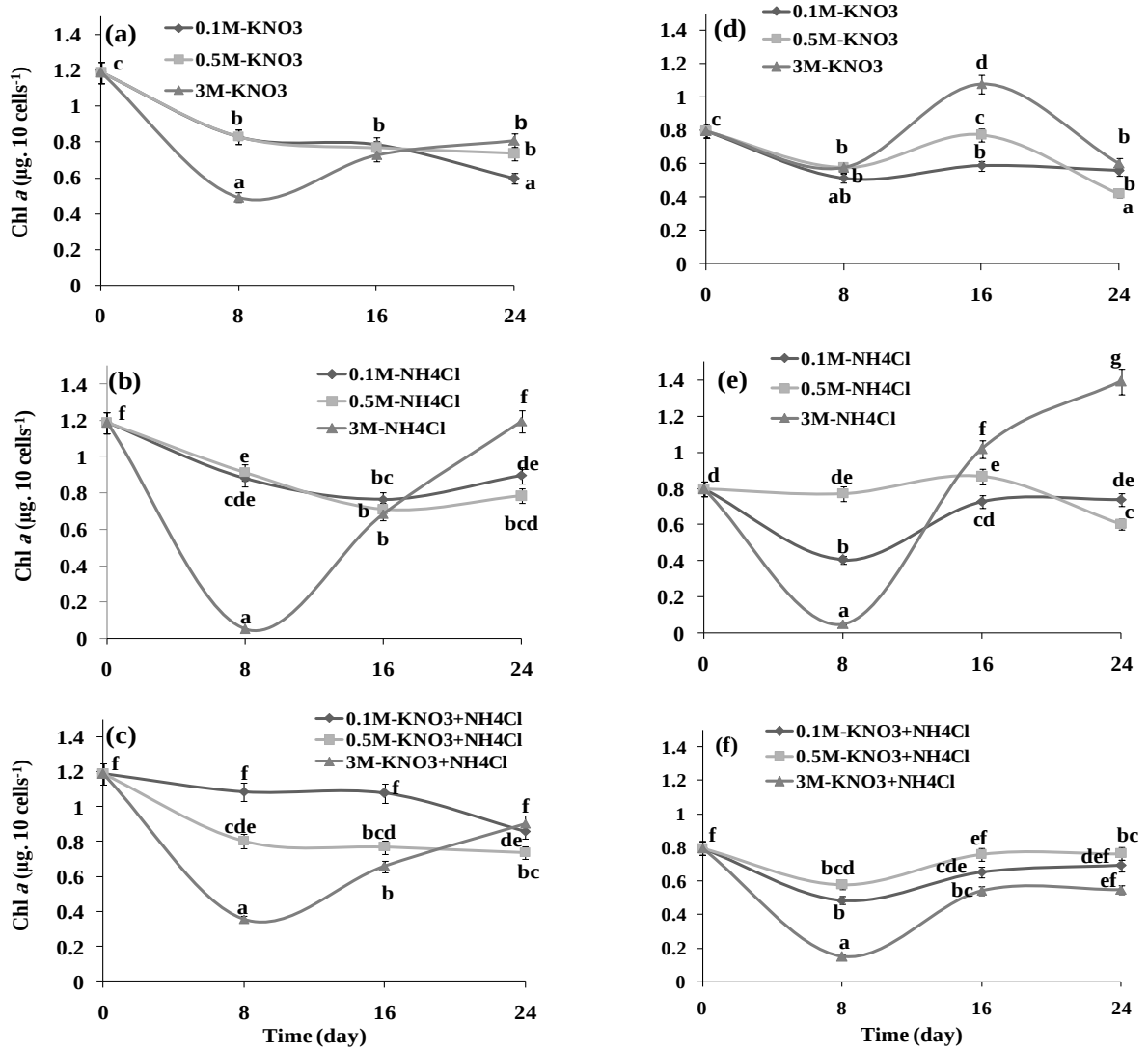
[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-12-12]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1394.4.13.12.4]

جدول ۲- زمان دو برابر شدن (DT) سلول‌ها بر حسب روز، در دو سویه جلبک *Dunaliella* در تیمار منابع نیتروژنی مختلف در یک دوره رشدی ۲٤ روزه.

سویه	*D. Dunaliella* sp.			*D. bardawil*		
منبع نیتروژنی	KNO_3+NH_4Cl	NH_4Cl	KNO_3	KNO_3+NH_4Cl	NH_4Cl	KNO_3
غلظت نمک (M)						
۰/۱	٥/۲±۰/۳^{b,B}	٥/۳±۰/۳^{a,C}	٤/۹±۰/۲^{b,A}	٤/۸±۰/۲^{b,B}	٥/۲±۰/۳^{b,C}	٤/۷±۰/۲^{b,A}
۰/٥	٤/٦±۰/۲^{a,B}	٥/۱±۰/۳^{a,C}	٤/٥±۰/۲^{a,A}	٤/۲±۰/۲^{a,B}	٤/۹±۰/۲^{a,C}	۳/۹±۰/۲^{a,A}
۳	٦/۷±۰/۳^{c,B}	۸/۱±۰/٤^{b,C}	۷/٥±۰/٤^{c,A}	٥/۰±۰/۳^{c,A}	۸/۰±۰/٤^{c,C}	٥/٥±۰/۳^{c,B}

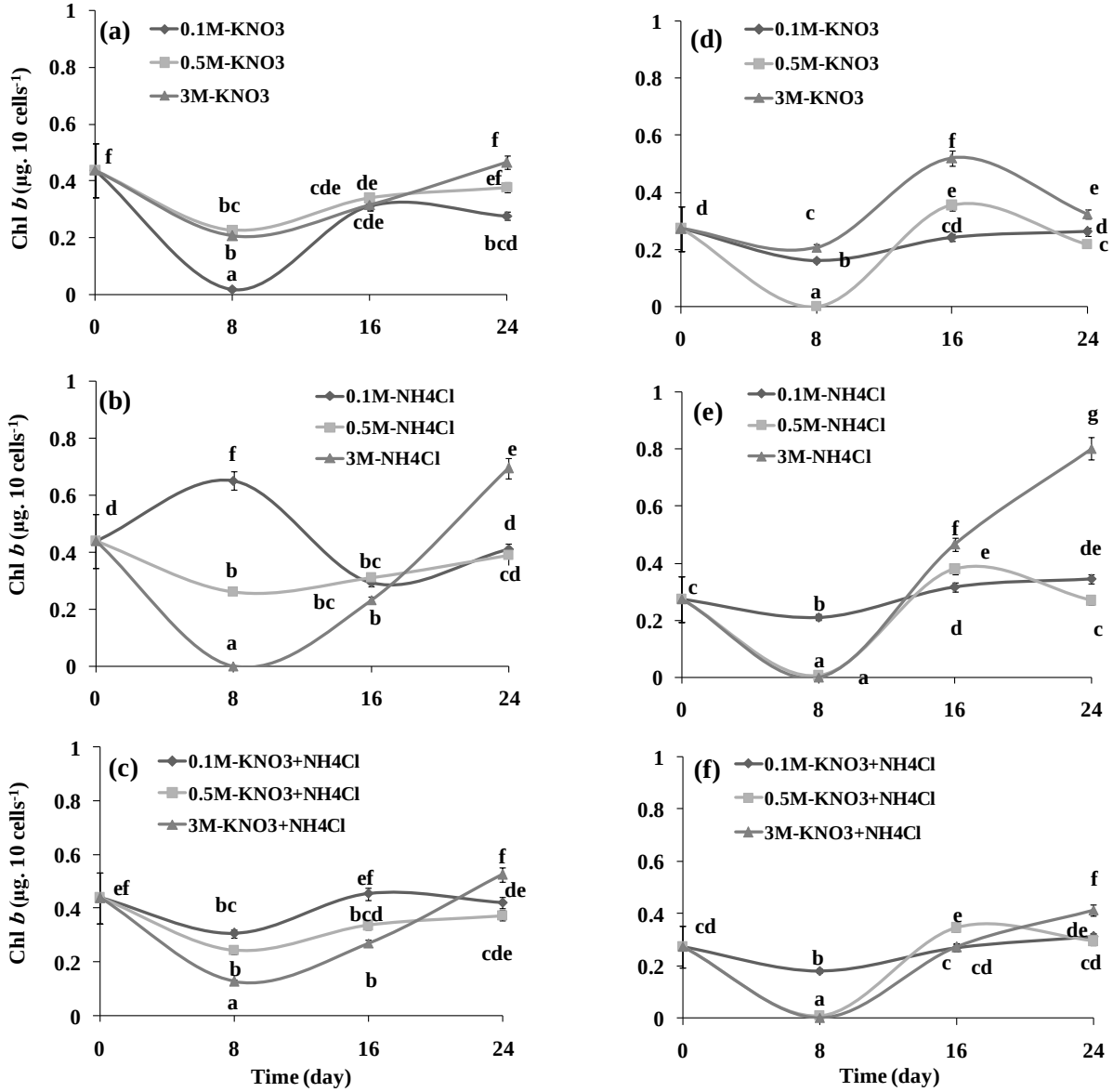
مقادیر میانگین سه تکرار ± SD بوده و حروف کوچک و بزرگ غیرمشابه بر اساس آزمون Tukey، به ترتیب نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار میان نمونه‌های هر ستون و هر سطر در $P<۰/۰٥$ می‌باشند.



شکل ۲- روند تغییرات کلروفیل *a* در دو سویه جلبک *Dunaliella* sp. و *D. bardawil* در تیمار منابع نیتروژنی متفاوت و غلظت‌های ۰/۱، ۰/٥ و ۳M نمک NaCl در نور ۵۰ $\mu mol.m^{-2}s^{-1}$ و دمای ۲٥/۲۳±۲°C، شب/روز a) *Dunaliella* sp. در منبع نیتروژنی KNO_3 b) *Dunaliella* sp. در منبع نیتروژنی NH_4Cl c) *Dunaliella* sp. در منبع نیتروژنی KNO_3+NH_4Cl d) *D. bardawil* در منبع نیتروژنی KNO_3 e) *D. bardawil* در منبع نیتروژنی NH_4Cl و f) *D. bardawil* در منبع نیتروژنی KNO_3+NH_4Cl.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-12-12]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1394.4.13.12.4]



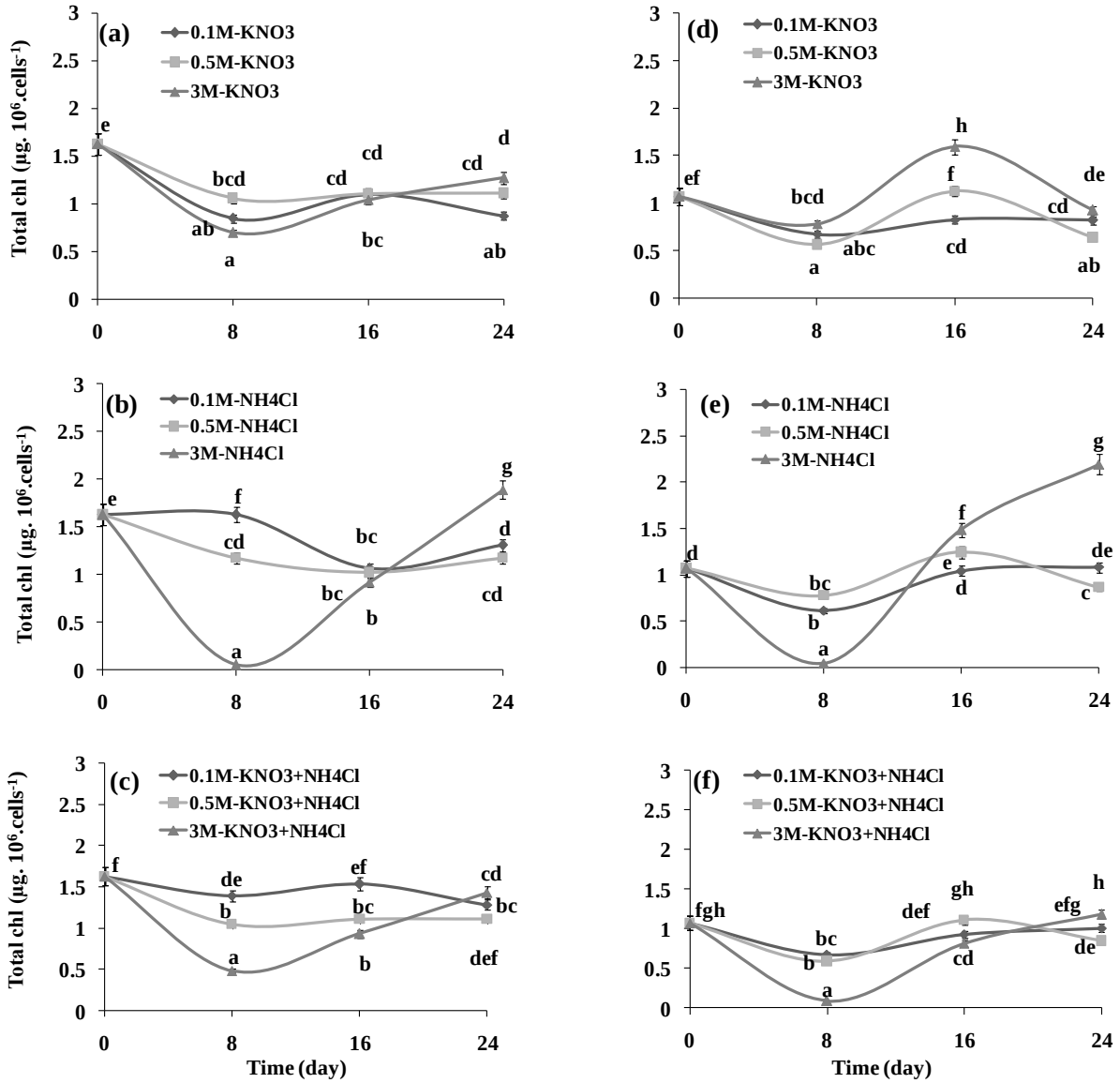
شکل ۳- روند تغییرات کلروفیل *b* در دو سویه جلبک *Dunaliella* sp. و *Dunaliella bardawil* در تیمار منابع نیتروژنی متفاوت و غلظت‌های ۰/۱، ۰/۵ و ۳ M نمک NaCl در نور $\mu mol.m^{-2}s^{-1}$ ۵۰ و دمای ۲۵/۲۳±۲°C، شب/روز a) *Dunaliella* sp. در منبع نیتروژنی KNO_3 b) *Dunaliella* sp. در منبع نیتروژنی NH_4Cl c) *D. bardawil* در منبع نیتروژنی KNO_3+NH_4Cl d) *D. bardawil* در منبع نیتروژنی NH_4Cl و f) *D. bardawil* در منبع نیتروژنی KNO_3+NH_4Cl.

روی کلروفیل کل سویه‌ها، در اغلب تیمارها به صورت یک کاهش در سلول‌های در حال تقسیم تا روز ۸ ام و نیز یک افت شدید در غلظت ۳ M قابل مشاهده است که در برخی حالات با روندهای افزایشی پس از اندازه‌گیری در روز ۸ ام آزمون، نیز دنبال می‌شود.

نوسانات مقدار بتاکاروتن بطور کلی در رابطه با غلظت ۳ M نسبت به سایرغلظت‌ها بیشتر بوده و با افزایش زیاد در روز ۸ ام در تیمار KNO_3 (برای سویه *D. bardawil*) و کاهش زیاد در روز ۸ ام در محیط حاوی آمونیوم (برای هر دو سویه) همراه بود. افزایش مقدار بتاکاروتن در این غلظت از روز ۱۶ ام به بعد نیز در تیمارهای دارای آمونیوم ملاحظه گردید و در باقی شرایط به جز یک مورد افزایش در میزان رنگدانه‌ها در غلظت ۰/۱ M، نوسانات کمتری مشاهده شد (شکل ۵).

آنالیز واریانس کلی نشان داد که در هر دو سویه نوع منبع

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-12-12]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1394.4.13.12.4]

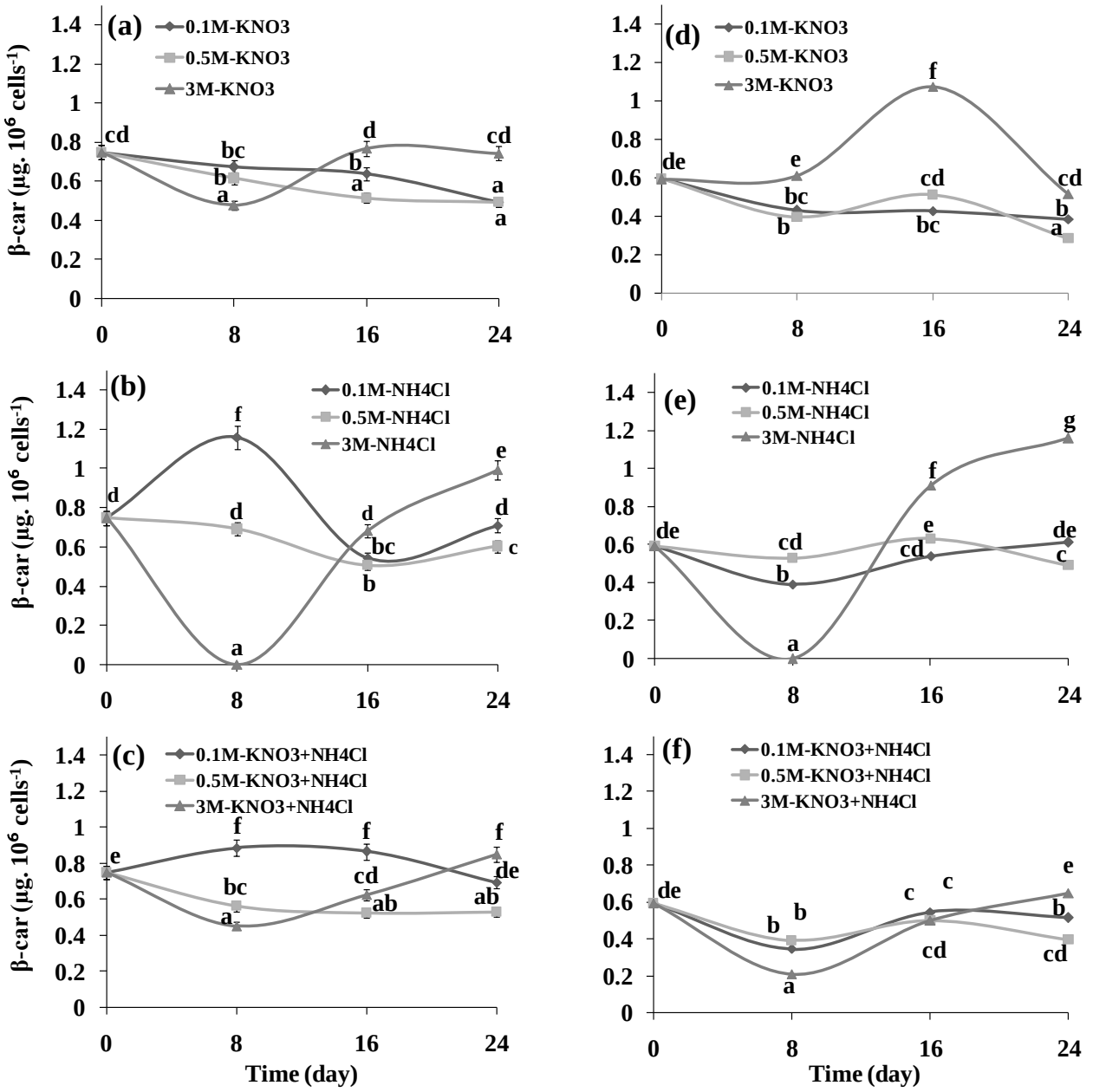


شکل ٤- روند تغییرات کلروفیل کل در دو سویه جلبک *Dunaliella* sp. و *Dunaliella bardawil* در تیمار منابع نیتروژنی متفاوت و غلظت‌های ۰/۱، ۰/۵ و ۳ M نمک NaCl در نور $\mu mol.m^{-2}s^{-1}$ ۵۰ و دمای ۲۵/۲۳±۲°C، شب/روز a) *Dunaliella* sp. در منبع نیتروژنی KNO_3 b) *Dunaliella* sp. در منبع نیتروژنی NH_4Cl c) *D. bardawil* در منبع نیتروژنی KNO_3+NH_4Cl d) *D. bardawil* در منبع نیتروژنی NH_4Cl و f) *D. bardawil* در منبع نیتروژنی KNO_3+NH_4Cl.

نیتروژنی بر تغییرات کاروتنوئید کل سلول فاقد تاثیر معنی‌دار بوده است (شکل ٦). مقایسات میانگین‌ها نشان داد که اثر تیمارهای نیتروژن در غلظت‌های مختلف نمک و نیز در روزهای متفاوت آزمون معنی‌دار می‌باشد. دررابطه با تغییرات پروتئین در طی دوره ٢٤ روزه آزمون، الگوهای متفاوت‌تری نسبت به رشد و رنگدانه‌ها در شوری‌های متفاوت در هر دو سویه بدست آمد که با کاهش در روز ۸ ام مواجه نبود. به نظر می‌رسد که سلول‌ها در مواجهه با شرایط جدید و به منظور بقا، به تولید بیشتر پروتئین اقدام می‌کنند، بطوریکه با وجود فاز لگاریتمی رشد کاهشی در میزان پروتئین سلول‌ها اتفاق نمی‌افتد (شکل ۷). بیشترین افزایش‌ها در تیمار غلظت ۳ M نمک در آمونیوم از روز ۸ ام به بعد در هر دو سویه ملاحظه گردید که مشابه همین مورد در تیمار KNO_3+NH_4Cl، اتفاق افتاد، اما با کاهش در روز ١٦ ام دنبال گردید.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-12-12]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1394.4.13.12.4]



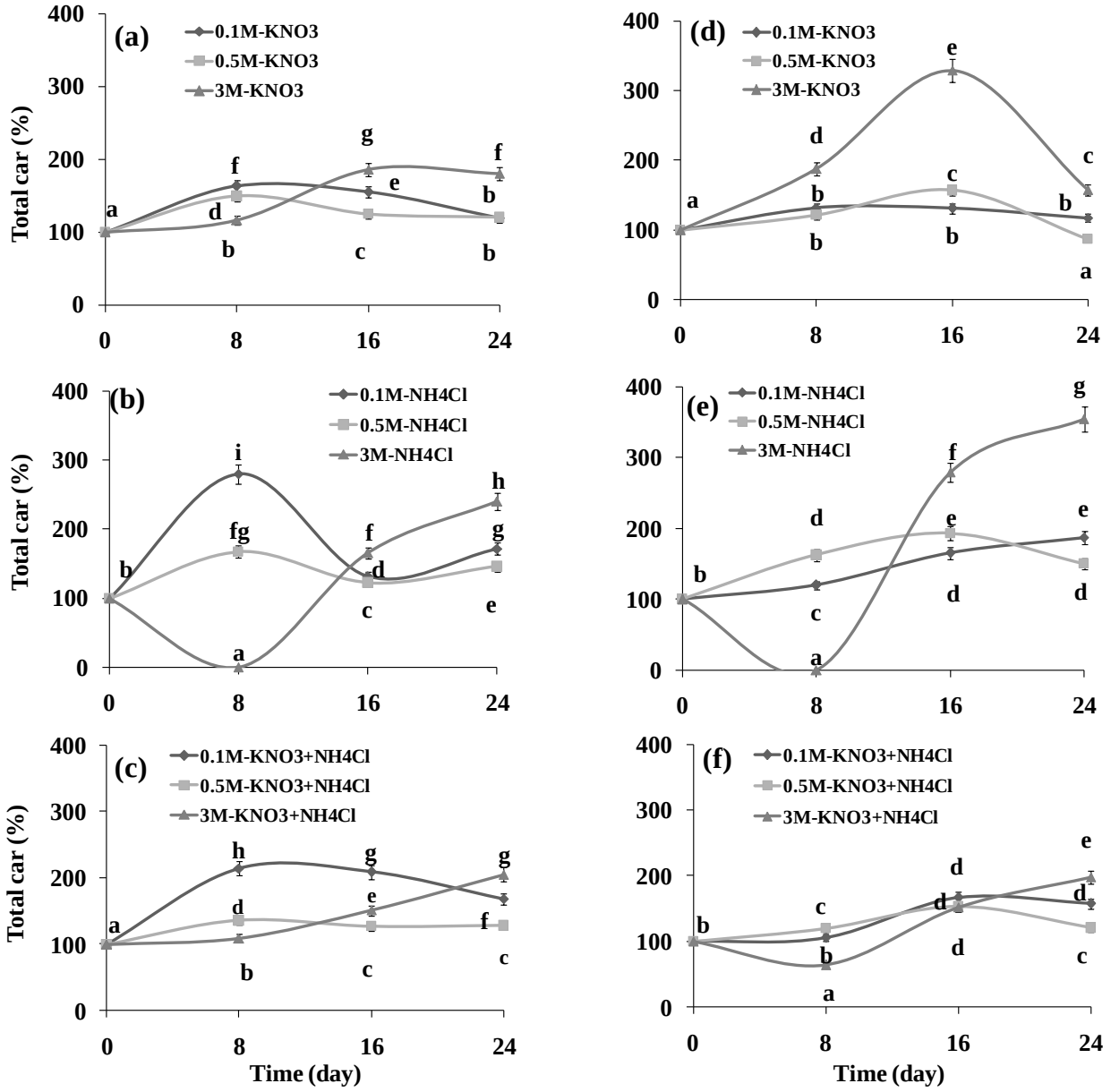
شکل ۵- روند تغییرات بتاکاروتن در دو سویه جلبک *Dunaliella* sp. و *Dunaliella bardawil* در شرایط منبع نیتروژنی متفاوت، در تیمار منابع نیتروژنی متفاوت و غلظت‌های ۰/۱، ۰/۵ و ۳ M نمک NaCl در نور ۵۰ $\mu mol.m^{-2}s^{-1}$ و دمای ۲۵/۲۳±۲°C، شب/روز a) *Dunaliella* sp. در منبع نیتروژنی KNO_3 b) *Dunaliella* sp. در منبع نیتروژنی NH_4Cl c) *Dunaliella* sp. در منبع نیتروژنی KNO_3+NH_4Cl d) *D. bardawil* در منبع نیتروژنی KNO_3 e) *D. bardawil* در منبع نیتروژنی NH_4Cl و f) *D. bardawil* در منبع نیتروژنی KNO_3+NH_4Cl.

با توجه به شکل ۸، بیشترین وزن تر مشاهده شده مربوط به روز ۸ ام آزمون و کمترین مقدار آن نیز در سلول‌های کشت شده در غلظت ۰/۵ M نمک مشاهده شد. نوع منبع نیتروژنی مورد استفاده بر تغییرات وزن تر در هر دو سویه تاثیر معنی‌دار داشت.

به طور کلی، نتایج حاکی از تفاوت پاسخ سویه‌های جلبکی به تفاوت منبع نیتروژنی و نیز تیمار زمان بوده و در غالب موارد معنی‌دار بودن تاثیر غلظت نمک محیط را بر شاخص‌های اندازه‌گیری شده، بصورت اصلی و در تاثیر متقابل بر منابع نیتروژن و زمان نشان می‌دهد.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-12-12]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1394.4.13.12.4]

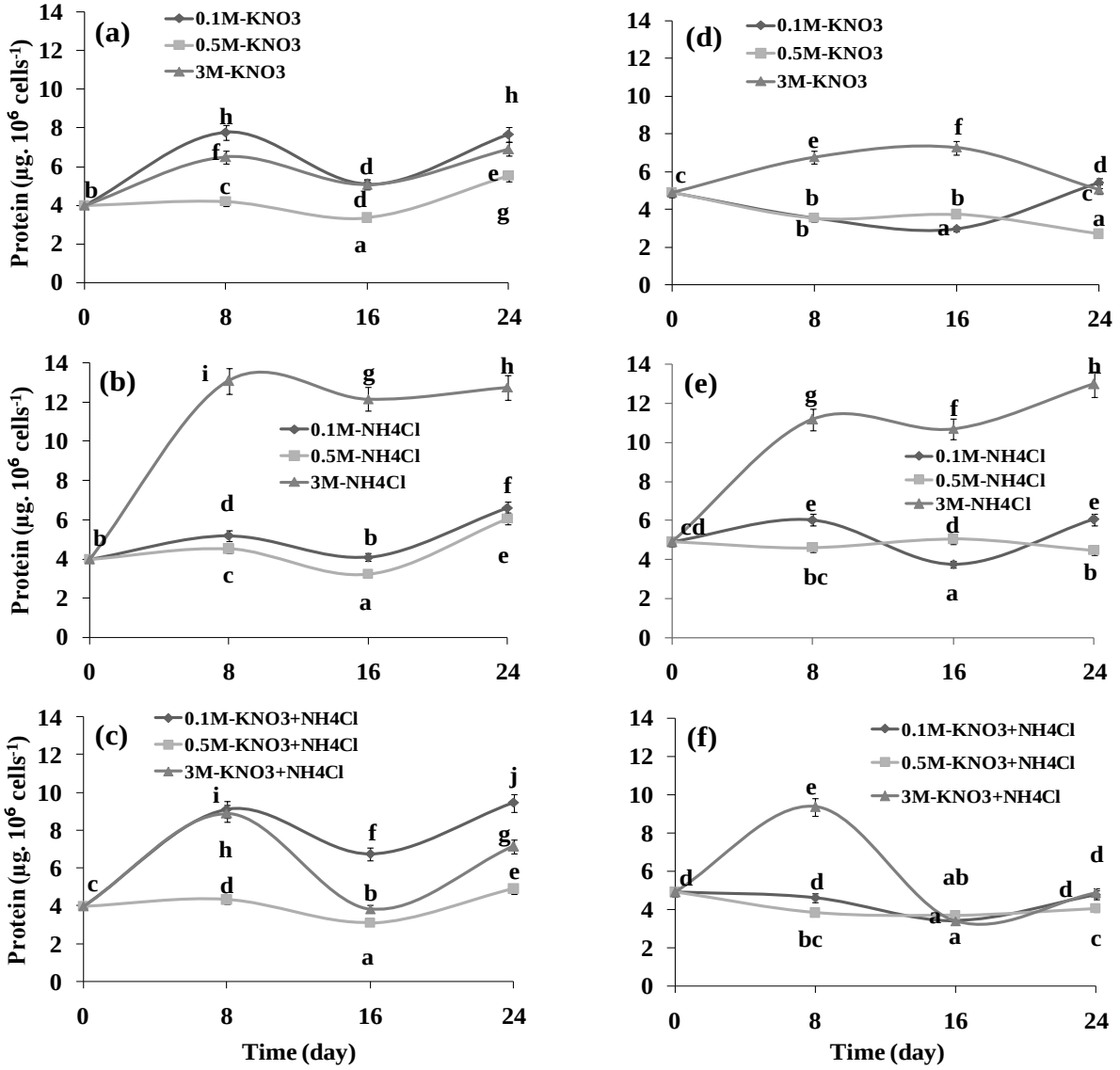


شکل ٦- درصد تغییرات کاروتنوئید کل سلول در دو سویه جلبک *Dunaliella* sp. و *Dunaliella bardawil* بر حسب درصد کنترل در ابتدای آزمون، در تیمار منابع نیتروژنی متفاوت و غلظت‌های ۰/۱، ۰/۵ و ۳ M نمک NaCl در نور $\mu mol.m^{-2}s^{-1}$ ۵۰ و دمای ۲۵/۲۳±۲°C، شب/روز a) *Dunaliella* sp. در منبع نیتروژنی KNO_3 b) *Dunaliella* sp. در منبع نیتروژنی NH_4Cl c) *Dunaliella* sp. در منبع نیتروژنی KNO_3+NH_4Cl d) *D. bardawil* در منبع نیتروژنی KNO_3 e) *D. bardawil* در منبع نیتروژنی NH_4Cl و f) *D. bardawil* در منبع نیتروژنی KNO_3+NH_4Cl.

بحث:

نتایج آماری داده‌های تحقیق و مقایسات میانگین‌ها حاکی از وجود اختلاف معنی‌دار میان مقادیر در روزهای مختلف آزمون و در تیمارهای نیتروژن-نمک در هر دو سویه می‌باشند. روند رشد در سلول‌های *D. bardawil*، در منابع متفاوت نیتروژن (KNO_3، NH_4Cl و KNO_3+NH_4Cl) در غلظت‌های مختلف نمکی (۰/۱، ۰/۵ و ۳ M) اختلاف معنی‌دار نشان داده و بیشترین تعداد سلول‌ها در محیط حاوی منبع نیتروژنی KNO_3 و غلظت ۰/۵ M نمک (با نرخ رشد ویژه تقریبا day^{-1} ۰/۱۸) حاصل شده و تا روز ۲٤ ام نیز شروع مرحله ایستایی رشد مشاهده نمی‌شود. در مورد سویه ایرانی نیز این مورد به همین صورت یعنی در مولاریته ۰/۵ و تیمار KNO_3، با نرخ رشد

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-12-12]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1394.4.13.12.4]



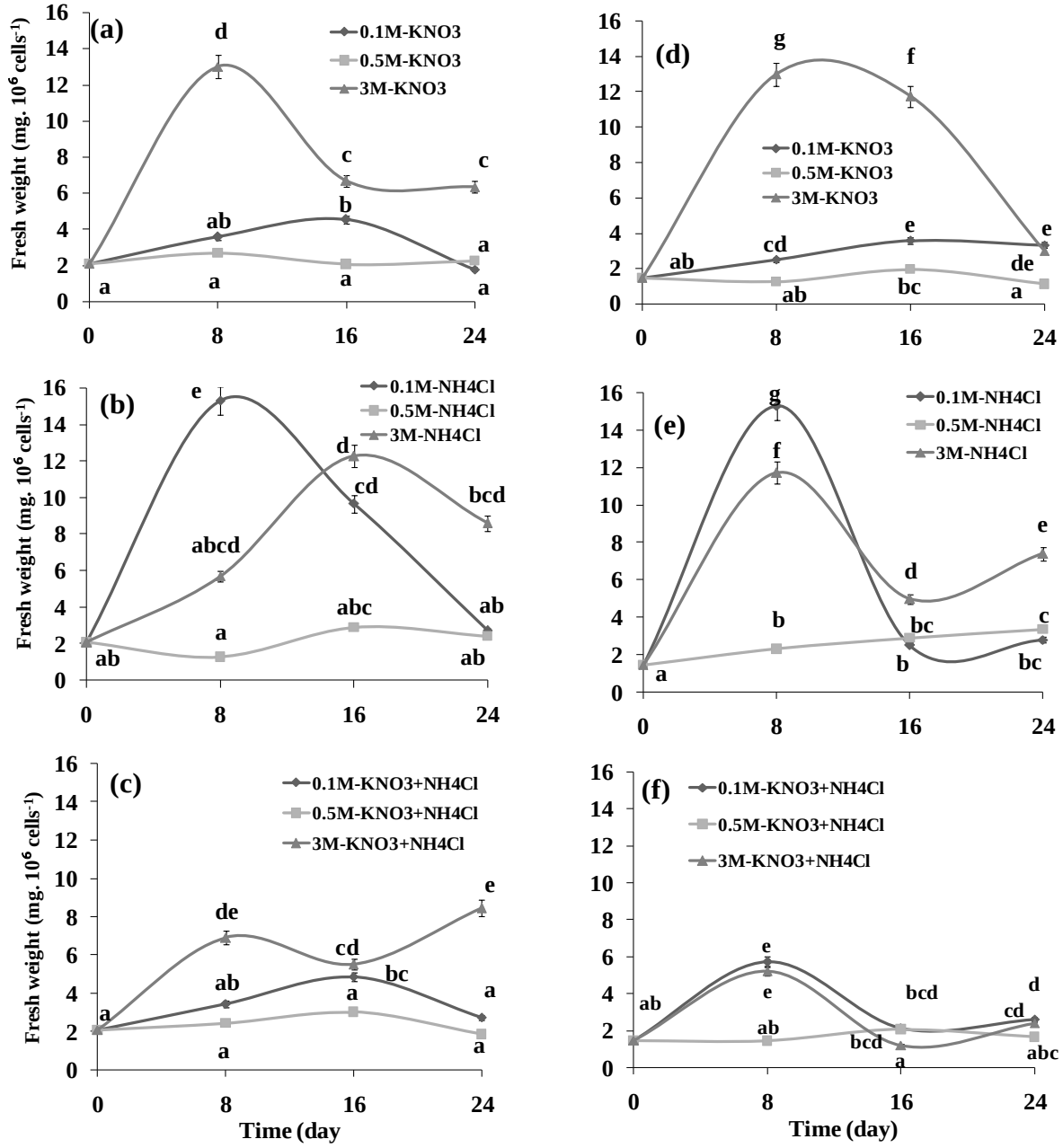
شکل ۷- روند تغییرات پروتئین سلول در دو سویه جلبک *Dunaliella* sp. و *Dunaliella bardawil* در تیمار منابع نیتروژنی متفاوت و غلظت های ۰/۱، ۰/۵ و ۳ M نمک NaCl در نور $\mu mol.m^{-2}s^{-1}$ ۵۰ و دمای ۲۵/۲۳±۲°C، شب/روز a) *Dunaliella* sp. در منبع نیتروژنی KNO_3 b) *Dunaliella* sp. در منبع نیتروژنی NH_4Cl c) *D. bardawil* در منبع نیتروژنی KNO_3+NH_4Cl d) *D. bardawil* در منبع نیتروژنی KNO_3 e) *D. bardawil* در منبع نیتروژنی NH_4Cl و f) در منبع نیتروژنی KNO_3+NH_4Cl.

ویژه تقریبا day^{-1} ۰/۱۵۶ ملاحظه می‌گردد.

استفاده از منبع نیتروژنی NH_4^+ به جای KNO_3، باعث کاهش بیش از ۵۰ درصدی تعداد سلول‌های *D. bardawil* در این غلظت نمکی، در انتهای دوره آزمون گردید. بر اساس نظر برخی محققین (Mengel and Kirkby 2001) استفاده از منبع آمونیومی نیتروژن به دلیل رقابت با کاتیون‌ها در هنگام جذب (Ten Hoopen *et al*., 2010) و نیز ایجاد اختلال در عملکرد کاتیون‌ها، می‌تواند بر رشد و عملکرد گیاه اثر منفی اعمال نماید، در حالی که نیتروژن نیتراتی می‌تواند ساخت آنیون‌های آلی و تجمع کاتیون‌ها را سبب گردد. در تقابل با این موارد، یافته‌های Giordano (۱۹۹۷) نشان داد که سلول‌های *Dunaliella salina* UTEX200 رشد یافته در محیط با غلظت ۱۰mM آمونیوم، سرعت رشد بیشتری نسبت به سلول‌های رشد یافته در محیط حاوی غلظت مشابه نیترات داشتند.

بررسی‌های Abusara و همکاران (۲۰۱۱) نیز نشان داد که رشد سویه‌های *Dunaliella* sp. استخراج شده از Dead sea،

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-12-12]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1394.4.13.12.4]



شکل ۸- روند تغییرات وزن تر سلول در دو سویه جلبک *Dunaliella* sp. و *Dunaliella bardawil* در تیمار منابع نیتروژنی متفاوت و غلظت‌های ۰/۱، ۰/۵ و ۳ M نمک NaCl در نور ۵۰ $\mu mol.m^{-2}s^{-1}$ و دمای ۲۵/۲۳±۲°C، شب/روز a) *Dunaliella* sp. در منبع نیتروژنی KNO_3 b) *Dunaliella* sp. در منبع نیتروژنی NH_4Cl c) *Dunaliella* sp. در منبع نیتروژنی KNO_3+NH_4Cl d) *D. bardawil* در منبع نیتروژنی KNO_3 e) *D. bardawil* در منبع نیتروژنی NH_4Cl و f) *D. bardawil* در منبع نیتروژنی KNO_3+NH_4Cl.

در محیط حاوی منبع نیتروژن $NaNO_3$ و یا NH_4Cl، نسبت به رشد در محیط حاوی NH_4NO_3 بیشتر بوده است. صرفنظر از اثر نمک، سویه *D. bardawil* بطور کلی میزان رشد کمتری را در محیط حاوی NH_4Cl نشان داد و بنظر می‌رسد سویه ایرانی از این جهت که میزان رشد آن در منبع NH_4Cl نسبت به محیط حاوی KNO_3، کاهش نشان نمی‌دهد دارای نقطه قوت است، گرچه میزان رشد آن در این شرایط با سویه خارجی معادل است.

از سوی دیگر بررسی‌ها نشان داده که بطور کلی تغذیه نیتروژنی سبب بروز رقابت میان نیتروژن و کربن برای دریافت

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-12-12]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1394.4.13.12.4]

انرژی و حد واسطها از فتوسنتز می‌گردد. در عین حال تجزیه کربوهیدراتها به جهت تامین انرژی مورد نیاز در تغذیه آمونیومی نیز گزارش شده که این موارد می‌توانند، برخی دلایل کاهش رشد سلول‌ها را در شرایط NH_4Cl توضیح دهند (Foyer *et al*., 1994).

بررسی و مقایسه نتایج غلظت‌های مختلف نمک استفاده شده در محیط کشت، نشان داد که برای هر دو سویه، در شرایط شوری زیاد (۳ M)، وجود هر دو منبع نیترات و آمونیوم در محیط کشت، سبب بهبود رشد و تقسیمات سلولی بویژه از روز هشتم به بعد شده که این نتایج با یافته‌های Irshad و همکارانش در سال ۲۰۰۲ بر روی گیاه گندم همخوانی نشان می‌دهد. محققین مزبور متوجه شدند که تیمار شوری (۶۰mM)، به کار گیری هر دو نوع منبع نیتروژنی (۲ mM KNO_3+NH_4Cl) به دلیل افزایش مقادیر جذب نیتروژن، سبب بهتر شدن رشد و توسعه گیاه می‌گردد. بطور کلی محققان بر این اعتقادند که اکثر گونه‌های گیاهی زمانی بهتر رشد می‌کنند که منبع غذایی حاوی نیتروژن بصورت مخلوطی از نیترات و آمونیوم وجود داشته باشد. این مورد برای رشد سلول‌ها و اندامهای گیاهی در محیط کشت بافت و نیز گیاهان صادق است (Pessarakli, 2001; Hunault, 1985). اما این مورد با نتایج Alyemani (1997) مبنی بر آنکه منبع آمونیومی به جهت ایجاد اختلال در جذب و متابولیسم کاتیونها، گیاه را به نمک حساس نموده و رشد را کاهش می‌دهد، انطباق ندارد. شاید به دلیل آنکه جلبک دانالیه‌لا بر خلاف گیاهان در محیط مایع زیست نموده و علاوه بر آنکه تحت تاثیر تنش آبی احتمالی ناشی از منبع آمونیوم قرار نمی‌گیرد (Quebedaux and Ozburn, 1973)، در جذب یونهای ضروری نظیر کلسیم، پتاسیم و منیزیم در محیط مایع نیز مشکل کمتری دارد. از سوی دیگر به نظر می‌رسد که این جلبک تک سلولی دارای مکانیسم‌های کارآمدی برای زیست در مناطق شور و تحمل شوری‌های زیاد می‌باشد.

روزهای ابتدائی آزمون که اندازه‌گیری‌ها در روز هشتم آن انجام شده و اکثر نوسانات و بویژه کاهش‌ها در آن اتفاق افتاده‌اند، از سویی مرحله رشد سریع و لگاریتمی تقسیمات منحنی رشد بوده و از سوی دیگر حداقل بخشی از آنها به نوعی مرحله سازگاری سلول‌ها با شرایط محیط کشت (بعنوان مثال از نظر میزان نور دریافتی توسط تعداد سلول‌های اندک موجود و تازه بودن محیط کشت) محسوب می‌شوند. در این رابطه مشخص شده که سلول‌ها در فاز لگاریتمی و تقسیمات سریع فرصت انباشت رنگدانه و یا برخی دیگر از ترکیبات را نداشته و بنابراین مقدار این ترکیبات در این شرایط در آن‌ها کاهش می‌یابد (Jimenez and Niell, 1991). بنابراین بنظر می‌رسد، برخی از افت‌های مشاهده شده در مقادیر اندازه‌گیری شده را علاوه بر اثر تیمارها، بتوان به این مورد نیز نسبت داد.

بررسی ساختمان کلروفیل نشان می‌دهد که نیتروژن در ساختمان کلروفیل مشرکت دارد. تحقیقات Hoyos Sanchez- و Manrique در سال ۱۹۹۵ بر روی گلسنگ، حاکی از افزایش مقدار رنگدانه‌ها در تیمار با KNO_3 و افزایش کلروفیل *b* در تیمار با NH_4Cl بود. تحقیقات Vasileva و Ilieva نیز در سال ۲۰۱۱، حاکی از افزایش مقدار رنگدانه‌ها در تیمار با نیترات یا آمونیوم می‌باشند. همچنین Giordano و همکاران (۱۹۹٤) نشان دادند که محتوای کلروفیل کل جلبک *Dunaliella salina* در غلظت بالای آمونیوم، دو برابر مقداری است که در محیط با غلظت بالای نیترات مشاهده می‌گردد و محتوای بتاکاروتن نیز در این حالت حدود ۵۰–۳۰ درصد افزایش یافت.

این تطابق به طور کامل در تحقیق حاضر ملاحظه نشد و تنها افزایش‌های مشاهده شده در تیمار آمونیومی مربوط به مقدار کلروفیل *b* در سلول‌های سویه ایرانی در غلظت ۰/۱ M نمک در روز ۸ام و کلروفیل‌های *a* ، *b* و کلروفیل کل، در غلظت‌های ۰/۵ و ۳ M نمک در سویه *D. bardawil* و در روز ۱٦ام می‌باشند. مقادیر بتاکاروتن و کاروتنوئید کل نیز با مستثنی کردن غلظت ۰/۵ M، مشابه حالات فوق افزایش یافتند. در برخی موارد که تیمار آمونیومی در غلظت بالای نمک اعمال گردید، حتی کاهش‌های بسیار مشخص در میزان رنگدانه‌ها هم مشاهده شد. در این رابطه سلول‌های تیمار شده در غلظت ۳ M نمک در NH_4Cl، کاهش شدید محتوای رنگدانه‌ای را در روز ۸ام اندازه‌گیری نشان می‌دهند که به نظر می‌رسد بخشی از

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-12-12]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1394.4.13.12.4]

آن مربوط به تقسیمات سلولی و باقی مربوط به برهم کنش تیمار شوری و آمونیوم است. البته کاهش مقدار رنگدانه‌ها در شرایط افزایش غلظت نمک محیط، در گیاهان نیز مشاهده شده که می‌تواند به دلایل تغییر نسبت لیپید به پروتئین در کمپلکس‌های رنگدانه-پروتئین و یا افزایش فعالیت کلروفیل در این شرایط باشد (Iyengar and Reddy 1996)، اما به نظر می‌رسد تغییر نوع تغذیه نیتروژنی بویژه در تیمار با NH_4Cl سبب کاهش بیشتر مقدار رنگدانه‌ها در غلظت‌های بالای نمکی شده است.

لازم به ذکر است در کلیه موارد، محتوای رنگدانه‌ای مربوط به سلول‌های غلظت M ۳ در تیمار آمونیومی، پس از افت مشخص یاد شده، بتدریج افزایش پیدا کرد و روند آن با سیر صعودی تا انتهای دوره آزمون ادامه یافت.

Holm-Hansen و همکاران در سال ۱۹۵۹، افزایش مقدار آمینواسیدها را به ازای مصرف مونوساکاریدهای فسفاته، با افزودن آمونیوم به محیط کشت جلبک *Chlorella*، گزارش نمودند. Giordano (۱۹۹۲) نیز سنتز آمینواسیدها و پروتئین در سلول را به عنوان یکی از موارد مصرف NH_4^+ در سلول‌های رشد یافته در غلظت بالای آمونیوم دانستند.

اما نتایج این تحقیق افزایش قابل توجه پروتئین محلول را تنها در غلظت زیاد نمک یعنی تیمار M ۳ و تیمار آمونیوم نشان داده و در رابطه با سایر غلظت‌های نمکی پایین نظیر ۰/۱ و ۰/۵، به جز یکی دو مورد در سایر تیمارهای نیتروژن، افزایش قابل ملاحظه‌ای مشاهده نمی‌شود. معنی‌دار بودن اثر متقابل نوع منبع نیتروژنی و غلظت نمک در هر دو سویه نشان می‌دهد که نقش آمونیوم در افزایش محتوای پروتئین سلول، با غلظت نمک محیط در ارتباط بوده و این افزایش احتمالا با ساخت آنزیم‌های دخیل در مقابله با تنش شوری در سلول همراه است. به نظر می‌رسد که در این شرایط به منظور مقابله با تنش شوری، سلول از جذب آمونیوم برای افزایش ترکیبات سازگار (Compatible solutes) نظیر آمینواسیدهای آزاد و پرولین بهره می‌گیرد (Almeida Viégas *et al*., 1999).

بررسی‌های آماری همچنین بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار میان وزن‌تر اندازه‌گیری شده در دو منبع نیتروژنی KNO_3 و KNO_3+NH_4Cl، در هر دو سویه بوده که احتمالا می‌تواند دال بر سنتز برخی ترکیبات نظیر آنزیم‌ها، کوآنزیم‌ها، اسیدهای نوکلئیک و سیتوکروم‌ها باشد (Hassegawa *et al*., 2008).

منابع:

Abusara, N. F. J. (2011) Optimal growth conditions for the production of beta-carotene and glycerol from a halophilic microalgae *Dunaliella* sp. isolated from the Dead Sea. MSc Thesis, Jordan University of Science and Technology, Jordan.

Almeida Viegas, R. and Albenisio Gomes da Silveira, J. (1999) Ammonia assimilation and proline accumulation in young cashew plants during long term exposure to NaCl-salinity. Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal 11:153-159.

Alvarado, C., Alvarez, P., Puerto, M., Gausseres, N., Jimenez, L. and Dela Fuente, M. (2006) Dietary supplementation on with antioxidants improves functions decreases oxidative stress of leucocytes from prematurely ageing mice. Nutrition 22: 767-777.

Alyemani, M. N. (1997) Growth response of *Vinga Ambacensis* L. seedling to the interaction between nitrogen and salt stress. Pakistan Journal of Botany 29: 323-330.

Avron, M. and Ben-Amotz, A. (1992) *Dunaliella*: physiology, biotechemistry and biotechnology. CRC Press, Boca Raton.

Baligar, V. C. and Schanffert, R. E. (1993) Growth and nutrient uptake parameters in sorghum as influenced by aluminum. Agronomy 58: 1068-1074.

Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of utilizing the principle of protein-Dye binding. Analytical Biochemistry 72: 248-254.

Duan, Y. H., Zhang, Y. L., Shen, Q. R. and Wang, S. W. (2006) Nitrate effect on rice growth and nitrogen absorption and assimilation at different growth stages. Pedosphere 16: 707-717.

Eijckelhoff, C. and Dekker, J. P. (1997) Routine method to determine the chlorophyll *a*, pheophytin *a* and *β*-carotene contents of isolated photosystem II reaction center complexes. Photosynthesis Research 52: 69-73.

Foyer, C. H. Noctor, G., Lelandais, M., Lescure, J. C., Valadier, M. H., Boutin, J. P. and Horton, P. (1994) Short-term effects of nitrate, nitrite and ammonium assimilation on photosynthesis, carbon partitioning and protein phosphorylation in maize. Planta 192: 211-220.

Giordano, M. (1992) Effetti di differenti condizioni di coltura sulla biologia della microalga verda alotollerante *Dunaliella salina*. PhD thesis, University of Geona, Geona, Italy.

Giordano, M., Davis, J. S. and Bowes, G. (1994) Organic carbon release by *Dunaliella salina* (Chlorophyta) under different growth conditions of CO_2, nitrogen, and salinity. Phycology 30: 249-257.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-12-12]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1394.4.13.12.4]

production. Plant and Soil 58: 177-204.
Oligae. (2014) Available on: http://www.oilgae.com/algae/cult/sew/new/amm/amm.html
Oliveria, L. and Huinh, H. (1989) Ultra structural cytochemistry of *Dunaliella tertiolecta* butcher or *Pavlov ahltheri* green grown on three different nitrogen regimes. New Phytologist 133: 481-490.
Pessarakli, M. 2001. Handbook of plant and crop physiology. 2nd Ed. Revised and expanded. Marcel Dekker, Inc., New York, 973p.
Pick, U. (2004) Adaptation of the halotolerant alga *Dunaliella* to high salinity. In: Salinity: Environment-Plants-Molecules (eds. Läuchli, A. Lüttge, U.). Pp: 97-112.Springer Netherlands.
Phang, S. M. (1992) Role of alga in livestock-fish integrated farming system. Proceeding of the FAO/IPT Workshop on Integrated Livestock-fish Production System. (eds. Mukherjee, T. K. Moi Panandam, P. S. and Yang, Y. S.) 16-20 Dec., University of Malaya, KualaLumpur, Malaysia. Pp: 49-56.
Post, F. J. (1977) The microbial ecology of the Great Salt Lake. *Microbial Ecology* 3: 143-165.
Quebedaux, B. and Ozburn, J. L. (1973) Effect of ammonium nutrition on water stress. Water uptake and rooi pressure in *Lycopersicon esculentum* Mill. Plant Physiology 52: 677-679.
Ricker, W. E. (1975) Computation and interpretation of biological statics of populations. Bulletin Fisheries Research Board of Canada 191: 1-382.
Roosta, H. R. and Schjoerring, J. K. (2007) Effect of ammonium toxicity on nitrogen metabolism and elemental profile of cucumber plants. Plant Nutrition 30: 1933-1951.
Sanchez-Hoyos, M. A. and Manrique, E. (1995) Effect of nitrate and ammonium on the pigment content (Xanthophylls, carotenes and chlorophylls) of *Amalina capitata*. Lichenologist 27: 155–160.
Sivasankar, S. and Oaks, A. (1996) Nitrate assimilation in higher plants: the effect of metabolites and light. Plant Physiology and Biochemistry 34: 609-620.
Stephens, D. W. and Gillespie, D. M. (1976) Phytoplankton production in the Great Salt Lake, Utah, and a laboratory study of algal response to enrichment. Limnology and Oceanography 21: 74-87.
Stitt, M. (1999) Nitrate regulation of metabolism and growth. Current Opinion in Plant Biology 2: 178-186.
Ten Hoopen, F., Cuin, T. A., Pedas, P., Hegelund, J. N., Shabala, S., Schjoerring, J. K. and Jahn, T. P. (2010) Competition between uptake of ammonium and potassium in barley and Arabidopsis roots: molecular mechanisms and physiological consequences. Journal of Experimental Botany 61: 2303-2315.
Vasileva, V. and Ilieva, A. (2011) Chemical composition, nitrate reductase activity and plastid pigments content in lucerne under the influence of ammonium and nitrate form mineral nitrogen. Agronomy Research 9: 357–364.
Giordano, M. (1997) Adaptation of *Dunaliella salina* (Volvocales, Chlorophyceae) to growth on NH_4^+ as the sole nitrogen source. Phycologia 36: 345-350.
Halama, D. (1990) Single cell protein. In: Nonconventional feed stuffs in the nutrition of farm animals (ed. Boda, K). Pp. 34-49. Elsevier Science Publishing Company, Inc. 655 Avenue of Americas, New York, N.Y. 10010.
Hallman, B. 1997. Aquarium Filtration. Aavailable on: http://fins.actwin.com/mirror/filters.html
Hartmut, K., Lichtenthaler, H. K. and Claus B. (2001) Chlorophylls and carotenoids: measurement and characterization by UV-VIS spectroscopy. Current Protocols in Food *Analytical Chemistry* Unit F4.3.
Hassegawa, R. H., Fonseca, H., Fancelli, A. L., da Silva, V. N., Schammass, E. A., Reis, T. A. and Correa, B. (2008) Influence of macro and micro nutrient fertilization on fungal contamination and fumonisim production in corn grains. Food Control 19: 36-43.
Hellio, C. and Le Gal, Y. (1999) Histidine from the unicellular green alga *Dunaliella tertiolect*a purification and partial characterization. European Journal of Phycology 34: 71-78.
Holm-Hansen, O., Nishida, K., Moses, V. and Calvin, M. (1959) Effects of mineral salts on short-term incorporation of carbon dioxide in *Chlorella*. Journal of Experimental Botany 10: 109–124.
Hue, N.V. and W. W. McCall. (1989) Soil salinity and the growth of Macadamia seedlings. Journal of Plant Nutrition 12: 449-464.
Hunault, G. (1985) Organic acids, pH, ammonium and nitrate interactions on the growth of Asparagus tissues cultivated in vitro. Annual Science Natural Botany Biology Vegetation 13: 63-75.
Irshad, M., Honna, T., Eneji, A. E. and Yamamoto, S. (2002) Wheat response to nitrogen source under conditions. Journal of Plant Nutrition 25: 2603-2612.
Iyengar, E. R. R. and Reddy, M. P. (1996) Photosynthesis in high salt tolerant plants. In: Hand book of photosynthesis. (ed. Pessarkali, M.) Pp. 56-65. Marshal Deker. Baten Rose, USA.
Jimenez, C. and Niell, F. X. (1991) Growth of *Dunaliella viridis* Teodoresco: effect of salinity, temperature and nitrogen concentration. Journal of Applied Phycology 3: 319-327.
Johnson, M. K., Johnson, E. J., Macelory, RD., Speer, H. L. and Bruff, B. S. (1968) Effect of salts on halophilic alga *Dunaliella viridis*. Bacteriology 95: 1461-1468.
Leliaert, A., Smith, D. R., Moreau, H., Herron, M. D., Verbruggen, H., Delwiche, C. F. and Clerck, O. (2012) Phylogeny and molecular evolution of the green algae. Critical Review of Plant Science 31: 1-46.
Lewis, O. A. M., Leidi E.O. and Lips, S. H. (1989) Effect of nitrogen source on growth response to salinity in maize and wheat. New Phytologist 111: 155-160.
Mengel, K. and Kirkby, E. A. (2001) Principles of plant nutrition. 5th ed. Kluwer academic Pub. London.
Novoa, R. and Loomis, R. S. (1981) Nitrogen and plant

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-12-12]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1394.4.13.12.4]