افزایش بیومس و رشد میکروجلبک *Dunaliella* تحت تاثیر تیمار وانیلین

فروغ اکبری و مریم مددکار حق‌جو*

گروه زیست شناسی (فیزیولوژی)، دانشکده علوم، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۰٦/۱۲، تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۵/۱۲/۰۷)

چکیده:

افزایش بیومس و میزان رشد میکروجلبک‌های سبز برای دست یافتن به مقادیر بیشتری از تولیدات ارزشمند آن‌ها، یکی از اهداف مهم علم فیزیولوژی گیاهی در رابطه با اکوسیستم‌های آبی است. عوامل بسیاری قادرند که بر افزایش و کاهش بیومس در جمعیت میکروجلبک‌ها تاثیر بگذارند. در این تحقیق تاثیر غلظت‌های مختلف ترکیب فنلی وانیلین ($C_8H_8O_3$)، بصورت صفر (شاهد)،۱۰، ۲۵، ٤۰، ۵۰، ۷۰، ۹۰ و ۱۰۰mg.L^{-1} بر تعداد سلول‌ها روند رشد، وزن تر و خشک و برخی شاخص‌های فیزیولوژیک (نظیر محتوای قندکل، قندهای احیاکننده، پروتئین و رنگدانه‌های فتوسنتزی) دو گونه *D.salina*-UTEX200 و *D.badawil*-UTEX2538، درطی یک دوره ۲٤روزه و در قالب طرح کاملاً تصادفی بصورت فاکتوریل با سه تکرار مورد مطالعه قرار گرفت. بیشترین تعداد سلول‌ها، در تیمارهای ۲۵ ، ٤۰ و ۵۰mg.L^{-1} وانیلین مشاهده شد. بیشترین سرعت رشد ویژه (Specific growth rate, SGR) و کمترین زمان دو برابر شدن تعداد سلول‌ها (Doubling time, DT) در *D. bardawil* در تیمار ۵۰mg.L^{-1} وانیلین و برای *D. salina* در تیمارهای ۲۵ و ٤۰mg.L^{-1} وانیلین، مشاهده شد. در اکثر تیمارهای وانیلین، وزن‌تر، وزن خشک و قندکل افزایش یافته، اما پروتئین و قندهای احیا (همگی در مقایسه با شاهد) کاهش یافتند. کلروفیل *a* و کل، کاروتنوئید کل صرفاً در *D. bardawil* افزایش یافتند، اما کلروفیل *b* و بتاکاروتن کاهش نشان دادند. گونه *D. salina* از سرعت رشد بیشتری نسبت به *D. bardawil*، برخوردار بود، اما مقادیر پروتئین، قند کل و قندهای احیا کننده در آن کمتر بودند. بطورکلی، برخلاف برخی مطالعات قبلی، حضور ترکیب فنلی وانیلین در محیط کشت در غالب موارد، سبب تحریک رشد و تقسیمات سلولی و نیز افزایش برخی شاخص‌های فیزیولوژیک در گونه‌های مزبور گردید.

کلمات کلیدی: بیومس، جلبک دانالیه‌لا، وانیلین، قندکل، قند احیا کننده، رنگدانه‌های فتوسنتزی

مقدمه

اهمیت برطرف شدن نیازهای تغذیه‌ای بشر موجب گردیده که نگاه او بیشتر به سوی طبیعت و هرآنچه که طبیعت در اختیار وی قرار می‌دهد، معطوف گردد. بطوریکه استفاده از فرآورده‌های طبیعی برای تامین نیازهای بشر، بعنوان یک راهکار سالم و مهم در زندگی ماشینی امروز مطرح شده و در این میان جلبک‌ها از سودمندترین و کارآمدترین تولیدکنندگان جامعه گیاهی هستند (Wijffels and Barbosa 2010; Carlsson, 2007).

از سویی، با توجه به رشد جمعیت، کمبود زمین‌های مساعد کشت، تجمع کودها و مواد شیمیایی و نیز شور شدن پیشرونده منابع خاکی، که کشاورزی و بهبود تولیدات آن را دشوار می‌سازد، امروزه در کشورهای مختلف صنعتی و پیشرفته، کشت و پرورش جلبک‌ها به منظور افزایش تولیدات آن‌ها در ابعاد صنعتی، کشاورزی، دارویی و غذایی به سرعت رو به پیشرفت نهاده و تکنولوژی‌های مدرن برای بهره‌برداری

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

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1397.7.24.11.6]

هرچه بیشتر از آن‌ها، مورد استفاده قرار گرفته‌اند. صرفه‌جویی اقتصادی با تاکید بر مصرف بهینه مواد اولیه، دلیل بسیار خوبی برای رشد و توسعه منابع جلبکی می‌باشد (Habib, 2008; Pulz and Gross, 2004; Richmond, 2004).

از نقطه نظر مسائل زیست محیطی نیز بیومس جلبکی در واقع به عنوان یک منبع انرژی سبز و تجدیدپذیر مورد توجه بوده و فناوری‌های جدید جهان، بر تولید سوخت‌های زیستی از جلبک‌ها نیز تاکید دارند. لذا در بین اقلام مختلف محصولات کشاورزی، منابع جلبکی برای تولید موادی نظیر اتانول و سوخت‌های زیستی در جهان انتخاب شده‌اند (Colla *et al.*, 2007). جلبک‌ها در کل حاوی ترکیبات ارزشمندی نظیر لیپیدها، قندها، پروتئین‌ها، آنتی‌اکسیدان‌ها، کربوهیدرات‌ها، ویتامین‌ها و مواد معدنی هستند (Ansari *et al.*, 2015; Lee *et al.*, 2013; Goo *et al.*, 2013; Pal *et al.*, 2011; Said, 2009; Alvarado *et al.*, 2006).

یکی از مهمترین جلبک‌های آب شور که امروزه به شکل مدرن و در سطح وسیع کشت می‌شوند، *Dunaliella* (دانالیه‌لا) است (Becker, 2007). این جلبک سبز، تک‌سلولی، تاژکدار و فاقد دیواره سلولی بوده و متعلق به خانواده پلی‌بلفاریداسه (Polyblepharidaceae) از شاخه کلروفیتا (Chlorophyta) و راسته ولوکال‌ها (Volvocales) می‌باشد (Leliaert *et al.*, 2012) که در خصوص قابلیت زیاد تجمع کارتنوئیدها (بویژه بتاکاروتن) بسیار مورد توجه و پژوهش قرار گرفته است (مزنگ قاسمی و همکاران، ۱۳۹۵). پلی‌ساکاریدها پس از کاروتن‌ها از دیگر ترکیبات با ارزش سلول جلبک دانالیه‌لا می باشند، که حدود ۱۲ تا ٤۰ درصد از محتوای کل جلبک را در برمی‌گیرند (Brown, 1991). جلبک مزبور بعنوان سیستم مدل در علوم پژوهشی، دارا بودن ایزومرهای مفید بتاکاروتن، کلروفیل و آنتی‌اکسیدان‌ها، در علوم پزشکی، دارا بودن پروتئین، کربوهیدرات، ویتامین‌ها، اسیدهای‌چرب ضروری در صنایع غذایی، و تولید گلیسرول در موارد صنعتی حائز اهمیت می‌باشد (Takaichi, 2011; Vilchez *et al.*, 2011; Wijffels and Barbosa 2010; Lamers *et al.*, 2008، مددکار حق جو،۱۳۹۰). علاوه بر اینکه *Dunaliella* بعنوان فیتوپلانکتون در اکوسیستم آب‌های شور، نیز مطرح بوده و بنابراین از نظر تغذیه زئوپلانکتون‌ها و جانوران ریز حائز اهمیت است (Shun-Xing *et al.*, 2007). بنابراین با توجه به کلیه موارد فوق، تولید و افزایش بیومس این جلبک از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است.

وانیلین (Vanillin) با نام علمی (4-hydroxy-3-methoxybenzaldehyde)، یک آلدهید فنلی با فرمول مولکولی $C_8H_8O_3$، می باشد. ساختار خاص وانیلین به عنوان ماده‌ای که در ساقه، ریشه، برگ و بذر بسیاری گیاهان وجود دارد (Skinner, 1915) سبب شده که این ماده دارای کاربردهای تجاری فراوانی باشد و به عنوان یک ترکیب فنلی، طعم‌دهنده، ترکیب عطری و یا پیش‌ساز دارویی استفاده گردد (Stanzione *et al.*, 2012; Kirk and Othmer, 2005). از لحاظ درمانی وانیلین را به عنوان یک ماده با خاصیت آنتی‌اکسیدانی، ضد میکروبی و آنتی‌موتاژنی می‌دانند (Kayaci and Uyar, 2012; Kumar *et al.*, 2012; Peng *et al.*, 2010) و خاصیت آنتی‌اکسیدانی وانیلین عمدتاً به حضور ترکیبات فنلی موجود در آن نسبت داده می‌شود (Shakeel *et al.*, 2015). وانیلین محلول در آب بوده و بررسی منابع نشان می‌دهد که برخی غلظت‌های آن در جلبک *Chlorella* سبب افزایش رشد گردیده است (Miazek *et al.*, 2013). اگرچه در رابطه با اثر ممانعت کننده و مهاری ترکیبات فنلی ازجمله وانیلین، بر رشد گیاهان، گزارش‌های زیادی وجود دارد (Yoshioka *et al.*, 2004; Kefeli *et al.*, 2003; Choe and Jung, 2001; Skinner, 1915) و مواردی نیز در رابطه با میکروجلبک‌ها، گزارش شده است (Choe and Jung, 2001; Vanilin, 1996). با این حال برخی دیگر از تحقیقات مدعی هستند که میکروجلبک‌ها قادر به حذف فنل در محیط کشت خود بوده و از این طریق می‌توانند اثر مهاری فنل بر رشد خود را از بین ببرند (El-Sheekh *et al.*, 2012; Pinto *et al.*, 2002).

بنابراین، نظر به اهمیت ویژه افزایش بیومس جلبک *Dunaliella* و جنبه‌های اقتصادی آن و نیز وجود اطلاعات ضد و نقیض در زمینه تاثیر ماده وانیلین بر رشد و تقسیمات سلولی، بررسی تاثیر این ماده در غلظت‌های مختلف، بر سرعت رشد، مقدار بیومس و برخی شاخص‌های فیزیولوژیک دو گونه

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1397.7.24.11.6]

جلبک *Dunaliella*، موضوع این تحقیق قرار گرفت.

مواد و روش‌ها:

دو گونه جلبک *Dunaliella salina*–UTEX200 و *Dunaliella bardawil*-UTEX2538 در این پژوهش مورد استفاده قرار گرفتند. نمونه های مزبور از دانشگاه اصفهان (بعنوان نمونه های هدیه شده از دانشگاه تگزاس) تهیه شده و در مجموعه جلبکی دانشگاه لرستان نگهداری می شوند. برای تهیه محیط کشت مایع از محیط کشت اصلاح شده جانسون و همکاران (Johnson, *et al*., 1968) با مولاریته یک مولار NaCl و pH معادل ۷/۲ استفاده شد (Shariati and Lilley, 1994). کلیه مواد مورد نیاز برای تهیه محیط‌های کشت جلبکی از شرکت سیگما یا مرک تهیه گردیدند. پس از اتوکلاو، مقادیر متفاوتی از ماده وانیلین با فرمول مولکولی $C_8H_8O_3$ تحت شرایط کاملاً استریل به محیط کشت پایه، به‌گونه‌ای اضافه شد که غلظت‌های صفر (بعنوان شاهد)، ۱۰، ۲۵، ٤۰، ۵۰، ۷۰، ۹۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر درون ارلن‌های مجزا تهیه شوند.

حجم‌های مشخصی از هر دو گونه (به طوریکه در نهایت تعداد 2×10^5 ml^{-1} سلول را در محیط کشت جدید، بدست دهند) به محیط کشت‌های تهیه شده، اضافه گردید. ارلن‌های تلقیح شده، سپس به شرایط آزمایش با شدت نور $\mu mol.m^{-2}\ s^{-1}$ ۵۰ و دمای ۲۵/۲۱±۲°C، (شب/روز) و با فتوپریود (۱۶/۸ ساعت، تاریکی/نور) منتقل شدند. برداشت نمونه از هر یک از ارلن‌ها به منظور شمارش سلولی و اندازه‌گیری شاخص‌های وزن تر، وزن خشک، پروتئین، قند کل، قندهای احیاکننده و رنگیزه‌ها در روزهای صفر، ٤، ۱۰، ۱٦ و ۲٤ تحت شرایط کاملاً استریل انجام گرفت. زمان‌های نمونه‌برداری و اندازه-گیری شاخص‌ها به صورتی انتخاب گردید که مراحل آغاز رشد، بخش لگاریتمی و نیز مرحله ایستایی رشد سلول‌ها را شامل گردد.

طراحی آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی بصورت فاکتوریل با سه تکرار، انجام شد. محاسبه و دسته‌بندی داده‌های آزمون با استفاده از نرم‌افزار Excel انجام شد، سپس نتایج حاصله با کمک نرم‌افزار (16) SPSS مورد آنالیز آماری واریانس ANOVA و مقایسات میانگین چند دامنه‌ی دانکن ($P<0.05$) قرار گرفتند.

به منظور شمارش سلولی، پس از رقیق سازی نمونه برداشت شده، از بلور ید برای ثابت کردن سلول‌ها استفاده شد و شمارش آن‌ها توسط لام آینه‌ای هموسایتومتر و با استفاده از میکروسکوپ نوری (با بزرگ نمایی ٤۰۰x) انجام شد و نتایج برحسب تعداد سلول در میلی‌لیتر بر اساس 10^6 سلول گزارش گردیدند (Martines *et al*., 1975).

برای اندازه‌گیری وزن تر، ده میلی‌لیتر از سوسپانسیون جلبکی در یک لوله آزمایش توزین شده، ریخته و سانتریفوژ گردید (Ramakrishna, 2011). محلول رویی خارج شد و پس از شستشوی سطحی با آمونیوم استات ۰/۵ درصد (Spektorov and Nazarenko, 1989) و خارج کردن مجدد محلول رویی، لوله‌های آزمایش حاوی رسوب جلبکی مجدداً توزین شدند. از اختلاف وزن لوله آزمایش و وزن ثانویه، وزن تر بر اساس 10^6 سلول ارائه شد. برای ارزیابی وزن خشک، لوله آزمایش حاوی بیومس تر به مدت ٤۸ ساعت، در درون آون ۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت.

نرخ رشد ویژه سلولی (Specific growth rate, SGR) در تیمارهای مختلف آزمایش از طریق فرمول ارائه شده توسط Omori و Ikeda (۱۹۸٤) و همچنین زمان دو برابر شدن (Doubling Time, DT) بر اساس فرمول ارائه شده توسط James و Al-Khars (۱۹۸٦) مورد محاسبه قرار گرفتند.

نرخ رشد ویژه با استفاده از رابطه (۱) محاسبه گردید، که در آن N_1 تعداد سلول‌های جلبک در زمان t_1 و N_2 تعداد سلول‌های جلبک در زمان t_2 و Δt مدت زمان انجام آزمایش است. زمان دو برابر شدن جمعیت سلولی نیز با استفاده از رابطه (۲) محاسبه گردید.

(1) $SGR= \mu = (ln N_2 - ln N_1)/ \Delta t$

(2) $DT= ln\ 2/ SGR$

اندازه‌گیری مقدار پروتئین به روش Bradford (۱۹۷٦) و با استفاده از محلول پروتئین استاندارد آلبومن گاوی، براساس اندازه‌گیری جذب نمونه (در طول موج ۵۹۵ نانومتر) انجام شد.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1397.7.24.11.6]

بدین صورت که یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون جلبکی به مدت ۵ دقیقه در g ۱۲۰۰۰ سانتریفوژ و محلول رویی خارج گردید. به رسوب جلبکی حاصل، ۵۰۰ میکرولیتر بافر استخراج (Smirnoff and Colombe, 1988) اضافه و به منظور یکنواخت شدن و استخراج کامل پروتئین‌ها به خوبی ورتکس شد. سپس سانتریفوژ به مدت ۱۵ دقیقه در g ۱۲۰۰۰، صورت گرفت و بسته به میزان رقت مورد نیاز، حجم مشخصی از محلول استخراج شده (مثلا ۵۰ میکرولیتر) به اپندرف دیگری منتقل شد و به آن محلول برادفورد اضافه گردید. این نمونه به مدت ۱۵ تا ۲۰ دقیقه در دمای اتاق قرار گرفت و در نهایت جذب محلول بدست آمده در طول موج ۵۹۵ نانومتر قرائت گردید.

سنجش مقدار قند کل سلول با استفاده از اسید سولفوریک غلیظ، مطابق روش Albalasmeh و همکاران (۲۰۱۳)، و ماده D-glucose برای ترسیم منحنی استاندارد (در طول موج ۳۱۵ نانومتر) صورت گرفت. بدین صورت که یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون جلبکی به مدت ۵ دقیقه در g ۱۲۰۰۰ سانتریفوژ و محلول رویی خارج گردید. به رسوب جلبکی حاصل ۸۰۰ میکرولیتر آب مقطر اضافه و به خوبی ورتکس شد و ۱۵ دقیقه در g ۱۲۰۰۰ سانتریفوژ گردید. سپس بسته به میزان رقت مورد نیاز، حجم مشخصی از محلول رویی به ظرف دیگری منتقل شد و به آن اسید سولفوریک غلیظ اضافه گردید. سپس به مدت ۳۰ ثانیه به سرعت ورتکس شد و به مدت ۲ دقیقه در آب یخ قرار داده شد و در نهایت جذب محلول بدست آمده در طول موج ۳۱۵ نانومتر قرائت گردید.

استخراج و سنجش مقدار قندهای احیاکننده، به ترتیب مطابق روشهای Lindsay (۱۹۷۳) و Miller (۱۹۵۹) و با استفاده از D-glucose برای ترسیم منحنی استاندارد (در طول موج ٥٤٠ نانومتر) انجام شد. به منظور استخراج، کلیه مراحل اولیه از برداشت سوسپانسیون جلبکی تا افزودن آب و انجام سانتریفوژ به مدت ۱۵ دقیقه در g ۱۲۰۰۰، بصورت مشابه با قند کل انجام شد و پس از برداشت حجم مشخصی از عصاره آبی و انتقال به ظرف دیگر، به جای اسید سولفوریک (که الیگوساکاریدها و دی ساکاریدها را به واحدهای کوچکتر مونوساکاریدی می شکند)، از معرف دی‌نیتروسالیسیلیک اسید (DNS)، که قابلیت احیا شدن توسط قندهای احیا کننده را دارد، استفاده گردید. محلول سپس در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد قرار گرفت و پس از گذشت مدت زمان ۱۰ دقیقه محلول سرد شده و جذب آن در طول موج ٥٤٠ نانومتر قرائت گردید. کلیه اندازه‌گیری‌ها با بهره‌گیری از دستگاه میکروپلیت ریدر (Biotec مدل Epoch) انجام شد و نتایج برحسب میکروگرم در 10^6 سلول گزارش گردیدند.

اندازه‌گیری و سنجش رنگدانه‌های کلروفیل *a*، کلروفیل *b*، کلروفیل کل و میزان بتاکاروتن براساس روش Eijckelhoff و Dekker (۱۹۹۷)، بر حسب میکروگرم رنگدانه در 10^6 سلول و مقدار کاروتنوئید کل براساس روش Lichtenthaler و Buschmann (۲۰۰۱)، بر حسب درصد تغییرات، با استفاده از دستگاه میکروپلیت ریدر فوق‌الذکر و حلال استون انجام شد. کلروفیل کل از مجموع کلروفیل‌های *a* و *b* بدست آمد.

نتایج و بحث

با توجه به ارزش اقتصادی جلبک *Dunaliella* (Anufriieva, 2014; Rosenberg *et al*., 2011)، افزایش بیومس برای دست یافتن به مقادیر بیشتری از تولیدات ارزشمند آن‌ها بسیار حائز اهمیت است. در این تحقیق از ماده وانیلین که تاثیر آن بر روی رشد جلبک *Chlorella*، قبلاً طی مطالعه‌ای، بررسی و مثبت گزارش شده بود (Miazek *et al*., 2013)، در محیط کشت جلبک *Dunaliella* استفاده گردید.

گزارشات بدست آمده از تحقیقات Miazek و همکاران (۲۰۱۳)، بر روی جلبک *Chlorella* که در آن غلظت‌های ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ میلی‌گرم بر لیتر وانیلین بر روی جلبک *Chlorella* مورد استفاده قرار گرفتند، حاکی از آن بود که صرفاً غلظت‌های پایین‌تر یعنی ۲۵ و ۵۰ سبب تحریک رشد و افزایش مقدار کلروفیل در کشت‌های جلبک مزبور گردیدند. از اینرو، در تحقیق حاضر، تاثیر غلظت وانیلین در محدوده صفر تا ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر بر روی رشد و برخی شاخص‌های زیستی دو گونه جلبک *Dunaliella* مورد بررسی قرار گرفت.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1397.7.24.11.6]

جدول ۱- میانگین مربعات جدول تجزیه واریانس برخی پارامترهای فیزیولوژیک جلبک *Dunaliella* تحت تاثیر گونه جلبک (*D. bardawil*, *D. salina*)، غلظت وانیلین (۰، ۱۰، ۲۵، ۴۰، ۵۰، ۷۰، ۹۰، ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر) و زمان یا روز نمونه‌برداری (۰، ٤، ۱۰، ۱٦، ۲٤).

منابع تغییرات	درجه آزادی	شمارش سلولی	وزن تر	وزن خشک	قند کل	قندهای احیا کننده	پروتئین
گونه جلبک	۱	۳۱۲۳/۸۹**	۳/۱۰۹**	۰/۰۰۱*	۸۲۳۵/۲**	٤٦٥/۰٥**	۱٤۱۷/۰۱**
وانیلین	۷	۱۰/٤۹۹**	۰/۰٤۹**	۰/۰۰۲**	٦۰/۰۰۱**	۹/۰۲۱**	۳/۳۳۲**
زمان	٤	۳۸۲۳/۲٥**	۳/۹۰۱**	۰/۰٦٤**	۱۱٦۰۷/٦**	۱۹۰۰/٤**	٥۲۳/۰۱**
گونه جلبک × وانیلین	۷	۹/٦۳٥**	۰/۰۰۹*	۰/۰۰۰۷**	۳٤/٥٦۲^{ns}	٦/٤٦۳**	۱/۱۳۸*
گونه جلبک × زمان	٤	٦٤۹/۷۸**	۰/٤۲۹**	۰/۰۱۱۲**	٤۹٦۳/۹۹**	۱٦۹/۰۷**	۱٦۹/۷٦**
وانیلین × زمان	۲۸	٥/۲۹۳**	۰/۰۲٦**	۰/۰۰۰۹**	٥۹/۳۹۲**	۸/٤۷**	۲/۷۷٦**
جلبک× وانیلین× زمان	۲۸	٦/٥٤۷**	۰/۰۱۲۳**	۰/۰۰۰٥**	٤٤/۸۱۷**	٥/٤۰۸**	۱/٦۲۱**
خطا	۸۰	۰/۱۰٤٤	۰/۰۰٤	۰/۰۰۰۲	۲۰/٤٦۸	۰/٥۹٤	۰/٤۷۱
کل	۱٦۰						

ادامه جدول ۱-

منابع تغییرات	کلروفیل ***a***	کلروفیل ***b***	کاروتنوئید کل	بتا کاروتن	کلروفیل کل
گونه جلبک	۳/٦۷۱**	۲/۰٤۷٦**	۱۲۹۷/٤۰**	۱/۳۸۹**	۱۱/۲۰۲**
وانیلین	۰/۰۱۳٤**	۰/۰۰۰۱٦^{ns}	۱۸/٥۷۰**	۰/۰۰۳٤**	۰/۰۱٤٤**
زمان	۰/۰٦۸۲**	۰/۲۱۲۷**	٦۳/٤۷٤**	۰/۰۹٦٦**	۰/٥۰٤**
گونه جلبک × وانیلین	۰/۰۲۳۰**	۰/۰۰۲**	۱۸/٦۳۰**	۰/۰۰٤۱**	۰/۰۳٥۷**
گونه جلبک × زمان	۰/۰٥۷٤**	۰/۰۹۳۰**	۳۱٥/٥٥۷**	۰/۰۲۸۹**	۰/۱٤۷**
وانیلین × زمان	۰/۰۰٦٤**	۰/۰۰۲۲**	۷/۱۹۹^{ns}	۰/۰۰۱۷**	۰/۰۱۳٤**
گونه جلبک × وانیلین× زمان	۰/۰۰٤۷**	۰/۰۰۱۷**	٦/۸٦۲^{ns}	۰/۰۰۱۲^{ns}	۰/۰۰۸۷**
خطا	۰/۰۰۱٥	۰/۰۰۰۱٥	۰/۰۰٦۳	۰/۰۰۰۸	۰/۰۰۲۳

**** و *، به ترتیب معنی‌دار در سطح ۱٪ و ٥٪ و ns، نشان دهنده عدم معنی‌داری هستند.**

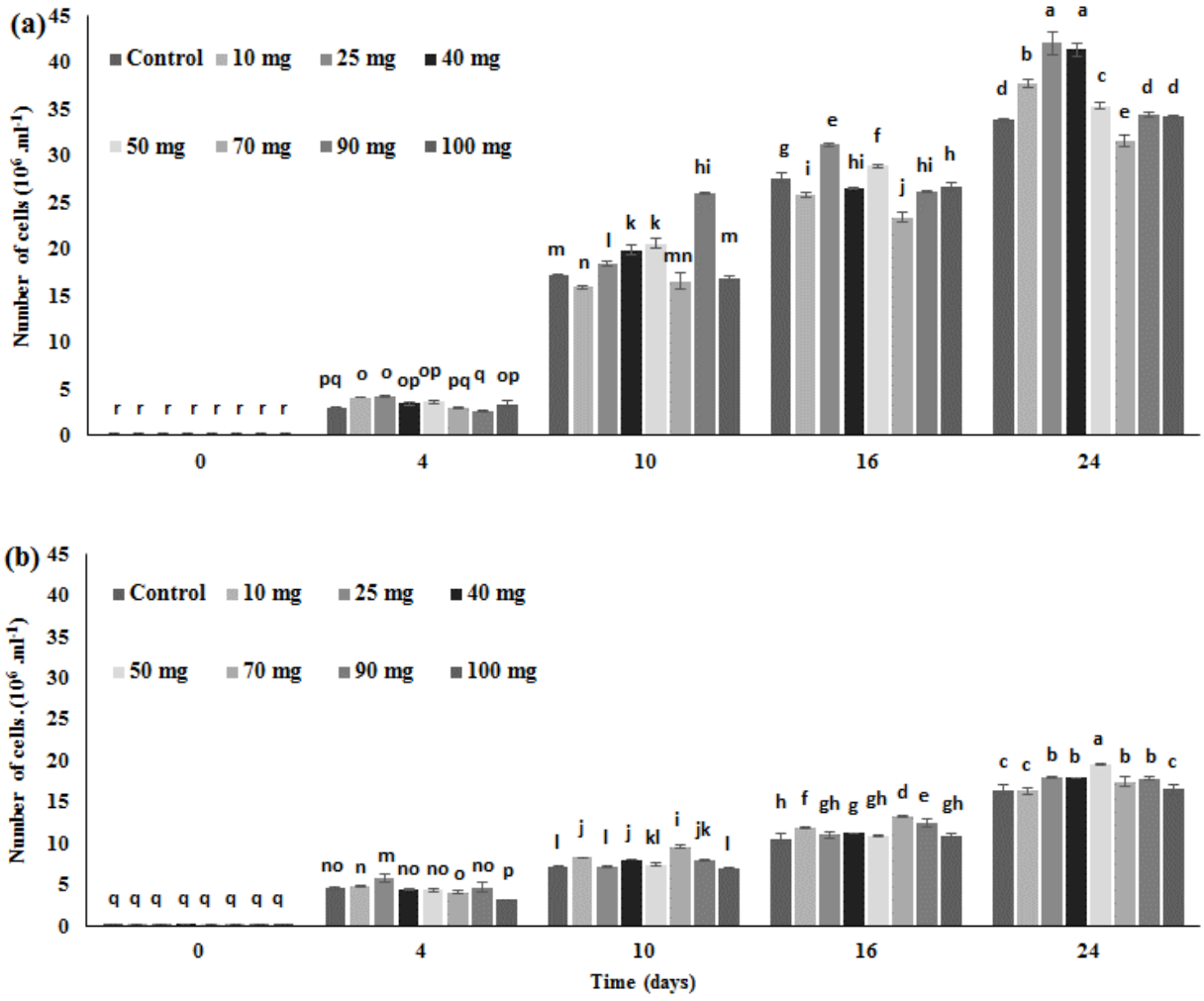
به طور کلی، به دلیل آنکه ارزیابی مستقیم محتوی کربن در اندازه‌گیری و تخمین مقدار بیومس، کار دشواری است، از اینرو در مطالعات بیومس، معمولاً از روش‌هایی نظیر شمارش سلولی، اندازه‌گیری وزن تر، وزن خشک و اندازه‌گیری غلظت رنگدانه‌ها که از شاخص‌های فیزیولوژیکی مهم جهت بررسی تنش‌ها هستند، استفاده می‌شود (Jeffrey *et al.*, 1997; Smayda, 1978).

نتایج آنالیز واریانس (جدول ۱) نشان داد که تاثیر وانیلین، گونه و نیز زمان بر روی اغلب شاخص‌ها از جمله تعداد سلول‌ها، معنی‌دار بوده است ($P<0.01, 0.05$). مقایسه میانگین‌ها، نیز حاکی از وجود اختلافات معنی‌دار ($P<0.05$) در مقادیر شاخص‌ها از جمله تعداد سلول‌ها بر اثر تیمار با غلظت‌های متفاوت وانیلین در هر دو گونه بود.

بررسی تاثیر تیمارهای مختلف وانیلین بر روند تقسیمات سلولی در شکل ۱، نشان می‌دهد که از روز تلقیح اولیه و یا شروع آزمایش (روز صفر)، یک روند افزایشی در تعداد

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1397.7.24.11.6]



شکل ۱- روند تغییرات منحنی‌های رشد بر اساس تقسیمات سلولی، در دو گونه جلبک *Dunaliella* در غلظت‌های مختلف وانیلین. a) منحنی رشد *D. salina* ; b) منحنی رشد *D. bardawil*. مقادیر میانگین سه تکرار ±SD می‌باشند.

سلول‌های هر دو گونه تا روز بیست و چهارم آزمون ملاحظه گردید. سرعت رشد و تقسیم در سوسپانسیون جلبکی *D. salina*، به طور کلی بالاتر از *D. bardawil* بود، بطوریکه در انتهای دوره رشد، تعداد سلول‌های *D. salina* در مجموعه تیمارها، به حدود $۳۰-۴۰\times۱۰^{۶}$ سلول و در *D. bardawil*، این تعداد، صرفاً به نصف تعداد قبلی یا حدود $۱۵-۲۰\times۱۰^{۶}$ سلول در هر میلی‌لیتر از سوسپانسیون جلبکی رسید. بررسی تعداد سلول‌ها در روزهای مختلف آزمون نشان داد که برخی از غلظت‌های وانیلین، دارای تعداد سلول بیشتری نسبت به شاهد (غلظت صفر وانیلین) در همان روز، می‌باشند که این امر نشان دهنده تاثیر تحریک کننده تیمارهای وانیلین بر تقسیمات سلولی است.

در *D. salina* بیشترین تعداد سلول، در غلظت‌های ۲۵ و ۴۰ میلی‌گرم بر لیتر وانیلین و در روز بیست و چهارم آزمون مشاهده شد (شکل a ,۱)، در حالیکه در روز شانزدهم، غلظت‌های ۲۵ و ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر و در روز دهم، غلظتی بالاتر یعنی ۹۰ میلی‌گرم بر لیتر وانیلین دارای بیشترین تعداد سلول بوده‌اند. در رابطه با *D. bardawil* (شکل b ,۱)، بیشترین تعداد سلول در غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر و روز بیست و چهارم مشاهده شد و در روزهای دهم و شانزدهم، تیماری که حاوی غلظت بالاتری از وانیلین یعنی غلظت ۷۰ میلی‌گرم بر لیتر بود، نیز بیشترین تعداد سلول را به خود اختصاص داد. به

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-03-29]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1397.7.24.11.6]

جدول ۲- نرخ رشد ویژه (SGR, μ) و زمان دو برابر شدن سلول‌ها (DT) برحسب روز، در دو گونه جلبک *Dunaliella* در غلظت‌های مختلف وانیلین طی یک دوره رشد ۲۴ روزه.

غلظت وانیلین ($mg.L^{-1}$)	*D. salina*		*D. bardawil*	
	SGR	DT	SGR	DT
Control	۰/۲۱۴ ^{d}	۱/۴۰۸ ^{b}	۰/۱۸۴ ^{c}	۱/۶۳۸ ^{a}
۱۰	۰/۲۱۸ ^{b}	۱/۳۷۹ ^{d}	۰/۱۸۳ ^{c}	۱/۶۴۲ ^{a}
۲۵	۰/۲۲۳ ^{a}	۱/۳۵۱ ^{e}	۰/۱۸۷ ^{b}	۱/۶۰۸ ^{b}
۴۰	۰/۲۲۲ ^{a}	۱/۳۵۵ ^{e}	۰/۱۸۷ ^{b}	۱/۶۰۸ ^{b}
۵۰	۰/۲۱۶ ^{c}	۱/۳۹۷ ^{c}	۰/۱۹۱ ^{a}	۱/۵۷۶ ^{c}
۷۰	۰/۲۱۱ ^{e}	۱/۴۲۸ ^{a}	۰/۱۸۶ ^{b}	۱/۶۱۷ ^{b}
۹۰	۰/۲۱۴ ^{cd}	۱/۴۰۴ ^{bc}	۰/۱۸۷ ^{b}	۱/۶۰۹ ^{b}
۱۰۰	۰/۲۱۴ ^{cd}	۱/۴۰۵ ^{bc}	۰/۱۸۴ ^{c}	۱/۶۳۷ ^{a}

مقادیر میانگین سه تکرار بوده و حروف کوچک غیرمشابه براساس آزمون دانکن، نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار میان نمونه‌های هر ستون ($P<0.05$) می‌باشند.

طور کلی با صرف‌نظر نمودن از برخی استثناها، به نظر می رسد که در هر دو گونه، غلظت‌های بالاتر وانیلین، در غالب اوقات، در اوایل کشت سوسپانسیون سلولی، سبب افزایش تقسیمات سلولی شده‌اند.

براساس اطلاعات مندرج در جدول ۲، در طول یک دوره ۲۴ روزه، به طور کلی، بالاترین نرخ رشد ویژه یا SGR در *D. salina* بر اثر تیمار با ۲۵ و ۴۰ میلی‌گرم بر لیتر وانیلین مشاهده شد و غلظت ۱۰ در رتبه بعدی قرار داشت. تیمار ۷۰ میلی‌گرم بر لیتر وانیلین طولانی‌ترین زمان دو برابر شدن سلول‌ها یا DT را موجب شد.

در *D. bardawil* کلیه تیمارها به جز ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر وانیلین دارای SGR بالاتر از شاهد بودند و بالاترین SGR در تیمار ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر وانیلین و سپس در باقی غلظت‌ها مشاهده شد. این نتایج نشان می‌دهد که به طور کلی، غلظت‌های محدوده ۲۵، ۴۰ و ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر وانیلین تقریباً در هر دو گونه تقسیمات سلولی را بیشتر تحریک می‌کنند (جدول ۲).

نتایج بدست آمده از تحقیقات حاضر که بر روی گونه‌های *Dunaliella* انجام شده، با آزمایشات صورت گرفته توسط Miazek و همکاران (۲۰۱۳) بر روی جلبک *Chlorella* sp. مطابقت دارد و بیان می‌کند که حضور وانیلین در برخی از غلظت‌ها، در محیط‌های کشت جلبک، نه تنها در فرآیند رشد و تکثیر سلولی اختلال ایجاد نمی‌نماید، بلکه می‌تواند موجب تحریک و افزایش رشد میکروجلبک نیز گردد. این مسئله می‌تواند به دو مورد که در ادامه توضیح داده خواهند شد، نسبت داده شود؛ اولاً برخی نقش‌های سیگنالی در داخل سلول‌ها به فنل نسبت داده شده اند و دوماً بخش اضافی و مضر فنل ممکن است توسط جلبک از محیط حذف شود.

در کنار تاثیر مثبت برخی غلظت‌های وانیلین بر رشد جلبک کلرلا، تحقیقاتی وجود دارد که نتایج آن‌ها حاکی از اثر مهاری وانیلین بر روی رشد و تکثیر برخی دیگر از جلبک‌ها و حتی سلول‌های جانوری است که به خاصیت فنلی وانیلین نسبت داده شده است (Lirdprapamongkol *et al*., 2009; Lirdprapamongkol *et al*., 2005). در تحقیقی که توسط Megharaj و همکاران (۱۹۹۲) برروی جلبک‌های *Chlorella vulgaris* و *Scenedesmus bijugatus* انجام گرفت، تاثیرات بازدارنده‌ای از ترکیبات فنلی و نیتروفنلی مشاهده گردید.

در عین حال، تحقیقات انجام شده، نقش‌های متفاوتی را برای فنل در سلول زنده معرفی نموده است. ترکیبات فنلی از یکسو از ترکیبات مهم تشکیل دهنده دیواره سلول‌های گیاهی و برخی جلبک‌ها (قهوه‌ای) گزارش شده‌اند که در برقراری پیوندهای عرضی مفید میان پلی‌ساکاریدهای مختلف، پکتین و

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1397.7.24.11.6]

نیز پروتئین‌ها نقش دارند (Popper and Tuohy, 2010; Schoenwaelder and Clayton, 1999) و از سوی دیگر، بعنوان ترکیبات سمی شناسایی شده‌اند که قادرند بر رشد و حیات سلول‌های زنده (از جمله جلبک‌ها) تاثیر منفی بگذارند (Qiming *et al*., 2006; Choe and Jung, 2001; Nakai *et al*., 2001). برخی مطالعات نیز به نقش‌های مهم و سیگنالی فنل‌ها، اشاره داشته‌اند که فعالیت آن‌ها در انتقال سیگنال‌های درون و برون سلولی و فعالسازی فرایندهای درون سلولی (نظیر تقسیم سلولی) را نشان می‌دهد (Mandal *et al*., 2010).

در رابطه با نقش فنل‌ها در تقسیم سلولی، بررسی منابع نشان داده است که برخی مشتقات اسیدی آن‌ها، رفتار و اثر سیتوکینین‌ها را تقلید می‌کنند، بنابراین احتمال دارد که از این طریق بتوانند در تقسیمات و توسعه سلولی دخیل باشند (Tamagnone *et al*., 1998). به نظر می‌رسد که ترکیبات فنلی از طریق نقش سیگنالی خود و نیز تقلید رفتار سیتوکینین‌ها، بتوانند در یک حالت وابسته به غلظت، در بیرون و درون سلول‌ها نقش‌های متفاوتی را اعمال نمایند و در این رابطه شاید تاثیرات مثبت، غالباً بر اثر غلظت‌های پایین فنل و تاثیرات منفی بیشتر بر اثر غلظت‌های بالا و سمی فنل بارز گردند. به بیان دیگر، غلظت‌های پایین وانیلین یعنی ۲۵، ٤۰ و ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر وانیلین که بر انجام تقسیمات سلولی در گونه‌های *Dunaliella* اثر مثبت داشته‌اند (شکل۱ و جدول ۲)، احتمالاً به همین صورت عمل کرده اند. در تحقیقی که بر روی گیاه بادمجان صورت گرفته است، نشان داده شده که وانیلین با غلظت کم می‌تواند سبب تحریک رشد ریشه‌ها و با غلظت بیشتر سبب ممانعت آن‌ها گردد (Chen *et al*., 2010).

با این حال، مشاهده می‌شود که غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر که پایین‌ترین غلظت مورد آزمون بوده است، تاثیر مثبت کمتری بر رشد و تکثیر سلولی (بویژه در گونه *D. bardawil*) اعمال نموده است (جدول ۱). بنابراین به نظر می‌رسد که در واقع وانیلین، در رابطه با تقسیم سلولی، در یک روند کاملاً کاهشی وابسته به غلظت عمل ننموده و احتمال می‌رود که عوامل دیگری نیز در تاثیرگذاری آن دخیل باشند.

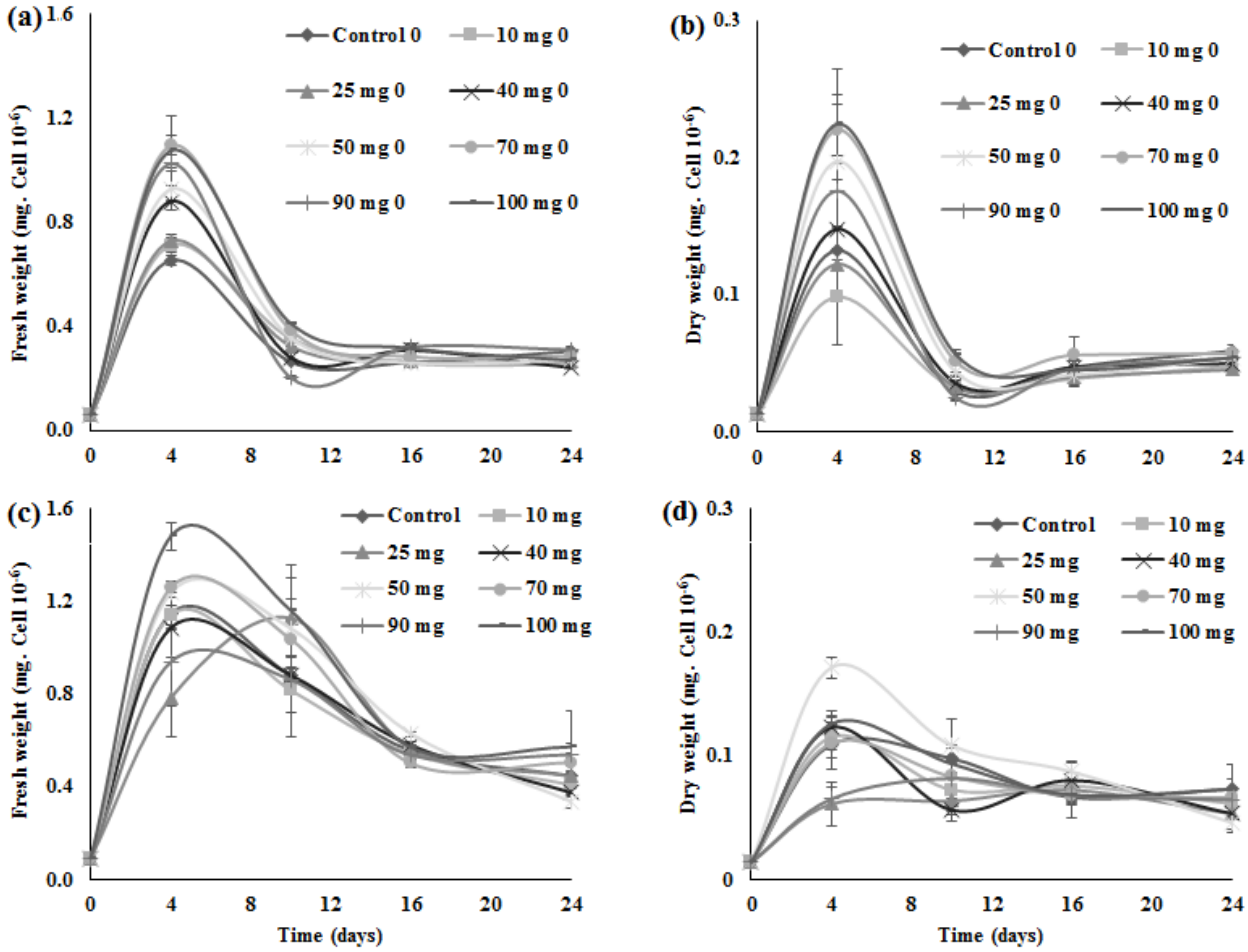
همانطور که قبلاً نیز عنوان شد، یکی از راهکارهایی که به منظور حذف ترکیبات فنلی محیط، صورت گرفته و نتیجتاً جلبک را از آثار سوء فنل در امان نگاه می‌دارد، عمل پالایش (Phycoremediation) است. این عمل در واقع از میکروارگانیسم‌هایی نظیر جلبک‌ها، قارچ‌ها و باکتری‌ها که قادر به برطرف نمودن زیستی فنل هستند، گزارش شده است. در رابطه با جلبک‌ها عمل مزبور می‌تواند با اتصال ماده به گروه‌های شیمیایی موجود بر روی دیواره سلولی و یا خنثی‌سازی احتمالی توسط مواد ترشح شده به درون محیط کشت توسط جلبک، و معدنی نمودن و تجزیه فنل به برخی ترکیبات کتکول (Catechols) صورت بگیرد (Gupta *et al*., 2015). البته جلبک دانالیه‌لا فاقد دیواره سلولی سلولزی است، ولی دارای غشای پلی‌ساکاریدی و موسیلاژی ویژه‌ای است که سلول را احاطه نموده است (Avron and Ben-Amotz, 1992).

نتایج بدست آمده از شکل ۱، نشان داد که در هر دو گونه، با افزایش سن سوسپانسیون سلولی، غلظت موثری از وانیلین که حاوی تعداد سلول‌های بیشتری است، تا حدودی کاهش می‌یابد. بعبارت دیگر تیمارهایی که در انتهای دوره (روز بیست و چهارم) حاوی تعداد سلول‌های بیشتر، نسبت به شاهد (غلظت صفر وانیلین) هستند، از اوایل آن (روزهای دهم و شانزدهم) کمترند (بترتیب ۲۵، ۵۰ و ٤۰ در مقابل ۷۰ تا ۹۰ میلی‌گرم بر لیتر وانیلین) و به عبارت دیگر یک تاثیر وابسته به زمان در این رابطه وجود دارد.

در تحقیقی که بر روی جلبک‌های *Ankistrodesmus braunii* و *Scenedesmus quadricauda* انجام گرفت، مشخص شد که این جلبک‌ها قادرند فنل پساب کارخانه روغن زیتون را تا روز پنجم کشت، به میزان ۷۰ درصد، حذف نمایند (Pinto *et al*., 2002). اما در آزمونی دیگر که بر روی توان پالایش فنل توسط جلبک‌ها و قارچ‌ها انجام شد، مشخص گردید که جلبک *Desmodesmus* sp. توانایی برطرف‌سازی ۷۵ درصد از ۲۵ میلی‌گرم بر لیتر فنل را تا روز ۲۵ کشت خود داراست (Al-fawwaz *et al*., 2016). در یک بررسی دیگر انجام شده بر روی رشد *Chlorella vulgaris*، نیز نشان داده

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1397.7.24.11.6]



شکل ۲- روند تغییرات وزن تر و وزن خشک سلول‌های دو گونه جلبک *Dunaliella* در غلظت‌های مختلف وانیلین. a) روند تغییرات وزن تر در *D. salina*، b) . روند تغییرات وزن خشک در *D. salina* ، c) روند تغییرات وزن تر در *D. bardawil*، d) روند تغییرات وزن خشک در *D. bardawil*. مقادیر میانگین سه تکرار ±SD می‌باشند.

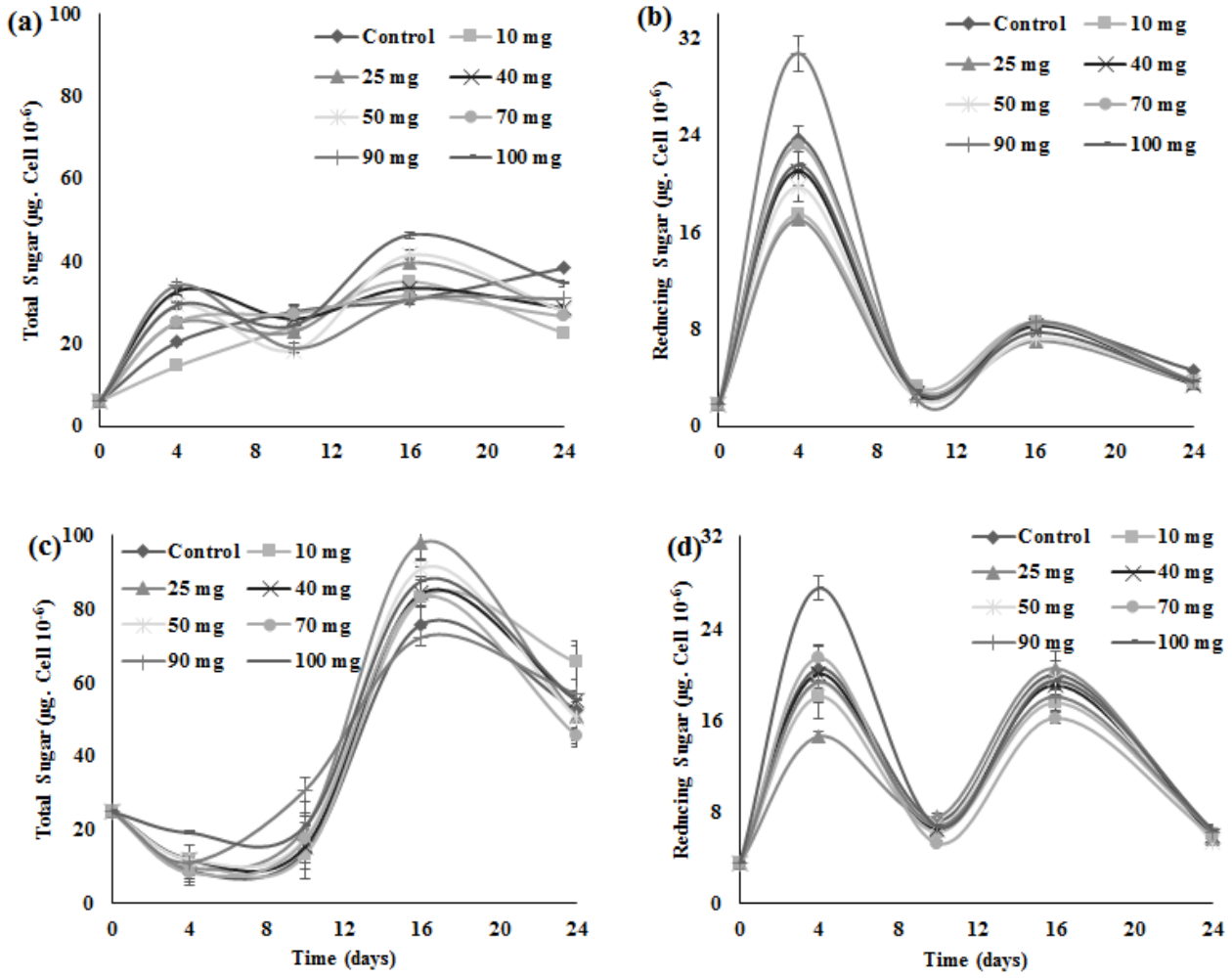
شد که حذف فنل در غلظت‌های ۲۵ و ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر وانیلین، سریعتر از سایر غلظت‌ها در محیط کشت، انجام گرفته است (El-Sheekh *et al.*, 2012). بنابراین به نظر می‌رسد که برطرف‌سازی ترکیبات فنلی توسط جلبک و نیز اثرگذاری آن بر سلول‌ها، علاوه بر غلظت، با فاکتور زمان نیز مرتبط باشد.

از طرف دیگر، جلبک‌ها دارای قابلیت ترشح بعضی مواد شامل قندها، اسیدهای آمینه، گلیکولیپیدها و نیز آنزیم‌ها به درون محیط کشت هستند که برخی از آن‌ها قادر به غیرفعال نمودن، ترکیبات فنلی می‌باشند (Seckbach, 2012). بنابراین به نظر می‌رسد که جلبک‌ها از این طریق بتوانند تا حدودی اثرات سمی فنل را خنثی نموده و احتمالاً از جنبه‌های تحریک کننده آن در متابولیسم بهره ببرند.

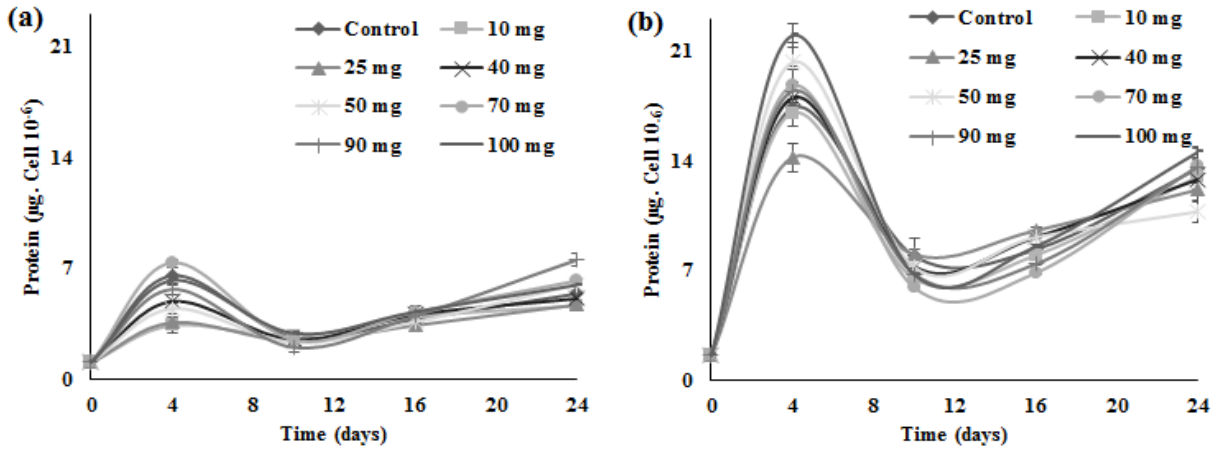
اختلافات موجود در پاسخ‌ها و رفتار دو گونه (شکل‌های ۱-۶ و جدول ۲) نشان داد که تاثیر وانیلین بر *Dunaliella*، علاوه بر غلظت و زمان، بستگی به نوع گونه تحت آزمون دارد.

علاوه بر تعداد سلول، وزن تر و وزن خشک نیز هر دو تحت تاثیر غلظت‌های متفاوت وانیلین قرار گرفته و در غالب موارد، بر اثر تیمارها، نسبت به شاهد، افزایش یافتند، اما میزان این افزایش بسته به نوع گونه متفاوت بود (شکل ۲). در گونه *D. salina*، غلظت‌های ۷۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر وانیلین سبب تولید بیشترین وزن تر و خشک شدند، درحالیکه در گونه *D. bardawil*، غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر، سبب بروز

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-03-29]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1397.7.24.11.6]



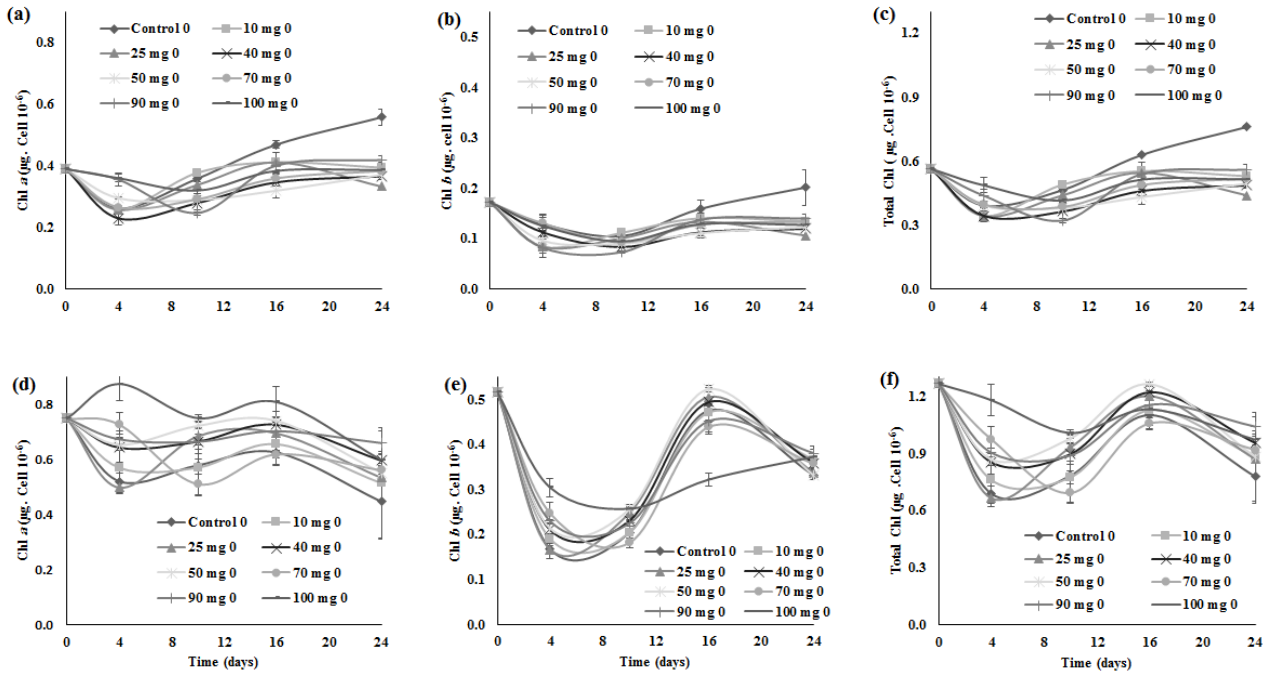
شکل ۳- روند تغییرات قند کل و قندهای احیاکننده، در سلول‌های دو گونه جلبک*Dunaliella* در غلظت‌های مختلف وانیلین. a) روند تغییرات قند کل در *D. salina*، b) روند تغییرات قندهای احیاکننده در *D. salina*، c) روند تغییرات قند کل در *D. bardawil*، d) روند تغییرات قندهای احیاکننده در *D. bardawil*. مقادیر میانگین سه تکرار ±SD می‌باشند.



شکل ٤- روند تغییرات پروتئین در سلول‌های دو گونه جلبک*Dunaliella* در غلظت‌های مختلف وانیلین. a) *D. salina*، b) *D. bardawil*. مقادیر میانگین سه تکرار ±SD می‌باشند.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1397.7.24.11.6]



شکل ۵- روند تغییرات کلروفیل *a*، کلروفیل *b* و کلروفیل کل، در دو گونه جلبک*Dunaliella* در غلظت‌های مختلف وانیلین. a) روند تغییرات کلروفیل *a* در *D. salina* ، b) روند تغییرات کلروفیل *b* در *D. salina* ، c) روند تغییرات کلروفیل کل در *D. salina*، d) روند تغییرات کلروفیل *a* در *D. bardawil*، e) روند تغییرات کلروفیل *b* در *D. bardawil*، f) روند تغییرات کلروفیل کل در *D. bardawil*. مقادیر میانگین سه تکرار ±SD می‌باشند.

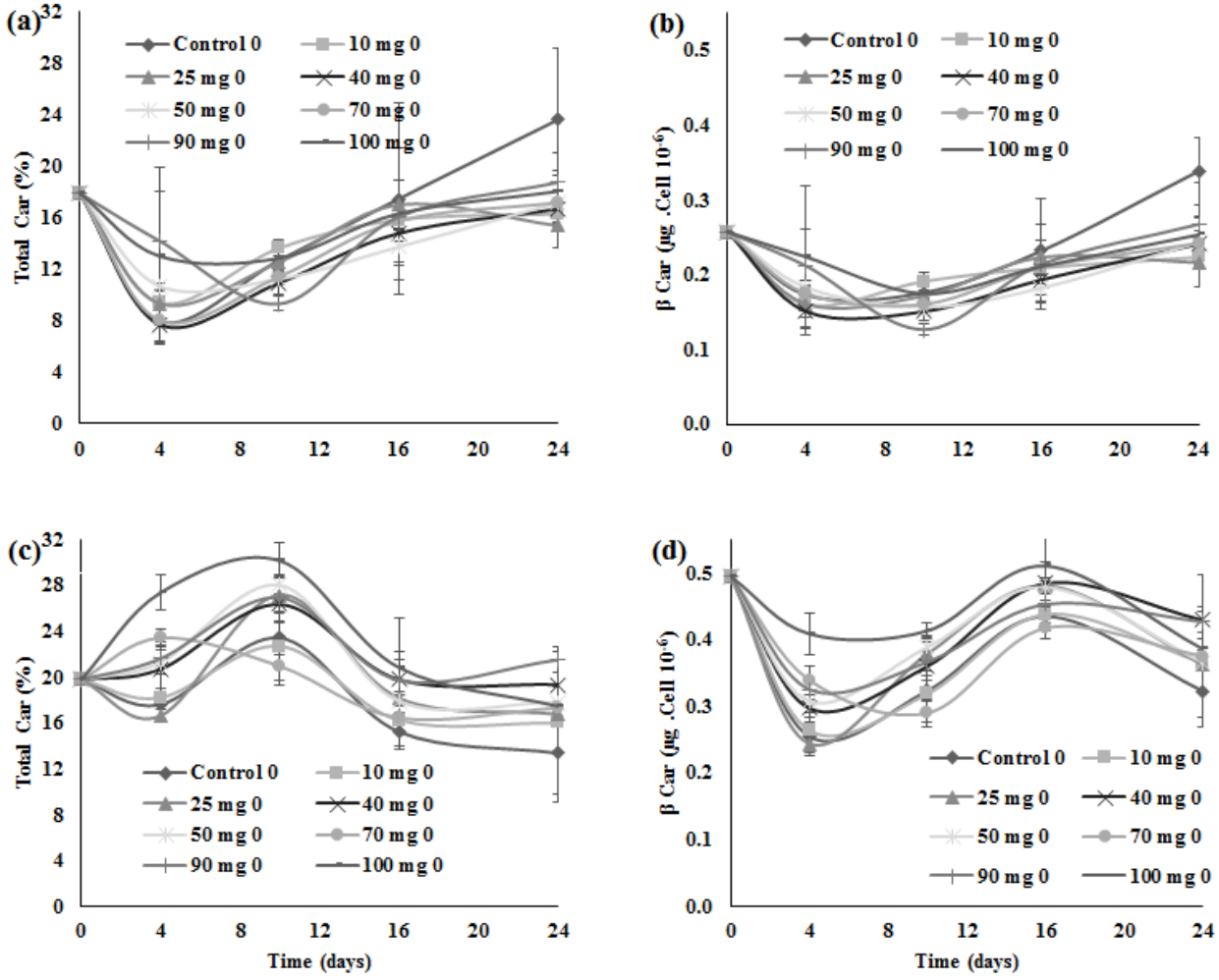
بیشترین وزن تر و ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر سبب تولید بیشترین وزن خشک شدند. همینطور با وجود بیشتر بودن مقادیر وزن تر در گونه *D. bardawil*، نسبت به گونه *D. salina*، مقدار وزن خشک گونه *D. bardawil*، از گونه *D. salina* کمتر بود. این امر می‌تواند به دلیل قابلیت بالای نگهداری آب و تولید مواد محلول، نظیر گلیسرول در گونه *D. bardawil* باشد، که بویژه در مقابله با تنش‌ها قادر است سلول را با شرایط محیط سازگار نماید. پتانسیل تولید مقادیر زیاد محلول‌ها و اسمولیت‌هایی نظیر گلیسرول در شرایط تنشی، در رابطه با گونه مزبور گزارش شده است (Markou and Nerantzis, 2013; Hadi *et al*., 2008). در ضمن کاهش مقدار وزن از روز چهارم تا روز دهم را می‌توان به تقسیمات سلولی پیاپی و سریع نسبت داد که به دلیل سرعت تقسیمات، تجمع مواد در درون سلول‌های در حال تقسیم را کاهش می‌دهد.

قندها از تولیدات بسیار مهم جلبکی هستند که اخیراً تحقیقاتی بر روی امکان تبدیل مستقیم آن‌ها به سوخت‌های زیستی صورت گرفته (Hestekin *et al*., 2011) و از آنجا که این ترکیبات دارای اسکلت کربنی بوده و منبع انرژی هستند، تغییرات آن‌ها در درون سلول، می‌تواند بر روی انجام تقسیمات سلولی و بیومس تاثیرگذار باشد (Kunz, 2014; Hu, 2004). مطالعات همچنین نشان داده‌اند که قندهای محلول نقش مهمی را در تنظیم فشار اسمزی سلول‌ها و نیز برخی نقش‌های مولکولی و سیگنالی، در شرایط تنشی ایفا می‌نمایند (Simaei *et al*., 2011; Gill *et al*., 2002).

برخی محققان که گیاهان تحت تنش را با برخی آنتی‌اکسیدان‌های اگزوژن تیمار کرده بودند، افزایش مقدار قندها، مقدار کلروفیل‌ها و تسریع رشد گیاه را گزارش نمودند (Sayed and Gadallah, 2002). احتمال می‌رود که ترکیبات فنلی نظیر وانیلین، که در واقع دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی هستند (Tai *et al*., 2011) نیز به همین صورت عمل کرده باشند.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1397.7.24.11.6]



شکل ٦- روند تغییرات کارتنوئید کل و بتاکاروتن سلول، در دو گونه جلبک *Dunaliella* در غلظت‌های مختلف وانیلین. a) روند تغییرات کارتنوئید کل در *D. salina* ، b) روند تغییرات بتاکاروتن در *D. salina*، c) روند تغییرات کارتنوئید کل در *D. bardawil*، d) روند تغییرات بتاکاروتن در *D. bardawil*. مقادیر میانگین سه تکرار ±SD می‌باشند.

در رابطه با قندهای احیا کننده، منحنی تغییرات آن‌ها، در غلظت‌های متفاوت وانیلین، با مصرف و کاهش سریع تا روز دهم (مرحله تقسیمات سلولی سریع) و سپس افزایش در روز شانزدهم (مرحله ایستایی رشد) در هر دو گونه، دنبال شد (شکل ۳, b, d). مصرف و کاهش قندهای احیاکننده در فاز لگاریتمی رشد، می‌تواند در جهت تامین انرژی برای رشد و تقسیمات سلولی به کار گرفته شده باشد (Goo *et al.*, 2013).

در این تحقیق، اغلب تیمارها سبب کاهش مقدار پروتئین، نسبت به شاهد، در هر دو گونه شدند. میزان پروتئین در گونه *D. salina* بسیار کمتر از گونه *D. bardawil* بوده و تغییرات آن نیز در طول دوره ۲٤ روزه آزمون، بطئی‌تر بود (شکل ٤). در اغلب نمونه‌ها، بیشترین مقدار پروتئین سلول‌ها، مشابه با وزن تر و خشک، در روز چهارم نمونه‌برداری مشاهده شد و از روز چهارم تا روز دهم آزمون که مرحله لگاریتمی و تقسیمات سریع سلولی است، محتوای پروتئین سلول روند کاهشی نشان داد. غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر وانیلین در گونه *D. bardawil*، سبب افزایش نسبت به شاهد شد. کاهش مقدار پروتئین برگ گیاه بر اثر اسید وانیلیک در غلظت ۱۰۰ میکرو مولار (۱۵/۲ میلی‌گرم بر لیتر) گزارش شده، درحالیکه غلظت ۰/۱ میکرو مولار آن ($۱۵/۲\times۱۰^{۶}$)، سنتز پروتئین را تحریک

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-03-29]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1397.7.24.11.6]

کرد (Mersie and Singh, 1993). بنابراین به نظر می‌رسد غلظت‌هایی که سبب تحریک سنتز پروتئین می‌شوند، بسیار پایین باشند. از سوی دیگر گزارش‌های متعددی در رابطه با باند شدن پروتئین‌ها به ترکیبات فنلی و غیرفعال شدن هر دو ترکیب وجود دارد (Mehanna *et al*., 2014; Rawel *et al*., 2005) که ممکن است در ارزیابی مقدار پروتئین‌های محلول موثر باشد.

علاوه بر آنکه کلروفیل در فرآیندهای فتوسنتز و تولید قند حائز اهمیت است، در اغلب مطالعات ارزیابی بیومس جلبکی نیز، از این رنگدانه که فراوانترین رنگدانه فتوسنتزی و مشترک میان تمامی موجودات فتوسنتز کننده است، استفاده می‌شود (Huot *et al*., 2007; Felip and Catalan, 2000). داده‌های حاصل از آنالیز واریانس نشان داد که به‌غیر از اثر اصلی وانیلین بر مقدار کلروفیل *b*، باقی تاثیرات اصلی و متقابل در رابطه با کلروفیل‌ها، معنی‌دار بوده‌اند (جدول ۱). تیمارهای وانیلین، در گونه *D. bardawil* سبب افزایش قابل توجه مقدار کلروفیل *a* شدند، در حالیکه در گونه *D. salina* بالعکس، کاهش‌ها بیشتر مشاهده گردیدند. این مورد تاثیر معنی‌دار نوع گونه بر مقدار کلروفیل *a*، در نمونه شاهد و نیز تحت تیمار وانیلین را نشان می‌دهد (جدول ۱ و شکل ۵, a , d). در رابطه با تغییرات کلروفیل *b*، تفاوت در مقدار و نیز تغییرات وابسته به زمان در میان دو گونه ملاحظه گردید (شکل ۵, b, e).

به دلیل آنکه قسمت اعظم کلروفیل کل، از کلروفیل *a* تشکیل شده، تغییرات کلروفیل *a* و نیز کلروفیل کل، تقریباً الگوهای مشابهی را به نمایش گذاردند (شکل ۵, c, f). نتایج بدست آمده دست کم در رابطه با گونه *D. bardawil*، با نتایج Miazek و همکاران (۲۰۱۳) بر روی جلبک *Chlorell*، که حاکی از افزایش میزان کلروفیل‌های *a* و *b* می باشند، همخوانی دارد. اما تفاوت میان منحنی‌های تغییرات کلروفیل در دو نمونه شاهد (غلظت صفر) از هر دو گونه را ممکن است بتوان به تفاوت موجود در سرعت انجام تقسیمات سلولی در آن‌ها نسبت داد. بطوریکه تقسیم سلولی گونه با اینکه بر تعداد سلول‌ها در واحد حجم می‌افزاید، ولی به خاطر کاهش زمان میان تقسیمات و در نتیجه کاهش فرصت تولید و تجمع رنگدانه‌ها، مقدار آن‌ها را در سلول‌ها کاهش می‌دهد (Alvarado *et al*., 2006).

بر اساس داده‌های حاصل از آنالیز واریانس به غیر از اثر متقابل غلظت وانیلین و زمان بر مقدار کاروتنوئید و نیز تاثیر متقابل گونه، غلظت وانیلین و زمان بر مقدار کاروتنوئید و بتاکاروتن، کلیه اثرات اصلی و نیز متقابل بر این دو شاخص، معنی‌دار بودند (جدول ۱). در گونه *D. salina*، هر دو مقدار کاروتنوئیدها و بتاکاروتن در ابتدای دوره رشد (تا روز ۱۶) مقداری کاهش نشان دادند و سپس در انتها اندکی افزایش یافتند (شکل ٦, a, b)، درحالیکه در گونه *D. bardawil*، افزایش معنی‌داری در مقدار کاروتنوئیدها مشاهده شد که در مقدار بتاکاروتن مشاهده نشد (شکل ٦, c, d). در هر دو گونه به طور کلی، غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر وانیلین در غالب اوقات، نسبت به سایر غلظت‌ها و نیز شاهد، سبب تولید مقادیر بیشتری از کاروتنوئید کل و نیز بتاکاروتن شد (شکل ٦, a, b , c, d).

در جلبک دانالیه‌لا و بویژه گونه *D. bardawil*، افزایش مقدار کاروتنوئیدها و بویژه بتاکاروتن بعنوان منابع ذخیره‌کننده کربن در پاسخ به تنش‌های محیطی به وفور مشاهده شده است. بعبارتی تجمع کارتنوئید ممکن است نتیجه برهم خوردن تعادل میان کربن و نیتروژن در سلول، طی شرایط نامطلوب محیطی باشد (Hu, 2004). برخی تحقیقات نیز نشان داده‌اند که کاروتنوئیدها از جمله بتاکاروتن می‌توانند حتی به عنوان آغازگر برای سنتز برخی ترکیبات معطر نظیر وانیلین به کار برده شوند (Van Dort *et al*., 1992).

در تحقیق که بتازگی انجام شده، رابطه میان رنگدانه‌ها، ترکیبات فنلی و نیز قند، نیز در گیاهی که مورد حمله یک پاتوژن قارچی قرار گرفته، بررسی شده و مشخص گردیده که افزایش مقدار کلروفیل، بتاکاروتن و سایر کاروتنوئیدها (بعنوان رنگدانه‌های فتوسنتزی)، با مقدار قندها (بعنوان اولین متابولیت‌های فتوسنتزی) و نیز مقدار ترکیبات فنلی (بعنوان آنتی‌اکسیدان‌هایی با وزن مولکولی پایین)، همبستگی مثبت و معنی‌دار دارند و بالعکس کاهش مقدار کلروفیل سلول که می‌تواند

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1397.7.24.11.6]

بر اثر ROS صورت گیرد، سبب ایجاد اختلال در فتوسنتز و تولید قند شده و در نهایت مقدار ترکیبات فنلی (آنتی‌اکسیدانی) تولید شده را کاهش می‌دهد (Hura *et al*., 2015).

نتیجه‌گیری:

بررسی منابع موجود از گذشته تا کنون نشان می‌دهد که ترکیبات فنلی نظیر وانیلین، در غالب موارد سبب ممانعت از تقسیم سلولی، اعمال تاثیرات منفی بر فتوسنتز و نیز ممانعت از سنتز پروتئین شده که در برخی موارد حتی به مرگ سلولی منجر شده است (Li *et al*., 2015; Colpas *et al*., 2003; Mersie and Singh, 1993; Clowes, 1951; Krahi and Clowes, 1940).

نتایج حاصل از این تحقیق بالعکس، در غالب موارد، حاکی از افزایش تقسیمات سلولی و سرعت رشد ویژه، افزایش مقدار قند کل، افزایش وزن تر و وزن خشک و نیز مقدار رنگدانه‌های کلروفیل، بتاکاروتن و بویژه کاروتنوئید کل، بوده که بسته به غلظت وانیلین، نوع گونه و سویه جلبک و سن کشت، برخی تفاوت‌ها نیز میان مقادیر قابل مشاهده بوده است. اما میزان پروتئین در اغلب تیمارها (به جز در غلظت‌های ۷۰ یا ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر وانیلین)، کاهش یافت. مقادیر برخی شاخص‌ها نظیر وزن تر، قند کل و قندهای احیا، پروتئین، کلروفیل‌ها و کاروتنوئیدها از جمله بتاکاروتن، به طور کلی در گونه *D. bardawil* بالاتر از گونه *D. salina* مشاهده شدند. به طور کلی، نتایج بررسی تعداد سلول‌ها در طول دوره رشد در هر دو گونه نشان داد که تاثیر غلظت‌های مختلف وانیلین بر وقوع تقسیمات سلولی یکسان نبوده، با اینحال غلظت‌های محدوده ۲۵، ٤۰ و ۵۰ بیشترین تاثیر را در روزهای انتهایی دوره رشد و غلظت‌های ۷۰ و ۹۰ میلی گرم بر لیتر بیشترین تاثیر را در میانه دوره (روز دهم نمونه برداری) بر افزایش تعداد سلول‌ها اعمال نمودند.

منابع:

مددکار حق‌جو، م. (۱۳۹۰) القای مقاومت در *Dunaliella* نسبت به پاراکوات، توسط برخی پیش‌تیمارها. مجله زیست شناسی گیاهی ایران، سال سوم، شماره دهم، ۷۱-۸٦.

مزنگ قاسمی، س. عینعلی، ع. ولیزاده، ج. نوروزی فر، م. (۱۳۹۵) القای تحمل به تنش ناشی از عصاره اسطوخودوس (*Lavandula angustifolia*) در جلبک سبز تک سلولی *Dunaliella salina* از طریق تعدیلات متابولیکی و تولید بتاکاروتن. مجله زیست شناسی گیاهی ایران، سال هشتم، شماره ۲۷، ٦۳-۸۰.

Albalasmeh, A. A., Berhe, A. A., and Ghezzehei, T. A. (2013) A new method for rapid determination of carbohydrate and total carbon concentrations using UV spectrophotometry. Carbohydrate Polymers 97: 253-261.

Al-fawwaz, A. T., Jacob, J. H., and Al-Wahishe, T. E. (2016) Bioremoval capacity of phenol by green micro-algal and fungal species isolated from dry environment. International Journal of Scientific and Technology Research 5: 155-160.

Alvarado, C., Alvarez, P., Puerto, M., and Gausseres, N. (2006) Dietary supplementation with antioxidants improves functions and decreases oxidative stress of leukocytes from prematurely ageing mice. Nutrition 27: 767-777.

Ansari, F. A., Shriwastav, A., Gupta, S. K., Rawat, I., Guldhe, and A. Bux, F. (2015) Lipid extracted algae as a source for protein and reduced sugar: a step closer to the biorefinery. Bioresourse Technology 179: 559-64.

Anufriieva, E. (2014) Copepods in hypersaline waters worldwide: diversity, environmental, social, and economic roles. Acta Geologica Sinica (English Edition) 88: 43-45.

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

Becker, E. W. (2007) Microalgae as a source of protein. Biotechnology Advances 25: 207-210.

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

Brown, M. R. (1991) The amino-acid and sugar composition of 16 species of microalgae used in mariculture. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 145: 79-99.

Carlsson, A. S. (2007) Micro and macro algae: utility for industrial applications: outputs from the EPOBIO project. CPL Press.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1397.7.24.11.6]

Chen, S. L., Zhou, B. L., Lin, S. S., Xia. L. and Xue-Ling. Y. (2010) Effects of cinnamic acid and vanillin on grafted eggplant root growth and physiological characteristics. The Journal of Applied Ecology/Zhongguo sheng tai xue xue hui 21: 1446-1452.

Choe, S., and Jung, I. (2001) Growth inhibition of freshwater algae by ester compounds released from rotted plants. Journal of Industrial and Engineering Chemistry 8: 297-304.

Clowes, G. H. A. (1951) The inhibition of cell division by substituted phenols with special reference to the metabolism of dividing cells. Annals of the New York Academy of Sciences 51: 1409-1431.

Colla, L. M., Reinehr, C. O., Reichert, C., and Costa, J. A. V. (2007) Production of biomass and nutraceutical compounds by *Spirulina platensis* under different temperature and nitrogen regimes. Bioresource Technology 98 (7): 1489-1493.

Colpas, F. T., Ono, E. O., Rodrigues, J. D., and Passos, J. R. S. (2003) Effects of some phenolic compounds on soybean seed germination and on seed-borne fungi. Brazilian Archives of Biology and Technology 46 : 155-161.

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

El-Sheekh, M. M., Ghareib, M., and Abou-EL-Souod, G. (2012) Biodegradation of phenolic and polycyclic aromatic compounds by some algae and cyanobacteria. Journal of Bioremediation and Biodegradation. 3 : 1-9.

Felip, M., Catalan, J. (2000) The relationship between phytoplankton biovolume and chlorophyll in a deep oligotrophic lake: decoupling in their spatial and temporal maxima. Journal of Plankton Research 22: 91-106.

Gill, P. K., Sharma, A. D., Singh, P., and Bhullar, S. S. (2002) Osmotic stress induced changes in germination, growth and soluble sugar content of *Sorghum bicolor* (L.) moench seeds. Bulgarian Journal of Plant Physiology 28: 12-25.

Goo, B. G., Baek, G. u., Choi, D. J., Park, Y. I., Synytsya, A., and Bleha, R., (2013) Characterization of a renewable extracellular polysaccharide from defatted microalgae *Dunaliella tertiolecta*. Bioresource Technology 129: 343-350.

Gupta, S. K., Shriwastav, A., Kumari, S., Ansari, F. A., Malik, A., and Bux, F. (2015) Phycoremediation of emerging contaminants. Algae and Environmental Sustainability 129-146.

Habib, M. A. B., Parvin, M., Huntington, T. C., and Hasan, M. R. (2008) A review on culture, production and use of *spirulina* as food for humans and feeds for domestic animals and fish. Food and Agriculture Organization of the United Nations 1029: 1-42.

Hadi, M. R., Shariati, M., and Afsharzadeh, S. (2008) Microalgal biotechnology: carotenoid and glycerol production by the green algae *Dunaliella* isolated from the Gave-Khooni salt marsh, Iran. Biotechnology and Bioprocess Engineering 13: 540-544.

Hestekin, G., Beitle, R., Lorenz, and Nicole. (2011) Extraction of sugars from algae for dirct conversion to butanol. University of Arkansas- Fayetteville. EPA Grant number: SU834701.

Hu, Q. (2004) 5 Environmental effects on cell composition. Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology 83-93.

Huot, Y., Babin, M., Bruyant, F., and Grob, C., (2007) Does chlorophyll *a* provide the best index of phytoplankton biomass for primary productivity studies. Biogeosciences Discuss 4(2): 707-745.

Hura, K., Hura, T., Dziurka, K., and Dziurka, M. (2015) Carbohydrate, phenolic and antioxidant level in relation to chlorophyll *a* in oilseed winter rape (*Brassica napus* L.) inoculated with *Leptosphaeria maculans*. European Journal of Plant Pathology 143: 291-303.

James, C. M., and and Al-Khars, A. M. (1986) Studies on the production of planktonic copepods for aquaculture. Syllogeus 58: 333-340.

Jeffrey, S.W., Mantoura, R. F. C., and Wright, S. W. (1997) Phytoplankton pigments in oceanography: guidelines to modern methods. UNESCO Publishing, Paris;

Johnson, M. K., Johnson, E. J., Macelroy, R. D., Speer, H. L., and Bruff, B. S. (1968) Effects of salts on halophilic alga *Dunaliella viridis*. Journal of Bacteriology 95: 1461-1468.

Kayaci, F., and Uyar, T. (2012) Encapsulation of vanillin cyclodextrin inclusion complex in electrospun polyvinyl alcohol (PVA) nanowebs: Prolonged shelf life and high temperature stability of vanillin. Food Chemistry 133: 641-649.

Kefeli, V. I., Kalevitch, M. V., and Borsari, B. (2003) Phenolic cycle in plants and environment. Journal of Cell and Molecular Biology 2 (1): 13-18.

Kirk, R. E., and Othmer, D. F. (2005) Encyclopedia of chemical technology. Edition, John Wiley and Sons.

Krahi, M. E., and Clowes, G. H. A. (1940) Studies on cell metabolism and cell division: IV. Combined action of substituted phenols, cyanide, carbon monoxide, and other respiratory inhibitors on respiration and cell division. The Journal of General Physiology 23 (4): 413-427.

Kumar, R., Sharma, P. K., and Mishra, P. S. (2012) A review on the vanillin derivatives showing various biological activities. International Journal of Pharm Tech Research 4: 266-279.

Kunz, S. (2014) Sugar-modulated gene expression and cell division in cell culture and seedlings of *A. thaliana*. Umea, Plant Science Centre Fysiologisk Botanik, Sweden.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1397.7.24.11.6]

Lamers, P. P., Janssen, M., De Vos, R. C. H., Bino, R. J., and Wijffels, R. H. (2008) Exploring and exploiting carotenoid accumulation in *Dunaliella salina* for cell factory applications. Trends Biotechnology 26: 631-638.

Lee, O. K., Kim, A. L., Seong, H. S., Lee, C. G., Jung, YT., Lee, J. W., and Lee, E. Y. L. (2013) Chemo-enzymatic saccharification and bioethanol fermentation of lipid-extracted residual biomass of the microalga, *Dunaliella tertiolecta*. Bioresource Technology 132: 197-201.

Leliaert, F., Smith, D. R., Moreau, H., Herron, M. D., Verbruggen, H., Delwiche, C. F. and De Clerck, O. (2012) Phylogeny and molecular evolution of the green algae. Critical Reviews in Plant Sciences 31: 1-46.

Li, H., Zhang, G. C., Xie, H. C., Li, K., and Zhang, S. Y. (2015) The effects of the phenol concentrations on photosynthetic parameters of *Salix babylonica* L. Photosynthetica 53 (3): 430-435.

Lichtenthaler, H. K., and Buschmann, C. (2001) Chlorophylls and carotenoids: measurement and characterization by UV-VIS spectroscopy. Current Protocols in Food Analytical Chemistry.

Lindsay, H. (1973). A colorimetric estimation of reducing sugars in potatoes with 3,5-dinitrosalicylic acid. Potato Research., 16: 176-179.

Lirdprapamongkol, K., Kramb, J. P., Suthiphongchai, T., Surarit, R., Srisomsap, C., Dannhardt, G., and Svasti, J. (2009) Vanillin suppresses metastatic potential of human cancer cells through PI3K inhibition and decreases angiogenesis in vivo. Journal of Agricultural and Food Chemistry 57: 3055-3063.

Lirdprapamongkol, K., Sakurai, H., Kawasaki, N., Choo, M. K., Saitoh, Y., Aozuka, Y., Singhirunnusorn, P., Ruchirawat, S., Svasti, J., and Saiki, I. (2005) Vanillin suppresses in vitro invasion and in vivo metastasis of mouse breast cancer cells. European Journal of Pharmaceutical Sciences 25: 57-65.

Mandal, S. M., Chakraborty, D., and Dey, S. (2010) Phenolic acids act as signaling molecules in plant-microbe symbioses. Plant Signaling and Behavior 5(4): 359-368.

Markou, G., and Nerantzis, E. (2013) Microalgae for high-value compounds and biofuels production: a review with focus on cultivation under stress conditions. Biotechnology Advances 31: 1532-1542.

Martines, M. R., Chakroff, R. P., and Pantastico, J. B. (1975) Note: direct phytoplankton counting technique using the hemocytometer. Philippine Agriculturis.

Megharaj, M., Pearson, H. W., and Venkateswarlu, K. (1992) Effects of phenolic compounds on growth and metabolic activities of *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus bijugatus* isolated from soil. Plant and Soil 140 (1): 25-34.

Mehanna, N. S., Hassan, Z. M. R., El-Din, H. M. F., Ali, A. A. E., Amarowicz, R., and El-Messery, T. M. (2014) Effect of interaction phenolic compounds with milk proteins on cell line. Food and Nutrition Sciences 5 (22): 2130-2146.

Mersie, W., and Singh, M. (1993) Phenolic acids affect photosynthesis and protein synthesis by isolated leaf cells of velvet-leaf. Journal of Chemical Ecology 19 (7): 1293-1301.

Miazek, K., Goffin, D., and Richel, A. (2013) The effect of vanillin on *Chlorella* growth. Life Sciences: Agriculture and Agronomy.

Miller, G. L. (1959) Use of dinitro salicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Analytical Chemistry 31 (3): 426-428.

Nakai, S., Inoue, Y., and Hosomi, M. (2001) Algal growth inhibition effects and inducement modes by plant-producing phenols. Water Research 35 (7): 1855-1859.

Noubigh, A., Cherif, M., Provost, E., and Abderrabba, M. (2008) Solubility of gallic acid, vanillin, syringic acid and protocatechuic acid in aqueous sulfate solutions from (293.15 to 318.15) K. Journal of Chemical and Engineering Data 53: 1675-1678.

Omori, M., and Ikeda, T. (1984) Methods in zooplankton ecology. John Wiley and Sons Inc., New York, USA. 332P.

Pal, D., Khozin- Goldberg, I., Cohen, Z., and Boussiba, S. (2011) The effect of light, salinity, and nitrogen availability on lipid production by *Nannochloropsis* sp. Journal of Applied Microbiology and Biotechnology 90 (4): 1429- 41.

Peng, H., Xiong, H., Li, J., Xie, M., Liu, Y., and Bai, C. (2010) Vanillin cross-linked chitosan microspheres for controlled release of resveratrol. Food Chemistry 121: 23-28.

Pinto, G., Pollio, A., Previtera, L., and Temussi, F. (2002) Biodegradation of phenols by microalgae. Biotechnology Letters 24 (24): 2047-2051.

Popper, Z. A., and Tuohy, M. G. (2010) Beyond the green: understanding the evolutionary puzzle of plant and algal cell walls. Plant Physiology 153: 373-383.

Pulz, O., and Gross, W. (2004) Valuable products from biotechnology of microalgae. Applied Microbiology and Biotechnology 65: 635-648.

Qiming, X., Haidong, C., Huixian, Z. and (2006) Allelopathic activity of volatile substance from submerged macrophytes on microcystin aeruginosa. Acta Ecologica Sinica 26 (11): 3549-3554.

Ramakrishna, A., Dayananda, C., Giridhar, P., Rajasekaran, T., and Ravishankar, G. A. (2011) Photoperiod influences endogenous indoleamines in cultured green alga *Dunaliella bardawil*. Indian Journal of Experimental Biology 49: 234-240.

Rawel, H. M., Meidtner, K., and Kroll, J. A. (2005) Binding of selected phenolic compounds to proteins. Journal of Agricultural and Food Chemistry 53: 4228-4235.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1397.7.24.11.6]

Richmond, A. (2004) Handbook of microalgal culture. Biotechnology and Applied Phycology. Oxford: Blackwell Science. John Wiley and Sons.

Rosenberg, J. N., Mathias, A., Korth, K., Betenbaugh, M. J., and Oyler, G. A. (2011) Microalgal biomass production and carbon dioxide sequestration from an integrated ethanol biorefinery in iowa: a technical appraisal and economic feasibility evaluation. Biomass and Bioenergy 35: 3865-3876.

Said, H. A. (2009) Changes in levels of cellular constituents of *Dunaliella parva* associated with inorganic phosphate depletion. Middle East Journal of Scientific Research 4: 94-99.

Sayed, S. A., and Gadallah, M. A. A. (2002) Effects of shoot and root application of thiamin on salt-stressed sunflower plants. Plant Growth Regulation 36: 71-80.

Schoenwaelder, M. E. A., and Clayton, M. N. (1999) The presence of phenolic compounds in isolated cell walls of brown algae. Phycologia 38: 161-166.

Seckbach, J. (2012) Evolutionary pathways and enigmatic algae: *Cyanidium caldarium* (Rhodophyta) and related cells. Springer Science and Business Media 91.

Shakeel, F., Haq, N., and Siddiqui, N. A. (2015) Solubility and thermodynamic function of vanillin in ten different environmentally beign solvents. Food Chemistry 180: 244-248.

Shariati, M., and Lilley, R. (1994) Loss of intracellular glycerol from *Dunaliella* by electroporation at constant osmotic pressure: subsequent restoration of glycerol content and associated volume changes. Plant, Cell and Environment 17 (12): 1295-1304.

Simaei, M., Khavari-Nejad, R. A., Saadatmand, S., Bernard, F., and Fahimi, F. (2011) Interactive effects of salicylic acid and nitric oxide on soybean plants under NaCl salinity. Russian Journal of Plant Physiology 58: 783-390.

Skinner, J. J. (1915) Effect of vanillin as a soil constituent. The Plant World 18: 321-330.

Smayda, T. J. (1978) From phytoplankters to biomass. Phytoplankton Manual. UNESCO, Paris 273-279.

Smirnoff, N., Colombe, S.V (1988) Drought influences the activity of enzymes of the chloroplast hydrogen peroxide scavenging system. Journal of Experimental Botany 39: 1097–1108.

Spektorov, K., and Nazarenko, L. (1989) Method of determining dry biomass by microalgae lacking a rigid cell wall. Soviet Plant Physiology 36 (3): 496-500.

Stanzione, J. F., Sadler, J. M., La Scala, J. J., Kaleigh, H., P. and Wool R. R. (2012) Vanillin based resin for use in composite applications. Green Chemistry 14: 2346-2352.

Tai, A., Sawano, T., Yazama, F., and Ito, H. (2011) Evaluation of antioxidant activity of vanillin by using multiple antioxidant assays. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects 1810: 170-177.

Takaichi, S. (2011) Carotenoids in algae: distributions, biosyntheses and functions. Marine Drugs 9 : 1101-1118.

Tamagnone, L., Merida, A., Parr, A., Mackay, S., Culianez-Macia, F. A., Roberts, K., and Martin, C. (1998) The ammyb308 and ammyb330 transcription factors from *Antirrhinum antirrhinum* regulate phenylpropanoid and lignin biosynthesis in transgenic tobacco. Plant Cell 10: 135-154.

Van Dort, J. M., De Heij, J. T., and Renes, H. (1992) Processing for preparing flavorings and perfumes based on one or more carotenoids as starting material. Google Patents.

Vanilin, O. S. (1996) Foreword introduction.bli 1: 2.

Vilchez, C., Forjan, E., Cuaresma, M., Bedmar, F., Garbayo, I., and Vega, J. M. (2011) Marine carotenoids: biological functions and commercial applications. Marine Drugs 9: 319-333.

Wijffels, R. H., Barbosa, M. J., and Eppink, M. H. (2010) Microalgae for the production of bulk chemicals and biofuels. Biofuels, Bioproducts and Biorefining 4 (3): 287-295.

Shun-Xing, L., Hua-Sheng, H., Feng-Ying, Z., Nan-Sheng, D., and Fang, L. (2007) Influence of nitrate on metal sorption and bioaccumulation in marine phytoplankton, *Dunaliella salina*. Environmental Toxicology 22: 582-6.

Yoshioka, T., Inokuchi, T., Fujioka, S., and Kimura, Y. (2004) Phenolic compounds and flavonoids as plant growth regulators from fruit and leaf of Vitex rotundifolia. Zeitschrift fur Naturforschung C 59: 509-514.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1397.7.24.11.6]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1397.7.24.11.6] [Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-03-29]