بسم الله الرحمن الرحيم

همه امتیازات این پایان نامه به دانشگاه لرستان تعلق دارد. در صورت استفاده از تمام یا بخشی از مطالب در مجلات، کنفرانس ها یا سخنرانی ها باید نام دانشگاه لرستان و اساتید راهنما و دانشجو با ذکر مأخذ و ضمن کسب مجوز رسمی از دفتر تحصیلات تکمیلی دانشگاه ثبت شود. در غیر اینصورت مورد پیگرد قانونی قرار خواهد گرفت.

دانشگاه لرستان

دانشکده علوم پایه

گروه زیست شناسی

پایان‌نامه جهت دریافت درجه کارشناسی ارشد در رشته فیزیولوژی گیاهی

عنوان

تعیین برخی خصوصیات فیزیولوژیک جلبک *Dunaliella* sp. (استخراج شده از ایران) در پاسخ به تغییر شرایط محیطی

استاد راهنما

دکتر مریم مددکار حق‌جو

نگارش

رؤیا محمدخانی

بهمن ۱۳۹۲

تقدیم به

پدر عزیزم که عرق جبینش عصاره هستی ام

و مادر مهربانم که وجودش آرامش زندگی ام است

و تقدیم به

استاد بزرگوارم، دکتر مریم مددکار حق جو

به پاس تمامی مساعدت ها و الطاف بی دریغش

و

همه کسانی که دوستشان دارم...

تقدیر و تشکر

سپاس خدای را که سخنوران در ستودن او بمانند و شمارندگان، شمردن نعمت‌های او ندانند، و کوشندگان حق او را گزاردن نتوانند و سلام و درود بر محمد و خاندان پاکش که وجودمان وامدار وجودشان و استواری هستی به برکت بودنشان است. شاکرم خدای را که بر من منت نهاد و توفیق انجام این پژوهش و نگارش این پایان نامه را عطا نمود و بدین سان وجوب سپاس‌گزاری از تمامی کسانی که در طی این مسیر، هموار کننده راهم بودند را بر من لازم و مبرهن داشت.

نخست از استاد بزرگوار، فرزانه و گرانقدرم، سرکار خانم دکتر مریم مددکار حق‌جو که با سعه صدر و مناعت طبع، راهنمایی این پایان نامه را به عهده گرفته و در طی این مسیر از هیچ گونه کمک، مساعدت و همکاری نسبت به من فروگذار نکرده و راهنمایی‌ها و دلسوزی‌های بی‌دریغشان همواره چراغ راهم بود، کمال تشکر و سپاس گزاری را دارم و از ایزد منان، برای ایشان و خانواده گرانقدرشان، سلامتی، شادکامی و توفیق روز افزون را خواستارم.

از استاد عزیز و ارجمندم، سرکار خانم دکتر مریم نصر اصفهانی که علاوه بر اینکه در طی این مدت از اساتید گرانقدرم بودند، زحمت داوری این پایان نامه را نیز متقبل شدند، نهایت تشکر و قدردانی را دارم.

از پدر و مادر و خانواده عزیزتر از جانم، متشکر و قدردانم به پاس تمام فداکاری‌ها و از خود گذشتگی‌هایی که لحظه‌ای از من دریغ نداشتند و بودنشان برایم امید تلاش و انگیزه ادامه راه بود و از خدای بزرگ توانی می‌طلبم که بتوانم ذره‌ای از دریای بی‌کران لطف و محبتشان را جبران کنم.

از تمامی اساتید بزرگواری که در طی این مقطع تحصیلی با آموختن حتی کلمه‌ای مرا بنده خویش ساختند، بسیار متشکر و سپاس گزارم.

از جناب آقای مهندس الماسیان، آقای دکتر محمدی و سرکار خانم جزایری به پاس همکاری‌ها و کمک‌های بی چشمداشتشان، به رسم ادب، قدر دانی می‌کنم.

و در پایان از دوست عزیز و خواهر مهربانم سرکار خانم مژگان کریمی و همه دوستان، همکلاسی‌ها و تمامی کسانی که بودنشان در طی مسیر برایم دلگرمی و کمکشان هموار کننده راهم بود متشکرم.

با سپاس و احترام- رؤیا محمدخانی

بهمن ۱۳۹۲

چکیده:

دانالیه‌لا (*Dunaliella*) یک جلبک سبز تک‌سلولی تاژکدار از شاخه Chlorophyceae، رده Chlamydomonadales، راسته Dunaliellales و تیره Dunaliellaceae می‌باشد. جلبک مزبور فاقد دیواره سلولی بوده و واجد یک غشای انعطاف‌پذیر است که می‌تواند در شرایط تنش اسموتیک در برابر افزایش یا کاهش چند برابری حجم سلول مقاومت نماید. دانالیه‌لا توانایی زیست در غلظت‌های بالای نمک NaCl را دارا بوده و در این شرایط با سنتز و تخریب گلیسرول، پتانسیل اسمزی خود را با محیط پیرامون تنظیم می‌نماید. در برخی شرایط تنش، جلبک مقادیر زیادی بتاکاروتن تولید نموده که می‌تواند از جهات پزشکی یا صنعتی مورد توجه واقع گردد. همچنین این جلبک ارزشمند از نظر استخراج ترکیباتی مانند پروتئین، گلیسرول، ویتامین‌ها و آنتی‌اکسیدان‌ها حائز اهمیت می‌باشد. کشت جلبک دانالیه‌لا به منظور کاربرد در تغذیه آبزیان نیز انجام می‌پذیرد. سویه‌های متفاوت جداسازی شده از مناطق مختلف جهان می‌توانند تحت شرایط متفاوت محیطی ویژگی‌های متفاوتی از خود بروز دهند که در استفاده از قابلیت‌های آنها در جنبه‌های مختلف تعیین کننده است. در مناطق مختلف ایران، زیستگاه‌های طبیعی برای این جلبک وجود دارد که ممکن است شامل سویه‌هایی باشند که از برخی ویژگی‌های متفاوت نسبت به سویه‌های شناخته شده برخوردار باشند. بررسی خصوصیات فیزیولوژیک این سویه‌ها در پاسخ به شرایط محیطی متفاوت در کنار بررسی مورفولوژیک به معرفی بهتر این سویه‌ها کمک نموده و شناسایی شرایط بهینه‌ای که سبب افزایش میزان رشد و تولیدات جلبک (از نظر ترکیبات کاروتنوئیدی، پروتئینی، گلیسرول وغیره) می‌گردد، به منظور استفاده‌های آتی از ظرفیت‌های جلبک ضروری است. در این تحقیق یکی از سویه‌های بومی(ایرانی) از باتلاق گاوخونی اصفهان جدا و خالص‌سازی گردید و تعیین ویژگی‌های مختلف فیزیولوژیک این سویه در شرایط متفاوت محیطی انجام پذیرفت. به منظور

بررسی مقایسه‌ای با سویه‌های شناخته شده، یک سویه دیگر با نام *Dunaliella* (UTEX2538) *bardawil* از کلکسیون جلبکی دانشگاه تگزاس تهیه گردید و همه آزمون‌ها به طور مشابه برای هر دو سویه انجام پذیرفت. در ابتدا یک آزمایش پایه با اهداف بررسی تاثیر غلظت‌های مختلف نمکی بر روند رشد سلول‌ها، میزان رنگدانه‌ها، پروتئین، گلیسرول و وزن تر، انتخاب سه غلظت نمکی مناسب برای انجام آزمون‌های بعدی و همچنین به عنوان آزمون شاهد، طراحی گردید. در این آزمایش، سویه‌ها در ۷ غلظت مختلف نمک (۰/۱، ۰/۵، ۱، ۱/۵، ۲، ۳ و ۴ مولار) و در شدت نور ۵۰ $\mu mol.m^{-2}s^{-1}$، دمای ۲۵/۲۳±۲°C، (شب/روز) با فتوپریود (۱۶/۸ ساعت، تاریکی/نور) و pH=۷/۳ و در سه تکرار برای هر سویه، رشد داده شدند. اندازه‌گیری پارامترهای مورد نظر هر ۴ روز یکبار انجام گرفت. بر اساس نتایج حاصل از این آزمون، بیشترین تعداد سلول‌ها برای سویه ایرانی و خارجی، به ترتیب در غلظت‌های ۰/۱ و ۰/۵ مولار نمک مشاهده گردید. در شرایط آزمون فوق افزایش نمک محیط کشت سبب افزایش مقدار پروتئین سلول گردید. با افزایش شدت نور به ۱۵۰ $\mu mol.m^{-2}s^{-1}$، غلظت بهینه برای رشد سویه ایرانی به ۰/۵ مولار نمک افزایش یافت. افزایش غلظت نمک محیط کشت با افزایش گلیسرول درون سلول رابطه مستقیم نشان داد و پایداری سلول‌های دانالیه‌لا در شرایط دمای ۳۷°C، با افزایش غلظت نمک محیط کشت و گلیسرول سلول، افزایش پیدا کرد. در این شرایط، افزایشی در مقدار بتاکاروتن سلول‌های سویه خارجی مشاهده گردید. قرار گرفتن سلول‌های هر دو سویه در معرض دمای ۱۵°C، کاهش سرعت رشد سلولی و افزایش مقادیر بتاکاروتن و پروتئین در هر دو سویه را به دنبال داشت. در خصوص سویه خارجی بهترین روند رشد سلولی در محیط حاوی منبع نیتروژنی KNO_3 و غلظت ۰/۵ مولار نمک، مشاهده گردید، در حالی که برای سویه ایرانی میان منابع مختلف نیتروژنی تفاوت معنی‌داری از نظر روند رشد سلول‌ها مشاهده نگردید. استفاده از آمونیوم به عنوان منبع نیتروژنی، سبب افزایش مقدار پروتئین در هر دو

سویه گردید. سریعترین روند رشد برای سویه خارجی در pH=۹ مشاهده گردید در حالی که سرعت رشد سویه ایرانی در pHهای مختلف، اختلافی در سطح معنی داری ۰/۰۵ >p نشان نداد.

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل اول: مقدمه و بررسی منابع

۱-۱- جلبک‌های تک سلولی ۱
۱-۱-۱-مراحل رشد جلبک‌های تک سلولی ۲
۱-۲- معرفی جلبک *Dunaliella* ۳
۱-۲-۱- تاریخچه و طبقه‌بندی ۳
۱-۲-۱- مورفولوژی جلبک *Dunaliella* ٤
۱-۲-۱-۱- تولید مثل جلبک *Dunaliella* ٦
۱-۱-۲-۲-۱- تولیدمثل جنسی ٦
۱-۲-۲-۲-۱- تولید مثل غیر جنسی ٦
۱-۲-۳-۱- اکولوژی جلبک *Dunaliella* ۷
۱-۲-٤-۱- فیزیولوژی جلبک *Dunaliella* ۷
۱-٤-۲-۱- رنگیزه‌های گیاهی و انواع رنگیزه‌های جلبک *Dunaliella* ۷
۱-۱-٤-۲-۱- کلروفیل ۸
۱-۲-٤-۲-۱- کاروتنوئید ۹
۱-۲-۱-٤-۲-۱- بتاکاروتن ۱۱
۱-۲-۱-٤-۲-۱- آلفاکاروتن ۱۲
۱-۲-۱-٤-۲-۱- کاروتنوئیدها و خنثی‌سازی ROS ۱۳
۱-۲-٤-۲-۱- شوری و پاسخ جلبک *Dunaliella* به تغییرات آن ۱٤
۱-۲-٤-۲-۱- تاثیر تنش شوری بر فتوسنتز ۱٦
۱-۲-٤-۲-۱- تغییرات محتوای کاروتنوئیدی در پاسخ به افزایش شوری محیط ۱۷
۱-۲-٤-۲-۱- تغییرات ایجاد شده در سایر ترکیبات سلول در پاسخ به افزایش شوری ۱۷
۱-۲-٤-۲-۱- شدت نور و پاسخ رنگدانه‌های جلبک *Dunaliella* به تغییرات آن ۱۸
۱-۲-٤-۲-۱- تغییرات دمای محیط و تاثیر آن بر جلبک *Dunaliella* ۲۰
۱-۲-٤-۲-۱- تاثیرات دمای پایین ۲۰
۱-۲-٤-۲-۱- تاثیرات دمای بالا ۲۱
۱-۲-٤-۲-۱- منبع نیتروژن و پاسخ جلبک *Dunaliella* به تغییرات آن ۲۲
۱-۲-٤-۲-۱- تاثیر تغییرات pH روی جلبک *Dunaliella* ۲٤

فصل دوم: مواد و روش‌ها

۱-۱- خالص‌سازی و کشت اولیه جلبک ۲٦

۱-۱-۲- کشت جلبک در محیط جامد ۲۶
۲-۱-۲- کشت تک کلنی‌ها در محیط مایع و بررسی‌های مورفولوژیک ۲۷
۲-۲- طراحی شرایط آزمون ۲۷
۱-۲-۲- آزمون پایه (کنترل) ۲۷
۲-۲-۲- بررسی تاثیر غلظت‌های متفاوت نمک NaCl (شوری) ۲۷
۳-۲-۲- تاثیر افزایش شدت نور ۲۷
٤-۲-۲- تغییرات میزان دما ۲۸
۱-٤-۲-۲- اعمال دمای $۳۷^{\circ}C$ ۲۸
۲-٤-۲-۲- اعمال دمای $۱۵^{\circ}C$ ۲۹
۵-۲-۲- شرایط تغییر منبع نیتروژنی ۲۹
۱-۵-۲-۲- منبع نیتروژنی KNO3 ..... ۲۹
۲-۵-۲-۲- منبع نیتروژنی NH_4Cl ۳۰
۳-۵-۲-۲- منبع نیتروژنی NH_4Cl و KNO_3 ..... ۳۰
٦-۲-۲- شرایط تغییر pH ۳۰
۱-٦-۲-۲- شرایط اسیدی (pH=۵) ۳۰
۲-٦-۲-۲- شرایط قلیایی (pH=۹) ۳۱
۳-٦-۲-۲- شرایط pH خنثی ۳۱
۳-۲- شمارش سلولی ۳۱
٤-۲- اندازه‌گیری رنگدانه‌ها ۳۲
۵-۲- اندازه‌گیری مقدار پروتئین سلول ۳۲
٦-۲- اندازه‌گیری وزن تر ۳۳
۷-۲- اندازه گیری pH محیط کشت در آزمون pH ۳۳
۸-۲- اندازه‌گیری میزان گلیسرول ۳۳

فصل سوم: نتایج

۱-۳- بررسی خصوصیات مورفولوژیک سویه‌های دانالیه‌لا ۳٤
۲-۳- نتایج حاصل از آزمون پایه ۳٤
۱-۲-۳- روند رشد سلول‌ها ۳٤
۲-۲-۳- روند تغییرات کلروفیل کل سلول ۳۵
۳-۲-۳- روند تغییرات کلروفیل *a* سلول ۳٦
٤-۲-۳- روند تغییرات کلروفیل *b* سلول ۳۷
۵-۲-۳- روند تغییرات بتاکاروتن سلول ۳۷
٦-۲-۳- روند تغییرات درصد کاروتنوئید کل ۳۸
۷-۲-۳- روند تغییرات پروتئین سلول ۳۹

۸-۲-۳- تغییرات وزن تر ٤٠
۹-۲-۳- بررسی نرخ رشد ویژه سلولی (SGR) ٤١
۱۰-۲-۳- نسبت مقدار گلیسرول ٤١
۳-۳- نتایج حاصل از آزمون شدت نوری $۱۵۰\mu mol.m^{-2}s^{-1}$ ٤٣
۱-۳-۳- روند رشد سلول‌ها ٤٣
۲-۳-۳-روند تغییرات کلروفیل کل سلول ٤٤
۳-۳-۳- روند تغییرات کلروفیل *a* سلول ٤٥
٤-۳-۳- روند تغییرات کلروفیل *b* سلول ٤٥
٥-۳-۳- روند تغییرات بتاکاروتن سلول ٤٦
٦-۳-۳- روند تغییرات درصد کاروتنوئید کل ٤٦
۷-۳-۳- روند تغییرات پروتئین سلول ٤٧
۸-۳-۳- تغییرات وزن تر ٤٨
۹-۳-۳- نرخ رشد ویژه سلولی ٤٩
٤-۳- نتایج آزمون اعمال دمای $۳۷^{\circ}C$ ٥٠
۱-٤-۳- روند رشد سلول‌ها ٥٠
۲-٤-۳-روند تغییرات کلروفیل کل سلول ٥١
۳-٤-۳- روند تغییرات کلروفیل *a* سلول ٥١
٤-٤-۳- روند تغییرات کلروفیل *b* سلول ٥٢
٥-٤-۳- روند تغییرات بتاکاروتن سلول ٥٤
٦-٤-۳- روند تغییرات درصد کاروتنوئید کل ٥٤
۷-٤-۳- روند تغییرات پروتئین سلول ٥٥
۸-٤-۳- تغییرات وزن تر ٥٦
۹-٤-۳-میزان گلیسرول سلول ٥٦
٥-۳- نتایج آزمون اعمال دمای $۱۵^{\circ}C$ ٥٧
۱-٥-۳- روند رشد سلول‌ها ٥٧
۲-٥-۳-روند تغییرات کلروفیل کل سلول ٥٨
۳-٥-۳- روند تغییرات کلروفیل *a* سلول ٥٩
٤-٥-۳- روند تغییرات کلروفیل *b* سلول ٦٠
٥-٥-۳- روند تغییرات بتاکاروتن سلول ٦١
٦-٥-۳- روند تغییرات درصد کاروتنوئید کل ٦١
۷-٥-۳- روند تغییرات پروتئین سلول ٦٢
۸-٥-۳- تغییرات وزن تر ٦٣
۹-٥-۳- نرخ رشد ویژه سلولی ٦٤

۱۰-۵-۳-میزان گلیسرول ٦٤
٦-۳- نتایج حاصل از آزمون منبع نیتروژن ٦٦
۱-٦-۳- روند رشد سلول‌ها..... ٦٦
۱-۱-٦-۳- روند رشد سلول‌های *Dunaliella bardawil*..... ٦٦
۲-۱-٦-۳- روند رشد سلول‌های *Dunaliella* sp..... ٦٧
۲-٦-۳- روند تغییرات کلروفیل کل سلول ٦٨
۱-۲-٦-۳- روند تغییرات کلروفیل کل در *Dunaliella bardawil*..... ٦٨
۲-۲-٦-۳- روند تغییرات کلروفیل کل در *Dunaliella* sp..... ٦٩
۳-٦-۳- روند تغییرات کلروفیل *a* سلول..... ۷۰
۱-۳-٦-۳- روند تغییرات کلروفیل *a* در *Dunaliella bardawil*..... ۷۰
۲-۳-٦-۳- روند تغییرات کلروفیل *a* در *Dunaliella* sp..... ۷۱
٤-٦-۳- روند تغییرات کلروفیل *b* سلول..... ۷۲
۱-٤-٦-۳- روند تغییرات کلروفیل *b* در *Dunaliella bardawil*..... ۷۲
۲-٤-٦-۳- روند تغییرات کلروفیل *b* در *Dunaliella* sp..... ۷۳
۵-٦-۳- روند تغییرات بتاکاروتن درون سلول ۷٤
۱-۵-٦-۳- روند تغییرات بتاکاروتن در *Dunaliella bardawil*..... ۷٤
۲-۵-٦-۳- روند تغییرات بتاکاروتن در *Dunaliella* sp..... ۷۵
٦-٦-۳- روند تغییرات کاروتنوئید کل سلول ۷٦
۱-٦-٦-۳- روند تغییرات کاروتنوئید کل در *Dunaliella bardawil* ۷٦
۲-٦-٦-۳- روند تغییرات کاروتنوئید کل در *Dunaliella* sp..... ۷۷
۷-٦-۳- روند تغییرات پروتئین درون سلول ۷۸
۱-۷-٦-۳- روند تغییرات پروتئین در *Dunaliella bardawil*..... ۷۸
۲-۷-٦-۳- روند تغییرات پروتئین در *Dunaliella* sp..... ۷۹
۸-٦-۳- تغییرات وزن تر ۸۰
۹-٦-۳- نرخ رشد ویژه سلول ۸۰
۷-۳- نتایج حاصل از آزمون pH..... ۸۱
۱-۷-۳- روند رشد سلول‌ها..... ۸۱
۱-۱-۷-۳- روند رشد سلول‌های *Dunaliella bardawil*..... ۸۱
۲-۱-۷-۳- روند رشد سلول‌های *Dunaliella* sp..... ۸۲
۲-۷-۳- روند تغییرات کلروفیل کل سلول ۸۳
۱-۲-۷-۳- روند تغییرات کلروفیل کل در *Dunaliella bardawil*..... ۸۳
۲-۲-۷-۳- روند تغییرات کلروفیل کل در *Dunaliella* sp..... ۸٤
۳-۷-۳- روند تغییرات کلروفیل *a* سلول..... ۸۵

۱-۳-۷-۳- روند تغییرات کلروفیل *a* در *Dunaliella bardawil* ۸۵
۲-۳-۷-۳- روند تغییرات کلروفیل *a* در *Dunaliella* sp. ۸۶
٤-۷-۳- روند تغییرات کلروفیل *b* سلول ۸۶
۱-٤-۷-۳- روند تغییرات کلروفیل *b* در *Dunaliella bardawil* ۸۶
۲-٤-۷-۳- روند تغییرات کلروفیل *b* در *Dunaliella* sp. ۸۸
٥-۷-۳- روند تغییرات بتاکاروتن سلول ۸۹
۱-٥-۷-۳- روند تغییرات بتاکاروتن در *Dunaliella bardawil* ۸۹
۲-٥-۷-۳- روند تغییرات بتاکاروتن در *Dunaliella* sp. ۹۰
٦-۷-۳- روند تغییرات کاروتنوئید کل سلول ۹۱
۱-٦-۷-۳- روند تغییرات کاروتنوئید کل در *Dunaliella bardawil* ۹۱
۲-٦-۷-۳- روند تغییرات کاروتنوئید کل در *Dunaliella* sp. ۹۲
۷-۷-۳- روند تغییرات پروتئین سلول ۹۳
۱-۷-۷-۳- روند تغییرات پروتئین در *Dunaliella bardawil* ۹۳
۲-۷-۷-۳- روند تغییرات پروتئین در *Dunaliella* sp. ۹٤
۸-۷-۳- تغییرات وزن تر ۹٥
۹-۷-۳- تغییر pH محیط کشت جلبک ۹٥
۱۰-۷-۳- نرخ رشد ویژه سلولی ۹۷

فصل چهارم: بحث

۱-٤- بحث ۹۹
جمع بندی ۱۰۸
پیشنهادات ۱۰۹
منابع ۱۱۰
ضمیمه ۱۲۷

فصل اول

مقدمه

۱-۱- جلبک‌های تک‌سلولی

ریزجلبک‌ها (microalgae) جانداران تک‌سلولی و میکروسکپی هستند که از طریق فتوسنتز، قابلیت تبدیل انرژی خورشیدی به انرژی شیمیایی را دارا بوده و حاوی ترکیباتی هستند که باعث کاربرد فراوان اقتصادی آن‌ها شده است. توانایی فتوسنتزی جلبک‌های تک‌سلولی برای تولید ترکیبات با ارزش، در مقایسه با گیاهان عالی، به دلیل استفاده کارآمدتر آن‌ها از نور خورشید، حاصل شده است. جلبک‌های تک‌سلولی می‌توانند در تهیه طیف وسیعی از متابولیت‌ها مثل پروتئین‌ها، لیپیدها، کربوهیدرات‌ها، کاروتنوئیدها[1] یا ویتامین‌ها به منظور مصارف درمانی، غذا و افزودنی‌های غذایی، مواد آرایشی و تولید انرژی به کار گرفته شوند. اولین استفاده انسان از این جلبک‌ها به ۲۰۰۰ سال پیش برمی‌گردد، زمانی که مردم چین طی دوران قحطی از *Nostoc* به عنوان غذا استفاده می‌کردند. این در حالی است که بیوتکنولوژی جلبک‌ها از اواسط قرن گذشته، آغاز گردیده است. امروزه از جلبک‌ها، استفاده‌های اقتصادی زیادی که می‌توان به بهبود ارزش غذایی مواد و تغذیه جانوران، اشاره کرد. جلبک‌های تک-سلولی نقش اساسی در کشت‌های آبی (Aquaculture) بازی می‌کنند و می‌توانند در ساخت مواد آرایشی کاربرد داشته باشد (Priyadarshani and Rath, 2012). آن‌ها همچنین یک منبع غنی از کاروتنوئیدها، پروتئین، آنزیم‌ها و فیبر هستند. بسیاری از ویتامین‌ها نظیر ویتامین A، C، B_1، B_2، B_6 و نیاسین و مواد معدنی نظیر ید، پتاسیم، آهن، منیزیم و کلسیم به مقدار زیاد در این جلبک‌ها یافت می‌شوند (Colla *et al.*, 2007). جلبک سبز-آبی *Spirulina platensis*، یک منبع غنی از پروتئین‌ها (*Colla et al.*, 2007)، اسیدهای چرب غیراشباع (Sajilata *et al.*, 2008)، رنگدانه‌ها (Madhyastha and Vatsala, 2007)، ویتامین‌ها و ترکیبات فنلی است (Colla *et al.*, 2007). کلرلا (*Chlorella*) جلبک دیگری است که به عنوان غذای ماهی، میگو و آبزیان مورد استفاده قرار می‌گیرد. مهمترین کاربرد اقتصادی کلرلا، تولید فرآورده‌هایی است که به عنوان مواد نگهدارنده در سبزیجات و غذاها استفاده می-شوند (Hills and Nakamura, 1976). یکی از مهمترین جلبک‌هایی که امروزه به شکل مدرن کشت می‌شود، *Dunaliella salina* است (Becker, 2004). جنس *Dunaliella*، در ابتدا برای تولید گلیسرول و پروتئین استفاده می‌شد، اما امروزه تولید کاروتنوئیدها، به خصوص بتاکاروتن[2]، زانتوفیل[3] و لوتئین، از این جلبک، مورد توجه ویژه‌ای قرار گرفته است (Ben-Amotz and Avron, 1983). جلبک مزبور به عنوان منبعی برای رنگدانه‌های فتوسنتزی و بتاکاروتن کاربرد دارد. کاروتنوئیدها به عنوان پیش‌ساز ویتامین A و رتینوئید عمل می‌کنند (Krinsky, 1993). این ترکیب اخیرا به عنوان یک ماده ضد سرطان

[1] Carotenoid
[2] β-caroten
[3] Xanthophyll

معرفی شده است. تحقیقات دیگر نشان داده است که بتاکاروتن روی کنترل کلسترول و کاهش خطر بیماری‌های قلبی تاثیرگذار است (Priyadarshani and Rath, 2012). دانالیه‌لا به عنوان منبع پروتئینی برای غذای پرندگان نیز کاربرد دارد (Finney *et al.*, 1984). این جلبک به علت دارا بودن مقادیر زیاد چربی، کشت آسان و دوره رشد کوتاه، به عنوان تولیدکننده سوخت‌های زیستی استفاده می‌گردد (Gouvein and Oliveria, 2009).

بهره‌گیری از جلبک‌های تک‌سلولی در مقاصد مختلف سبب راه اندازی سیستم‌های کشت گسترده از مقیاس‌های بسیار بالا در حد 10^{10} لیتر تا مقادیر کمتر (۱۰۰۰ لیتر) شده است. در کنار سسیستم‌های کشت ویژه که مقیاسی کوچک در حد کمتر از ۱۰۰۰ لیتر دارند، برای مقاصد تجاری از استخرهای روباز، استخرهای دارای بازوهای چرخان، استخرهای با جریان سریع و کیسه‌های بزرگ نیز استفاده می‌شود. از سایر سیستم‌های کشت ریزجلبک‌ها در مقیاس وسیع می‌توان به تانک‌های کشت مورد استفاده در مزارع پرورش آبزیان و سیستم‌های آبشاری اشاره کرد. عوامل مختلفی در انتخاب نوع سیستم کشت ریزجلبک‌ها نقش دارند که مهم‌ترین آن‌ها شامل نوع ریزجلبک، مواد غذایی، میزان مصرف انرژی، نوع محصول نهایی، قیمت زمین و همچنین آب و هوای منطقه برای کشت‌های صحرایی یا روباز (outdoor culture) می‌باشند (فرامرزی و همکاران، ۱۳۸۹).

۱-۱-۱- مراحل رشد جلبک‌های تک‌سلولی

همانند هر میکروارگانیسم دیگر، به دنبال فراهم بودن عوامل فیزیکی و مواد لازم برای رشد، ریزجلبک‌ها تکثیر می‌شوند و پس از طی مراحل رشد، توده سلولی مناسب ایجاد می‌کنند. رشد ریزجلبک‌ها شامل پنج مرحله مختلف می‌باشد:

الف) مرحله کند یا القا (Lag phase): این مرحله از رشد با یک وقفه زمانی در ابتدا خود را نشان می‌دهد. در واقع سلول‌ها در این مرحله، محیط اطراف خود را ارزیابی می‌کنند، تعدادی از سلول‌ها تقسیم می‌شوند و تعدادی دیگر از بین می‌روند؛ طوری که برآیند آن مشاهده عدم رشد سلولی است. هرچه ترکیب اجزاء محیط کشت به محیط اولیه کشت ریزجلبک نزدیک‌تر باشد مدت زمانی که سلول در این مرحله متوقف می‌شود نیز کمتر خواهد بود.

ب) مرحله رشد انبوه یا فاز لگاریتمی (Exponential phase): در این مرحله سلول‌هایی که به محیط جدید عادت کرده‌اند با سرعت بسیار زیادی شروع به تکثیر می‌کنند و تعداد آنها به شدت افزایش می‌یابد. بسته به مدت زمان لازم برای تقسیم سلول و نوع میکروارگانیسم، این مرحله از چندین ساعت تا چندین روز طول می‌کشد.

ج) مرحله کاهش (Decrease phase): پس از طی مرحله رشد انبوه، تعداد سلول‌ها به دلیل افزایش و تولید متابولیت‌های سمی و همچنین کمبود مواد غذایی رو به کاهش می‌گذارند و نوعی کاهش در منحنی رشد سلولی مشاهده خواهد شد.

د) مرحله ثابت یا بدون تغییر (Stationary phase): در این مرحله تعداد سلول‌هایی که از بین می‌روند با تعداد سلول‌هایی که تکثیر می‌شوند برابر هستند؛ بنابراین منحنی رشد به صورت یک خط افقی با شیب صفر در می‌آید.

و) مرحله مرگ (Death phase): در این مرحله کمبود مواد غذایی به حدی می‌رسد که تعداد سلول‌هایی که از بین می‌روند بیشتر از سلول‌هایی هستند که تکثیر می‌شوند بنابراین شیب نمودار منفی خواهد بود (فرامرزی و همکاران، ۱۳۸۹).

۲-۱- معرفی جلبک *Dunaliella*

۱-۲-۱- تاریخچه و طبقه بندی

اولین نگارش‌های علمی درباره این جلبک آب شور، توسط فردی فرانسوی به نام Dunal از سال ۱۸۳۷ به جای مانده است. دانال اولین کسی بود که اظهار داشت رنگ قرمز برخی آب‌گیرهای اشباع از نمک به خاطر وجود این جلبک است و آن را *Haematococcus salinus* نامید اما در سال ۱۹۰۵، فردی به نام Teodoresco ثابت کرد که این جلبک شباهت زیادی با *Haematococcus* ندارد و فاقد دیواره سلولی است و به افتخار دانال آن را *Dunaliella* نامید (Borowitzka and Borowitzka, 1988). در همان سال فردی به نام Clara Hamburger نیز، توصیفات خود در خصوص این جلبک را منتشر کرد (Hamburger, 1905). گونه‌های جدید جنس *Dunaliella* توسط Nicolai و Bass-Becking در سال ۱۹۳۵، Lerche در سال ۱۹۳۷ و Butcher در سال ۱۹۵۹ معرفی شدند که Butcher تعدادی از گونه‌های دریایی (آب شور) را توصیف کرد. فردی به نام Massyuk در سال ۱۹۷۳، جنبه‌های تاکسونومی دانالیه‌لا را مورد بررسی قرار داده و تعداد ۲۹ گونه را برای این جنس معرفی و یک کلید شناسایی برای این جلبک ارائه کرد (Borowitzka, 2007).

از زمان دانال تا کنون، جنس دانالیه‌لا، موضوع بسیاری از مطالعات فیزیولوژی، بیوشیمی، اکولوژی و کاربردهای اقتصادی گردیده که این امر در نتیجه چندین فاکتور حاصل شده است: ۱) سهولت کشت اکثر گونه‌های دانالیه‌لا، ۲) توانایی رشد در طیف وسیعی از غلظت‌های نمکی و شوری زیاد. ۳) توانایی ذخیره کردن مقدار بسیار زیاد بتاکاروتن در برخی سویه‌های *Dunaliella* و ۴) تحمل زیاد برخی سویه

به تنش‌های مختلف از جمله فلزات سنگین و آفت‌کش‌ها (مددکار حق‌جو، ۱۳۹۰). به عنوان مثال Ben-Amotz و Avron در سال ۱۹۷۳، Borowitzka و Brown در سال ۱۹۷۴ و Borowitzka و همکاران در سال ۱۹۷۷ به این نتیجه دست یافتند که توانایی گونه‌های دانالیه‌لا برای رشد در محدوده وسیعی از غلظت‌های نمکی و شوری‌های بالا، در حد اشباع نمک، به سبب توانایی آن‌ها برای تولید مقادیر زیاد گلیسرول می‌باشد. به علاوه *Dunaliella* نه تنها توانایی رشد در غلظت‌های بالای نمک را دارا می‌باشد، بلکه می‌تواند مقدار زیادی بتاکاروتن را نیز در خود ذخیره سازد. توانایی منحصر به فرد این جلبک به عنوان یک منبع طبیعی تولیدکننده بتاکاروتن، منجر به کشت و پرورش آن در مقیاس تجاری در سال ۱۹۷۰ گردید. در حال حاضر تولید بتاکاروتن توسط دانالیه‌لا، در کشورهایی نظیر استرالیا، چین، هند و ... انجام می‌شود (به نقل از Borowitzka, 2007).

بر اساس کلید شناسایی Massyuk، در سال ۱۹۹۲ Preising یک رده بندی از جنس *Dunaliella* تهیه نمود (Borowitzka, 2007). جنس *Dunaliella* و سایر تاژک‌داران فاقد دیواره، قبلا در تیره پلی‌بلی‌فریداسه[1] و راسته ولوکالس[2] قرار داشتند (Borowitzka and Siva, 2007)؛ اما در حال حاضر این جلبک، در شاخه کلروفیسه[3]، رده کلامیدومونادالس[4]، راسته دانالیه‌لالس[5] و تیره دانالیه‌لاسه[6] طبقه‌بندی می‌شود (Leliaert *et al.*, 2012). در گذشته تنها از صفات ریخت‌شناسی و بیوشیمیایی در رده‌بندی‌های تاکسونومیک استفاده می‌گردید، اما امروزه کاربرد مارکرهای ملکولی، به این روش‌ها افزوده شده است (Fazeli *et al.*, 2006). جلبک دانالیه‌لا دارای شباهت‌های زیادی با اعضای راسته کلامیدومونادالس است با این تفاوت که فاقد دیواره سلولی می‌باشد (Avron, and Ben-Amotz, 1992b; Borowitzka and Siva, 2007). هرچند از نظر ساختمان تاژکی و حالت و ترتیب اندامک‌هایی مثل میتوکندری و دیکتیوزوم‌های گلژی نیز تفاوت‌هایی میان آن‌ها دیده می‌شود (Avron, and Ben-Amotz, 1992a).

۲-۲-۱- مورفولوژی جلبک *Dunaliella*

جنس *Dunaliella*، همان طور که ذکر شد یک جلبک سبز تک‌سلولی و فاقد یک دیواره سلولی محکم می‌باشد. این ویژگی باعث تفکیک این جلبک از سایر اعضای شاخه کلروفیتا شده است. در واقع

[1] Polyblepharidaceae
[2] Volvocales
[3] Chlorophyceae
[4] Chlamydomonadales
[5] Dunaliellales
[6] Dunaliellaceae

می‌توان گفت که دانالیه‌لا یک پروتوپلاست واقعی است که تنها بوسیله یک غشای انعطاف پذیر ظریف پوشانیده شده است (Avron and Ben-Amotz, 1992b). این سلول‌های جلبکی، به شکل بیضوی، تخم مرغی، کروی، گلابی شکل و دوکی دیده می‌شوند. تحت برخی شرایط محیطی مانند شوک نمکی، سلول‌ها اغلب شکل کروی پیدا می‌کنند و در کشت‌های پیر و خصوصا در دمای پایین، ممکن است سلول‌هایی بزرگ و آمیبی شکل مشاهده گردد (Borowitzka, 2007). سلول‌های دانالیه‌لا، دارای تقارن شعاعی، دوطرفه و یا بدون تقارن هستند. این سلول‌ها فاقد دیواره سلولی‌اند اما یک پوشش موسیلاژی شبه گلیکوکالیکس[1] با ضخامت‌های متفاوت، می‌تواند در سلول‌های مسن‌تر تشکیل گردد (Borowitzka, 2007). این جلبک دارای دو تاژک هم اندازه است که در قسمت راس سلول قرار گرفته اند و حرکت سلول را امکان پذیر می‌کنند (Avron and Ben-Amotz, 1992b). دو تاژک دارای طول مساوی بوده و از قطب جلویی سلول، خارج شده‌اند. هر تاژک در جسم سلولی، به یک قاعده متصل می‌شود که این جسم قاعده‌ای[2] با دو ریشه تاژکی که شامل میکروتوبول‌ها و یک غلاف رشته‌ای است، در ارتباط می‌باشد. جلبک تاژکدار *Dunaliella* با شنا کردن به سمت نور و یا در جهت مخالف آن، جهت‌گیری خود را نسبت به منبع نور تنظیم می‌کند. اندامک کلروپلاست بیشترین فضای سلول را اشغال می‌کند (Avron and Ben-Amotz, 1992a) که معمولا به شکل فنجانی، مقعر یا زنگوله مانند دیده می‌شود و واجد یک پیرونوئید در قسمت ضخیم شده قاعده‌ای آن، در همه گونه‌ها به جز برخی گونه‌های آب شیرین می‌باشد (Borowitzka, 2007). پیرونوئید، ساختمان شبه پروتئینی است که توسط ذرات ریز نشاسته احاطه شده است و درون استرومای کلروپلاست قرار دارد و شامل بخش عمده‌ای از آنزیم روبیسکو[3] می‌باشد (Jimenenz *et al*., 1996). کلروپلاست ممکن است در برخی گونه‌ها به چندین لوب تقسیم شود. گاهی تیلاکوئیدها به شکل نامنظم روی هم قرار گرفته و وارد پیرنوئید می‌شوند اما از آن عبور نمی‌کنند. دسته‌ای شدن کلروپلاست‌ها به شدت نور و شوری محیط بستگی دارد. در کشت‌های پیر ممکن است دانه‌های نشاسته درون استرومای کلروپلاست قرار بگیرند. گویچه‌های لیپیدی که حاوی کاروتنوئیدها هستند نیز، درون کلروپلاست قرار گرفته‌اند (Browitzka and Siva, 2007). پیرنوئید معمولا با دانه‌های نشاسته احاطه می‌شود. بیشتر گونه‌ها دارای یک لکه چشمی[4] هستند که در انتهای قدامی کلروپلاست واقع شده و در برخی گونه‌ها، به سختی بوسیله میکروسکپ نوری قابل مشاهده است (Avron and Ben-Amotz, 1992a). وجود رودوپسین به عنوان یک گیرنده نوری، در لکه چشمی کلامیدوموناس و جنس‌های وابسته به آن، مشابه چشم حیوانات ثابت شده است (Hegmann, *et al*., 1997). هسته که بیشتر ناحیه

[1] Glycocalyx
[2] Basal body
[3] Rubisco
[4] Eyespot

قدامی سلول را اشغال می‌کند، معمولا در طول زندگی جلبک، بوسیله تعدادی گرانول پوشش داده می‌شود و دارای غشا منفذدار و یک هستک می‌باشد. میتوکندری‌ها در نواحی مختلف سلول قابل رویت هستند و با توجه به مراحل مختلف رشد جلبک، اندازه متغیر دارند. تعداد دو تا چهار دیکتیوزوم[1] (اجسام گلژی) در سیتوپلاسم مشاهده می‌شود که هر کدام در بر گیرنده ۱۵-۱۰ سیسترن[2] هستند. شبکه آندوپلاسمی در بیشتر قسمت‌های سلول در زیر غشای پلاسمایی دیده می‌شود. گلبول‌های لیپیدی ممکن است در قسمت‌های مختلف سیتوپلاسم قابل رویت باشند (Browitzka and Siva, 2007).

۱-۲-۲-۱- تولید مثل جلبک *Dunaliella*

۱-۱-۲-۲-۱- تولید مثل جنسی

تولید مثل جنسی به صورت ایزوگامی انجام می‌گیرد و آمیختگی گامت‌ها روندی شبیه به کلامیدوموناس[3] دارد. در این نوع تولید مثل، گامت‌ها از نظر شکل و اندازه یکسان هستند (Borowitzka, 2007). کاهش شوری محیط، تولید مثل جنسی را تحریک می‌کند. دو سلول از طول در کنار هم قرار گرفته و از طریق تاژک‌هایشان به هم متصل شده و تاژک‌ها از طول در کنار هم قرار می‌گیرند. لوله جفت‌گیری توسط یکی از گامت‌ها تولید شده و و به گامت دیگر متصل می‌گردد. نتیجتا دو سلول به سمت هم کشیده شده و از انتهای قدامی الحاق صورت می‌پذیرد و پلاتوزیگوت[4] چهارتاژکی تشکیل می‌شود. سپس پلاتوزیگوت، تاژک‌هایش را از دست داده و یک دیواره ضخیم چند لایه در اطراف خود تشکیل می‌دهد (Loconardi and Caceres, 1997 به نقل از Borowitzka and Siva, 2007).

۲-۱-۲-۲-۱- تولید مثل غیر جنسی

تولید مثل غیر جنسی معمولا از طریق تقسیم پروتوپلاسم سلول‌های متحرک صورت می‌گیرد (Marano, 1976). در این نوع تولیدمثل، سلول در نتیجه ایجاد یک شیار طولی، تقسیم می‌شود. مسیر حرکت این شیار از قسمت قدامی به سمت قسمت پشتی سلول می‌باشد. پیشروی این شیار سبب تقسیم پیرنوئید و کلروپلاست و در نهایت تقسیم سلول می‌شود (Preisig, 1992). شرایطی مانند شوری کم، روزهای سرد زمستان و پیرئشدن کشت، تشکیل کیست‌های رویشی یا آپلانوسپور[5] را افزایش می‌دهد (Borowitzka and Siva, 2007).

---

[1] Dictyosome
[2] Cisternae
[3] *Chlamydomonas*
[4] Platozygot
[5] Aplanospore