



## اندازه‌گیری نرخ رشد ویژه داینوفلاژله *Symbiodinium sp.* جداسازی شده از شقایق دریایی *Stichodactyla haddoni*

حمیده طهماسبی ملکردی، بهروز زارعی دارکی\*

گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس

نوع مقاله:	چکیده
پژوهشی	کشت داینوفلاژله‌ها به علت فشار هیدرودینامیکی حاصل از محیط کشت بر رشد آن‌ها، بسیار دشوار است. در پژوهش حاضر، نمونه‌برداری شقایق دریایی <i>Stichodactyla haddoni</i> از سواحل شرقی جزیره هرمز صورت گرفت. ابتدا داینوفلاژله‌های همزیست در آزمایشگاه به روش هموژنیزه از شقایق جداسازی و سپس در محیط کشت‌های $ASP_{12}$ ، $ASP_8$ ، $F_2$ -Gilard و $L_1$ تحت دماهای $29 \pm 1^\circ C$ و $17 \pm 1$ و شدت نوری $100 \mu mol.photon.m^{-2}.s^{-1}$ قرار داده شدند. سپس ریزجلبک‌ها در محیط کشت $ASP_{12}$ ، به‌عنوان محیط کشت انتخابی کشت داده شدند. شمارش سلولی به‌صورت روزانه با استفاده از لام نئوبار انجام شد. در نهایت نرخ رشد ویژه و شاخص میتوزی محاسبه گردید. به ترتیب ماکزیمم شاخص میتوزی، تعداد سلولی و نرخ رشد ویژه در طول دوره کشت تحت دمای $23 \pm 1^\circ C$ به میزان $0.4\%$ ، $10^5 \times 12$ cell/ml و $0.86 \text{ d}^{-1}$ در محیط کشت $ASP_{12}$ مشاهده گردید. نتایج آماری نشان داد، اختلاف معناداری در نرخ رشد ویژه داینوفلاژله، تحت سه دمای مذکور وجود دارد ( $P < 0.05$ ). همچنین بررسی‌های انجام‌شده در این مطالعه نشان می‌دهد که عوامل محیطی مانند درجه حرارت می‌تواند بر میزان رشد داینوفلاژله <i>Symbiodinium sp.</i> مؤثر باشد.
تاریخچه مقاله: دریافت: ۹۵/۱۲/۰۵ اصلاح: ۹۶/۰۳/۰۴ پذیرش: ۹۶/۰۳/۱۵	
کلمات کلیدی: داینوفایت‌ها مرفولوژی دو تاژکیان زیست‌فناوری <i>Symbiodinium sp.</i>	

### مقدمه

فیتوپلانکتون‌ها، تولیدکنندگان مهم دریاها، اقیانوس‌ها و پایه هرم انرژی هستند. مطالعه آن‌ها به‌منظور شناسایی حلقه اول شبکه غذایی، پایه حیات و تولید اکوسیستم‌های آبی ضروری می‌باشد (Graham and Wilcox, 2000). فیتوپلانکتون‌ها از جمله داینوفلاژله‌های دریایی به سبب اهمیت ترکیباتشان در عرصه‌های مختلف غذا و دارو از قبیل بهبود بخشیدن واکنش‌های آلرژیک، اثر مهار قوی بر فعال‌سازی آنتی‌ژن اولیه ویروس هرپس انسانی ۴ (herpes virus)، القای آپاپتوز سلول‌های سرطانی روده بزرگ انسانی (Onodera et al., 2014; Sugawara et al., 2007; Tsushima et al., 1995) مورد توجه قرار گرفته‌اند. از داینوفلاژله‌ها جنس *Symbiodinium* در اغلب بی‌مهرگان دریایی به‌صورت همزیست مشاهده می‌شود (Pochon and Pawlowski, 2006). متغیرهای محیطی از جمله دما، تأثیر بسزایی بر فتوسنتز و در نتیجه رشد داینوفلاژله‌ها اعمال می‌کنند. بر اساس نتایج به‌دست‌آمده، حداکثر نرخ رشد داینوفلاژله *Symbiodinium microadriaticum* در محدوده دمایی  $20-35^\circ C$  در محیط کشت  $ASP_8$  مشاهده شده است (Iglesias-Prieto, 1992).

\* نویسنده مسئول، پست الکترونیک: zareidarki@modares.ac.ir

کشت داینوفلاژله‌ها در مقیاس فنی به دلیل رشد ضعیف آن‌ها تاکنون ناشناخته مانده است. نیروهای هیدرودینامیکی حاصل از بیورآکتورهای طراحی‌شده، تأثیر منفی قابل‌توجهی را بر رشد نشان داده است (Benstein *et al.*, 2014). این امر در تولید تجاری داینوفلاژله‌ها منجر به ایجاد موقعیتی شده که در آن حتی مقادیر جزئی از مواد خام نمی‌تواند عرضه شود. با توجه به کاربردهای بسیار زیاد تولیدات داینوفلاژله‌ای در صنعت غذا و دارو، کشت آن‌ها در مقیاس فنی از اهمیت بسیار بالایی برخوردار است (Gallardo-Rodríguez *et al.*, 2012; Camacho, 2007). تولید مواد زیست فعال نیاز به یک محیط کشت مناسب و فاقد نیروهای هیدرودینامیکی دارد. به‌منظور پیش‌بینی این امر، محققین اثرات متلاطم آب دریا در لایه یوفوتیک را بررسی نموده و یکی از علل اصلی در کاهش رشد داینوفلاژله‌ها بیان نموده‌اند. با بررسی میزان این تلاطم و اجرای عملی آن در آزمایشگاه می‌توان از کاهش رشد آهسته داینوفلاژله‌ها تا حدودی جلوگیری نمود (Camacho *et al.*, Gibson and Thomas, 1995, 2007). جهت بهینه‌سازی شرایط رشد و تولیدات از داینوفلاژله‌ها، انواع مختلفی از تحقیقات در نقاط مختلف جهان صورت گرفته است (Pistocchi *et al.*, 2011; Dixon and Syrett, 1988; Morton *et al.*, 1992; Kitaya *et al.*, 2008). باین‌حال، اکثر مطالعات، تنها مرتبط با کشت آزمایشگاهی در مقیاس کم بوده و به انبوه‌سازی تولیدات حاصله اشاره‌ای نشده است (Beuzenberg *et al.*, 2012). طبق بررسی‌های انجام‌گرفته، رایج‌ترین محیط کشت‌های استفاده‌شده شامل  $ASP_8$  (Chang *et al.*, 1983; Colley and Trench, 1983; Fitt *et al.*, 1981; Schoenberg and trench, 1980)  $F_2$  (Banaszak *et al.*, 2000)،  $ASP_{12}$  (Benstein *et al.*, 2014) و  $L_1$  (Rogers and Marcovich, 2007; Guillard and Hargraves, 1993) بوده است.

طبق نتایج به‌دست‌آمده، بسیاری از مرجانیان همزیست با داینوفلاژله‌ها از جنس *Symbiodinium* می‌باشند. این امر موجب افزایش تاب تحمل آن‌ها نسبت به شرایط سخت محیطی از جمله افزایش دما و نور شده است. مرجانیان در برخی شرایط با تغییر همزیست خود از کلاد C به D قادر به تحمل افزایش دمایی به‌اندازه  $1-1/5^{\circ}C$  هستند. این امر گویای آن است که در مناطق با افزایش دمایی، میزبان‌های همزیست با داینوفلاژله کلاد D، تراکم بیشتری دارند. بنابراین یک مرجان همزیست با ۱ تا ۳ گونه زئوزانتلا، می‌تواند نسبت به پارامترهای محیطی، پتانسیل متفاوتی داشته باشد. لذا جداسازی و انتخاب محیط کشت مناسب، جهت رشد زئوزانتلاهای همزیست با شقایق دریایی از اهداف این مطالعه بوده است (Berkelman and Oppen, 2006; Baker *et al.*, 2013; Stat *et al.*, 2013).

## مواد و روش‌ها

### نمونه‌برداری شقایق دریایی *stichodactyla haddoni*

نمونه‌برداری شقایق دریایی *Stichodactyla haddoni* سبزرنگ در زمان جزر کامل، از نواحی شرقی جزیره هرمز (ایستگاه خضر) صورت گرفت. موقعیت جغرافیایی منطقه‌ی نمونه‌برداری در جزیره هرمز به ترتیب  $27^{\circ}1'$  تا  $27^{\circ}6'$  عرض شمالی و  $56^{\circ}25'$  تا  $56^{\circ}30'$  طول شرقی ثبت گردید. در محل، به‌آرامی پولیپ فشار داده شد تا زئوزانتلا خارج شود، سپس در فالكون‌های حاوی آب همان محل ریخته شدند و سریعاً در ظرف حاوی یخ خشک قرار گرفتند. فالكون‌های حاوی نمونه در کمترین زمان ممکن به آزمایشگاه انتقال داده و در دمای  $4^{\circ}C$  نگهداری شدند.

### استخراج داینوفلاژله‌های همزیست با شقایق دریایی *Stichodactyla haddoni*

بخش‌هایی از صفحه دهانی شقایق دریایی مذکور با کاتر جدا شد، سپس با آب دریای فیلتر شده مخلوط و ورتکس گردیدند. سوسپانسیون به‌دست‌آمده سانتریفیوژ و مایع رویی دورریز شد، سپس رسوب باقی‌مانده رقیق گردید و مجدداً سانتریفیوژ انجام شد. این عمل جهت به دست آمدن رسوب خالص جلبکی چندین مرتبه تکرار گردید (Jeffrey and Haxo, 1968; Jeffrey, 1968).

### شستشو و حذف آلودگی از رسوب خالص جلبکی

به رسوب خالص جلبکی، آب دریای خلیج فارس افزوده و ورتکس شدند. در مرحله بعدی نمونه‌ها در شرایط دمایی  $4^{\circ}\text{C}$  سانتریفیوژ گردیدند. فاز رویی دورریز و به رسوب حاصل مجدداً آب دریای خلیج فارس افزوده شد. مراحل شستشو چندین بار تکرار گردید. سپس به نمونه‌ها آنتی‌بیوتیک افزوده و در یخچال نگهداری شدند (Polne-Fuller, 1991; Laskey, 1970; Oliveira, 2010).

#### کشت داینوفلاژله‌های استخراج‌شده

پس از شستشوی جلبک‌ها از آنتی‌بیوتیک، جهت خوگیری زئوزانتلای همزیست از محیط کشت‌های  $\text{ASP}_{12}$ ،  $\text{ASP}_8$ ،  $\text{F}_2$  و  $\text{L}_1$  استفاده گردید. ترکیبات محیط کشت  $\text{ASP}_8$  شامل:  $\text{NaCl}$ ،  $\text{MgSO}_4$ ،  $\text{KCl}$ ،  $\text{CaCl}_2$ ،  $\text{NaNO}_3$ ،  $\text{Na}_2\text{glycero.po}_4$ ،  $\text{FeCl}_3$ ،  $\text{MnCl}_2$ ،  $\text{ZnSO}_4$ ،  $\text{COSO}_4$ ،  $\text{Na}_2\text{MoO}_4$ ،  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ ،  $\text{Tris}$ ،  $\text{H}_3\text{BO}_3$ ،  $\text{Biotin}$ ،  $\text{Vitamin B}_{12}$  و  $\text{Thiamine HCl}$  به استناد (Schoenberg and trench, 1980؛ *Fitt et al.*, 1981؛ *Chang et al.*, 1983؛ *Banaszak et al.*, 2000؛ *Colley and Trench*, 1983؛ *Fitt et al.*, 1981؛ *and trench*, 1980؛ *Thiamine* و  $\text{Vitamin B}_{12}$ ،  $\text{CoCl}_2$ ،  $\text{CuSO}_4$ ،  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ ،  $\text{Na}_2\text{MoO}_4$ ،  $\text{ZnSO}_4$ ،  $\text{MnCl}_2$ ،  $\text{FeCl}_3$ ،  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ،  $\text{NaNO}_3$ ،  $\text{HCl}$  به استناد (Polne-Fuller, 1991؛ *Guillard and Ryther*, 1962؛  $\text{ASP}_{12}$  شامل:  $\text{NaCl}$ ،  $\text{MgSO}_4$ ،  $\text{KCl}$ ،  $\text{CaCl}_2$ ،  $\text{NaNO}_3$ ،  $\text{Na}_2\text{glycero.po}_4$ ،  $\text{FeCl}_3$ ،  $\text{MnCl}_2$ ،  $\text{ZnSO}_4$ ،  $\text{COSO}_4$ ،  $\text{Na}_2\text{MoO}_4$ ،  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ ،  $\text{Tris}$ ،  $\text{H}_3\text{BO}_3$ ،  $\text{Biotin}$ ،  $\text{Vitamin B}_{12}$  و  $\text{Thiamine HCl}$  به استناد (Benstein et al., 2014) و  $\text{L}_1$  شامل:  $\text{NaCl}$ ،  $\text{MgSO}_4$ ،  $\text{KCl}$ ،  $\text{CaCl}_2$ ،  $\text{NaNO}_3$ ،  $\text{Na}_2\text{glycero.po}_4$ ،  $\text{FeCl}_3$ ،  $\text{MnCl}_2$ ،  $\text{ZnSO}_4$ ،  $\text{COSO}_4$ ،  $\text{Na}_2\text{MoO}_4$ ،  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ ،  $\text{Tris}$ ،  $\text{H}_3\text{BO}_3$ ،  $\text{Biotin}$ ،  $\text{Vitamin B}_{12}$  و  $\text{Thiamine HCl}$  به استناد (Rogers and Marcovich, 2007؛ *Guillard and Hargraves*, 1993) می‌باشد. بعد از مشاهده تکثیر زئوزانتلا در محیط کشت‌های به کار گرفته‌شده طی چندین هفته، محیط کشت مناسب انتخاب شد. در مرحله بعد، جهت کشت دوم با محیط کشت انتخابی، زئوزانتلاها تحت دماهای  $29 \pm 1^{\circ}\text{C}$  و  $17 \pm 23, 1 \pm 1^{\circ}\text{C}$  و دوره نوری ۱۵ ساعت روشنایی/۹ ساعت تاریکی در ژرمیناتورها قرار داده شدند. نمونه‌ها هر دو روز، یک‌مرتبه توسط میکروسکوپ بررسی شدند (Polne-Fuller, 1991). شمارش سلول‌ها توسط لام نئوبار انجام شد و سپس شاخص میتوزی محاسبه گردید (Benstein et al., 2014; McDuff and Chisholm, 1982; Gibson and Thomas, 1995).

#### اندازه‌گیری نرخ رشد ویژه و محاسبه شاخص میتوزی

ابتدا تمامی وسایل شیشه‌ای با آب مقطر شستشو داده شدند. ارلن‌های حاوی محیط کشت مایع به‌وسیله پنبه و فویل آلومینیومی پوشانیده شدند و جهت استریل شدن در دستگاه اتوکلاو به مدت ۲۰ دقیقه با دمای  $120^{\circ}\text{C}$  قرار گرفتند. جهت استریل نمودن اتاق کشت از لامپ UV به مدت نیم ساعت استفاده گردید. در این پژوهش از شدت نور  $1 \mu\text{mol.photon.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  توسط لامپ‌های فلورسنت با تناوب نوری ۱۵ ساعت روشنایی/۹ ساعت تاریکی و سطح‌های دمایی  $29 \pm 1^{\circ}\text{C}$  و  $17 \pm 23, 1 \pm 1^{\circ}\text{C}$  استفاده شد. جهت کشت ریز جلبک مذکور از محیط کشت  $\text{ASP}_{12}$  استفاده گردید. پس از سترون نمودن محیط کشت، با افزودن ریزجلبک داینوفلاژله، عملیات کشت آغاز گردید. جلبک‌ها در ابتدا طی شرایط نوری و دمایی مذکور در فضای کوچک‌تر در محیط کشت  $\text{ASP}_{12}$  کشت داده شدند. پس از رشد و اطمینان از خالص بودن ریزجلبک‌های مذکور، به محیط‌های کشت بزرگ‌تر انتقال داده شدند. جهت شمارش سلولی،  $40$  میکرولیتر از محیط کشت موردنظر در کنار شعله نمونه‌برداری و با استفاده از لام هماسیتومتر (نئوبار) توسط میکروسکوپ نوری با عدسی  $20\times$  شمارش گردید. شمارش سلول به روش ذیل محاسبه شد (Krediet et al., 2015).

$$\text{تراکم سلولی در میلی‌لیتر} = \text{کل سلول‌های شمارش‌شده} \times 10^4 \times \text{فاکتور رقت}$$

بعد از مشاهده تکثیر زئوزانتلا در محیط کشت‌های به کار گرفته‌شده طی چندین هفته، محیط کشت مناسب انتخاب شد. درنهایت پس از نزدیک شدن رشد جلبک‌ها به انتهای مرحله رشد لگاریتمی خود (stationary phase)، جهت تعیین میزان بیوماس سلولی، از روش اندازه‌گیری نرخ رشد ویژه ( $\mu$ ) استفاده شد (Levasseur et al., 1993).

$$k = 3,32. 1/t. (\text{Log } N_t - \text{Log } N_0) \quad (\text{معادله ۱})$$

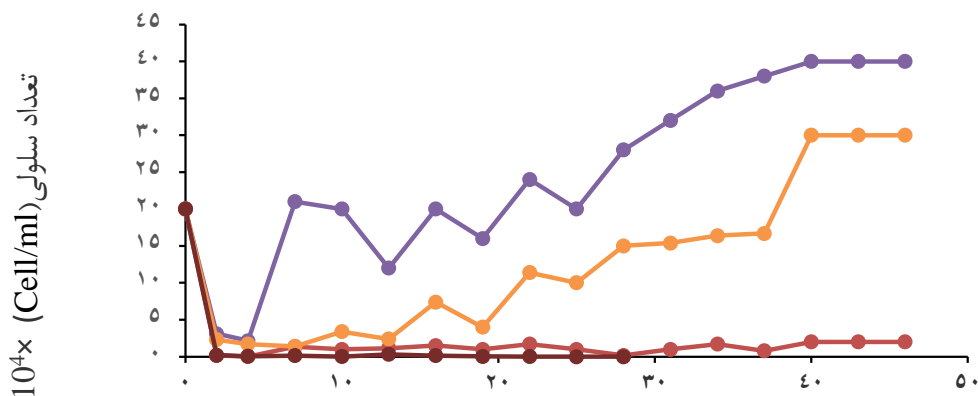
K؛ ثابت نرخ رشد،  $N_t$ ؛ تعداد سلول‌ها در زمان  $t$ ،  $N_0$ ؛ تعداد سلول‌ها در زمان شروع کشت

### تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

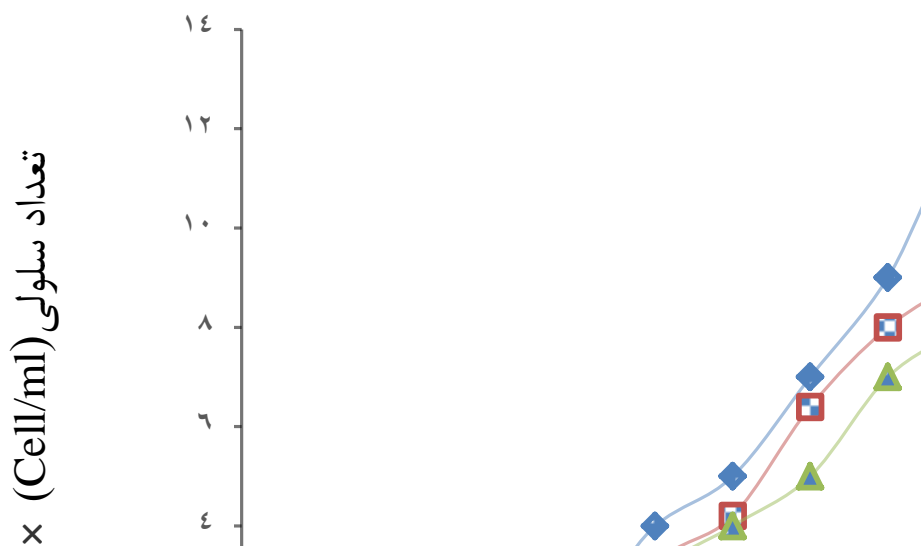
تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری Spss 16 و جهت رسم نمودارها از نرم‌افزار Excel 2010 استفاده شد. ابتدا نرمال بودن داده‌ها با استفاده از آزمون Kolmogorov-Smirnov مورد بررسی قرار گرفت. در صورت نرمال بودن داده‌ها از آزمون ANOVA و جهت مقایسه میانگین‌ها از آزمون Tukey و Duncan استفاده شد.

### نتایج

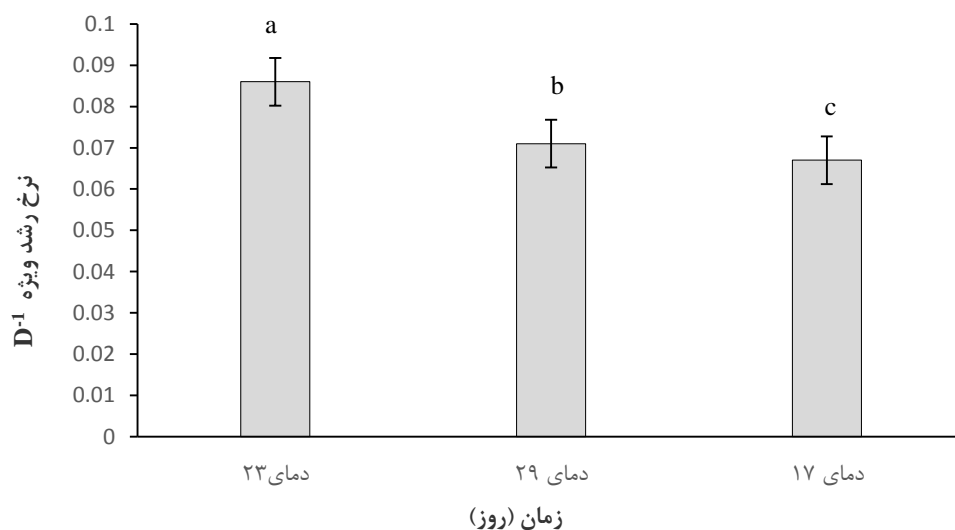
نتایج کشت اولیه جهت خوگیری زئوزانتلای همزیست، بیشترین شاخص میتوزی و تعداد سلولی را به ترتیب به مقدار ۴۰٪ و  $4 \times 10^5$  Cell/ml در محیط کشت  $ASP_{12}$  نشان داد. درصد شاخص میتوزی و تعداد سلولی در محیط کشت  $F_2$ ،  $ASP_8$  و  $L_1$  در سطح پایین‌تری نسبت به  $ASP_{12}$  مشاهده گردید. قابل‌ذکر است در محیط کشت  $L_1$  بعد از گذشت چهار هفته، کلیه سلول‌ها بی‌رنگ شدند (شکل ۱). سپس، زئوزانتلاها از محیط کشت  $ASP_{12}$  به‌عنوان محیط کشت انتخابی، به محیط کشت سوسپانسیون (ASP<sub>12</sub>) تحت سه دمای مختلف انتقال داده شدند. بیشترین تعداد سلول به مقدار  $12 \times 10^5$  cell/ml در محیط کشت سوسپانسیون  $ASP_{12}$  تحت دمای  $23^\circ\text{C}$  مشاهده گردید؛ به‌طوری‌که نتایج حاصل از این پژوهش، نرخ رشد ویژه سلول‌های داینوفلاژله را تحت دماهای  $29 \pm 1^\circ\text{C}$  و  $17 \pm 23, 1 \pm 1^\circ\text{C}$  به ترتیب ۰/۰۷۱، ۰/۰۸۶ و ۰/۰۶۷ نشان داد، بنابراین بیش‌ترین تراکم و نرخ رشد ویژه در دمای  $23 \pm 1^\circ\text{C}$  و محیط کشت  $ASP_{12}$  مشاهده شد. نتایج آماری نشان داد که اختلاف معناداری بین تعداد سلول و نرخ رشد ویژه سلول‌های زئوزانتلا در دمای  $23 \pm 1^\circ\text{C}$  با دماهای  $29 \pm 1^\circ\text{C}$  و  $17 \pm 1^\circ\text{C}$  وجود دارد ( $P < 0.05$ ) (شکل ۲ و ۳). همچنین اختلاف معناداری بین درصد تقسیم میتوزی در سلول‌های زئوزانتلا در محیط کشت  $ASP_{12}$  نسبت به  $ASP_8$  و  $L_1$  مشاهده شد. با توجه به اهمیت مواد زیست‌فعال داینوفلاژله‌ها در زمینه‌های پزشکی و غیرپزشکی، مطالعات بیشتر بر روی زئوزانتلای فوق، گامی اولیه در راستای مطالعات زیست‌فناوری بر روی این موجود می‌باشد.



شکل ۱. مقایسه رشد *Symbiodinium* sp. تحت محیط کشت‌های  $ASP_{12}$ ،  $ASP_8$ ،  $F_2$ -Gilard و  $L_1$  جهت تعیین محیط کشت انتخابی و اندازه‌گیری شاخص میتوزی. با توجه به نمودارها، بیشترین شاخص میتوزی و تراکم سلول‌های *Symbiodinium* sp. در محیط کشت  $ASP_{12}$  به مقدار ۴۰٪ و  $4 \times 10^5$  Cell/ml مشاهده شد. نتایج آماری، اختلاف معناداری را در شاخص میتوزی و تراکم سلولی داینوفلاژله در محیط کشت  $ASP_{12}$  نسبت به محیط کشت‌های  $ASP_8$  و  $L_1$  نشان می‌دهد ( $P < 0.05$ ).



شکل ۲. مقایسه رشد *Symbiodinium sp.* تحت دماهای مختلف در محیط کشت سوسپانسیون  $ASP_{12}$ . با توجه به نمودارها بیشترین تراکم سلول‌های *Symbiodinium sp.* در دمای  $23 \pm 1$  °C به میزان  $12 \times 10^5$  Cell/ml مشاهده شد. نتایج آماری، اختلاف معناداری را بین تراکم سلولی در دمای  $23 \pm 1$  °C نسبت به دمای  $29 \pm 1$  °C و  $17 \pm 1$  °C نشان می‌دهد ( $P < 0.05$ ).



شکل ۳. مقایسه نرخ رشد ویژه سلول‌های داینوفلاژله طی دماهایی مختلف در محیط کشت  $ASP_{12}$ . بیشترین نرخ رشد ویژه سلول‌های *Symbiodinium sp.* در دمای  $23 \pm 1$  °C به مقدار  $0.086 \pm 0.001$  d<sup>-1</sup> مشاهده شد. طبق نتایج آماری اختلاف معناداری بین نرخ رشد ویژه سلول‌های زئوزانتلا در دماهای مختلف وجود دارد ( $P < 0.05$ ).

## بحث

فاکتورهای مختلفی از جمله دما، نور، pH و شوری در رشد جلبک‌ها تأثیر بسزایی دارند. دقت در تنظیم فاکتورهای فوق می‌تواند کمک شایانی به کشت بهتر آن‌ها نماید. دما و نور از عوامل مهمی هستند که نوسان مقدارشان در میزان رشد سلول و تولید بیوماس جلبکی تأثیرگذار است (Ben-Amotz et al., 1982). در پژوهش حاضر، با توجه به شکل ۳-۱، کمترین تعداد سلولی و نرخ رشد ویژه در دمای  $17 \pm 1$  °C مشاهده شده است. با توجه به نتایج و همچنین اهمیت نقش کمپلکس تجزیه‌کننده آب در ادامه جریان انتقال الکترون فتوسیستم II می‌توان گفت، کاهش کارایی کمپلکس تجزیه آب در اثر کاهش

دما احتمالاً در کاهش میزان انتقال الکترون به پذیرنده‌های الکترون فتوسیستم II نقش داشته و اختلال در فعالیت زنجیره انتقال الکترون فتوسیستم II ( $E_0\Phi$ ) در ریز جلبک داینوفلاژله گونه مذکور در اثر کاهش دما می‌تواند به علت کاهش کارایی کمپلکس تجزیه کننده آب تحت تنش سرما باشد (Zouni et al., Pereira et al., 2000; Wise, 1995; Amotz et al., 1982) (2001).

همچنین لازم به ذکر است که در پژوهش حاضر، سازگار نمودن و اشباع سازی داینوفلاژله‌ها با محیط کشت  $ASP_{12}$  به دلیل وجود نیروهای هیدرودینامیکی و رشد بسیار آهسته آن‌ها، ۶ ماه به طول انجامید. بعد از اعمال تیمارهای دمایی، توسط شاخص میتوزی نرخ رشد جمعیت ریز جلبک‌ها محاسبه شد (Swift and Durbin, 1972). در این پژوهش سعی شد با تعیین شاخص میتوزی و با در نظر گرفتن فاکتورهای دمایی مطلوب، تعداد جمعیت داینوفلاژله‌های کشت داده شده به همراه نرخ رشد ویژه در محیط کشت  $ASP_{12}$  مشخص شود. در پژوهش حاضر، تراکم زئوزانتلا در محیط کشت  $ASP_{12}$  در دمای  $23 \pm 1^\circ C$  به مقدار  $12 \times 10^5$  cell/ml مشاهده شد که نتایج بررسی شده مبنی بر تأیید این گزارش می‌باشد. طبق نتایج حاصل از این بررسی، حداکثر نرخ رشد ویژه سلول‌های داینوفلاژله در محدوده دمایی  $23 \pm 1^\circ C$  می‌باشد و با نتایج Iglesias-Prieto و همکاران (۱۹۹۲) که فتوسنتز داینوفلاژله *Symbiodinium microadriaticum* را در محدوده دمایی  $25 - 20^\circ C$  گزارش نمودند، مطابقت دارد. بر اساس نتایج Thomas و Carr (۱۹۸۵)، تراکم داینوفلاژله کلاد D در محدوده  $1 - 6 \times 10^5$  cell/ml گزارش شده است، این میزان با نتایج Valenzuela-Espinoza و همکاران (۲۰۱۱)، که تراکم سلولی را برای گونه *Amphidinium carterae* برابر با  $23/3 \times 10^5$  cell/ml گزارش دادند و همچنین با نتایج حاصل از این پژوهش ( $12 \times 10^5$  cell/ml) همخوانی نداشت. بیشترین تراکم سلولی در داینوفلاژله‌های کشت داده شده در محیط کشت  $F_2$ ،  $146/6 \times 10^3$  cell/ml با نرخ رشد  $0.1 \pm$  در روز و بیوماس  $0.3 \pm 0.26$  g/L وزن خشک گزارش شده است (Shah et al., 2014). با توجه به مشاهدات Benstein و همکاران (۲۰۱۴)، مقدار بیوماس تولید شده از داینوفلاژله‌های کشت داده شده در فتوبیوراکتور تحت محیط کشت  $ASP_{12}$  در محدوده ۱۱-۱ گرم در مترمربع در روز گزارش شده و محیط کشت  $ASP_{12}$  به‌عنوان بهترین محیط کشت معرفی شده است که با نتایج حاصل از این پژوهش مطابقت دارد. دمای مطلوب جهت نرخ رشد داینوفلاژله *Gymnodinium* در محدوده  $24 - 20^\circ C$  گزارش شده است و با بررسی‌های موجود در این مقاله که دمای  $23 \pm 1^\circ C$  به‌عنوان بهترین دما جهت رشد زئوزانتلا است، مطابقت دارد. Nielsen (۱۹۹۶)، گزارش نموده است که دمای  $32^\circ C$  موجب تخریب کلروپلاست و شکست لاملای تیلاکوئید در داینوفلاژله *Pocillopora damicornis* می‌گردد. طبق نتایج López-Rosales و همکاران (۲۰۱۴)، داینوفلاژله *Prorocentrum belizeanum* در محدوده دمایی  $18^\circ C$ ،  $25$  و  $28$ ، حداکثر میزان رشد بهینه را در محدوده دمایی  $25^\circ C$  نشان داده است. داینوفلاژله *Vulcanodinium rugosum*، قادر به زندگی در محدوده دمایی  $30 - 20^\circ C$  و تابش نوری  $100 \mu \text{mol.photon.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  می‌باشد (Abadie et al., 2016). Hume و همکاران (۲۰۱۶)، بیان نموده‌اند که داینوفلاژله *Symbiodinium thermophilum* همزیست با مرجانیان خلیج فارس و دریای عرب در برابر افزایش دمایی  $35^\circ C$  در تابستان مقاومت داشته است. لیکن با توجه به نتایج گزارش‌های ذکر شده، حداکثر نرخ رشد ویژه سلول‌های داینوفلاژله در محدوده دمایی  $29 \pm 1 - 23 \pm 1^\circ C$ ، اثبات می‌گردد. همچنین هوادهی و تزریق  $CO_2$  در محیط کشت زئوزانتلا می‌تواند در راندمان بیوماس کشت مؤثر باشد. با وجود اینکه تولیدات داینوفلاژله‌های فتوتروپیک از جمله توکسین‌ها و رنگ‌دانه‌ها، پتانسیل بسیار مهمی را در علوم پزشکی و صنعت داروسازی ایفا می‌نمایند، لیکن مطالعات بسیار اندکی در ارتباط با کشت داینوفلاژله‌ها در کشور صورت گرفته است؛ بنابراین نتایج اولین کشت داینوفلاژله همزیست از خلیج فارس می‌تواند پیش‌زمینه‌ای جهت مطالعه گسترده در راستای توسعه سیستم‌های کشت پایدار و استخراج مواد زیست فعال با ارزش از این همزیست‌ها باشد.

## منابع

Abadie, E., Muguet, A., Berteaux, T., Chomérat, N., Hess, P., Roque D'OrbCastel, E., Laabir, M. 2016. Toxin and growth responses of the neurotoxic dinoflagellate *Vulcanodinium rugosum* to varying temperature and salinity. *Toxins*. 8(5): 135-152.

- Baker, D.M., Andras, J.P., Jordán-Garza, A.G., Fogel, M.L. 2013. Nitrate competition in a coral symbiosis varies with temperature among *Symbiodinium* clades. *The ISME Journal*. 7(6): 1248-1251.
- Banaszak, A.T., LaJeunesse, T.C., Trench, R.K. 2000. The synthesis of mycosporine-like amino acids (MAAs) by cultured, symbiotic dinoflagellates. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 249(2): 219-233.
- Ben-Amotz, A., Katz, A., Avron, M. 1982. Accumulation of  $\beta$ -carotene in Halotolerant algae: purification and characterization of  $\beta$ -carotene-rich globules from *Dunaliella Bardawil* (Chlorophyceae). *Journal of Phycology*. 18(4): 529-537.
- Benstein, R.M., Çebi, Z., Podola, B., Melkonian, M. 2014. Immobilized growth of the peridinin-producing marine dinoflagellate *Symbiodinium* in a simple biofilm photobioreactor. *Marine biotechnology*. 16(6): 621-628.
- Berkelmans, R., Van Oppen, M.J. 2006. The role of zooxanthellae in the thermal tolerance of corals: a 'nugget of hope' for coral reefs in an era of climate change. *Proceedings of the Royal Society of London. B: Biological Sciences*. 273(1599): 2305-2312.
- Beuzenberg, V., Mountfort, D., Holland, P., Shi, F., MacKenzie, L. 2012. Optimization of growth and production of toxins by three dinoflagellates in photobioreactor cultures. *Journal of Applied Phycology*. 24(5): 1023-1033.
- Camacho, F.G., Rodríguez, J.G., Mirón, A.S., García, M.C., Belarbi, E.H., Grima, E.M. 2007. Determination of shear stress thresholds in toxic dinoflagellates cultured in shaken flasks: Implications in bioprocess engineering. *Process Biochemistry*. 42(11): 1506-1515.
- Chang, S.S., Prezelin, B.B., Trench, R.K. 1983. Mechanisms of photoadaptation in three strains of the symbiotic dinoflagellate *Symbiodinium microadriaticum*. *Marine Biology*. 76(3): 219-229.
- Colley, N.J., Trench, R.K. 1983. Selectivity in phagocytosis and persistence of symbiotic algae by the scyphistoma stage of the jellyfish *Cassiopeia xamachana*. *Proceedings of the Royal Society of London. B: Biological Sciences*. 219(1214): 61-82.
- Dixon, G.K., Syrett, P.J. 1988. The growth of dinoflagellates in laboratory cultures. *New Phytologist*. 109(3): 297-302.
- Fitt, W.K., Chang, S.S., Trench, R.K. 1981. Motility patterns of different strains of the symbiotic dinoflagellate *Symbiodinium* (= *Gymnodinium*) *microadriaticum* (Freudenthal) in culture. *Bulletin of Marine Science*. 31(2): 436-443.
- Gallardo-Rodríguez, J., Sánchez-Mirón, A., García-Camacho, F., López-Rosales, L., Chisti, Y., Molina-Grima, E. 2012. Bioactives from microalgal dinoflagellates. *Biotechnology advances*. 30(6): 1673-1684.
- Gibson, C.H., Thomas, W.H. 1995. Effects of turbulence intermittency on growth inhibition of a red tide dinoflagellate, *Gonyaulax polyedra* Stein. *Journal of Geophysical Research: Oceans*. 100(C12): 24841-24846.
- Graham, L.K., Wilcox, L.W. 2000. The origin of alternation of generations in land plants: a focus on matrotrophy and hexose transport. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 355(1398): 757-767.
- Guillard, R.R.L., Hargraves, P.E. 1993. *Stichochrysis immobilis* is a diatom, not a chrysophyte. *Phycologia*. 32(3): 234-236.
- Guillard, R.R., Ryther, J.H. 1962. Studies of marine planktonic diatoms: I. *Cyclotella Nana* Hustedt, and *Detonula Confervacea* (CLEVE) Gran. *Canadian Journal of Microbiology*. 8(2): 229-239.
- Hume, B.C., Voolstra, C.R., Arif, C., D'Angelo, C., Burt, J.A., Eyal, G., Wiedenmann, J. 2016. Ancestral genetic diversity associated with the rapid spread of stress-tolerant coral symbionts in response to Holocene climate change. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 113(16): 4416-4421.
- Iglesias-Prieto, R., Matta, J.L., Robins, W.A., Trench, R.K. 1992. Photosynthetic response to elevated temperature in the symbiotic dinoflagellate *Symbiodinium microadriaticum* in culture. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 89(21): 10302-10305.
- Jeffrey, S.W. 1968. Quantitative thin-layer chromatography of chlorophylls and carotenoids from marine algae. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*. 162(2): 271-285.

- Jeffrey, S.W., Haxo, F.T. 1968. Photosynthetic pigments of symbiotic dinoflagellates (zooxanthellae) from corals and clams. *The Biological Bulletin*. 135(1): 149-165.
- Kitaya, Y., Xiao, L., Masuda, A., Ozawa, T., Tsuda, M., Omasa, K. 2008. Effects of temperature, photosynthetic photon flux density, photoperiod and O<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> concentrations on growth rates of the symbiotic dinoflagellate, *Amphidinium* sp. *Journal of Applied Phycology*. 20(5): 737-742.
- Krediet, C.J., DeNofrio, J.C., Caruso, C., Burriesci, M.S., Cella, K., Pringle, J.R. 2015. Rapid, precise, and accurate counts of *Symbiodinium* cells using the Guava flow cytometer, and a comparison to other methods. *PLOS One*. 10(8): e0135725.
- Laskey, R.A. 1970. The use of antibiotics in the preparation of amphibian cell cultures from highly contaminated material. *Journal of Cell Science*. 7(3): 653-659.
- Levasseur, M., Thompson, P.A., Harrison, P.J. 1993. Physiological acclimation of marine phytoplankton to different nitrogen sources. *Journal of Phycology*. 29(5): 587-595.
- López-Rosales, L., Gallardo-Rodríguez, J.J., Sánchez-Mirón, A., Cerón-García, M. D. C., Belarbi, E. H., García-Camacho, F., Molina-Grima, E. 2014. Simultaneous effect of temperature and irradiance on growth and okadaic acid production from the marine dinoflagellate *Prorocentrum belizeanum*. *Toxins*. 6(1): 229-253.
- Morton, S.L., Norris, D.R., Bomber, J.W. 1992. Effect of temperature, salinity and light intensity on the growth and seasonality of toxic dinoflagellates associated with ciguatera. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 157(1): 79-90.
- McDuff, R.E., Chisholm, S.W. 1982. The calculation of in situ growth rates of phytoplankton populations from fractions of cells undergoing mitosis: a clarification. *Limnology and Oceanography*. 27(4): 783-788.
- Nielsen, M.V. 1996. Growth and chemical composition of the toxic dinoflagellate *Gymnodinium galatheanum* in relation to irradiance, temperature and salinity. *Marine Ecology Progress Series*. 136: 205-211.
- Onodera, K.I., Konishi, Y., Taguchi, T., Kiyoto, S., Tominaga, A. 2014. Peridinin from the marine symbiotic dinoflagellate, *Symbiodinium* sp., regulates eosinophilia in mice. *Marine Drugs*. 12(4): 1773-1787.
- Oliveira, M.L.P.D., Costa, M.G.C., Silva, C.V.D., Otoni, W.C. 2010. Growth regulators, culture media and antibiotics in the in vitro shoot regeneration from mature tissue of citrus cultivars. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 45(7): 654-660.
- Pereira, W.E., de Siqueira, D.L., Martínez, C.A., Puiatti, M. 2000. Gas exchange and chlorophyll fluorescence in four citrus rootstocks under aluminium stress. *Journal of Plant Physiology*. 157(5): 513-520.
- Pistocchi, R., Pezzolesi, L., Guerrini, F., Vanucci, S., Dell'Aversano, C., Fattorusso, E. 2011. A review on the effects of environmental conditions on growth and toxin production of *Ostreopsis ovata*. *Toxicon*. 57(3): 421-428.
- Pochon, X., Pawlowski, J. 2006. Evolution of the soritids-*Symbiodinium* symbiosis. *Symbiosis*. 42(2): 77-88.
- Polne-Fuller, M. 1991. A novel technique for preparation of axenic cultures of *Symbiodinium* (Pyrrophyta) through selective digestion by amoebae. *Journal of Phycology*. 27(4): 552-554.
- Rogers, J.E., Marcovich, D. 2007. A simple method for the extraction and quantification of photopigments from *Symbiodinium* spp. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 353(2): 191-197.
- Schoenberg, D.A., Trench, R.K. 1980. Genetic variation in *Symbiodinium* (=Gymnodinium) *microadriaticum* Freudenthal, and specificity in its symbiosis with marine invertebrates. I. Isoenzyme and soluble protein patterns of axenic cultures of *Symbiodinium microadriaticum*. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*. 207(1169): 405-427.
- Shah, M.M.R., Samarakoon, K.W., Ko, J., Lakmal, H.C., Lee, J., An, S., Jeon, Y. 2014. Potentiality of benthic dinoflagellate cultures and screening of their bioactivities in Jeju Island, Korea. *African Journal of Biotechnology*. 13(6): 792-805.
- Stat, M., Pochon, X., Franklin, E.C., Bruno, J.F., Casey, K.S., Selig, E.R., Gates, R.D. 2013. The distribution of the thermally tolerant symbiont lineage (*Symbiodinium* clade D) in corals from

- Hawaii: correlations with host and the history of ocean thermal stress. *Ecology and Evolution*. 3(5): 1317-1329.
- Sugawara, T., Yamashita, K., Sakai, S., Asai, A., Nagao, A., Shiraishi, T., Hirata, T. 2007. Induction of apoptosis in DLD-1 human colon cancer cells by peridinin isolated from the dinoflagellate, *Heterocapsa triquetra*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 71(4): 1069-1072.
- Swift, E.L.I.J.A.H., Durbin, E.G. 1972. The phased division and cytological characteristics of *Pyrocystis* spp. can be used to estimate doubling times of their populations in the sea. In *Deep Sea Research and Oceanographic Abstracts*. 19(3): 189-198.
- Thomas, P.H., Carr, N.G. 1985. The invariance of macromolecular composition with altered light limited growth rate of *Amphidinium carteri* (Dinophyceae). *Archives of Microbiology*. 142(1): 81-86.
- Tsushima, M., Maoka, T., Katsuyama, M., Kozuka, M., Matsuno, T., Tokuda, H., Iwashima, A. 1995. Inhibitory effect of natural carotenoids on Epstein-Barr virus activation activity of a tumor promoter in Raji cells. A screening study for anti-tumor promoters. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 18(2): 227-233.
- Valenzuela-Espinoza, E., Millán-Núñez, R., Santamaría-del-Ángel, E., Trees, C.C. 2011. Macronutrient uptake and carotenoid/chlorophyll a ratio in the dinoflagellate *Amphidinium carteri* *Hulbert*, cultured under different nutrient and light conditions. *Hydrobiologica*. 21(1): 34-48.
- Wise, R.R. 1995. Chilling-enhanced photooxidation: the production, action and study of reactive oxygen species produced during chilling in the light. *Photosynthesis Research*. 45(2): 79-97.
- Zouni, A., Witt, H.T., Kern, J., Fromme, P., Krauss, N., Saenger, W., Orth, P. 2001. Crystal structure of photosystem II from *Synechococcus elongatus* at 3.8 Å resolution. *Nature*. 409(6821): 739-743.