المجلة العراقية للاستزراع المائي المجلد (20) العدد (1)-2023: 19-40 DOI:

دراسة تشخيصية للطحلب *Dunaliella salina* من البرك المالحة في محافظة البصرة و تأثير ملح كلوريد الصوديوم في نموه وإنتاج الكاروتين

أنفال فلاح عبدالله و عماد يوسف عواد السلطان* iD

قسم علوم الحياة، كلية التربية للعلوم الصرفة، جامعة البصرة، العراق

*Corresponding Author e-mail:emad.awed@uobasrah.edu.iq

تاريخ الاستلام: 2022/09/2 تاريخ القبول: 2022/12/31 تاريخ النشر: 2023/06/25

المستخلص

تضمنت الدراسة الحالية تسليط الضوء على احد اجناس الطحالب الخضر *Dunaliella salina* المنتشر في البرك المالحة brine ponds في محافظة البصرة جنوب العراق والبالغة تسعة مواقع واستزراعه مختبريا وتأكيد تشخيصه مظهرياً، اذ بينت الدراسة ان جميع العينات المعزولة للطحلب من المواقع المختلفة في محافظة البصرة تعود للنوع *D. salina*، يضاف الى ذلك ان العوامل البيئة المقاسة تتناسب مع نمو هذا النوع دون غيره من افراد هذا الجنس لاسيما الملوحة وذلك لنموه بشكل متزايد وبفارق معنوي $P\leq 0.05$ تحت تراكيز تراوحت بين 0–15 % من ملح كلوريد الصوديوم والتي يعادل في التركيز العالي منها اكثر من ملوحة ماء البحر بحوالي 4 مرات والتي بلغت 150غرام/لتر، كما تبين ان جميع العزلات قد نمت بشكل مثالي وبدون وجود فارق معنوي تحت التركيز الملحي 5% من ملح كلوريد الصوديوم، اذ لم يلاحظ وجود فروق معنوية $P\leq 0.05$بين زمن تكاثر الجيل وثابت النمو لجميع التراكيز الملحية. وتم في الدراسة الحالية اثبات ان جميع العزلات لمواقع الدراسة المختلفة قد اظهرت قابلية على انتاج الكاروتين الكلي استجابة للزياد الملحية او انخفاضها كما هو الحال في مجموعة السيطرة الخالية من الملوحة باعتباره جهد يتطلب من الطحلب انتاج الكاروتين وهذه صفة مهمة لهذا النوع ايضاً ومن النتائج اعلاه فقد تبين بان جميع العزلات للطحلب للمواقع المختلفة تعود لنوعا واحد فقط والذي تم تشخيصه في الدراسة الحالية.

الكلمات المفتاحية: الطحلب الاخضر *D. salina* ، ملح كلوريد الصوديوم، الكاروتين الكلي، التشخيص المظهري، البرك المالحة

P-ISSN: 1812-237X, E-ISSN: 2788-5720, https://ijaqua.uobasrah.edu.iq/index.pip/iaqua
This is an open access article under the CC BY 4.0 license http://creativecommons.org/licenses/by/4.0).

المقدمة

يعد الطحلب الاخضر *Dunaliella* sp. من اكثر الاجناس شيوعا ضمن قسم الطحالب الخضر وهو طحلب اخضر متحمل للملوحة يفتقر للجدار الخلوي، وقد وصف النوع *Dunaliella salina* من قبل Dunal في عام 1838 باسم *Haematococcus salinus* ولكن في عام 1905 وجد Teodoresco أن هذا النوع يختلف بوضوح عن النوع *Haematococcus* و*Chlamydomonas* حيث وضعه Cohn عام 1865 ومنحه الاسم الجديد *Dunaliella* (Ben-Amots and Avron, 1992; Murthy *et al.*, 2005).

ادناه المراتب التصنيفية للنوع:

قسم: Chlorophyta

الصف: Chlorophyceae

الرتبة: Dunaliellales

العائلة: Dunaliellaceae

الجنس: *Dunaliella*

النوع: *salina*

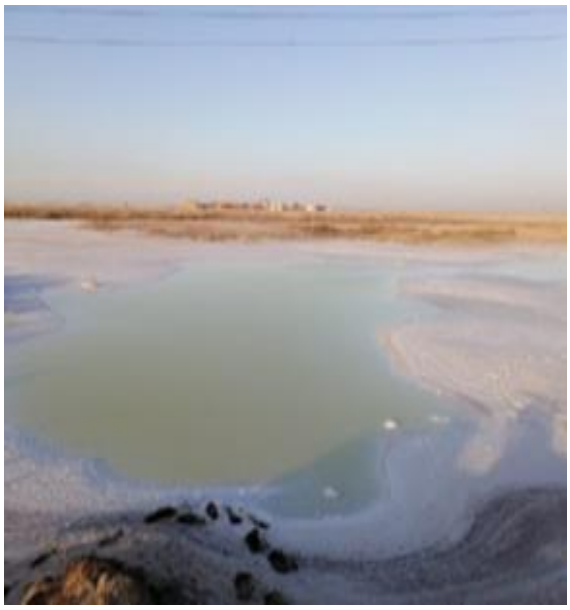
يضم هذا الجنس أنواع عديدة تصل الى اكثر من 100 نوع منها *D. parva* و *D. Viridis* و *D. pseudosalina* و *D. tertiolecta* و *D. bardawil* و *D. salina* قسم منها بحرية المعيشة والقسم الاخر يقطن البرك المالحة brine ponds (González *et al.*, 2019) وتختلف اشكال الخلايا في الطحلب *Dunaliella* sp. ما بين الشكل الإهليجي والبيضاوي والكمثري الى الشكل الكروي تقريبا، قد يتغير شكل الخلية مع تغير ظروف النمو وشدة الإضاءة وزيادة او قلة الملوحة وغالبا ما تصبح كروية في ظل تلك الظروف غير الملائمة والقاسية والمتغيرة وشديدة الملوحة (Ben-Amotz *et al.*, 2009; Borowitzka and Siva،2007)، يتكاثر هذا الطحلب بطريقتين اللاجنسية Asexual reproduction بواسطة الانشطار الطوليLongitudinal fission و الجنسية Sexual reproduction بواسطة اتحاد الامشاج او الجميتات المتشابهة (Borowitzzka and Siva, 2007).

المواد وطرائق العمل

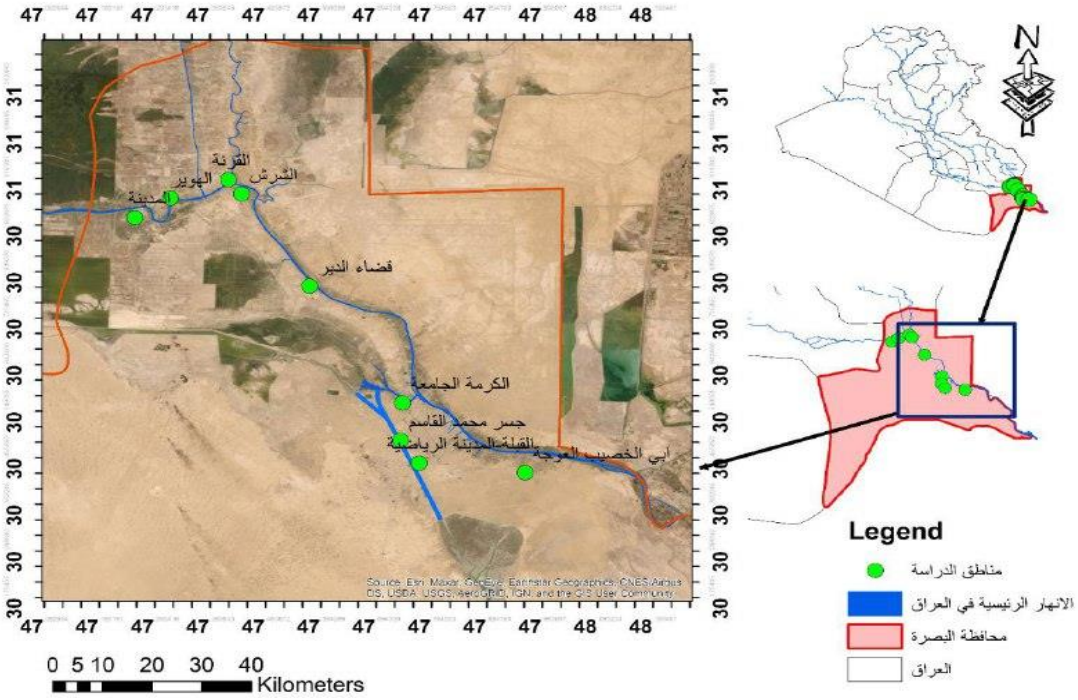
اختيار منطقة الدراسة

شملت الدراسة تسعة مواقع في محافظة البصرة، اذ جمعت عينات المياه من البرك المالحة صورة (1 و2) في المواقع المختارة باستخدام قناني بلاستيكية نظيفة ومعقمة سعة 500 ملليتر إذ جمعت ست عينات في شهر تشرين الأول 2020 تمثلت بالبرك المالحة في المواقع (قضاء المدينة وناحية عزالدين سليم وقضاء الدير وموقع جامعة البصرة–كرمة علي) والرباط الجديد والقبلة مقابل المدينة الرياضية) وثلاث عينات في شهر حزيران 2021 شملت المواقع (قضاء القرنة وناحية الشرش وقضاء ابي الخصيب) (صورة 3)، جلبت العينات المائية بعد ذلك للمختبر للتأكد من وجود الطحلب فيها وذلك بعمل شرائح مجهرية بصورة مباشرة وفحصها مجهريا تحت قوى التكبير المختلفة X100-4. حيث تتواجد في تلك المناطق البرك المالحة brine bonds الناتجة من تجمع مياه الأمطار ومعظمها في المناطق القاحلة المالحة، والتي يتواجد فيها الطحلب المتحمل للملوحة *Dunaliella* sp. إذ جمعت ست عينات في شهر تشرين الأول 2020 وثلاث عينات في شهر حزيران 2021.

صورة 1: بركة مائية مالحة ذات لون وردي حاوية على الطحلب *D. salina* من موقع ابي الخصيب.



صورة 2: بركة مائية مالحة ذات لون اخضر حاوية على الطحلب *D. salina* من موقع الرباط الجديد قرب جسر محمد القاسم – محافظة البصرة.



صورة3: خريطة توضح مواقع الدراسة في محافظة البصرة

تشخيص الطحلب مظهرياً

شخص الطحلب مظهريا على الصفات التصنيفية المظهرية واعتمادا على بعض المصادر الرئيسية (Borowitzka and Siva 2007; AL-Sultan, 1999; Ben-Amotz, and Avron 1992; Smith, 1950)، اذ اخذت القياسات المظهرية للطحلب باستخدام مجهر تصويري نوع Leica الماني الصنع لتصوير عينة الطحلب واخذت قياسات لطول وعرض الخلية وطول السوط بوحدة المايكرون وعلى قوة تكبير 100. x

قياس العوامل البيئية

درجة حرارة الماء والهواء

قيست درجة حرارة الماء والهواء أثناء عملية جمع العينات من المواقع البيئية باستخدام المحرار الزئبقي Thermometer وعبر عن الناتج بوحدات الدرجة المئوية لمحرار مقسم الى 100°م.

الأس الهيدروجيني pH

قدر الأس الهيدروجيني لعينات المياه باستخدام جهاز pH meter نوع WTW الماني الصنع.

الملوحة

قيست الملوحة للعينات المائية بعد جمعها وجلبها للمختبر بصورة مباشرة باستخدام جهاز Salinity meter نوع Lovibond الماني الصنع وعبر عن الناتج بوحدات جزء بالألف (غرام/لتر) وتم اجراء التخفيف للعينات بسبب الملوحة العالية ثم ضربت النتيجة بعامل التخفيف.

عزل الطحلب وتنميته مختبريا

تم جمع عينات المياه من البرك المالحة في قناني بلاستيكية نظيفة من البرك المالحة التي يسود فيها الطحلب الأخضر *Dunaliella* sp. ملونا إياها باللون الأخضر او اللون الوردي المحمر، جلبت العينات الى المختبر لغرض تنميتها على الوسط الزرعي السائل الجاهز وحسب ما وصفه Chu (1942) والمكون من المواد المذكورة في جدول (1).

جدول 1: مكونات الوسط الزرعي Chu's –10 الجاهز

المادة	التركيز غرام/لتر
$Ca(No_3)_2$	0.04
K_2HPO_4	0.005
$MgSO_4 .7H_2O$	0.025
Na_2Co_3	0.02
Na_2SiO_3	0.025
$FeCl_3$	0.0008

تحضير الوسط الزرعي و المزرعة النقية

حضر الوسط الزرعي المذكور أعلاه من خلال إذابة 123 مليغرام من مكونات الوسط الزرعي جيدا فـي 1 لتر من الماء المقطر باستخدام جهاز الخلاط المغناطيسي Magnetic stirrer، كما اضيف 50 غرام من ملح كلوريد الصوديوم للحصول على تركيز 5% في الوسط الزرعي. عقم الوسط الزرعي باستخدام جهاز المؤصدة الكهربائية Autoclave تحت ضغط 15

باوند/أنج^2 ولمدة 20 دقيقة، ترك الوسط الزرعي بعد التعقيم لكي يبرد، بعدها استعملت طريقة Weidman *et al.* (1964) للحصول على مزارع نقية، إذ غسلت العينات المائية المالحة بالماء المقطر المعقم ثم أدخلت بجهاز الطرد المركزي بسرعة 3000 دورة/الدقيقة لمدة 5 دقائق، اهمل الراشح ومزج الراسب مع الماء المقطر مره أخرى وكررت العملية 12 مرة، ثم وزع الوسط الزرعي المعقم في دوارق زجاجية نظيفة ومعقمة ذات سعة 250 و500 ملليتر، إذ ملئ كل دورق بحجم 100 ملليتر من الوسط الزرعي السائل ولقحت الأوساط الزرعية المعقمة بخلايا الطحلب *D. salina* المعزول والمنقى من العينات المائية المالحة بنسبة 5 ملليتر من العينة المائية الحاوية على الطحلب لكل 100 ملليتر من الوسط الزرعي وسدت فوهات الدوارق بسدادات قطنية. وضعت الدوارق في غرفة الزرع وبدرجة حرارة 25 ±2 ^{o}م وتحت شدة اضاءة مستمرة Continuous illumination بلغت 4000 لوكس بواسطة شمعات ذات لون ابيض قيست باستخدام جهاز شدة الإضاءة Lux meter وفحص الطحلب النامي بعد مرور 10–14 يوم من الزرع، اذ اعطى لونا اخضرا للوسط الزرعي. تم التأكد من نقاوة العزلات الطحلبية من البكتريا والفطريات بعد زراعتها على وسط الاكار المغذي Nutrient agar لمدة 24 ساعة للتأكد من خلوها من البكتريا و7 ايام لخلوها من الفطريات تحت درجة حرارة 37°م بالاعتماد على طريقة (Stein, 1975).

قياس نمو الطحلب الاخضر *Dunaliella salina* المعزول من البرك المالحة

تم حساب معدل اعداد الخلايا (خلية/ملليتر) لجميع التراكيز الملحية المذكورة أعلاه كل 48 ساعة لمدة 14 يوم من طور الاستقرار لنمو الطحلب ثم تركت المزارع تحت نفس الظروف وقيست بعد مرور 30 وحسب طريقة (Vo and Tran, 2014) باستخدام المجهر الضوئي وشريحة عد كريات الدم الحمر Hemocytometer ذات عمق 0.1 مليميتر بعد إضافة قطرة من مادة الفورمالين 4% لقتل الخلايا وذلك ليسهل عدها وتركت لمدة خمس دقائق لتستقر خلايا الطحلب وتم قياس ثابت النمو (K) وزمن تكاثر (G) الجيل حسب طريقة Fogg (1965).

تأثير تراكيز مختلفة من ملح كلوريد الصوديوم على نمو الطحلب *Dunaliella salina* وانتاج الكاروتين الكلي

اختيرت ثلاثة تراكيز ملحية من ملح كلوريد الصوديوم (5 و10 و 15)% وزن/حجم اضافة الى مجموعة السيطرة الخالية من ملح كلوريد الصوديوم لكل عينة للطحلب المعزول والمنقى من البرك المختلفة. حضر الوسط الزرعي حسب الطريقة السابقة الذكر وباستخدام دوارق زجاجية

بحجم 250 مليلتر لقياس النمو وبواقع ثلاث مكررات لكل موقع من مواقع الدراسة، اما في تجربة انتاج الكاروتين الكلي وقياس تركيزه فقد استخدمت انابيب اختبار حجم 100 مليليتر نظيفة ومعقمة ملئت بحجم 50 مليلتر من الوسط الزرعي نفسه وبواقع ثلاث مكررات لكل موقع من مواقع الدراسة ولكل تركيز ملحي (5 و10 و15)% اضافة الى مجموعة السيطرة الخالية من الملوحة وحضنت المزارع لمدة 14 يوم في درجة حرارة المختبر 25°م ±2 وتحت شدة اضاءة مستمرة بلغت 4000 لوكس حددت باستخدام جهاز شدة الإضاءة بواسطة مصابيح اضاءة بيضاء اللون، تم حساب نمو الطحلب في مزارع التراكيز الملحية المذكورة عن طريق حساب معدل اعداد الخلايا)خلية/مليلتر) كل 48 ساعة حسب طريقة Vo and Tran (2014) كما تم قياس تركيز الكاروتين الكلي بعد مرور 30 يوما الزرع.

تقدير محتوى الكاروتين الكلي لعينات الطحلب المعزولة من البرك المختلفة

اخذ 1 ملليتر من المزرعة النقية للطحلب لكل عزلة ونبذت بجهاز الطرد المركزي بسرعة 10000 دورة/دقيقة لمدة 5 دقائق مع 3 ملليتر من مذيب ايثانول: هكسان بنسبة 2:1حجم/حجم، اضيف بعدها 2 ملليتر من الماء المقطر مع 4 ملليتر من الهكسان ومزجت جيدا ثم اعيدت الى جهاز الطرد المركزي لمدة 5 دقائق على سرعة 10000 دورة/دقيقة، اخذت طبقة الهكسان العلوية وقيس محتوى الكاروتين على طول موجي 450 نانومتر باستخدام جهاز المطياف الضوئي UV- Visiblle Spectrophotometer وحسبت كمية الكاروتين بوحدة الميكروغرام / ملليتر من العينة (Vo and Tran, 2014) وحسب المعادلة التالية:

الكاروتين الكلي (مايكروغرام/ مليلتر) = الامتصاصية عند طول موجي (450)× 25.2

التحليل الاحصائي

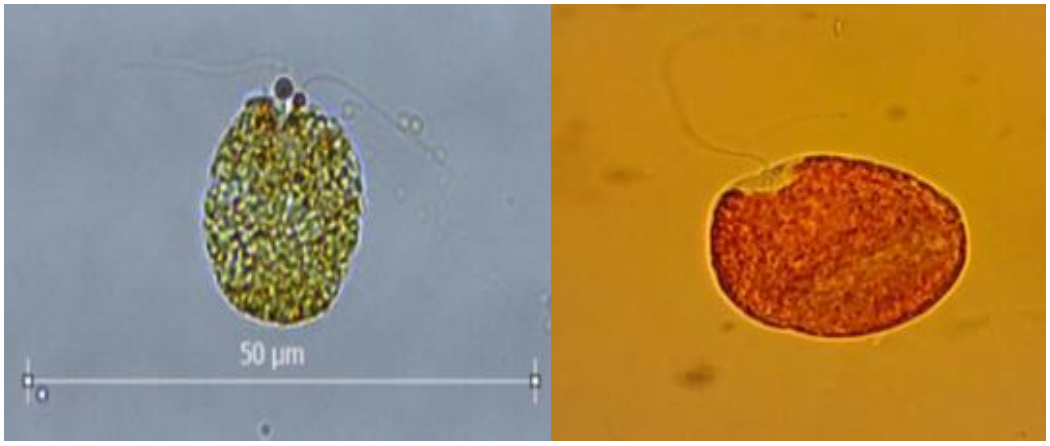
استخدم التحليل الاحصائي One Way Anova وتحليل مربع كاي X^2 تحت مستوى المعنوية $P\leq 0.05$ للمقارنة بين المعدلات والقيم على الترتيب للتحليلين الاحصائيين باعتماد البرنامج الاحصائي الجاهز Statistical package for social sciences SPSS Version-24 وتم استخراج اقل فرق معنوي معدل Revised least significant differences (RLSD) للمقارنة بين المعدلات.

النتائج والمناقشة

العزل و التشخيص المظهري

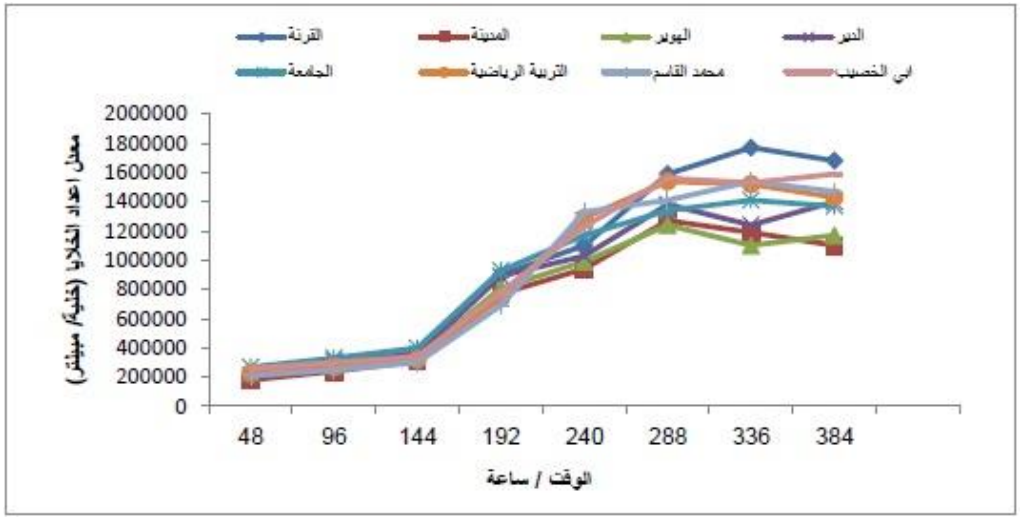
تم عزل الطحلب من مياه البرك المالحة المنتشرة في محافظة البصرة بعد جمعها وتنقيتها وزرعها على وسط Chu`s Medium No.10 السائل وبتركيز 5% من ملح كلوريد الصوديوم وتحت نفس الظروف من شدة اضاءة ودرجة حرارة لجميع المواقع، اذ بينت الدراسة أن ابعاد خلية الطحلب تراوحت بين 10.8–15.7 مايكرون للطول و 7.8–13.4 مايكرون للعرض وبلغ طول السوط 13.3–17.3 مايكرون صورة (1 و2)، إذ كان هناك تباين كبير بين اقطار واطوال الخلايا ويعزى ذلك الى فقدانها للجدار الخلوي وكذلك امتلاء الخلايا بالكليسرول والبرولين والنشويات وغيرها لمقاومة زيادة الملوحة إذ جمعت العزلات من برك ذات ملوحة عالية تصل الى تسع مرات اكثر من ملوحة ماء البحر كما ان وجود البقعة العينية في الجزء الأمامي للخلية بين السوطين يعد صفة تشخيصية مهمة، وهذا يؤكد أن الطحلب قيد الدراسة هو *Dunaliella* sp. وليس *Chlamydomonas*، إذ يحتوي هذا الجنس على الجدار الخلوي مما يجعل حجمة ثابت بالإضافة الى ان البقعة العينية في النوع *C. reinhardti* والأنواع الأخرى لهذا الجنس والذي يعد الأقرب للطحلب *Dunaliella* sp. والتي تكون جانبية في مقدمة الخلية واقرب الى احد السوطين من الاخر وتعتبر صفة تصنيفية مهمه في تشخيص هذا النوع (Holmes and Dutcher, 1989)، وهذا يماثل ما جاء في دراسة AL-Sultan (1999) إذ عزل الطحلب من البرك المالحة في البصرة وتشخيصها مظهريا وذكر أن التركيز 5% من ملح كلوريد الصوديوم هو الأمثل لنمو الطحلب. كما توصلت الدراسة الحالية الى ان جميع العزلات التي تم جمعها من البرك هي *D. salina* إذ تطابقت جميع صفات الطحلب المظهرية مع ما ذكره Ben-Amotz and Avron (1992) وفيما يتعلق بالنمو فقد تم حساب معدل اعداد الخلايا وثابت النمو وزمن تكاثر الجيل طيلة فترة النمو وكان اعلى معدل لأعداد الخلايا في موقع قضاء القرنة إذ بلغت اعداد الخلايا 1770000 خلية/ملليتر بعد مرور 14 يوما من الزرع وبلغ اقل معدل لها 110000 خلية/ملليتر في موقع الهوير بعد مرور نفس الفترة وكان ثابت النمو وزمن تكاثر الجيل متقارب لكل العزلات وبلغ اعلى ثابت نمو 6.061 واقل زمن لتكاثر الجيل 0.049 يوم في موقع الجامعة كما كان اقل ثابت نمو واعلى زمن لتكاثر الجيل في المدينة الرياضية إذ بلغ 5.969 و 0.05 على التوالي (شكل 1 وجدول 2). تبين من خلال نتائج النمو للعزلات المختلفة لمواقع الدراسة ان هناك تشابها كبيرا في نمو العزلات مختبريا تحت نفس الظروف بتقارب كبير في ثابت النمو وزمن تكاثر الجيل

لجميع العزلات، وهذا دليل يثبت تشابه الطحلب من الناحية الفسلجية وهذا يدعم نتائج التشخيص المظهري.



صورة 1: الطحلب المتحمل للملوحة *Dunaliella salina* في باللون الاحمر في البرك المالحة (100 x) قبل استزراعه مختبريا.

صورة 2: الطحلب المتحمل للملوحة *Dunaliella salina* بالون الاخضر في البرك المالحة (100 x) بعد استزراعه مختبريا.



شكل 1: منحنى النمو لخلايا الطحلب *Dunaliella salina* لمواقع الدراسة تحت التركيز الملحي 5% من ملح كلوريد الصوديوم

جدول 2: ثابت النمو وزمن تكاثر الجيل لطحلب المعزول والمستزرع من مواقع الدراسة في محافظة البصرة. تحت تركيز ملوحة 5% من ملح كلوريد الصوديوم.

المواقع المعزول منها الطحلب *D. salina*	ثابت النمو (K)	زمن تكاثر الجيل (G)
المدينة	6.040	0.049
الهوير	6.018	0.050
الدير	6.026	0.049
موقع الجامعة (كرمة علي)	6.061	0.049
القبلة قرب المدينة الرياضية	5.969	0.050
الرباط الجديد / جسر محمد القاسم	6.027	0.049
ابي الخصيب / العوجة	6.010	0.050
قضاء القرنة	6.007	0.050

العوامل البيئية

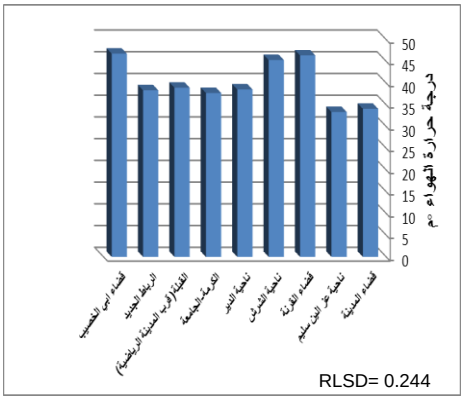
بينت النتائج أن المدى الحراري الذي تواجد فيه الطحلب *D. salina* تراوح بين 33.3°م في شهر تشرين الأول 2020 و 46.7°م في شهر حزيران 2021 للهواء و 32.26°م في شهر تشرين الأول الى 45.13°م للماء (شكل2 و3)، إذ أدت الدرجات الحرارية المرتفعة الى جفاف تلك البرك في بعض مواقع الدراسة، وتتفق الدراسة الحالية مع ما جاء في دراسة Al-Sultan (1999) الذي سجل مدى حراري تراوح بين 15–41°م في البرك المالحة في محافظة البصرة جنوب العراق ولأربعة مواقع شملت (ابي الخصيب والقبلة والموفقية والكرمة)، كما سجلت الدراسة درجة 46.7 °م لأول مره في البرك المالحة في محافظة البصرة وهذا يخالف ما ذكره Klaus *et al.* (1980) إذ ذكر أن درجات الحرارة المرتفعة 45–60 °م تؤدي الى قتل خلايا الطحلب بسبب تحلل بعض المركبات التي تعمل على الموازنة الأزموزية مثل الكليسرول في الأنواع *D. salina* و *D. viridis* كما ذكروا Watsuji *et al.* (2021) بأن خلايا الطحلب *D. salina* تفقد القدرة على الحركة عند المدى الحراري 45–50 °م وكلما ارتفعت درجة الحرارة زادت سرعة فقدان الخلايا للحركة. لقد اشارت الدراسات السابقة أن مدى درجة الحرارة المثلى لنمو الطحلب هي 20–30 °م

(Watsuji *et al.*, 2021; Casadiego *et al.*, 2016; AbuSara *et al.*, 2011)، وبذلك تكون الدرجات الحرارية التي تم تسجيلها في الدراسة الحالية هي الدرجات المثالية نوعا ما لانتشار وتواجد هذ الطحلب مع تسجيل تواجده في برك ملحية ذات درجات حرارة مياه اكثر من 45 ^{o}م في محافظة البصرة.

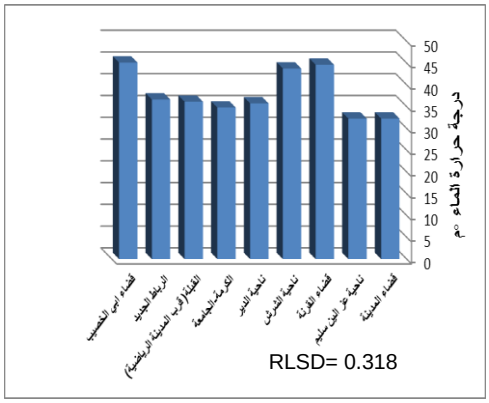
بينت الدراسة أن قيم الأس الهيدروجيني كانت ضمن الحدود الطبيعية والملائمة لنمو معظم افراد الجنس *Dunaliella* sp.، إذ تراوحت بين 6.8-8.4 (شكل 4) وهذا يطابق ما ذكرته الدراسات السابقة، بأن الصفة القاعدية هي السائدة في المياه العراقية (Al-sultan 1999; Al-Mousawi and Al-Asadi, 2013; Alwan, 2016)، كما ذكر Khalil *et al.* (2010) أن افراد الطحلب *D. bardawil* تنمو في مدى واسع للأس الهيدروجيني يتراوح بين 4-9، كما بينا Sui and Vlaeminck (2019) أن اعلى إنتاجية للبروتين كانت عند الرقم الهيدروجيني pH=7.5، لذا يعد هذا المدى ملائما لنمو وازدهار هذا الطحلب. ذكرا Celekli and Dönmez (2006) أن اعلى نمو للخلايا واقصى تراكم للبيتا كاروتين في الجنس *Dunaliella* sp. كانت عند الرقم الهيدروجيني 7، اذ يمتاز افراد الجنس *Dunaliella* بتحمل مدى واسع من الدالة الحامضية يمكن ان يصل الى 11 وهذا ما شجع الطحلب على النمو في تلك البيئات القاسية اذ يؤكد ما توصلت اليه الدراسة الحالية هو ما أشارا اليه Tafreshi and Shariati (2009) أن الرقم الهيدروجيني الأمثل لنمو الطحلب *Dunaliella* يتراوح بين 7.5-8.

سجلت الدراسة تفاوت واضح في نسب الملوحة بين المحطات إذ تراوحت بين 110.8-315.5 جزء بالألف والذي يماثل النسبة المئوية التالية 11.08-31.55 على التوالي (شكل 5)، وهذا يتوافق مع النتائج المستحصل عليها من قبل Taha *et al.* (2012) والتي سجلوا فيها تواجد نوعين من الطحالب المتحملة للملوحة هما *D. bardawil* و *D. salina* في بحيرتي Bardawil و Qarwn الملحيتين في جمهورية مصر العربية، وقد بلغ مستوى الملوحة فيهما 119.12 و 340.9 غرام/ لتر على التوالي. ذكر Brock (1975) ان تواجدا لأفراد جنس الطحلب *Dunaliella* في بحيرة Great Salt Lake في الولايات المتحدة الأمريكية كان في مستوى ملوحة تراوح بين 10-30% من ملح كلوريد الصوديوم، إذ أن تواجد هذا الطحلب في تلك الملوحة العالية والتي لا تصل اليها الأجناس الأخرى القريبة ولاسيما الطحلب الأخضر *Chlamydomonas* والذي يستطيع بعض انواعه مثل *C. reinhardtii* من تحمل ملوحة لا تزيد عن 1.5 مولاري من ملح كلوريد الصوديوم، وان خلايا هذا الطحلب عند تعرضها الى ملوحة

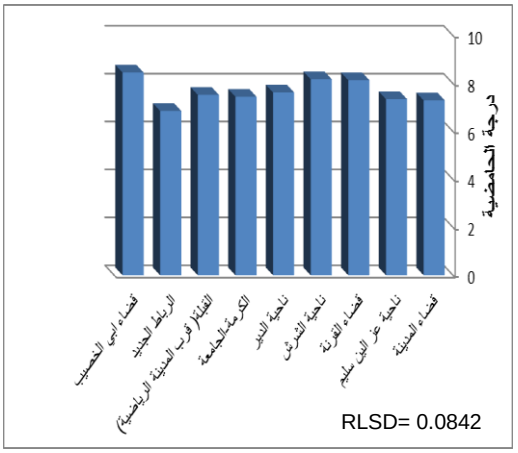
من 1.5–2 مولاري يؤدي الى تثبيط عملية البناء الضوئي وانكماش حجمها فضلا عن موت اغلبها (Wang *et al.*, 2018)، وهذا يدل على ان الجنس قيد الدراسة هو *Dunaliella* وليس *Chlamydomonas* وذلك لشدة التشابه بينهما من الناحية المظهرية والتصنيفية، إذ بينت الدراسات ان افراد الجنس *Dunaliella* sp. تستطيع النمو في مديات واسعة من الملوحة تتراوح بين 0.05–5.5 مولاري من ملح كلوريد الصوديوم وأن الطحلب يعطي افضل نمو تحت التراكيز من 2–10% من ملح كلوريد الصوديوم، وان التركيز الأمثل هو 5% من الملح لذا يعد هذا الجنس متحمل للملوحة Halotolerant alga (Chen and Jiang, 2009; Al-Sultan,1999; Mofeed, 2015).



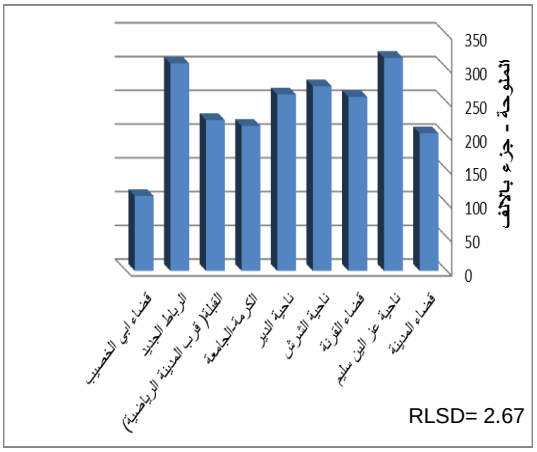
شكل 2: درجة حرارة الهواء لبعض البرك المالحة للمواقع المدروسة في محافظة البصرة جنوب العراق



شكل 3: درجة حرارة الماء لبعض البرك المالحة للمواقع المدروسة في محافظة البصرة جنوب العراق.



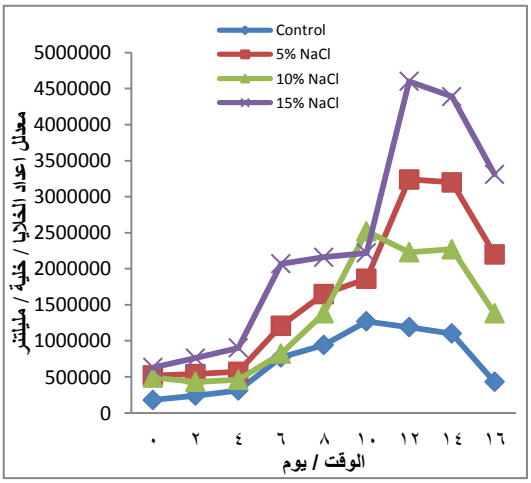
شكل 4: درجة حامضية المياه لبعض البرك المالحة للمواقع المدروسة في البصرة جنوب العراق.



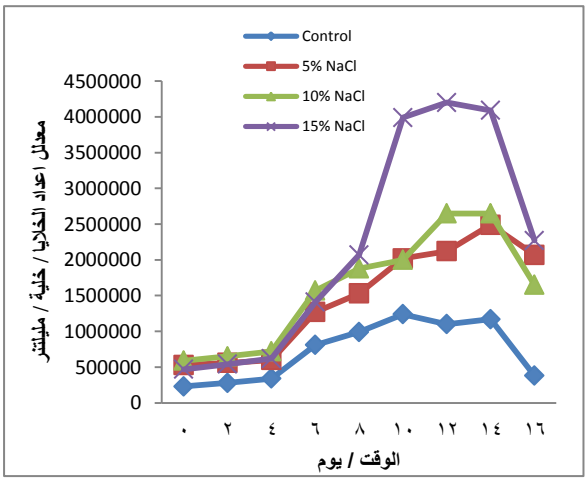
شكل5: تركيز الملوحة لبعض البرك المالحة للمواقع المدروسة في البصرة جنوب العراق (غرام/ لتر).

تأثير زيادة تركيز ملح كلوريد الصوديوم على نمو الطحلب

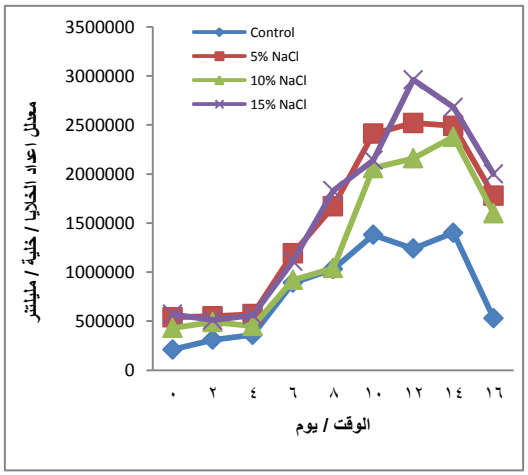
برهنت نتائج الدراسة على ان لملح كلوريد الصوديوم تأثير واضح على تحفيز نمو خلايا الطحلب *D. salina*، إذ ان الزيادة التدريجية من ملح كلوريد الصوديوم بين 5–15% أدت الى زيادة معنوية واضحة في اعداد الخلايا (خلية/ملليتر) إذ أظهر الطحلب في جميع العزلات نموا واضحا وبصوره معنوية في التركيز الملحي 15% على جميع التراكيز الأخرى ومعاملة السيطرة، يليه التركيز 10% ثم التركيز 5%، وكانت معاملة السيطرة هي الأقل من حيث اعداد الخلايا (الاشكال 6–13) وهذا يتفق مع دراسة AL-Sultan (1999) إذ ذكر ان زيادة تركيز ملح كلوريد الصوديوم يؤدي الى زيادة معنوية في الكتلة الحية واعداد خلايا الطحلب *D. salina* مقارنة بمعاملة السيطرة، مما يدل على ان الطحلب متحمل للملوحة ومفضل لها، كما ذكر أن تعريض الطحلب الى تراكيز ملحية عالية جدا من كلوريد الصوديوم اكثر من 20% ينتج عنه نقصان في النمو، يتضح من نتائج الدراسة ان الطحلب *D. salina* يحتاج الى كميات معينة من ملح كلوريد الصوديوم ليصل الى افضل معدل نمو كما لوحظ أن الطحلب يمكن ان يعيش في بيئة خالية من ملح كلوريد الصوديوم كما في معاملة السيطرة، كذلك يستطيع الطحلب *D. salina* مقاومة تراكيز عالية من الملح رغم تأثيرها السلبي على النمو (Avron, 1990; AL-Ben-Amotz and Sultan;1999).



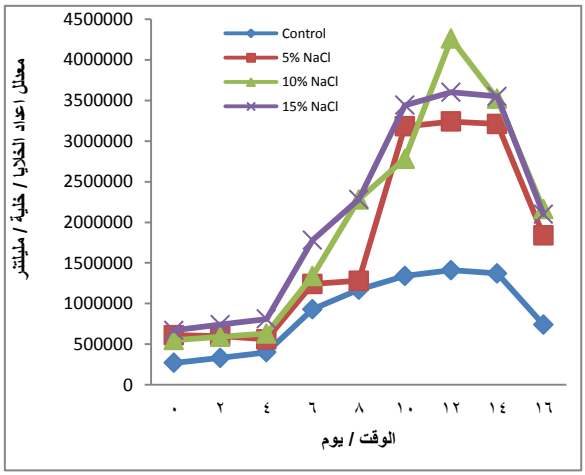
شكل 6: معدل نمو خلايا الطحلب *D. salina* (خلية/ملليتر) المعزول من بركة مائية مالحة في قضاء المدينة محافظة البصرة/ جنوب العراق تحت مستويات ملحية مختلفة.



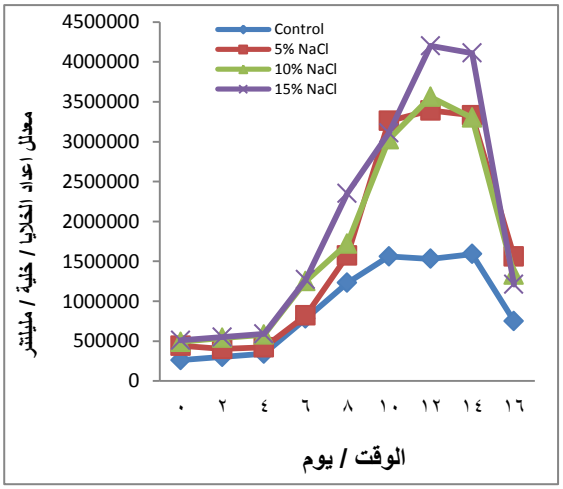
شكل 7:معدل نمو خلايا الطحلب *D. salina* (خلية/ملليتر) المعزول من بركة مائية مالحة في ناحية الشهيد عز الدين سليم تحت مستويات ملحية مختلفة.



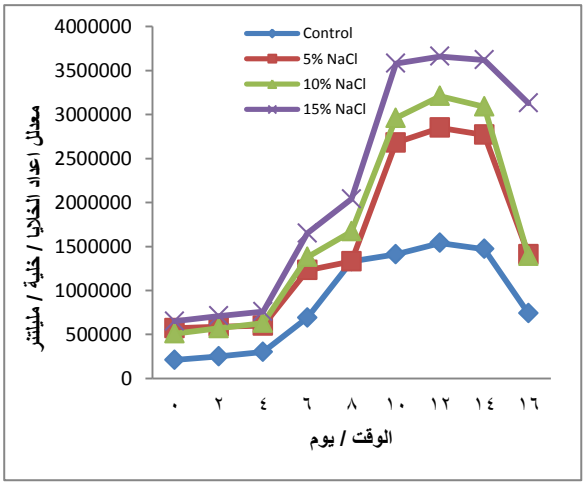
شكل 8: نمو خلايا الطحلب *D. salina* (خلية/ملليتر) المعزول من بركة مائية مالحة في ناحية الدير تحت تراكيز ملحية مختلفة.



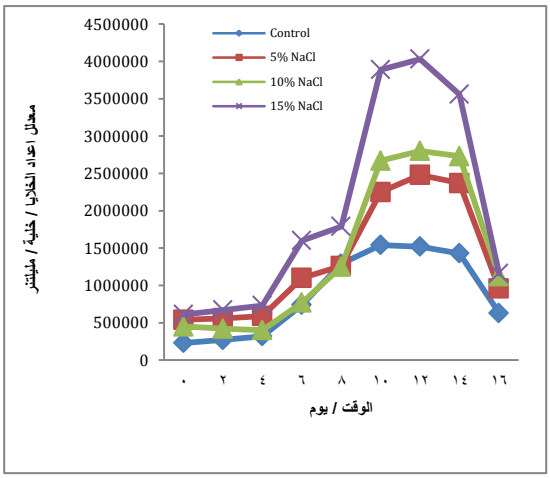
شكل 9: نمو خلايا الطحلب *D. salina* (خلية/ملليتر) المعزول من بركة مائية مالحة في موقع الجامعة تحت تراكيز ملحية مختلفة.



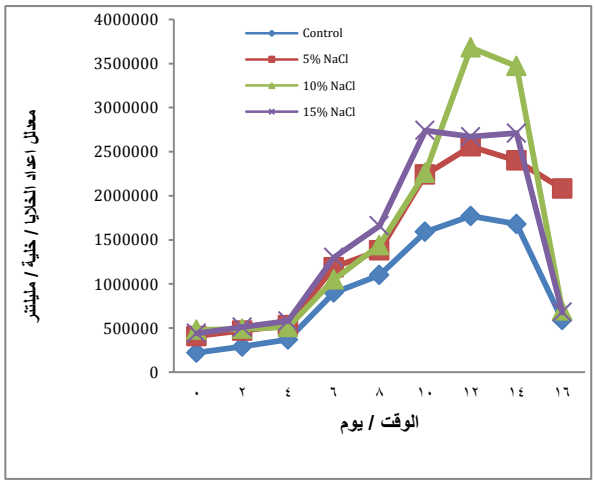
شكل 10: نمو خلايا الطحلب *D. salina* (خلية/ملليتر) المعزول من بركة مائية مالحة في موقع ابي الخصيب تحت تراكيز ملحية مختلفة.



شكل 11: نمو خلايا الطحلب *D. salina* (خلية/ملليتر) المعزول من بركة مائية مالحة في موقع محمد القاسم تحت تراكيز ملحية مختلفة.



شكل 12: نمو خلايا الطحلب *D. salina* (خلية/ملليتر) المعزول من بركة مائية مالحة في موقع المدينة الرياضية تحت تراكيز ملحية مختلفة.

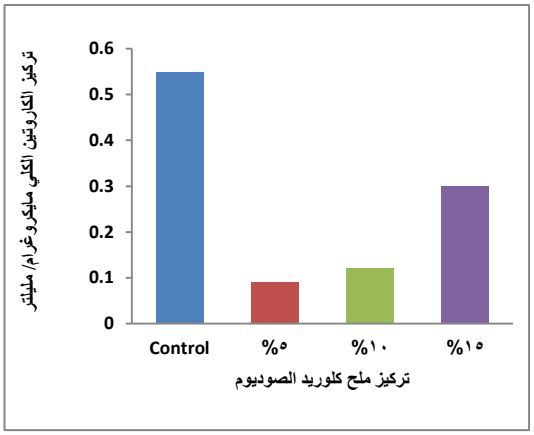


شكل 13: نمو خلايا الطحلب *D. salina* (خلية/ملليتر) المعزول من بركة مائية مالحة في موقع القرنة تحت تراكيز ملحية مختلفة.

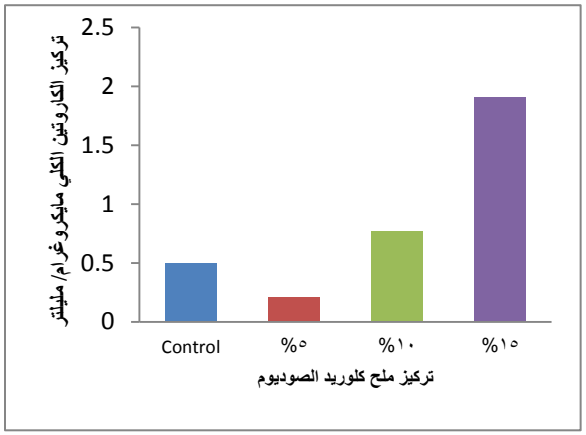
تأثير زيادة تركيز ملح كلوريد الصوديوم على محتوى خلايا الطحلب من الكاروتين الكلي

تؤثر عوامل مختلفة على انتاج الكاروتين منها ظروف الاستزراع والعوامل الغذائية والبيئية واستخلاص البيتا كاروتين، ووجدت الدراسة الحالية أن من بين ظروف الاستزراع فإن العوامل مثل الملوحة ودرجة الحرارة وشدة الإضاءة هي الأكثر تأثيرا وهذا يتفق مع ما جاء في دراسة (Pourkarimi *et al.*, 2020)،اذ تبين في الدراسة الحالية ان زيادة انتاج الكاروتين يزداد بزيادة الملوحة إذ بلغ اعلى معدل لإنتاج الكاروتين عند تركيز 15% من ملح كلوريد الصوديوم 1.915مايكروغرام/ ملليتر في موقع ناحية الشهيد عزالدين سليم وكذلك الحال لبقية المواقع إذ كان محتوى الخلايا من الكاروتين مرتفع لهذا التركيز، وبدأ محتوى الخلايا من الكاروتين ينخفض كلما انخفض تركيز الملح، إذ انخفض محتوى الخلايا من الكاروتين عند التركيز 10% والتركيز 5% من ملح كوريد الصوديوم وسجل الاخير اقل محتوى للخلايا من الكاروتين 0.092 مايكروغرام/ ملليتر و0.126 مايكروغرام/ ملليتر للتركيز 10% في قضاء المدينة وهذا مقارب لما ذكر في دراسة Vo and Tran (2014)، إذ لوحظ أن انتاج الكاروتين الكلي يزداد بزيادة الإجهاد الملحي الاشكال (14–22)، كما سجلت مزرعة السيطرة والخالية من أي ملح ارتفاع في محتوى الخلايا من

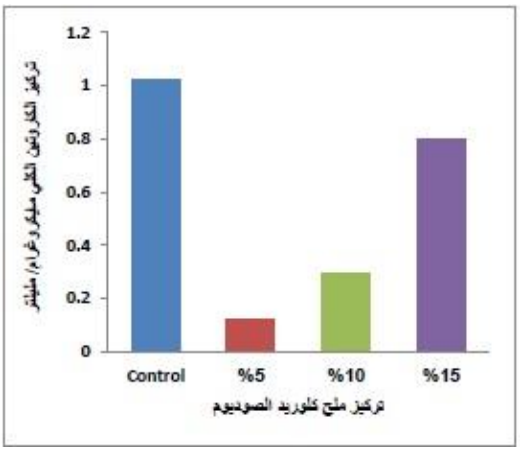
الكاروتين لأغلب مواقع الدراسة، والذي سجل ثاني اعلى محتوى من الكاروتين اذ بلغ 1.024 مايكروغرام/ ملليتر في موقع قضاء القرنة، وقد يكون السبب هو أن قلة الملوحة او انعدامها يمثل عامل اجهاد أيضا مثل عمل الزيادة في تركيز الملوحة، إذ اشارت نتائج Fazeli *et al.* (2006) عند دراستهم لتأثير تراكيز ملحية مختلفة من ملح كلوريد الصوديوم (15-0.05) % من ملح كلوريد الصوديوم وأن اعلى كمية من الكاروتين كانت عند تركيز 0.05 مولاري من ملح كلوريد الصوديوم وهذا يعتبر تركيز منخفض جدا مقارنة بالتراكيز التي يتحملها الطحلب *D. salina*.



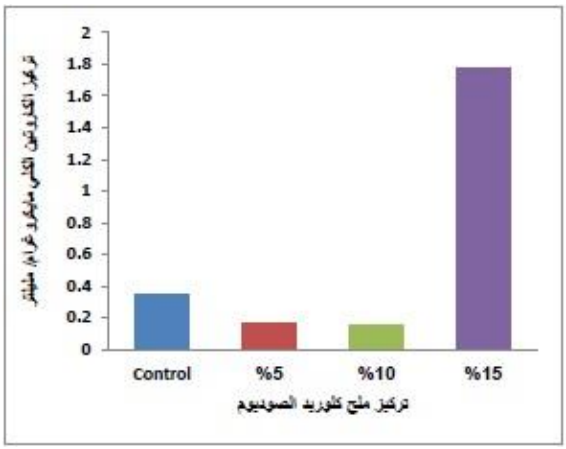
شكل 14: معدل تركيز الكاروتين الكلي (مايكروغرام/ ملليتر) في خلايا الطحلب *D. salina* المعزول من بركة مالحة في قضاء المدينة تحت تراكيز مختلفة من ملح كلوريد الصوديوم بعد 30 يوم من الزرع.



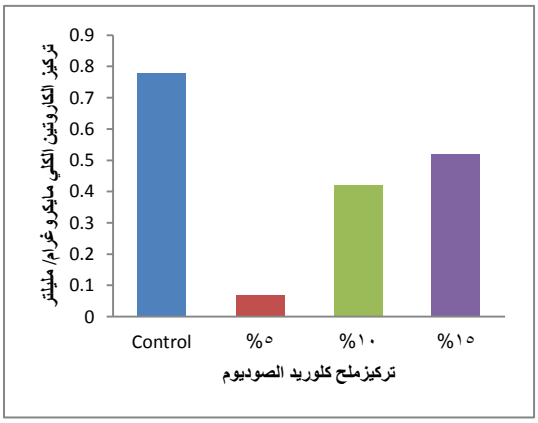
شكل 15: معدل تركيز الكاروتين الكلي (مايكروغرام/ ملليتر) في خلايا الطحلب *D. salina* المعزول من بركة مالحة في ناحية الشهيد عزالدين سليم (الهوير) تحت تراكيز مختلفة من ملح كلوريد الصوديوم بعد مرور 30 يوم من الزرع.



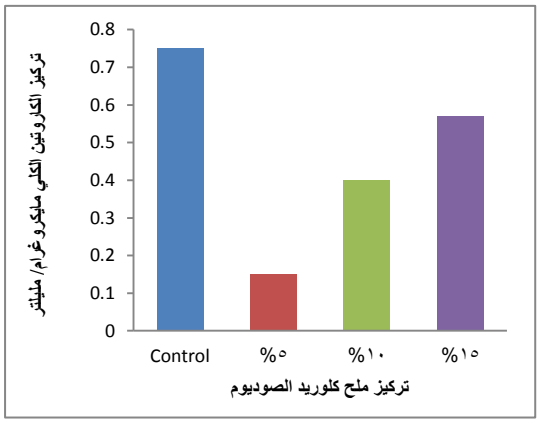
شكل 16: معدل تركيز الكاروتين الكلي(مايكروغرام/ ملليتر) في خلايا الطحلب *D. salina* المعزول من بركة مالحة في قضاء القرنة تحت تراكيز مختلفة من ملح كلوريد الصوديوم بعد مرور 30 يوم من الزرع.



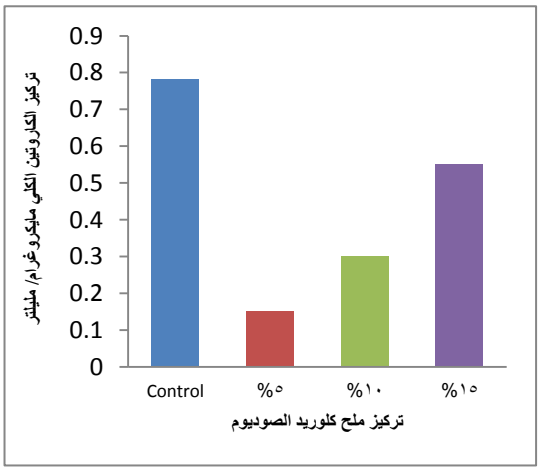
شكل 17: معدل تركيز الكاروتين الكلي (مايكرو غرام/ ملليتر) في خلايا الطحلب *D. salina* المعزول من بركة مالحة في ناحية الشرش تحت تراكيز مختلفة من ملح كلوريد الصوديوم بعد مرور 30 يوم من الزرع.



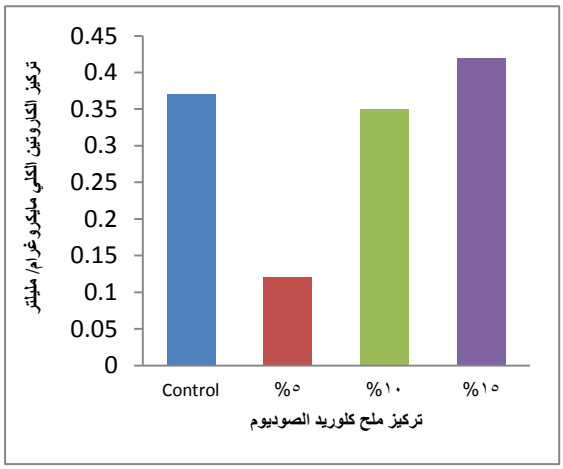
شكل 18: معدل تركيز الكاروتين الكلي (مايكروغرام/ ملليتر) في خلايا الطحلب *D. salina* المعزول من بركة مالحة في قضاء الدير تحت تراكيز مختلفة من ملح كلوريد الصوديوم بعد مرور 30 يوم من الزرع.



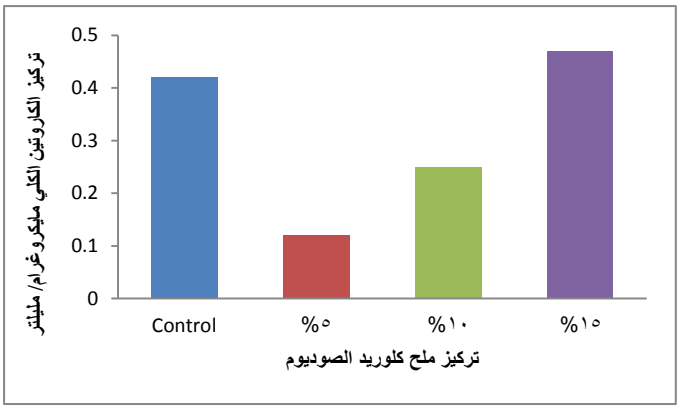
شكل 19: معدل تركيز الكاروتين الكلي(مايكروغرام/ ملليتر) في خلايا الطحلب *D. salina* المعزول من بركة مالحة في الكرمة (موقع الجامعة) تحت تراكيز مختلفة من ملح كلوريد الصوديوم بعد مرور 30 يوم من الزرع.



شكل 20: معدل تركيز الكاروتين الكلي (مايكروغرام/ ملليتر) في خلايا الطحلب *D. salina* المعزول من بركة مالحة قرب المدينة الرياضية تحت تراكيز ملحية مختلفة بعد مرور 30 يوم من الزرع.



شكل 21: معدل تركيز الكاروتين الكلي (مايكروغرام/ ملليتر) في خلايا الطحلب *D. salina* المعزول من بركة مالحة في الرباط الجديد قرب جسر محمد القاسم تحت تراكيز ملحية مختلفة بعد مرور 30 يوم من الزرع.



شكل 22: معدل تركيز الكاروتين الكلي (مايكروغرام/ ملليتر) في خلايا الطحلب *D. salina* المعزول من بركة مالحة في قضاء ابي الخصيب تحت تراكيز ملحية مختلفة بعد مرور 30 يوم من الزرع.

الاستنتاجات

استنتج من الدراسة الحالية ان الطحلب المعزول والمنقى من البرك المالحة لجميع مواقع الدراسة التسعة في محافظة البصرة هو الطحلب المتحمل للملوحة *D. salina* وذلك اعتمادا على التشخيص المظهري والنتائج البيئية والتجارب الفسلجية المختبرية التي اوضحت ذلك واهمها قابليته على مقاومة ازدياد مستوى الملوحة اعلى من 15% من ملح كلوريد الصوديوم والتي تعادل مستوى ملوحة اعلى من مستوى ملوحة ماء البحر حوالي 150 جزء بالألف والذي ينفرد به افراد هذا النوع يضاف الى ذلك مقاومة جميع العزلات لارتفاع مستويات الملوحة بإنتاج الكاروتين وبشكل يظهر ان العزلات من المواقع المختلفة تعود لنفس النوع والجنس المشخص اعلاه وذلك لامتلاكها نفس اليات المقاومة الملحية وانتاج الكاروتين تحت ظروف الاجهاد الملحي والنمو مختبريا علما بانه تم تأكيد تشخيص الجنس والنوع اعلاه جزيئيا من قبل الباحث (بحث غير منشور)

شكر وتقدير

شكرنا وتقديرنا الى جامعة البصرة وعمادة كلية التربية للعلوم الصرفة ورئاسة قسم علوم الحياة لدعمهم المستمر وتوفير بيئة العمل المناسبة لإنجاز هذا البحث.

المصادر

Abusara, N.F.; Emeish, S.; and Sallal, A.K. (2011). The effect of certain environmental factors on growth and β-carotene

production by *Dunaliella* sp. isolated from the Dead Sea. Jordan J. Biol. Sci., 4(1): 29-36. URL.

Al-Mousawi, N.J. and Al-Asadi, W.M. (2013). Occurrence of Halotolerant algae in shallow salina water (bogs), Distributed in Basra City, Iraq. J. Thi-Qar Sci., 4(1): 9-17. URL.

AL-Sultan, E.Y. (1999). An Ecological and Physiological Study on a Halotolerant alga *Dunaliella salina* in Basrah. M. Sc. Thesis Coll. Educ., Univ. Basrah, 120 pp.

Alwan, A.A. (2016). Extraction and some bioactive compounds from halotolerant green alga *Dunaliella* sp. and study their biological application. M. Sc. Thesis, Coll. Sci., Univ. Basrah, 112 pp.

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

Ben-Amotz, A.; Polle, J.E.; and Subba-Rao, D.V. (2009). The Alga *Dunaliella*: Biodiversity, Physiology, Genomics and biotechnology. CRC press,1St publisher Taylor and Francis Group.

Borowitzka, M.A. and Siva, C.J. (2007). The taxonomy of the genus *Dunaliella* (Chlorophyta, Dunaliellales) with emphasis on the marine and halophilic species. J. Appl. Phycol., 19(5): 567-590. DOI: https://doi.org/10.1007/s10811-007-9171-x.

Brock, T.D. (1975). Salinity and the ecology of *Dunaliella* from Great Salt Lake. J. Gen. Microbiol., 89(2): 285-292. DOI: https://doi.org/10.1099-/00221287-89-2-285

Casadiego, D.A.C.; Arrieta, A.R.A.; Mercado E.R.A.; Cahuana, S.J.C.; Noriega, K.S.B.; Escobar, A.F.S. and Avendano, E.D.M. (2016). Evaluation of Culture Conditions to Obtain Fatty Acids from Salina Microalgae Species: *Dunaliella salina*, Sinecosyfis sp., and *Chroomonas* sp. BioMed Res. Inter.1-7. DOI: https://doi.org/10.1155/2016/508-1653

Chen, H. and Jiang, J.G.(2009). Osmotic responses of *Dunaliella* to the changes of salinity. J. Cell Physiol., 219(2): 251-258. DOI: https://doi.org/10.1002/jcp.21715

Chu, S.P. (1942). The influence of the mineral composition of the medium on the growth of planktonic algae: part I. Methods and culture media. The J. Ecol., 284-325.

Fazeli, M.R.; Tofighi, H.; Samadi, N.; and Jamalifar, H. (2006). Effects of salinity on β-carotene production by *Dunaliella tertiolecta* DCCBC26 isolated from the Urmia salt lake, north of Iran. Biores. Technol., 97(18): 2453-2456. DOI:

Fogg, G.E.(1965). Algal cultures and phytoplankton. Ecology Univ. Wisconsin press. 51, 1: 1266. DOI: https://doi.org/10.1002-/iroh.19660510-116.

González, M.A.; Gómez, P.I. and Polle, J.E. (2019). Taxonomy and phylogeny of the genus *Dunaliella*. In The Alga *Dunaliella* (15-44). CRC Press. DOI: https://doi.org/10.-1201/97804290616-39-2.

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. Biotech. Bioproc. Engin., 13(5): 540-544.

Holmes, J.A. and Dutcher, S.K. (1989). Cellular asymmetry in *Chlamydomonas reinhardtii*. J. Cell. Sci., 94(2): 273-285. DOI: https://doi.org/10.1242/jcs.94.2.273.

Khalil, Z.I.; Asker, M.M.; El-Sayed, S. and Kobbia, I.A. (2010). Effect of pH on growth and biochemical responses of *Dunaliella bardawil* and *Chlorella ellipsoidea*. World J. Microbiol. Biotech., 26(7): 1225-1231. DOI: https://doi.org/10.1007/s11-274-009-0292-z.

Klaus, W.; Ben-Amotz, A. and Avron, M. (1980). Effect of temperature on glycerol retention in the halotolerant algae *Dunaliella* and *Asteromonas*. Plant Physiol., 66(6): 1196-1197. DOI: https://doi.org/10.1104/pp.66.6.1196.

Mofeed, J. and Abdel-Aal, E.I. (2015). Effect of phenol on some antioxidant enzymes in the marine microalga *Dunaliella salina*. J. Environ. Sci., 44(1): 185-196. URL.

Murthy, K.C.; Vanitha, A.; Rajesha, J.; Swamy, M.M.; Sowmya, P.R. and Ravishankar, G.A. (2005). In vivo antioxidant activity of carotenoids from *Dunaliella salina* a green micro-alga. Life Sci., 76(12): 1381-1390. DOI: https://doi.org/10.1016/j.lfs-.2004.1-0.015.

Pourkarimi, S.; Hallajisani, A.; Alizadehdakhel, A.; Nouralishahi, A. and Golzary, A. (2020). Factors affecting production of beta-carotene from *Dunaliella salina* microalgae. Biocat. Agric. Biotech., 29, 101771. DOI: https://doi.org/10.1016/j.bcab-.2020.1017-71.

Smith, M. (1950). Fresh water algae of the united states. McGraw Hill, New York Second edition. PP. 325. URL

Stein, J.R. (1975). Handbook of phytochemical methods. Camb. Univ. Press. Camb., 445 pp.

Sui, Y. and Vlaeminck, S.E. (2019). Effects of salinity, pH and growth phase on the protein productivity by *Dunaliella salina*. J. Chem. Technol. Biotechnol., 94(4): 1032-1040. DOI: https://doi.org/10.1002/jctb.5850.

Tafreshi, A. and Shariati, M. (2009). Dunaliella biotechnology: methods and applications. J. Appl. Microbiol., 107(1): 14-35. URL.

Taha, O.; Abo El-Kheir, W.; Hammouda, F. and Abd El-Hady, H. (2012). Production of β-Carotene and Glycerol from *Dunaliella bardawil* and *D. salina* Isolated from the Egyptian Wet-Lands Qarun and Bardawil. Int. Conf. Ecol., Environ. Biol. Sci., 369-373. URL.

Vo, T. and Tran, D. (2014). Carotene and antioxidant capacity of *Dunaliella salina* strains. World J. Nutr. Health, 2(2): 21-23. DOI: 10.12691/jnh-2-2-2.

Wang, N.; Qian, Z.; Luo, M.; Fan, S.; Zhang, X. and Zhang, L. (2018). Identification of salt stress responding genes using transcriptome analysis in green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. Int. J. Mol. Sci., 19(11): 3359. DOI: https://-doi.org/10.3390/ijm s19113359.

Watsuji, T.O.; Naka, A.; Morita, Y. and Kurahashi, M. (2021). Effect of temperature and dissolved oxygen on gravity sedimentation of the unicellular alga *Dunaliella salina*. Ann. Microbiol., 71(1): 1-7. DOI: https://doi.org/10.1186/s13213-021-01636-6.

Wiedeman, V.E.; Walne, P.L. and Trainor, F.R. (1964). A new technique for obtaining axenic cultures of algae. Can. J. Bot., 42(7): 958-959. DOI: https://doi.org/10.1139/b64-085.

Diagnostic study of the green alga *Dunaliella salina* in the brine ponds from Basrah Governorate and the effect of chloride salt on alga growth and carotene production.

Anfal F. Abdulla and Emad Y.A. AL-Sultan* iD

Biology Departments, College of Education For Pure Sciences, University of Basrah, Iraq
*Corresponding Authors e-mail: emad.awed@uobasrah.edu.iq

Received: 02/09/2022 Acceppted: 31/12/2022 Published: 25/06/2023

Abstract

The current study included shedding light on one genus of green alga *Dunaliella salina* spread from the saline brine ponds, Basrah Governorate, southern Iraq. Morphological results showed all algal samples from different brine ponds sites in Basrah governorate were belong to the species *D. salina*, and the measured enviro-nmental factors are commensurate with the growth of this species especially salinity, due to its increasing growth compatible increasing salinity with significantly P≤0.05 at concentrations 0-15% of sodium chloride salt, which equaled a salinity level more than 4 times the salinity of sea water, which amounted to 150 g/L. finding showed the concentration 5% of sodium chloride is considered it is a suitable concentration for the growth of all alga samples with no significant differences P≤0.05 between the generation time (G) and constant growth (K) for all cultures samples. Finding was proven that all isolates of the different sites showed the ability to produce total carotene in response to an increase or decrease in salinity, as is the case in the salinity-free control group as an effort that requires the alga to produce carotene, and this is an important characteristic for this species as well. From these results, it can be concluded that all isolates of algae from different sites belong to only one species diagnosed in the current study.

Keywords: brine ponds, *D. salina,* green alga, Morphological diagnosis, sodium chloride salt, total carotene.

P-ISSN: 1812-237X, E-ISSN: 2788-5720, https://ijaqua.uobasrah.edu.iq/index.pip/iaqua
This is an open access article under the CC BY 4.0 license http://creativecommons.org/licenses/by/4.0).