

Biophysical Effect of Anionic Surface-Active Substance on the Growth Dynamic and Computational Predict in Extracellular Signal-Regulated Kinases (ERKs) of *Dunaliella viridis* Microalgae

Ali Asghar Rastegari ^{1*}, Behrooz Zarei Darki ²

¹ Department of Cellular and Molecular Biochemistry, Faculty of Biological Sciences, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran

² Department of Marine Biology, Faculty of Natural Resources and Marine Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

Abstract

The present study was conducted to evaluate the anionic SDS surfactant in various environmental conditions on *Dunaliella viridis* alga growth dynamics. The effect of different concentrations of 0.1, 1 and 10 mg. L⁻¹ of SDS and pH of 7, 8, 9 and 10 on the *Dunaliella* were investigated. The 20% reduction in growth rate of algae in all concentrations in comparison with the control was observed in the sixth and seventh day of experiments. The growth rate was close to 92% in the culture medium at a concentration of 1 mg. L⁻¹ SDS at pH 8 on day 7. In addition, the biodegradation process of surfactant will depend on the length of the alkylated chain as well as to cell metabolism. The short-lived alkyl chain SDS showed the highest percentage of degradation in the cell population. Therefore, the loss of cell density caused by surfactant in the culture medium results in an effect on the *Dunaliella* cell cycle, which is strongly dependent on ERK phosphorylation of MAPKs. In this research, to predict the structure and function of protein, the models have used the multiple sequencing alignment algorithms more. ERK sequences showed that their residues are strongly conserved in unicellular microalgae in higher plants and mammals. The degree of identity between the model sequences (Target) and ERK1 and ERK2 protein kinases (Template) has been calculated in RMSD 2.30 and 2.9 Å with highest sequence coverage.

Keywords: Biodegradation, *Dunaliella viridis*, Extracellular Signal-Regulated Kinases (ERKs), Sodium Dodecyl Sulphate, Target-template sequence

* Corresponding Author: rastegari@iaufala.ac.ir

تأثیر بیوفیزیکی ماده فعال سطحی آنیونی بر دینامیک رشد و پیشگویی محاسباتی کینازهای تنظیم‌شده با سیگنال خارج سلولی در جلبک *Dunaliella viridis*

علی اصغر رستگاری^{۱*}، بهروز زارعی دارکی^۲

^۱ گروه بیوشیمی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان، اصفهان، ایران

^۲ گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

چکیده

پژوهش حاضر، برای ارزیابی تأثیر سورفکتانت آنیونی سدیم دو دسیل سولفات (SDS) در شرایط مختلف محیطی بر دینامیک رشد جلبک *Dunaliella viridis* انجام شد. سدیم دو دسیل سولفات با غلظت‌های ۰/۱، ۱ و ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر و pH برابر با ۷، ۸، ۹ و ۱۰ اعمال شدند. میزان رشد جلبک در هر سه محیط حاوی سه غلظت متفاوت سدیم دو دسیل سولفات در روز هفتم نسبت به شاهد تقریباً ۲۰ درصد بود. میزان رشد در محیط کشت با غلظت ۱ میلی‌گرم بر لیتر سدیم دو دسیل سولفات و pH=۸ در روز هفتم نسبت به شاهد ۹۲ درصد بود. فرایند تخریب زیستی سورفکتانت، علاوه بر متابولیسم سلولی به طول زنجیره آلکیل نیز بستگی دارد. زنجیره آلکیل با طول کوتاه سدیم دو دسیل سولفات بیشترین درصد تخریب را در جمعیت سلولی از خود نشان می‌دهد؛ در نتیجه، کاهش تراکم سلولی ناشی از سورفکتانت در محیط کشت در چرخه سلولی *D. viridis* تأثیر می‌گذارد که به شدت به فسفریلاسیون کینازهای تنظیم‌شده با سیگنال خارج سلولی (ERKS) به وسیله پروتئین کینازهای فعال شده با میتوزن (MAPKs) وابسته است. در پژوهش حاضر، مدل‌ها در جهت پیشگویی ساختمان و عملکرد پروتئین، بیشتر الگوریتم هم‌ردیفی توالی‌ها را به کار می‌برند. توالی‌های کینازهای آبخاری تنظیم‌شده با سیگنال خارج سلولی نشان می‌دهند باقیمانده‌های آمینواسیدی آنها به شدت در جلبک‌های تک‌سلولی، گیاهان و پستانداران عالی‌تر محافظت شده‌اند. میزان همانندی بین توالی‌های مدل‌شده، با پروتئین کینازهای الگوی ERK1 و ERK2 در ریشه میانگین انحرافات مربعی (RMSD) ۲/۳۰ و ۲/۰۹ آنگستروم با پوشش‌دهی بیشترین توالی محاسبه شده است.

واژه‌های کلیدی: تخریب زیستی، توالی هدف یا الگو، دونالیلا ویریدیس، سدیم دودسیل سولفات، کینازهای تنظیم‌شده با سیگنال خارج سلولی

* نگارنده مسئول: نشانی پست الکترونیک: rastegari@iaufala.ac.ir شماره تماس: ۰۳۱۳۷۴۲۰۱۳۴

مقدمه

جلبک‌ها نخستین حلقه زنجیره‌های غذایی بوم‌سامانه‌های آبی به شمار می‌روند و به دو گروه جلبک‌های میکروسکوپی و ماکروسکوپی تقسیم می‌شوند. جلبک‌های میکروسکوپی بیشتر تک‌سلولی‌اند و ابتدایی‌ترین منبع انرژی در جهان به شمار می‌روند. این موجودات طیف وسیعی از مواد بیوشیمیایی تولید می‌کنند که اهمیت اقتصادی فراوانی دارند (Salmaninejad, 2016). از سوی دیگر کشت و نگهداری این موجودات آسان است و کار با آنها به فضای نسبتاً اندکی نیاز دارد (Hadi et al., 2008). همچنین استفاده از مواد فعال زیستی این موجودات، موجب شده است در حل مشکلات زیست‌محیطی در پژوهش‌های بیوتکنولوژی نیز جایگاه بسیار بالایی داشته باشند (Hosseini Tafreshi and Shariati, 2009). *Dunaliella viridis* یکی از گونه‌های یوکاریوتی مقاوم به شوری به شمار می‌رود؛ زیرا در بسیاری از محیط‌های حاوی نمک مانند دریاچه‌ها و مرداب‌های آب شور یافت می‌شود (Lee, 1989). برخی گونه‌های *Dunaliella* مقادیر زیادی بتاکاروتن را (گاهی بیش از ۱۰ درصد وزن خشک) در شرایط شوری زیاد، شدت نور زیاد و محدودیت مواد غذایی در خود تجمع می‌دهند. *Dunaliella* ریزجلبک یوکاریوتی از رده کلروفیتا و تک‌سلولی است که از لحاظ ریخت‌ساختی به کلامیدوموناس شباهت دارد؛ با این تفاوت که *Dunaliella* دیواره سلولی ندارد (Witman et al., 1972; Borowitzka and Borowitzka, 1988). نداشتن دیواره سلولی و احاطه شدن پروتوپلاست با

یک غشای نازک، ویژگی مهم و متمایزکننده اعضای این جنس از سایر جلبک‌های سبز به شمار می‌رود (Avron and Ben-Amots, 1992)؛ زیرا نبود دیواره سخت پلی‌ساکاریدی جلبک را وادار می‌کند به فشارهای محیطی و هر تغییری در شرایط اسمزی و مکانیکی محیط به سرعت واکنش نشان دهد (Ben-Amotz et al., 1989). تاکنون در جهان تقریباً ۲۸ گونه از جنس *Dunaliella* گزارش شده‌اند (Guiry and Guiry, 2014). مواد فعال سطحی، مواد دوگانه‌دوست هستند که دم آب‌گریز و سر آب‌دوست دارند. مواد فعال سطحی آنیونی بر اثر یونیزه‌شدن در محیط آبی به یک یون مثبت که اغلب سدیم یا پتاسیم است و یون‌های منفی با یک زنجیره R یک‌کربنی طولانی آلکیل تفکیک می‌شوند. یون‌های آلی با بار منفی عهده‌دار فعالیت در سطح هستند. این گروه بیشترین مصرف را بین مواد فعال سطحی دارند و بیشتر در پاک‌کننده‌ها استفاده می‌شوند. انتشار مواد فعال سطحی در محیط‌زیست خطر دارد و در عملکرد بوم‌سامانه اختلال ایجاد می‌کند؛ به طوری که حجم زیادی از آب و فاضلاب حاوی مواد فعال سطحی مشکلات زیستی را دوچندان می‌کند. یکی از پر مصرف‌ترین این مواد سدیم دودسیل سولفات است (Ostroumov, 2006). غلظت مواد فعال سطحی در آب‌ها از ۰/۱ تا ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر نوسان دارد و بیشتر در محیط‌های قلیایی مشاهده می‌شوند (Markina, 2010)؛ بنابراین با توجه به رشد روزافزون جمعیت و ورود شوینده‌ها از پساب‌ها به آب‌های سطحی و سپس دریاچه‌ها و دریاها توانایی‌های *Dunaliella viridis* برای ارزیابی این

حاضر، اثر این ماده سمی در دینامیک رشد سلولی جلبک بررسی می‌شود. بررسی‌های زیستی محدود دیگری بر *Dunaliella salina* انجام شده‌اند؛ بنابراین با منابع اندک یا بدون بررسی آثار زیستی توکسین در جلبک روبه‌رو هستیم (Markina, 2010)؛ با این حال بررسی‌ها تنها به تأثیر سدیم دودسیل سولفات (SDS) در غلظت‌ها و pH های متفاوت با توجه به محتوای ماده فعال سطحی در آب‌های دریایی در محدوده سه غلظت ماده تا اندازه ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر در شرایط قلیایی محیط کشت پرداخته‌اند. بررسی حاضر، تنها وضعیت فیزیولوژیک را بررسی نمی‌کند؛ بلکه آثار ماده سورفکتانت را که آلاینده بر بوم‌سامانه آبی است در شرایط *in vitro* و ارتباط آن را با محتوای فیزیولوژیک و تنوع گونه جلبک با روش omics مدل‌سازی می‌کند. بر این اساس پیشگویی محاسباتی ساختار کینازهای تنظیم شده با سیگنال خارج سلولی با اطلاعات توالی، تلفیق توالی و ساختمان سه‌بعدی پروتئین مد نظر در جلبک انجام شده است.

مواد و روش‌ها

مواد شیمیایی: مواد شیمیایی استفاده شده در پژوهش حاضر از شرکت مرک آلمان با درصد خلوص زیاد تهیه شدند.

آماده کردن نمونه‌ها: برای جدا و خالص کردن جلبک *D. viridis* نمونه‌برداری از تالاب گاوخونی در شرق استان اصفهان انجام شد. نخستین نقطه نمونه‌برداری در قسمت دلتای رودخانه و دیگری در برکه کوچکی در نزدیکی دلتای رودخانه زاینده‌رود بود. همگام با نمونه‌برداری، شاخص‌های شوری،

بوم‌سامانه‌های آبی بررسی شدند. رویکردهای امروزی پژوهش‌ها در زمینه جلبک‌های میکروسکوپی، به‌طور گسترده از روش‌های omics (ساختار و عملکرد ژن یا پروتئین) درباره بهره‌برداری از جلبک‌ها برای تولید سوخت‌های زیستی منشأ می‌گیرد. بر اثر تخمیر زیست‌توده جلبکی، فراورده‌های بیوتکنولوژی تولید می‌شوند؛ به طوری که لیپیدها به‌ویژه تری‌آسیل‌گلیسرول‌ها (TAGs) به بیودیزل تبدیل می‌شوند که سوخت زیستی ایدئال است. شناسایی نشدن سازوکار دقیق فیزیولوژیک ایستا و پویای جلبک‌های میکروسکوپی، بینش کاربردی و پیدایش پروتئومیکس و متابولومیکس (omics) جلبکی را موجب شده است (Mallick, et al. 2016). جلبک *Dunaliella* مدلی ایدئال برای بررسی سازوکارهای تحمل به استرس به شمار می‌رود؛ بنابراین مقایسه ساختمان و عملکرد پروتئین‌های هومولوگ با ویژگی‌های مشابه در توالی ازلحاظ شرایط محیطی مزوفیل، اکستریموفیل (اکستریموتولرانت) راهکارهای مبهم مولکولی را ازلحاظ ساختاری آشکار می‌کند؛ از جمله پروتئین کینازها که در پاسخ سلولی به تغییرات وسیع و عوامل تنش‌زا شرکت می‌کنند. کینازهای آبخاری تنظیم شده با سیگنال خارج سلولی ERK1 و ERK2 مؤثر بر رشد در *Dunaliella* شامل پروتئین کینازهای فعال شده با میتوزن (MAPKs) می‌شوند که در تمایز سلولی نقش دارند. با توجه به بررسی نشدن تأثیر زیستی ماده فعال سطحی آنیونی بر جلبک *Dunaliella* که جزء مهم سیستم آبی در تأمین اکسیژن حیوانات آبری است، در پژوهش

و فیزیولوژی دان‌ها به چالش تبدیل شده‌اند. به‌همین دلیل، شناسایی جلبک با روش ریخت‌شناختی، با دقت زیاد و با کمک متخصصان خارجی انجام شد. برای اعمال تیمارهای مختلف ماده فعال سطحی نمونه خالص شده، ابتدا ظروف و وسایل لازم با آب مقطر شستشو و در آون (شرکت Sarvazma، ایران) با دمای ۱۸۰ درجه سانتی‌گراد به مدت یک ساعت خشک و استریل شدند. کشت جلبک در محیط کشت Trenkenshu (Salmaninejad, 2016) در شدت نور ۱۲۰ میکرومول فوتون بر متر مربع بر ثانیه، درجه حرارت 25 ± 0.5 درجه سانتی‌گراد و دوره‌های نوری صفر تا ۲۴ ساعت روشنایی و تاریکی انجام شد (Salmaninejad, 2016). برای تهیه یک لیتر محیط کشت Trenkenshu آب محیط نمونه برداری فیلتر و سپس در اتوکلاو (مدل LAC-5045SP، شرکت Lab Tech، کره جنوبی) ضدعفونی شد و نسبت‌های معینی از عناصر شامل سدیم نترات (NaNO_3) به مقدار ۱/۸ گرم بر لیتر، سدیم دی‌هیدروژن فسفات یک‌آبه ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) به مقدار ۰/۳ گرم بر لیتر، سدیم اتیلن دی‌آمین تترا استات (Na_2EDTA) به مقدار ۰/۰۳۷ گرم بر لیتر، فریک سترات ۷ آبه ($\text{FeC}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) به مقدار ۰/۰۶۲ گرم بر لیتر، منیزیم کلرید چهارآبه ($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) به مقدار ۰/۰۰۸ گرم بر لیتر، کبالت (II) نترات شش‌آبه ($\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) به مقدار ۰/۰۰۶۲۵ گرم بر لیتر، آمونیوم مولیبدات چهارآبه ($(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) به مقدار ۰/۰۰۱۸۳ گرم بر لیتر، کروم آلوم ($\text{K}_2\text{Cr}_2(\text{SO}_4)_4 \cdot 24\text{H}_2\text{O}$) به مقدار ۰/۰۰۲۳۸ گرم بر

pH و دمای آب با دستگاه مولتی‌متر اندازه‌گیری شدند. هنگام نمونه‌برداری، در دلتای رودخانه؛ شوری آب، ۱۲/۴ قسمت در هزار و دما، ۲۳ درجه سانتی‌گراد و در برکه نزدیک دلتا؛ شوری آب، ۵۴/۶ قسمت در هزار و دمای آب، ۲۹ درجه سانتی‌گراد بود. pH آب نیز در دلتا ۸/۳ و در برکه ۸/۵ ثبت شد. آب در محل برکه به رنگ سبز نمایان بود و برداشت نمونه‌ها با بطری‌های ۱/۵ لیتری به صورت دستی انجام شد. در ایستگاه دلتای رودخانه با تور پلانکتون (شرکت Lamotte، آمریکا) مقدار ۵۰ لیتر آب از تور پلانکتون فیلتر شد و سپس نمونه‌ها با روش آب‌شویی به قسمت استکان تور پلانکتون هدایت شدند. پس از آن به ظروف ۲۰۰ میلی‌لیتری منتقل و در نهایت نمونه‌ها در ظرف با دمای تقریباً ۴ درجه سانتی‌گراد به آزمایشگاه هدایت شدند. خالص کردن *D. viridis* با کشت خطی و پلیت نوترینت آگار در سه مرتبه تکرار انجام شد (Ilknur et al., 2008; Melkonian et al., 1980). برای شناسایی گونه از مونوگراف‌ها و کلیدهای شناسایی مختلف استفاده شد (Massyuk, 1973; Massyuk et al. 2010). یکی از دلایل اصلی برای استفاده نکردن از روش‌های مولکولی به‌ویژه در جلبک‌ها این است که استخراج پروتئین‌ها و نوکلئیک اسیدها از آنها گران و زمان‌بر است و پلی‌سارکاریدهای مهارکننده پروتئین‌ها نیز در محیط مزاحمت ایجاد می‌کنند. این عوامل، پیوندهای شیمیایی پلیمرهای زیستی اجزای خارج سلولی را که سازگاری ساختاری ویژه‌ای دارند در غشای پلاسمایی سلول ناپایدار می‌کنند؛ از این رو روش‌های مولکولی برای بوم‌سامانه‌شناسان

رشد این جلبک با اندازه گیری جذب در طول موج ۶۵۰ نانومتر، به مدت ۷ روز و با رابطه ۱ انجام شد.

$$\text{ECA} = A/B \times 100 \quad \text{رابطه ۱}$$

در این رابطه، A برابر با مقدار جذب نمونه حاوی ماده فعال سطحی در طول موج ۶۵۰ نانومتر و B، مقدار جذب نمونه بلانک در همان طول موج است (Markina, 2010).

تحلیل فیلوژنتیک و مدل سازی کینازها: تحلیل

فیلوژنتیک با اطلاعات توالی اولیه برای کینازهای تیپ یک و دو و اطلاعات ساختار دوم انجام شد. توالی های اولیه با برنامه Clustal W2 (Larkin et al., 2007) تراز شدند. این برنامه برای هماهنگی انطباق چندتایی پروتئین ها و نوکلئیک اسیدها به کار می رود. همه ویژگی های توالی از لحاظ رفتاری وزن یکسان و بدون نظم داشتند. مدل فیلوژنی همسایگی مجاور، الگوریتم شاخص برای دو نوع کیناز تنظیم کننده سیگنال خارج سلولی است. درخت های همسایگی مجاور با برنامه PHYLIP که از لحاظ کیفی مشابه Clustal W2 است با محاسبه فاصله تکاملی ترسیم شدند.

مناسب ترین مدل اختصاصی پروتئین باید برای موارد ویژه صحیح باشد. ساخت مدل شامل چهار مرحله شناسایی الگوهای ساختاری، شناسایی ترتیب و توالی هدف و ساختمان های الگو، ساخت مدل و ارزیابی کیفی آن است که این مراحل تا به دست آمدن نتایج قانع کننده مدل تکرار شد. مدل سازی همولوگ پروتئین در پایگاه اینترنتی کاملاً خودکار (Biasini et al., Swiss Model 2014) انجام شد.

لیتر، تیتانیوم دی اکسید (TiO₂) به مقدار ۰/۰۰۵۸ گرم بر لیتر و سدیم کلرید (NaCl) به مقدار ۶۰ گرم بر لیتر به آن اضافه شد. برای شناسایی کلونی های جلبک *Dunaliella*، از میکروسکوپ نوری (مدل Upright، شرکت Taimaz، ایران) استفاده شد. ابتدا برای خالص کردن از محیط کشت جامد نوترینت آگار استفاده شد. پس از اطمینان از وجود کلونی ها، *D. viridis* جدا و به محیط کشت مایع منتقل شد. پس از رشد جلبک و سبز شدن لوله ها، در مرحله رشد تصاعدی، مقدار ۵ میلی لیتر سوسپانسیون جلبک *D. viridis* به هریک از ارلن های یک لیتری محیط کشت Trenkenshu اضافه شد. میزان جذب در طول موج ۶۵۰ نانومتر با اسپکتروفوتومتر (مدل 6300، شرکت Jenway، انگلستان) اندازه گیری شد و هنگامی که بیشترین میزان رقت سوسپانسیون توده سلولی به دست آمد یعنی بین ۹۰ تا ۹۳ درصد ثابت شد، اضافه کردن سوسپانسیون جلبکی متوقف شد.

سنجش دینامیک رشد در حضور ماده فعال

سطحی: از ماده فعال سطحی آنیونی سدیم دو دسیل سولفات (SDS) دارای وزن مولکولی ۲۸۸/۴ گرم بر مول با غلظت های ۰/۱، ۱ و ۱۰ میلی گرم بر لیتر استفاده شد. برای بررسی تأثیر pH بر نمودار رشد ابتدا ارلن های ۲۵۰ میلی لیتری و محیط کشت تهیه شده ضد عفونی شدند؛ سپس ۱۰۰ میلی لیتر از محیط کشت به آنها اضافه شد. پس از افزودن ماده فعال سطحی با غلظت های مد نظر، pH محیط کشت تهیه شده اندازه گیری شد و برای تنظیم pH از محلول های سدیم هیدروکسید (NaOH) ۰/۱ نرمال و هیدروکلریک اسید (HCl) ۰/۱ نرمال استفاده شد (Salmaninejad, 2016). ارزیابی نمودار دینامیک

حاوی ماده فعال سطحی با غلظت ۱ میلی‌گرم بر لیتر نیز در روز دوم کاهش ۴۵ درصدی و در روز هفتم نیز کاهش ۸۵ درصدی نسبت به شاهد داشت. تحلیل داده‌ها تفاوت معنی‌داری بین رشد در محیط کشت با غلظت‌های ۰/۱، ۱ و ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر ماده فعال سطحی سدیم دو دسیل سولفات در سطح $P < 0/05$ در روزهای مختلف نشان نداد. با توجه به اهمیت کاربردی آثار زیستی سورفکتانت در جمعیت جلبک‌های تک‌سلولی محیط‌های آبی و تخریب زیستی این آلاینده‌های محیطی در روزهای مختلف، میله‌های خطا (انحراف معیار) افقی در روزها و غلظت‌های متفاوت سورفکتانت به‌اندازه کافی با هم هم‌پوشانی دارند و میانگین جمعیت در روزهای اول تا سوم مطمئن‌تر است.

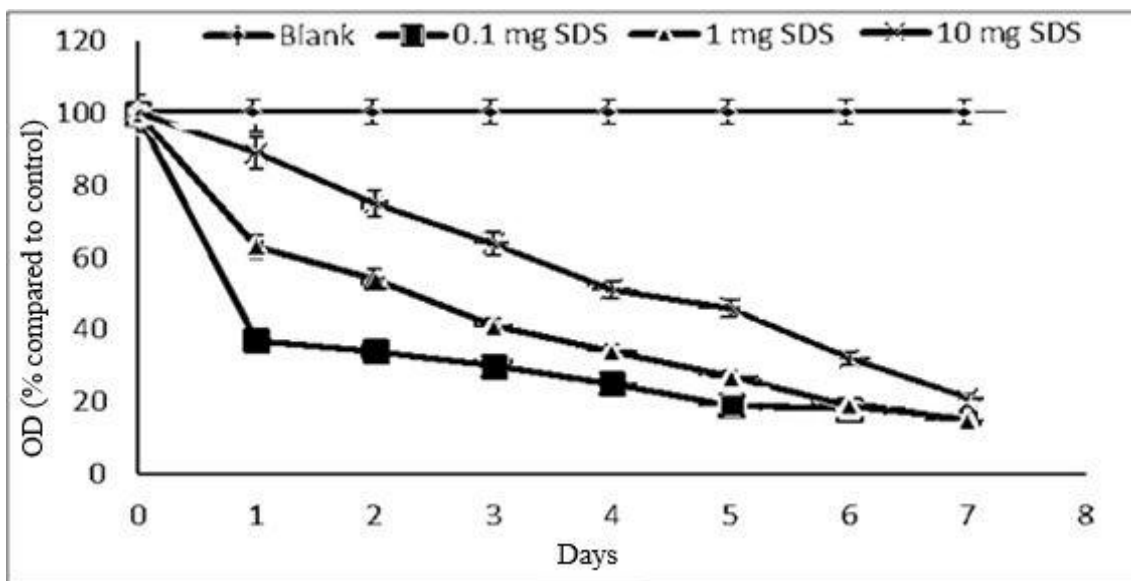
با توجه به شکل ۲، در $pH=7$ در محیط کشت با غلظت ۱ میلی‌گرم بر لیتر سدیم دو دسیل سولفات در روز چهارم، میزان رشد به ۶۲ درصد و در روز ششم به مرز ۷۰ درصد نسبت به شاهد رسید که به‌وضوح نشان‌دهنده بهبود جمعیت توده جلبکی با افزایش فتوسنتز در محیط است. در روز هفتم، میزان رشد به ۳۹ درصد رسید که بیان‌کننده مسموم شدن یا تخریب زیستی در جمعیت سلولی است. علاوه بر این در محیط کشت با غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر سدیم دو دسیل سولفات در روز ششم، رشد به کمترین میزان یعنی به مرز ۴۴ درصد نسبت به شاهد رسید که بیان‌کننده مسموم شدن توده سلولی با سورفکتانت است. تحلیل داده‌ها تفاوت معنی‌داری بین غلظت‌های ۱ و ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر ماده فعال سطحی سدیم دو دسیل سولفات با $pH=7$ در سطح

تحلیل آماری: تحلیل داده‌های به‌دست آمده از پژوهش حاضر با نرم‌افزارهای Minitab نسخه ۱۵ و SPSS نسخه ۱۸ و رسم نمودارها با نرم‌افزار Excel نسخه ۲۰۱۳ انجام شد. برای تعیین نرمال بودن داده‌ها و تجزیه واریانس از نرم‌افزار Minitab نسخه ۱۸ استفاده شد. داده‌های تجربی نتیجه سه تکرار هستند. ابتدا تحلیل با آزمون مقایسه میانگین چند جامعه (ANOVA) با فاصله اطمینان ۹۵ درصد انجام شد. با توجه به آزمون تحلیل واریانس، بین جوامع مطالعه شده اختلاف معنی‌دار مشاهده شد. برای دسته‌بندی متغیرها از آزمون Post Hoc (دانکن) و برای توصیف آنها از میانگین و انحراف معیار استفاده شد.

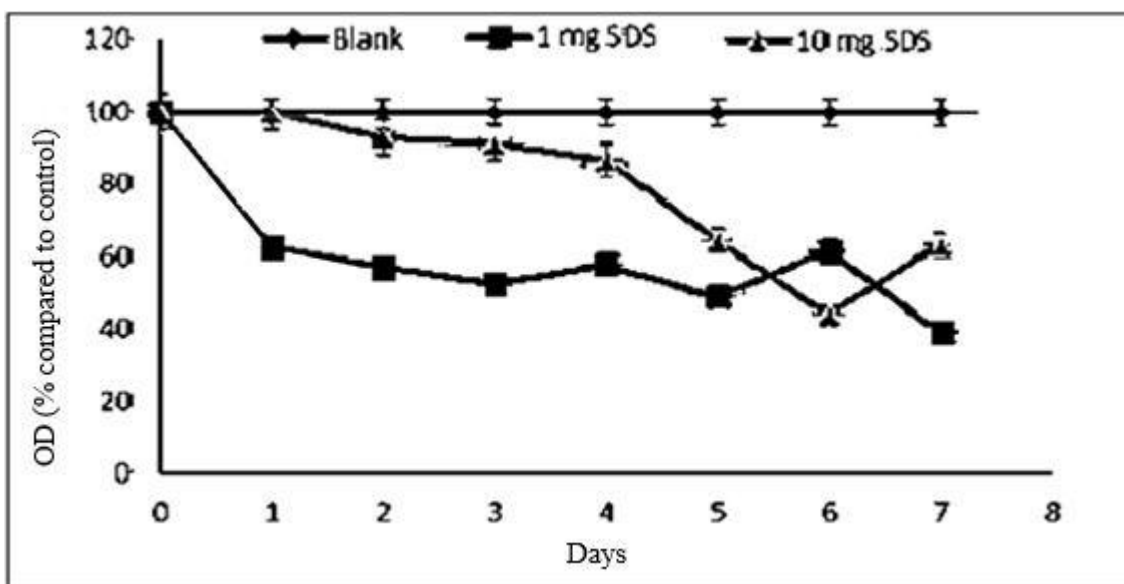
نتایج

تأثیر ماده فعال سطحی سدیم دو دسیل سولفات و pH محیط کشت در رشد جلبک *D. viridis*: در پژوهش حاضر، تأثیر ماده فعال سطحی آنیونی سدیم دو دسیل سولفات با غلظت‌های ۰/۱، ۱ و ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر و pHهای ۷، ۸، ۹ و ۱۰ محیط کشت در رشد جلبک *D. viridis* بررسی شد. همان‌طور که در شکل ۱ مشاهده می‌شود جلبک *D. viridis* در ماده فعال سطحی سدیم دو دسیل سولفات با غلظت‌های ۰/۱، ۱ و ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر، درصد رشد متفاوتی داشت و رشد در محیط کشت با غلظت ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر سدیم دو دسیل سولفات تا روز دوم به‌اندازه ۶۳ درصد نسبت به شاهد کاهش یافت؛ در حالی که در غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر تنها ۲۵ درصد کاهش رشد نسبت به شاهد مشاهده شد. رشد جلبک در محیط کشت

$P < 0/05$ نسبت به شاهد نشان نداد.



شکل ۱- تأثیر غلظت‌های ۰/۱، ۱ و ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر ماده فعال سطحی سدیم دو دسیل سولفات (SDS) در درصد رشد *D. viridis*- مقادیر، میانگین سه تکرار \pm SD هستند. حروف متفاوت، بیان‌کننده تفاوت معنی‌دار در سطح $P < 0/05$ هستند.



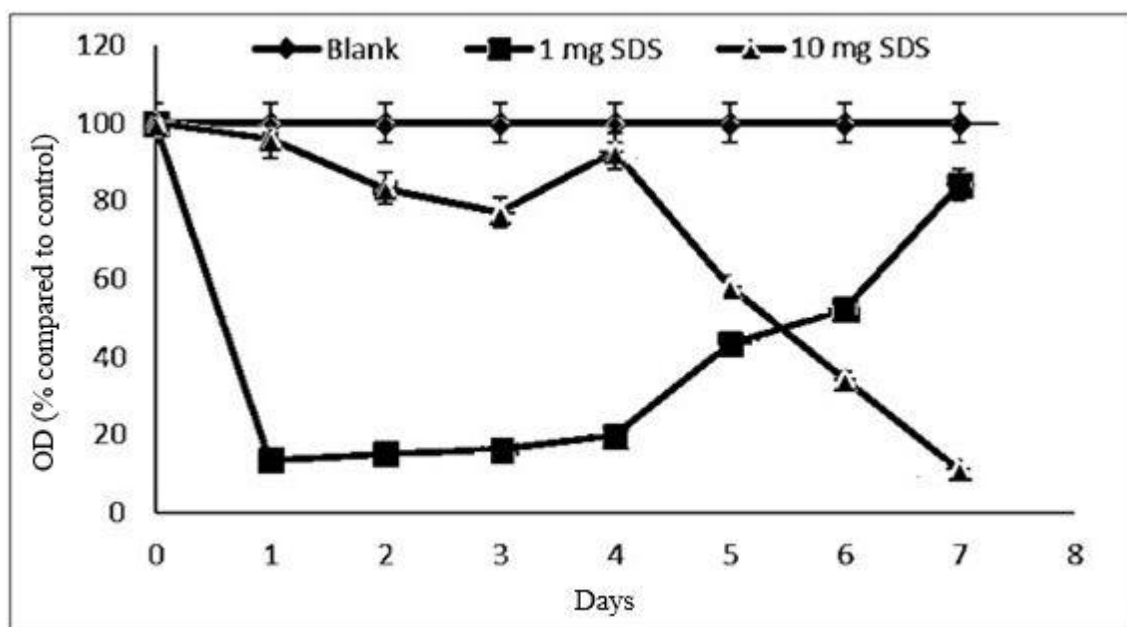
شکل ۲- تأثیر pH=7 در درصد رشد *Dunaliella viridis* در محیط کشت حاوی غلظت‌های ۱ و ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر سدیم دو دسیل سولفات (SDS)- مقادیر، میانگین سه تکرار \pm SD هستند. حروف متفاوت، بیان‌کننده تفاوت معنی‌دار در سطح $P < 0/05$ هستند.

به شاهد رسید که بیان‌کننده مسموم شدن یا تخریب زیستی در جمعیت سلولی است؛ درحالی که در روز هفتم به بیشترین مقدار یعنی ۹۲ درصد نسبت به شاهد رسید که نشان‌دهنده بهبود جمعیت در توده

همان‌طور که در شکل ۳ مشاهده می‌شود در pH=8 رشد جلبک *D. viridis* در محیط کشت با غلظت ۱ میلی‌گرم بر لیتر سدیم دو دسیل سولفات در روز اول به کمترین میزان یعنی ۱۵ درصد نسبت

فتوستت در محیط کشت سلولی به کمترین مقدار برسد؛ به عبارت دیگر شاهد مرگ جمعیت جلبکی در محیط کشت با pH=۸؛ بنابراین pH=۸ محیط کشت در آزمایش حاضر با پویایی رشد جمعیت جلبکی همبستگی دارد. تحلیل داده‌ها تفاوت معنی‌داری بین غلظت‌های ۱ و ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر ماده فعال سطحی سدیم دو دسیل سولفات در pH=۸ در سطح $P < 0/05$ نسبت به شاهد نشان داد.

جلبکی و افزایش فتوستت در محیط کشت سلولی است. در محیط کشت با غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر سدیم دو دسیل سولفات میزان رشد کاهش یافت و به حدود ۶۰ درصد در روز پنجم رسید و این کاهش رشد تا روز هفتم ادامه یافت و به کمترین مقدار خود در این روز یعنی ۱۱ درصد نسبت به شاهد رسید. شواهد نشان می‌دهند در pH=۸ و غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر سدیم دو دسیل سولفات تخریب توده سلولی با سورفکتانت موجب می‌شود



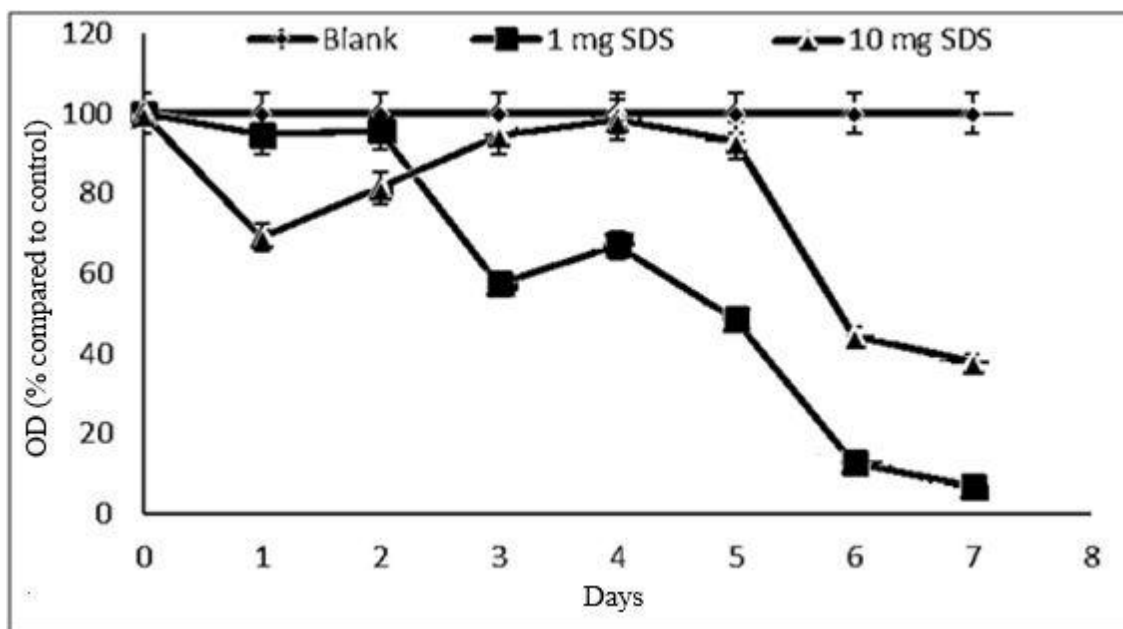
شکل ۳- تأثیر pH=۸ در درصد رشد *Dunaliella viridis* در محیط کشت حاوی غلظت‌های ۱ و ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر سدیم دو دسیل سولفات (SDS)- مقادیر، میانگین سه تکرار \pm SD هستند. حروف متفاوت، بیان‌کننده تفاوت معنی‌دار در سطح $P < 0/05$ هستند.

رشد در محیط کشت با غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر سدیم دو دسیل سولفات تا روز هفتم نسبت به شاهد کاهش یافت و به ۵۰ درصد در روز ششم و ۳۸ درصد در روز هفتم یعنی کمترین مقدار خود رسید. در همین غلظت تا روز چهارم، افزایش در میزان رشد رخ داد و رشد به مرز ۹۸ درصد رسید که نشان‌دهنده بیشترین مقدار فتوستت در محیط کشت

باتوجه به شکل ۴، در pH=۹ رشد جلبک *D. viridis* در محیط کشت با غلظت ۱ میلی‌گرم بر لیتر سدیم دو دسیل سولفات از روز پنجم تا هفتم نسبت به شاهد کاهش یافت و در روز ششم به ۵۰ درصد و در روز هفتم به حدود ۷ درصد رسید. این مسئله بیان‌کننده تخریب زیستی در جمعیت سلولی است که به بیشترین مقدار خود در روز هفتم رسید. میزان

pH های ۸ یا ۹ اهمیت بسزایی در تخریب زیستی جمعیت سلولی از خود نشان دادند. با توجه به افت و خیزهای زیاد در نمودارها تنها تحلیل داده‌های عددی مربوط به pH های مختلف همبستگی دینامیک رشد جمعیت را در pH خاص نشان داد. تحلیل داده‌ها تفاوت معنی‌داری بین غلظت‌های ۱ و ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر ماده فعال سطحی سدیم دو سیل سولفات در pH=۹ در سطح $P < 0.05$ نسبت به شاهد نشان نداد.

سلولی است. نتایج نشان می‌دهند در pH=۹ و در هردو غلظت ۱ و ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر سدیم دو سیل سولفات، تخریب توده سلولی با سورفکتانت افزایش یافت؛ بنابراین، کمترین مقدار فتوستتزر در محیط کشت سلولی یا مرگ توده جلبکی ناشی از مسموم شدن را در محیط کشت انتظار داریم. با توجه به حساسیت میزان رشد تضمینی جلبک در محیط بسیار قلیایی، محدوده pH محیط کشت با روش غوطه‌وری، ۷ تا ۱۰ تعیین شد. هرکدام از



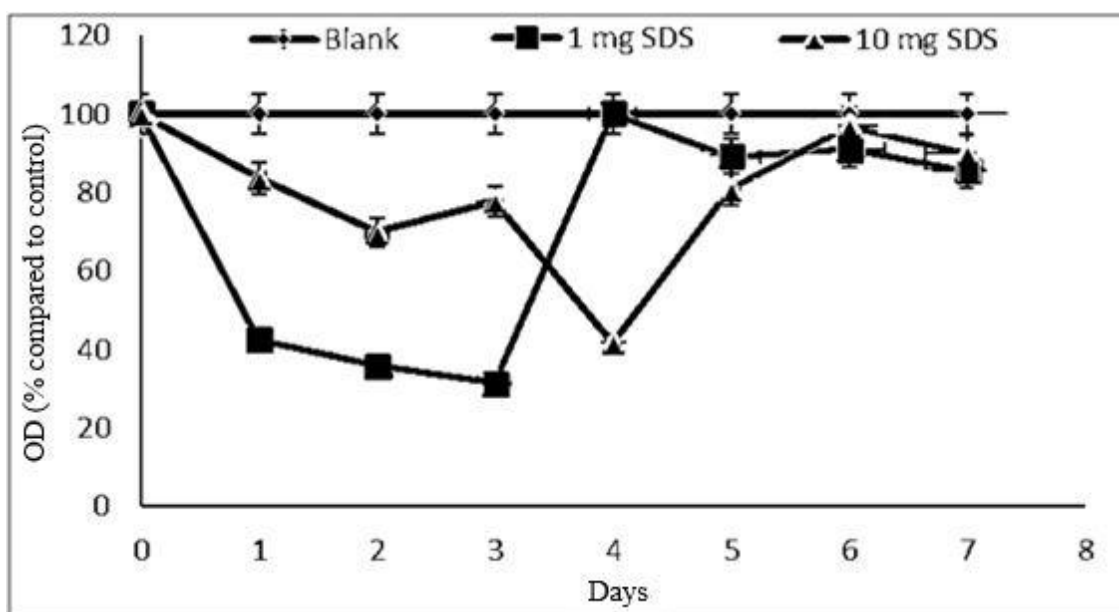
شکل ۴- تأثیر pH=۹ در درصد رشد *Dunaliella viridis* در محیط کشت حاوی غلظت‌های ۱ و ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر سدیم دو سیل سولفات (SDS)- مقادیر، میانگین سه تکرار \pm SD هستند. حروف متفاوت، بیان‌کننده تفاوت معنی‌دار در سطح $P < 0.05$ هستند.

درصد نسبت به شاهد رسید. این دلیلی بر بهبود جمعیت در توده جلبکی و افزایش فتوستتزر در محیط کشت سلولی است. در محیط کشت با غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر سدیم دو سیل سولفات، کاهش میزان رشد ناشی از مسموم شدن تا روز چهارم ادامه یافت و به مرز ۴۲ درصد رسید؛ سپس رشد افزایش یافت و در روز ششم به بیشترین مقدار

همان‌طور که در شکل ۵ مشاهده می‌شود در pH=۱۰ در محیط کشت با غلظت ۱ میلی‌گرم بر لیتر سدیم دو سیل سولفات به دلیل مسموم شدن یا تخریب زیستی در جمعیت سلولی، رشد جلبک *D. viridis* کاهش یافت و تا روز سوم به کمترین مقدار یعنی به حدود ۳۲ درصد رسید و سپس تا روز چهارم افزایش یافت و به بیشترین مقدار یعنی ۱۰۲

سولفات بیشترین درصد تخریب توده را نشان می‌دهد. سورفکتانت با زنجیره آلکیل بلند تمایل به جذب روی سطح دارد و تغییرات در پدیده‌های سطحی را موجب می‌شود. تحلیل داده‌ها تفاوت معنی‌داری بین غلظت‌های ۱ و ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر ماده فعال سطحی سدیم دو دسیل سولفات با $\text{pH}=10$ در سطح $P < 0.05$ نسبت به شاهد نداشت.

خود یعنی ۹۵ درصد نسبت به شاهد رسید که در واقع با کاهش نیافتن مسموم‌شدگی و افزایش متابولیسم سلولی روبه‌رو شدیم؛ البته در فرایند تخریب زیستی، بیشتر تجزیه آنزیمی در مراحل اولیه انجام می‌شود و در مراحل بعدی، تغییر در متابولیسم سلولی رخ می‌دهد. علاوه‌براین، تخریب به طول زنجیره آلکیل سورفکتانت نیز بستگی دارد. زنجیره آلکیل با طول کوتاه‌تر، مانند سدیم دو دسیل



شکل ۵- تأثیر $\text{pH}=10$ در درصد رشد *Dunaliella viridis* در محیط کشت حاوی غلظت‌های ۱ و ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر سدیم دو دسیل سولفات (SDS)- مقادیر، میانگین سه تکرار \pm SD هستند. حروف متفاوت، بیان‌کننده تفاوت معنی‌دار در سطح $P < 0.05$ هستند.

فعال سطحی آنیونی که مهارکننده رشد سلول‌های *D. viridis* است و نیز فسفریلاسیون کینازهای تنظیم‌شده با سیگنال خارج سلولی ارزیابی شدند. توالی‌های بررسی‌شده برای کینازهای تنظیم‌شده با سیگنال خارج سلولی تیپ یک و دو (ERK1 و ERK2) به ترتیب شامل ۴۴۶ و ۳۹۵ جفت باز

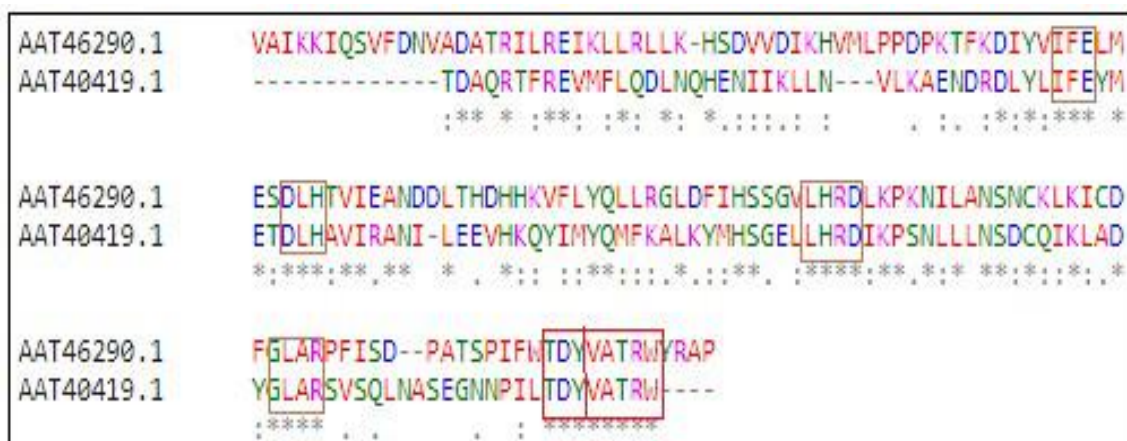
تحلیل محاسباتی کینازهای تنظیم‌شده با سیگنال خارج سلولی: انواع مختلفی از تنش‌های زیست‌محیطی مانند تنش هایپراسموتیک تقسیم سلولی موقتی را در *Dunaliella* ممانعت می‌کنند. در پژوهش حاضر، تأثیر تنش ماده فعال سطحی، احتمال پیامدهای فیزیولوژیک حضور غلظت ماده

A		
D8U607	FKDLYVVFELMESDLHTVIGANDDLTRDHHKVFPLYQLLRGLNFMHTNVLHRDLKPKNIL	137
A8JI35	FKDLYVCFELMESDLHTVIGANDDLTADHHKVFPLQLLRGLNFMHSGVLRDLKPKNIL	137
Q6GWG4	FKDIYVIFELMESDLHTVIEANDDLTHDHHKVFPLYQLLRGLDFIHSVGLHRDLKPKNIL	108
Q9LV37	FRDIYVVFELMESDLHQVIKANDDLTPEHYQFFLYQLLRGLKFIHTANVFHRDLKPKNIL	156
D7L7Z0	FRDIYVVFELMESDLHQVIKANDDLTPEHYQFFLYQLLRGLKFIHTANVFHRDLKPKNIL	156
Q5XU40	FRDIYVVFELMESDLHQVIKANDDLTPEHYQFFLYQLLRGLKFIHTANVFHRDLKPKNIL	156
B7ZZV1	QDIYVVFELMESDLHQVIKANDDLTPEHHQFFLYQLLRALKYIHAANVFHRDLKPKNIL	223
Q0DFQ5	FRDIYVIFELMESDLHQVIKANDDLTPEHHQFFLYQLLRGMKYIHAASVFHRDLKPKNIL	238
D8U6Y1	FRDIYVVFELLETDLHQVIKANDDLTPEHHQFFLYQMLRGLKYIHSARVFHRDLKPKNIL	152
E1ZNH5	FKDIYVVFELMETDLHQVIKANDDLTPEHHQFFLYQMLRGLKYIHSARVFHRDLKPKNIL	149
	*:*** ** **:*:* ** ***** :*::**:*:*:..*:*: *:*:*****	
B		
C1FE89	EIMFLQEVNNHENIVRLNLVKAENDRDYLI FEYMETDLHAVIRANILEDIHKQYIMYQ	119
C1ML96	EIMFLQEVNNHDNIIRLNLVKAENDRDYLI FEYMETDLHAVIRANILEDVHKQYIMYQ	119
D8TXI3	EVMPFLQDLNNHDNIIRLNLVKAENDRDYLVFEYMETDLHAVIRANILEEVHKQYIMYQ	120
A8JB11	EVMPFLQDLNNHDNIIRLNLVKAENDRDYLVFEYMETDLHAVIRANILEEVHKQYIMYQ	120
Q6IT23	EVMPFLQDLNQHENIKLNLVKAENDRDYLI FEYMETDLHAVIRANILEEVHKQYIMYQ	68
D8S135	EVMPFLQELNDHENVIKLTVLKAENDRDYLVFEYMETDLHAVIRANILEDVHKQYIMYQ	119
D8R0V8	EVMPFLQELNDHENVIKLTVLKAENDRDYLVFEYMETDLHAVIRANILEDVHKQYIMYQ	119
A9SKF6	EVMPFLQEMNDHENIKLNLVKAENDRDYLVFEYMETDLHAVIRANILEEIHKQFIMYQ	119
Q2QDG8	EIMFLQELAGHENIVRLKENVLKAENDDKDIYLVFDYMETDLHAVIRADILEEIHKQYIVYQ	119
B6KJY7	EIMFLQELAGHENIVRLKENVLKAENDDKDIYLVFDYMETDLHAVIRADILEEIHKQYIVYQ	119
	*:****: *:*::* *****:**:*:*:*:*****:****:****:*:**	

شکل ۶- انطباق (هم‌ردیفی) توالی‌های چندگانه با الگوریتم Clustal W2 بین ده پروتئین کیناز تنظیم شده با سیگنال خارج سلولی با شباهت زیاد از جمله پروتئین کینازهای *Dunaliella viridis* با نام ورودی ERK1 (Q6GWG4) (A) و ERK2 (Q6IT23) (B)- توالی‌های آمینواسیدی ده پروتئین از موجودات زنده مختلف، درجه‌های همانندی (درصد آمینواسیدهای یکسان) زیاد ۷۲ و ۷۴ درصد را به ترتیب با ERK1 و ERK2 نشان می‌دهند که بیان‌کننده وجود آمینواسیدهای حفاظت شده در این پروتئین‌ها در مدت تکامل است. شماره دسترسی هر موجود زنده و جزئیات کامل آن شامل نام ورودی، پروتئین و موجود زنده و فاصله تکاملی برای خوشه‌های ERK1 و ERK2 به ترتیب در جداول ۱ و ۲ تنظیم شده‌اند.

همان‌طور که در شکل ۷ نشان داده شده است چند آمینواسید متعارف مانند سرین و ترئونین یا دمین‌های تیروزین پروتئین کیناز شناسایی شده‌اند که ویژگی‌های موتیف فسفریلاسیون دوگانه در همه کینازهای فعال شده با میتوزن هستند. این موتیف فسفریلاسیون دوگانه در کینازهای آبشاری تنظیم شده با سیگنال خارج سلولی *D. viridis* به صورت TDY نشان داده شده است.

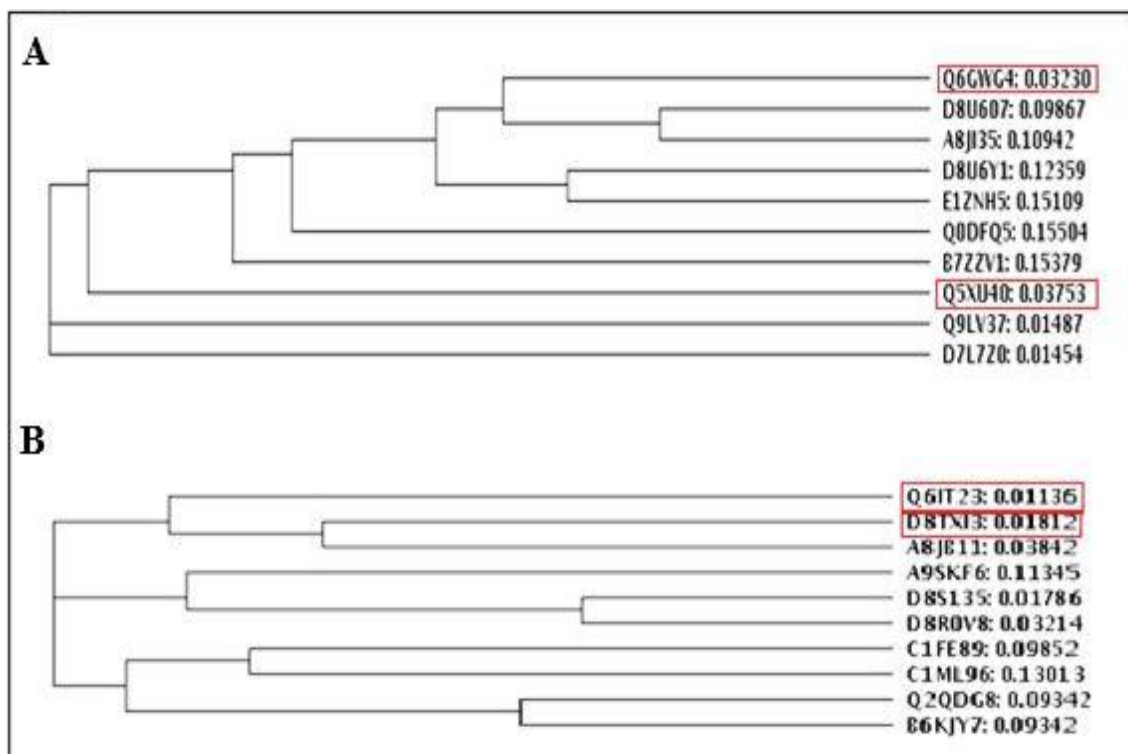
بودند که هر کدام ۱۴۹ و ۱۳۱ آمینواسید در توالی پلی‌پپتیدی خود دارند. این توالی‌ها همولوژی زیادی با کینازهای تنظیم شده با سیگنال خارج سلولی موجودات زنده دیگر دارند (شکل ۶). این توالی‌ها به ترتیب برای کینازهای ERK1 و ERK2 در *Dunaliella* با شماره دسترسی AY628422 و AY630341 در بانک ژن در NCBI ارجاع داده شده‌اند.



شکل ۷- تحلیل توالی‌های ERK1 (AAT46290) و ERK2 (AAT40419) که حضور چندین موتیف را از جمله موتیف فسفریلاسیون دو گانه TDY در پروتئین کیناز نشان می‌دهد.

طیف گسترده‌ای از پروتوزآ تا انسان دارند. توالی ERK1 *D. viridis* نشان می‌دهد موتیف TEY بین همه موجودات زنده فراگیر نیست. درحقیقت موتیف TEY در همه حیوانات، پروتوزآها، قارچ‌ها و بیشتر گیاهان دارای کینازهای فعال شده با میتوزن یافت می‌شود؛ با این حال، گروهی از گیاهان، موتیف TDY را نشان می‌دهند؛ از جمله: *Dunaliella*، *Zea* و *Triticum*، *Selaginella*، *Arabidopsis* و *Oryza* است. در حال حاضر داده‌های کلادوگرام پیشنهاد می‌کنند توالی ERK1 دو شاخه متفاوت دارد. یکی برای گیاهانی که موتیف TEY دارند مانند ریزجلبک *Chlamydomonas* و همچنین حیوانات، قارچ‌ها و پروتوزآها و دیگری برای گیاهانی که موتیف TDY دارند مانند *Dunaliella* را شامل می‌شوند. واگرایی تکاملی بین جلبک سبز *Dunaliella* و *Chlamydomonas* شگفت‌انگیز است.

در شکل ۸، کلادوگرام ERK1 و ERK2 از *D. viridis* با ترسیم درخت فیلوژنتیک در Clustal W2 نشان داده شده است. نتایج به دست آمده از آنها و فواصل تکاملی با پروتئین‌های دیگر در جداول ۱ و ۲ فهرست‌بندی شده‌اند. داده‌ها نشان می‌دهند تیپ‌های یک و دو پروتئین کیناز *D. viridis* متفاوت از سایر گونه‌ها هستند و تنها شباهت ۷۲ تا ۷۴ درصدی را بین توالی‌های چندتایی دارند. تیپ‌های یک و دو *Dunaliella viridis* به‌طور دور از انتظاری بیشترین نزدیکی را به گونه‌های مختلف از تیپ‌های کینازهای فعال شده با میتوزن از لحاظ فاصله با ریشه دارند. نزدیک‌ترین موجود زنده به ERK1 و ERK2 با محاسبه فاصله ژن از ریشه به ترتیب برای تیپ ۱ کیناز *Brassica napus* (Rape) و تیپ ۲ کیناز *Volvox carteri* f. *nagariensis* *Selaginella moellendorffii* است. کینازهای آبشاری تنظیم‌شده با سیگنال خارج سلولی در *Dunaliella* همانندی زیادی در



شکل ۸- کلاдоگرام پروتئین کینازهای *D. viridis* به ترتیب با نام ورودی (A) ERK1 (Q6GWG4) و (B) ERK2 (Q6IT23) رسم شده با الگوریتم Clustal W2- کلاдоگرام مربوط به پروتئین کیناز ERK1 با شماره دسترسی Q6GWG4 ارتباط تکاملی خیلی نزدیکی با MAPK9 از *Brassica napus* (Rape) نشان می دهد که در کادراهای مستطیلی قرمز در حد ۰/۰۳ نشان داده شده است و در جدول ۱ با ستاره مشخص شده است. همچنین اطلاعات ارتباط تکاملی بین سایر پروتئین ها با شماره دسترسی هر موجود زنده در جدول ۱ ارائه شده اند. کلاдоگرام مربوط به پروتئین کیناز ERK2 با شماره ورودی Q6IT23 نیز شباهت تکاملی نزدیکی با MAPK5 از *Volvox carteri f. nagariensis* در حد ۰/۰۱ نشان می دهد که در جدول ۲ با ستاره مشخص شده است. همچنین جزئیات کامل آن در جدول ۲ مشاهده می شوند.

الگو هم زمان و به صورت جدا مدل ها ساخته شدند و نواحی غیرمحافظتی از توالی ها برای تشکیل چارچوب اصلی مدل ظاهر شدند. ساختار قالب مناسب برای توالی های مشابه با ERK1 و ERK2 با الگوریتم BLAST (Boratyn et al., 2012) از Swiss-Model، ساختمان مناسبی از قالب کتابخانه ExpDB (Rose et al., 2017) به صورت مدل 1ERKA و 3COIA به ترتیب برای توالی ERK1 و ERK2 شناسایی شد (شکل ۹). با ریشه میانگین انحرافات مربعی (RMSD) برحسب آنگستروم و

توصیف خوشه های ERK1 مربوط به موجودات زنده مختلف روی کلاдоگرام و همچنین فاصله تکاملی از منشاء در جدول ۱ نشان داده شده اند.

توصیف خوشه های ERK2 مربوط به موجودات زنده مختلف روی کلاдоگرام و همچنین فاصله تکاملی از منشاء در جدول ۲ نشان داده شده اند. برای ایجاد ساختمان سه بعدی ERK1 و ERK2 از توالی های ارائه شده، در Swiss-Model با مدل سازی همولوگ، بخش هایی از مناطق همگرایی

جدول ۱- خوشه‌های ERK1 روی کلادوگرام

شماره	شناسه ورودی	نام ورودی	پروتئین	موجودزنده	فاصله تکاملی
۱	D8U607	D8U607_VOLCA	Mitogen-activated protein kinase 4	<i>Volvox carteri f. nagariensis</i>	۰/۱۲۳۵۹
۲	A8JI35	A8JI35_CHLRE	Mitogen-activated protein kinase 4 (2.7.1.)	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	۰/۱۰۹۴۲
۳	Q6GWG4	Q6GWG4_9CHLO	ERK1-like protein kinase	<i>Dunaliella viridis</i>	۰/۰۳۲۳۰ *
۴	Q9LV37	MPK9_ARATH	Mitogen-activated protein kinase 9 (AtMPK9) (MAP kinase 9) (EC 2.7.11.24)	<i>Arabidopsis thaliana</i> (Mouse-ear cress)	۰/۰۱۴۸۷
۵	D7L7Z0	D7L7Z0_ARALY	Putative uncharacterized protein	<i>Arabidopsis lyrata</i> subsp. <i>lyrata</i>	۰/۰۱۴۵۴
۶	Q5XU40	Q5XU40_BRANA	Mitogen-activated protein kinase 9	<i>Brassica napus</i> (Rape)	۰/۰۳۷۵۳ *
۷	B7ZZV1	B7ZZV1_MAIZE	Putative mitogen-activated protein kinase 17-3 Putative uncharacterized protein	<i>Zea mays</i> (Maize)	۰/۱۵۳۷۹
۸	Q0DFQ5	Q0DFQ5_ORYSJ	Os05g0576800 proteincDNA clone: J023062F11, full insert sequence	<i>Oryza sativa</i> subsp. <i>japonica</i> (Rice)	۰/۱۵۵۰۴
۹	D8U6Y1	D8U6Y1_VOLCA	Mitogen-activated protein kinase 2	<i>Volvox carteri f. nagariensis</i>	۰/۱۲۳۵۹
۱۰	E1ZNH5	E1ZNH5_9CHLO	Putative uncharacterized protein	<i>Chlorella variabilis</i>	۰/۱۵۱۰۹

جدول ۲- خوشه‌های ERK2 روی کلادوگرام

شماره	شناسه ورودی	نام ورودی	پروتئین	موجودزنده	فاصله تکاملی
۱	C1FE89	C1FE89_MICSR	Predicted protein	<i>Micromonas</i> sp. (strain RCC299 / NOUM17) (Picoplanktonic green alga)	۰/۰۹۸۵۲
۲	C1ML96	C1ML96_MICPC	Predicted protein	<i>Micromonas pusilla</i> (strain CCMP1545) (Picoplanktonic green alga)	۰/۱۳۰۱۳
۳	D8TXI3	D8TXI3_VOLCA	Mitogen-activated protein kinase 5	<i>Volvox carteri f. nagariensis</i>	۰/۰۱۸۱۲ *
۴	A8JB11	A8JB11_CHLRE	Mitogen-activated protein kinase 5(2.7.1.-)	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	۰/۰۳۸۴۲
۵	Q6IT23	Q6IT23_9CHLO	ERK2-like protein	<i>Dunaliella viridis</i>	۰/۰۱۱۳۶ *
۶	D8S135	D8S135_SELML	Putative uncharacterized protein	<i>Selaginella moellendorffii</i> (Spikemoss)	۰/۰۱۷۸۶
۷	D8R0V8	D8R0V8_SELML	Putative uncharacterized protein	<i>Selaginella moellendorffii</i> (Spikemoss)	۰/۰۳۲۱۴
۸	A9SKF6	A9SKF6_PHYPA	Predicted protein	<i>Physcomitrella patens</i> subsp. <i>patens</i> (Moss)	۰/۱۱۳۴۵
۹	Q2QDG8	Q2QDG8_TOXGO	Mitogen-activated protein kinase 2 Serine/threonine-protein kinase / mitogen-activated protein kinase, putative (2.7.11.24)	<i>Toxoplasma gondii</i>	۰/۰۹۳۴۲
۱۰	B6KJY7	B6KJY7_TOXGO	Mitogen-activated protein kinase 2 (2.7.11.24)	<i>Toxoplasma gondii</i>	۰/۰۹۳۴۲

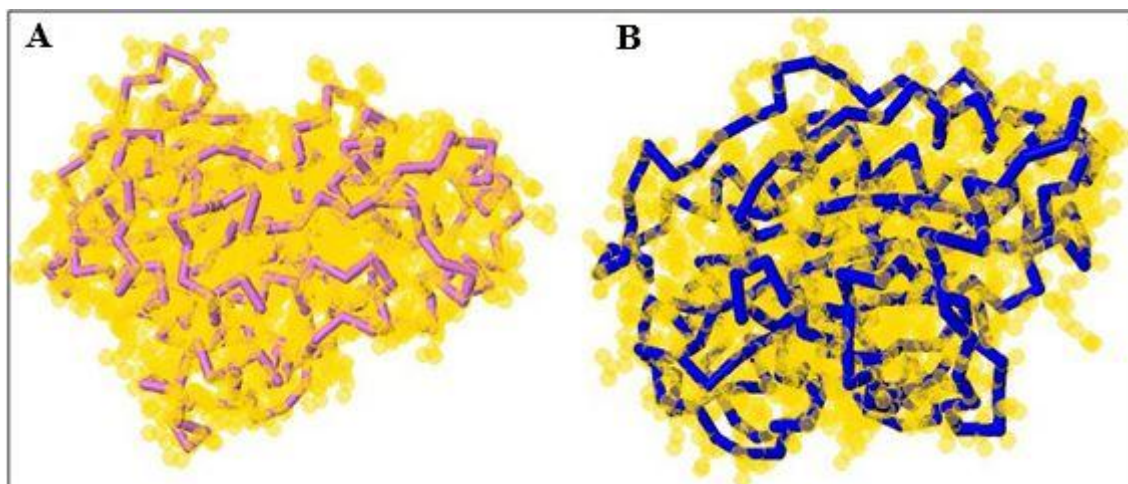
A						
TARGET	2	AIKKIQSVFD	NVADATRILR	EIKLLRLLKH	SDVVDIKHVM	LPPDPKTFKD
lerkA	50	aikkispf-e	hqtycqrtr	eikillrfrh	eniiqindii	raptiecmkd
TARGET		sssss	hhhhhhhhh	hhhhhhh	sss	
lerkA		sssss	hhhhhhhhh	hhhhhhh	sss	
TARGET	52	IYVIFELMES	DLHTVIEAND	DLTHDHHKVF	LYQLLRGLDF	IHSSGVLHRD
lerkA	99	vyivadlmet	dlykllk-tq	hlsndhicyf	lyqilrglky	ihsanvlhrd
TARGET		sssss	s ssshhh	hhhhhhh	hhhhhhhhh	hhh sss
lerkA		sssss	s ssshhh	hhhhhhh	hhhhhhhhh	hhh sss
TARGET	102	LKPKNILANS	NCKLKICDFG	LARPFISDPA	TSPIFWTDYV	ATRWRAP -
lerkA	148	lkpsnlllnt	tedlkicdfg	larvadpdhd	ht-gflteyv	atrwrapei
TARGET		ssss	sss	sss		
lerkA		ssss	sss	sss	s ss	hh
B						
TARGET	2		DAQ	RTFREVMFLQ	DLNQHENIIK	LLNVLKAE--
3coiA	50	kvaikklsrp	fqsei--fak	rayrellllk	hmq-henvig	lldvftpass
TARGET			hb	hhhhhhhhh	h	sss
3coiA		ssssssss	hh hhh	hhhhhhhhh	h	sss
TARGET	33	--NDRDLYLI	FEYMETDLHA	VIRANILEEV	HKQYIMYQMF	KALKYMHSGE
3coiA	97	lrnfydfylv	mpfmqtdlqk	imgl-kfsee	kiqylvyqml	kglkyihsaq
TARGET		sss	ssshh h	hh	hhhhhhhhh	hhhhhhhhh
3coiA		ssss s	ssshh h	hh	hhhhhhhhh	hhhhhhhhh
TARGET	81	LLHRDIKPSN	LLLNSDCQIK	LADYGLARSV	-----	-----
3coiA	146	vvhrdlkpgn	lavnedcelk	ildfglarhv	vtrwrapev	ilswmhynqt
TARGET		s	ssss	sss ss		
3coiA		s	ssss	sss ss	sss	hhh hh h

شکل ۹- محاسبه همانندی توالی‌های مدل‌شده (TARGET) به ترتیب با پروتئین کیناز الگو (ERK1) (IERKA) در محدوده ۱ تا ۱۴۹ آمینواسید با ریشه میانگین انحرافات مربعی (RMSD) برحسب ۲/۳۰ آنگستروم و ۱.5E-43 E-value و با پروتئین کیناز الگو (3COIA) ERK2 در محدوده ۲ تا ۱۱۰ آمینواسید با ریشه میانگین انحرافات مربعی برحسب ۲/۰۹ آنگستروم و 2.2E-34 E-value (B) از کتابخانه ExPDB

بحث

نتایج نشان دادند غلظت‌های مختلف ماده فعال سطحی سدیم دو دسیل سولفات در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و دوره نوری صفر تا ۲۴ ساعت و شدت نور ۶۰۰۰ میکرومول فوتون بر متر مربع بر ثانیه بر رشد جلبک *D. viridis* تأثیر می‌گذارند و تعداد سلول‌های آن را در دوره کشت افزایش یا کاهش می‌دهند. نوسان‌های pH در محیط‌های کشت با غلظت‌های مختلف ماده فعال سطحی نیز ممکن است بر رشد سلول‌ها آثار چشمگیری بگذارد.

براساس موقعیت‌های جفت‌شده اتم‌های کربن آلفا (C^α) مدل یا ساختمان با بیشترین پوشش‌دهی توالی به دست آمد. ساختار فضایی برای ERK1 براساس قالب IERKA و ریشه میانگین انحرافات مربعی (RMSD) معادل ۲/۳۰ درجه آنگستروم و همانندی ۴۸/۹ درصدی توالی با هدف شکل گرفت. ساختار دیگری براساس ERK2 و قالب 3COIA و ریشه میانگین انحرافات مربعی معادل ۲/۰۹ درجه آنگستروم و همانندی ۴۲/۴ درصدی توالی با توالی هدف پیشگویی شد (شکل ۱۰).



شکل ۱۰- پیشگویی ساختار سه‌بعدی باقیمانده‌های مدل‌شده (TARGET) از ERK1 (1ERKA) (A) و ERK2 (3COIA) (B)

فعال سطحی سدیم دو دسیل سولفات با غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر در روز هفتم کمترین کاهش رشد جلبک نسبت به شاهد مشاهده می‌شود. بررسی‌های انجام‌شده بر *D. salina*، بیشترین رشد این گونه را نسبت به شاهد به اندازه ۶۰ درصد گزارش کردند (Markina, 2010). نتایج به‌دست‌آمده از تأثیر pH محیط کشت در محدوده ۸ نشان دادند رشد در محیط کشت با $\text{pH}=8$ و حاوی غلظت‌های ۱ میلی‌گرم بر لیتر ماده فعال سطحی پس از روز اول، افزایش رشد با شیب کم (سرعت کم) تا روز چهارم رخ داد و سپس از روز چهارم تا روز نهمی، رشد با شیب زیاد (سرعت زیاد) مشاهده شد. گفتنی است افزایش غلظت ماده فعال سطحی سدیم دو دسیل سولفات در محیط کشت *Dunaliella* به ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر کاهش چشمگیر رشد را نسبت به شاهد باعث شد و به مرز ۱۱ درصد رسید؛ بنابراین با کنترل محیط کشت حاوی ماده فعال سطحی سدیم دو دسیل سولفات در محدوده $\text{pH}=8$ ، بیشترین تراکم سلولی در غلظت ۱ میلی‌گرم بر لیتر به دست آمد. در پژوهش حاضر بین $\text{pH}=8$ و غلظت ۱

در بررسی حاضر، اعمال غلظت‌های ۰/۱، ۱ و ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر ماده فعال سطحی سدیم دو دسیل سولفات در محیط کشت نشان داد رشد سلول‌های *D. viridis* در محیط کشت با غلظت ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر سدیم دو دسیل سولفات کاهش یافت که در روز دوم این کاهش، ۶۳ درصد نسبت به شاهد بود. در غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر نیز ۲۵ درصد کاهش رشد نسبت به شاهد در روز دوم رخ داد. رشد در محیط کشت حاوی ماده فعال سطحی سدیم دو دسیل سولفات با غلظت ۱ میلی‌گرم بر لیتر نیز در روز دوم ۴۵ درصد و در روز هفتم ۸۵ درصد نسبت به شاهد کاهش یافت؛ بنابراین در مدت هفت روز، رشد در محیط کشت حاوی این ماده فعال سطحی حالت نزولی داشت؛ اما این نتایج با یافته‌های Markina (۲۰۱۰) مطابقت ندارند.

نتایج به‌دست‌آمده از اثر pH در محیط کشت نشان دادند غلظت‌های مختلف ماده فعال سطحی سدیم دو دسیل سولفات در محیط‌های کشت و pH های مختلف بر رشد گونه *Dunaliella* تأثیر می‌گذارند. در محیط کشت با $\text{pH}=7$ و حاوی ماده

می‌شوند. ماده فعال سطحی آنیونی، ماده‌ای تنش‌زا است و حضور آن ممکن است پیامدهای فیزیولوژیک متعدد مانند مهار رشد سلول‌های *D. viridis*، فسفریلاسیون کینازهای تنظیم شده با سیگنال خارج سلولی و در نتیجه، خوب انجام نشدن تقسیم سلول‌های *D. viridis* را داشته باشد. حضور ماده فعال سطحی آنیونی در محیط کشت، نوعی تنش به شمار می‌رود که کاهش رشد و در نتیجه، کاهش تراکم سلولی را موجب می‌شود. یافته‌ها با تحقیقات Jiménez و همکاران (۲۰۰۷) هماهنگی دارند. علاوه بر این، فرایند تخریب زیستی سورفکتانت به طول زنجیره آلکیل آن نیز بستگی دارد. زنجیره آلکیل با طول کوتاه سدیم دو سیل سولفات بیشترین درصد تخریب را در جمعیت سلولی موجب می‌شود. به نظر می‌رسد این ماده تنش‌زا به صورت انتخابی و نفوذپذیر از مسیر ERK استفاده می‌کند و بر مسیرهای سیگنال جایگزین اثر ندارد. در حال حاضر با نتایج آزمایش‌ها در شرایط *in vitro* و به دست آوردن یک یا چند عامل تجربی با مدل‌سازی بیوفیزیک سلولی به شرایط بهینه سلول و پیشگویی مسیرهای متابولیسمی دخیل در آن با دقت زیاد دسترسی می‌یابیم. پروتئین کینازهای *D. viridis* با نام ورودی ERK1 (Q6GWG4) و ERK2 (Q6IT23) با توالی‌های آمینواسیدی ده پروتئین از موجودات زنده مختلف همولوژی زیادی به ترتیب ۷۲ و ۷۴ درصد نشان می‌دهند. کلادوگرام مربوط به پروتئین کیناز ERK1 ارتباط تکاملی خیلی نزدیکی با MAPK9 از *Brassica napus* (*Rape*) به اندازه ۰/۰۳ و پروتئین کیناز ERK2 نیز این شباهت زیاد با MAPK5 از *Volvox carteri* f.

میلی گرم بر لیتر همبستگی مثبت و معنی‌داری ($r = ۰/۸۳۵$) در سطح $P < ۰/۰۵$ مشاهده شد؛ در نتیجه ممکن است در غلظت و pH یادشده بهترین دینامیک رشد سلولی را در محیط آبی داشته باشیم. محیط کشت‌ها با $pH=۹$ همگی کاهش توده سلولی را تا روز نهمی نشان دادند. کمترین رشد در محیط کشت با غلظت ۱ میلی‌گرم بر لیتر سدیم دو سیل سولفات مشاهده شد که برابر با ۷ درصد بود؛ بنابراین نتایج به دست آمده با یافته‌های Markina (۲۰۱۰) مطابقت ندارند؛ زیرا در بررسی او رشد جلبک *D. salina* در غلظت ۱ میلی‌گرم بر لیتر سدیم دو سیل سولفات و $pH=۹$ محیط کشت برابر با ۱۰۵ درصد نسبت به شاهد گزارش شده است (Markina, 2010). در $pH=۱۰$ ، رشد سلول‌های *D. viridis* در محیط کشت حاوی سدیم دو سیل سولفات با غلظت ۱ میلی‌گرم بر لیتر در روز چهارم با شاهد برابر شد که تأییدی بر یافته‌های قبلی است (Markina, 2010). بدین ترتیب مشخص شد مواد فعال سطحی تأثیر چشمگیری در رشد *D. viridis* گذاشته‌اند و رشد آنها را در مراحل مختلف رشد کاهش یا افزایش داده‌اند. سایر pH ها و غلظت‌ها همبستگی معنی‌داری با رشد سلولی در سطح $P < ۰/۰۵$ نداشتند و افت‌وخیزهایی در روزهای مختلف نشان دادند. اتصال سورفکتانت به پروتئین‌ها در کشت سلولی ممکن است تحریک یا مهار فعالیت آنزیم‌های سوپر اکسید دیسموتاز و کاتالاز را باعث شود. نیروهای آب‌دوست و آب‌گریز به‌طور هم‌زمان در محل اتصال درگیر هستند و در نتیجه تعاملات نیروهای مختلف به آثار زیستی قوی وابسته به ساختمان ماده فعال سطحی منجر

سدیم دو دسیل سولفات مهار رشد، مسموم‌شدگی توده جلبکی و در نتیجه کاهش کلروفیل a، کاروتنوئید و بهره‌وری اکسیژن را موجب می‌شود و در نهایت، آثار منفی در محیط‌زیست دریایی می‌گذارد. بررسی حاضر، روش مفیدی برای سنجش توانایی زنده‌مانی جلبک پس از قرار گرفتن در معرض ماده فعال سطحی سدیم دو دسیل سولفات است. وقتی ماده فعال سطحی وارد آب می‌شود مانند سایر مواد سمی در جوامع جلبکی آشفستگی ایجاد می‌کند. به نظر می‌رسد در غلظت‌های زیاد مواد شوینده، نزدیک غلظت بحرانی، تجمع زنجیرهای آلکیل ماده فعال سطحی به صورت میسل با کاهش انرژی آزاد در سطح سلول، محیطی هیدروفوب ایجاد می‌کند و چسبندگی سلولی در محیط کشت کاهش می‌یابد. مواد فعال سطحی آنیونی در غلظت‌هایی که به نوع گونه و ماده فعال سطحی (۱۰ میلی‌گرم بر لیتر) وابسته هستند رشد را متوقف می‌کنند و به مرگ سلولی منجر می‌شوند؛ به طوری که بیشتر گونه‌ها به عوامل کاتیونی نسبت به عوامل آنیونی و غیریونی حساسیت بیشتری نشان می‌دهند. تحمل گونه‌ها در هر خانواده، مشابه است و از الگوی ویژه‌ای برای توقف رشد پیروی می‌کند؛ بنابراین برای توصیف مفصل‌تر عملکرد مواد شوینده در ریزجلبک‌ها از روش‌های بیوشیمیایی و میکروسکوپ الکترونی تکمیلی استفاده می‌شود. غلظت ۱ میلی‌گرم بر لیتر و pH=۸ ماده فعال سطحی سدیم دو دسیل سولفات ممکن است ارتباط مثبت و معنی‌داری با رنگدانه‌ها و شدت فتوسنتز در جمعیت جلبکی داشته باشد؛

nagariensis به اندازه ۰/۰۱ دارد. در پایگاه داده‌های زیستی، موتیف TEY در *Arabidopsis* و موتیف TDY در *Chlamydomonas* یافت نشده‌اند. از آنجا که ژنوم کامل این موجودات موجود نیست، امکان ندارد از مجموعه دیگری از ژن‌های ERK با موتیف‌های TEY و TDY استفاده شود. شاید استنباط شود جابه‌جایی از TEY به TDY رخ داده است که این ممکن است به دلیل جایگزینی تک‌نوکلئوتیدی در موقعیت سوم کدون مربوطه در تکامل گیاه باشد؛ بنابراین نتیجه‌گیری می‌شود تقسیم سلولی در *Dunaliella* به شدت به فسفریلاسیون کینازهای تنظیم‌شده با سیگنال‌های خارج سلولی با کینازهای فعال‌شده با میتوزن وابسته است و به نظر می‌رسد کنترل تقسیم سلولی از الگوهای مشابه انتقال سیگنال در موجودات تک‌سلولی و چندسلولی پیروی می‌کند. تحلیل ژن‌های کینازهای تنظیم‌شده با سیگنال‌های خارج سلولی نشان می‌دهد توالی آنها به شدت از جلبک‌های تک‌سلولی به گیاهان و پستانداران عالی‌تر محافظت می‌شود و منشاء مسیر ERK پیش از شروع تفاوت‌های سلسله گیاه و قارچ - جانوران به دست آمده است.

جمع‌بندی

باتوجه به اینکه تأثیر مستقیم ماده فعال سطحی آنیونی بر گونه‌های مختلف جلبک کمتر مطالعه شده است، در پژوهش حاضر اثر ماده فعال سطحی سدیم دو دسیل سولفات در رشد جلبک *D. viridis* بررسی شد. براساس نتایج، استنباط می‌شود غلظت محدود ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر ماده فعال سطحی

- accumulated beta-carotene of *Dunaliella bardawil* in protecting the alga against damage by excess irradiation. *Plant Physiology* 91(3): 1040-1043.
- Biasini, M., Bienert, S., Waterhouse, A., Arnold, K., Studer, G., Schmidt, T., Kiefer, F., Gallo Cassarino, T., Bertoni, M., Bordoli, L. and Schwede, T. (2014) SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. *Nucleic Acids Research* 42: W252-W258.
- Boratyn, G. M., Schäffer, A. A., Agarwala, R., Altschul, S. F., Lipman, D. J. and Madden, T. L. (2012) Domain enhanced lookup time accelerated BLAST. *Biol. Direct* 7: 7-12.
- Borowitzka, M. A. and Borowitzka, L. J. (1988) Limits to growth and carotenogenesis in laboratory and large-scale outdoor cultures of *D. salina*. In: *Algal biotechnology* (Eds. Stadler, T., Mollion, J., Berdus, M. C., Karamanos, Y., Morvan, H. and Christiane, D.) 139-150. Elsevier Applied Science, Barking.
- Guiry, M. D. and Guiry, G. M., (2014) *Algaebase*. World-Wide Electronic Publication, National University of Ireland, Galway.
- Hadi, M., 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. *Journal of Biotechnology and Bioprocess Engineering* 13: 540-544.
- Hosseini Tafreshi, A. and Shariati, M. (2009) *Dunaliella* biotechnology: methods and applications. *Journal of Applied Microbiology* 107(1): 14-35.
- Ilknur, A. K., Cirik, S. and Göksan, T. (2008) Effect of light intensity, salinity and temperature on growth in Ç amalti strain of *Dunaliella viridis* Teodoresco. from Turkey. *Journal of Biological Sciences* 8(8): 1356-1359.
- Jiménez, C., Cossío, B. R., Rivard, C. J., Berl, T. and Capasso, J. M. (2007) Cell division in the unicellular microalga *Dunaliella viridis* depends on phosphorylation of extracellular signal-
- بنابراین، pH محیط با پویایی دینامیک رشد ارتباط دارد؛ به طوری که در pH های اسیدی و همین غلظت از آلاینده با تخریب توده های جلبکی مواجه می شویم. با توجه به اینکه مواد فعال سطحی از آلاینده های آب های سطحی به شمار می روند و *D. viridis* در محیط های قلیایی رشد چشمگیری نسبت به شاهد دارد، این گونه، نشانگر و پالایش کننده زیستی در محیط های آبی در نظر گرفته می شود. پژوهش حاضر، آثار ماده سورفکتانت را که آلاینده است در شرایط *in vitro* در بوم سامانه آبی و ارتباط آن را با فرایندهای فیزیولوژیک و تنوع گونه جلبک با روش omics مدل سازی می کند. بر این اساس، پیشگویی محاسباتی ساختار کینازهای تنظیم شده با سیگنال خارج سلولی با اطلاعات توالی، تلفیق توالی و ساختمان سه بعدی پروتئین مد نظر در جلبک انجام شده است.
- ### سپاسگزاری
- نگارندگان از دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان بابت در اختیار قرار دادن امکانات لازم همچنین از گروه زیست شناسی دریا دانشگاه تربیت مدرس، کارشناسان آزمایشگاه دانشگاه و سرکارخانم مهندس معصومه سلمانی نژاد بابت همکاری در انجام پژوهش حاضر سپاسگزاری می کنند.
- ### منابع
- Avron, M. and Ben-Amotz, A. (1992) *Dunaliella*: physiology, biochemistry and biotechnology. CRC Press, Boca Raton.
- Ben-Amotz, A., Shaish, A. and Avron, M. (1989) Mode of action of the massively

- Experimental Botany 58(5): 1001-1011.
- Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., McGettigan, P. A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I. M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J. D., Gibson, T. J. and Higgins, D. G. (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23(21): 2947-2948.
- Lee, R. E. (1989) *Phycology*. 2nd edition, Cambridge University Press, Cambridge.
- Mallick, N., Bagchi, S. K., Koley, S. and Singh, A. K. (2016) Progress and challenges in microalgal biodiesel production. *Frontiers in Microbiology* 7(1019): 1-11
- Salmaninejad, M. (2016) Effect of culture mediums and light intensity on growth and carotenoids of *Dunaliella salina* in Urmia Lake. *Journal of Plant Research* 28(4): 771-783 (in Persian).
- Massyuk, N. P. (1973) Morphology, taxonomy, ecology and geographic distribution of the genus *Dunaliella* Teod. and prospects for its potential utilization. *Naukova Dumka*, Kiev.
- Massyuk, N. P., Posudin, Yu. I. and Lilitkaya, G. G. (2010) Photomovement of *Dunaliella* Teod. (Dunaliellales, Chlorophyceae, Viridiplantae). *Naukova Dumka*, Kiev.
- Melkonian, M., Kroger, K. H. and Maruardt, K. G. (1980) Cell shape and microtubules in zoospores of the green alga *chlorosarcinopsis gelatinosa* (chlorosarcinales): effect of low temperature. *Protoplasma* 104: 283-293.
- Ostroumov, S. A. (2006) *Biological effect of surfactants*. CRC Press; Boca Raton.
- Rose, P. W., Prlić, A., Altunkaya, A., Bi, C., Bradley, A. R., Christie, C. H., Costanzo, L. D., Duarte, J. M., Dutta, S., Feng, Z., Green, R. K., Goodsell, D. S., Hudson, B., Kalro, T., Lowe, R., Peisach, E., Randle, C., Rose, A. S., Shao, C., Tao, Y. P., Valasatava, Y., Voigt, M., Westbrook, J. D., Woo, J., Yang, H., Young, J. Y., Zardecki, C., Berman, H. M. and Burley, S. K. (2017) regulated kinases (ERKs). *Journal of The RCSB protein data bank: integrative view of protein, gene and 3D structural information. Nucleic Acids Research* 45: D271-D281.
- Witman, G. B., Carlson, K., Berliner, J. and Rosenbaun, J. L. (1972) *Chlamydomonas flagella* isolation and electrophoretic analysis of microtubules, matrix, membranes and mastigonema. *Journal of Cell Biology* 54: 507-539.