استفاده از عصاره دانه گیاه *Azadirachta indica* علیه مژکداران تک سلولی مهاجم در محیط پرورش متراکم جلبک تک سلولی *Dunaliella tertiolecta*

• **رامین مناف‌فر**، عضو هیات علمی‌مرکز تحقیقات آرتمیا و جانوران آبزی، دانشگاه ارومیه
• **رامین ملکی**، عضو هیات علمی، آزمایشگاه تجزیه مواد غذایی و شیمیایی، جهاد دانشگاهی، واحد ارومیه
• **بهروز آتشبار** ، عضو هیات علمی، مرکز تحقیقات آرتمیا و جانوران آبزی، دانشگاه ارومیه
• **ناصر آق**، عضو هیات علمی، مرکز تحقیقات آرتمیا و جانوران آبزی، دانشگاه ارومیه

تاریخ دریافت: تیرماه ۱۳۸۲ تاریخ پذیرش: خرداد ماه ۱۳۸۴

Email: Raminmanaffar@yahoo.com

چکیده

تاثیرعصاره دانه گیاه سنجد تلخ با نام علمی(Juss) *Azadirachta indica* علیه آلودگی جلبک تک سلولی *Dunaliella tertiolecta* (Butcher) با مژکداران تک سلولی مهاجم در شرایط آزمایشگاهی مورد مطالعه قرار گرفت. بدین منظور غلظت کشنده مژکداران و نیمه کشنده جلبک تحت تاثیر عصاره استخراج شده از دانه گیاه، در شرایط بهینه رشد جلبک بررسی شد. آزمایش نشان داد اثر کاملا کشنده، LC_{100} عصاره بر روی مژکداران در غلظت ۴ – ۳/۶ میلی گرم درلیتر طی ۲۴ صورت می‌گیرد درصورتی‌که EC_{50} جلبک طی ۲۴ ساعت در غلظت ۱۰ میلی گرم در لیتر می‌باشد. همچنین در بررسی تاثیر همزمان عصاره روی مژک داران و جلبک تک سلولی در یک نمونه آلوده شده مشخص شد عصاره در دزهای بالاتر از ۵-۴ میلی گرم در لیتر در۲۴ساعت توانایی حذف کامل آلودگی و ترمیم توده جلبک آلوده را دارد، در حالی‌که در همین دز بازماندگی توده جلبکی بیش از ۸۰٪ می‌باشد. نهایتاً بررسی تاثیر طولانی مدت عصاره بر روی نمونه آلوده شده نشان داد که این عصاره در ۷۲ ساعت هیچ تاثیر منفی بر توده جلبکی نداشته است.

کلمات کلیدی: پروتوزوا، دونالیلا، *Azadirachta indica*، Azadirachtin ، Ciliata.

Pajouhesh & Sazandegi No:71 pp: 82-88

Effect of *Azadirachta indica* seed extract upon predator ciliates on intensive culture of unicellular algae *Dunaliella tertiolecta*

By: R. Manaffar, Lecturer (Scientific Staff) Artemia and Aquatic Animals Research Center- Urmia University-Urmia.,
R. Maleki,Lecturer (Scientific Staff) Chemical and Food Analysis Research Lab- Jahad- e -Daneshgahi., B. Atashbar,Lecturer (Scientific Staff) Artemia and Aquatic Animals Research Center- Urmia University-Urmia., N. Agh,Lecturer (Scientific Staff) Artemia and Aquatic Animals Research Center- Urmia University-Urmia

In this research effect of *Azadirachta indica* (Juss) seed extract upon predator ciliates in intensive unicellular algal mass culture of *Dunaliella tertiolecta* (Butcher) under laboratory condition were studied. For this propose, LC_{100} of ciliates and EC_{50} algae in the optimum Lab. condition were examined. Results show that a 24-h LC_{100} at 4mg/l seed extract was found for the ciliate whereas at 24h EC_{50} 10 mg/l had the best result for the ciliate. But at investigation of seed extract effect upon the of unicellular algae and ciliate both to gathers at one contaminated sample show that The application dose for use of this extract with useful effect in completely elimination of ciliates is over than 4 - 5 mg/l. Finally study in long time effect of seed extract upon the mortality, motion and body shape of algae cells showed that this extract is able to recover contaminated algal population and had no harmful effect on the algae cells at 72 hour.

Keywords: Azadirachtin، *Azadirachta indica*, Ciliate, Dunaliella sp., Protozoan, EC_{50}, LC_{100}.

مقدمه

گونه‌های مختلفی از جلبک سبز تک سلولی Dunaliella sp. به عنوان غنی ترین منبع بتاکاروتن و همچنین به عنوان اصلی ترین ماده غذایی در پرورش سخت پوستانی از قبیل Artemia sp. مورد توجه فراوان محققین قرار گرفته است(۱۹،۱۰). این جلبک آب شور که به‌راحتی دامنه شوری ۱۰۰ ppt -۱۰ را تحمل می‌کند (۱۳). امروزه در بسیاری از کشورهای جهان به‌صورت انبوه در تانکرهای پلی اتیلنی، استخرهای بتونی و خاکی به‌صورت کاملاً خالص و تجاری کشت داده می‌شود(۱۹).

چنین سیستم‌های پرورشی همیشه در خطر آلودگی با انواع مهاجمان از جمله روتیفرها، کلادوسرها و تک سلولی‌های مژک داری از شاخه پروتوزوان می‌باشند(۲۲،۲۰،۱۳). جمعیت جلبک‌های تک سلولی که در معرض حمله مهاجمانی از جمله مژک داران تغذیه کننده از جلبک‌های تک سلولی قرار گرفته‌اند اگر در شرایط بهینه رشد قرار نگیرند پس از طی یک مدت کوتاه بلافاصله توسط مژک‌داران تغذیه شده و از بین می‌روند (۱۹،۱۶). فیلتراسیون هوای ورودی و استریل کردن تمامی ظروف و محیط‌های کشت در سیستم‌های مداربسته می‌تواند تا حدی مانع ایجاد و انتشار آلودگی گردد(۲۰،۱۹) اما این روش در حجم‌های بالا و در استخرهای پرورشی روباز مقدور و مقرون به‌صرفه نمی‌باشد. از طرفی این مژک‌داران قابلیت تحمل تغییرات وسیع شوری از ۱۵۰ppt -۱۶ را نیز دارند به همین دلیل نمی‌توان از استرس شوری به عنوان یک راه کار جهت حذف مهاجمان مژکدار استفاده کرد (۱۳). یکی از راه‌های مقابله با چنین مهاجمانی پیدا کردن موادی است که علاوه بر حذف مهاجمان تاثیر منفی بسیار کمی بر روی جلبک ها داشته باشند. پیش از این محققان از طریق افزایش pH موجب افزایش غیر مستقیم آمونیاک غیر یونیزه شده و موفق به حذف روتیفرها (Brachionus sp.) و کلادوسرها (Diaphanosoma sp.) از محیط پرورش جلبک‌های تک سلولی گردیدند(۲۰). در سال ۱۹۹۱ دو تن از محققان با اضافه نمودن ۵ تا ۷ میلی گرم هیپوکلریت موفق به حذف پروتوزوان در کشت متراکم جلبک تک سلولی Chlorella sp. شدند (۲۲). تاثیر مترونیدازول نیز در درمان آلودگی‌های جنس‌هایی ازجلبک‌های تک سلولی (۱۶). همچنین سولفات گنه گنه، هیپوکلریت، فرمالدئید و پروکسید هیدروژن بر روی آلودگی‌های کشت متراکم *Dunaliella salina* (Dunal) با پارامسی‌ها پیش از این مورد بررسی قرار گرفته و مترونیدازول و سولفات گنه گنه به عنوان داروهای موثر در درمان آلودگی سیستم‌هایی پرورش میکروآلگها پیشنهاد شد(۱۳).

در همین راستا تاثیر عصاره دانه گیاه *Azadirachta indica* درکنترل آلودگی جلبک تک سلولی *Dunaliella tertiolecta* با مژکداران مهاجم مورد مطالعه قرار گرفت. این گیاه دولپه‌ای از خانواده Meliaceae، بومی کشورهند بوده و در ایران بنام سنجد تلخ معروف می‌باشد (شکل ۱). عصاره این گیاه با نام Azadirachtin از ترکیبات تری ترپنوئید می‌باشد (شکل ۲) که برای اولین بار توسط Morgan و Butterworth در سال ۱۹۶۸ از دانه گیاه *Azadirachta indica* جدا سازی شد (۱۱). روغن استحصال شده این گیاه نیز با نام تجاری Neem سابقه ۴۰۰۰ ساله در درمان بیماری‌ها دارد.

این ترکیب دارای خواص ضد باکتریایی و ضد قارچی بوده (۱۵،۱۲،۸،۵) و در سال‌های اخیر به علت داشتن کمترین اثر سمیت بر روی پستانداران و همچنین عدم تاثیر نامطلوب در محیط زیست به عنوان یک آفت کش طبیعی در دفع حشرات موذی مورد توجه قرار گرفته است (۷). نتایج بررسی اثرات ضد قارچی این عصاره بر روی Puccinia sp. (زنگ بادام زمینی) نشان داد که می‌توان از این ترکیب به عنوان یک داروی بیولوژیک با خواص ضد قارچی استفاده نمود (۱۵). مطالعه در زمینه تاثیرات آنتی باکتریال این عصاره بر روی هفت جنس و ۱۰۵ گونه باکتری نیز حاکی از خواص جالب توجه ضد باکتریایی عصاره این گیاه بود (۲۶،۵). هدف از اجرای این تحقیق بررسی اثرسمیت عصاره گیاه فوق بر روی محیط‌های کشت جلبک‌های تک سلولی می‌باشد که درنهایت بتوان ازاین عصاره به عنوان یک ماده موثر در حذف مژک داران مهاجم و درمان کشت‌های آلوده جلبک‌های تک سلولی سود جست. براساس مطالعات انجام گرفته هیچ گزارشی مبنی بر تاثیر عصاره گیاه سنجد تلخ بر کشت انبوه جلبک‌ها و مژک‌داران مهاجم پیدا نشد.

مواد و روش‌ها

کشت جلبک

جهت پرورش جلبک از آب دریاچه ارومیه با شوری ppt ۳۰ استفاده گردید. بدین صورت که ابتدا آب شور ppt ۲۵۰ پس از فیلتر شدن، بوسیله آب مقطر به شوری ۳۰ گرم در لیتر رسانده شد. از محیط کشت Walne نیز به عنوان تامین کننده مواد ضروری مورد نیاز جلبک‌های تک سلولی استفاده گردید (۱۹،۱). کلیه تجهیزات، آب و محیطهای کشت توسط اتوکلاو در دمای ۱۲۰ درجه به مدت ۱۵ دقیقه استریل شده و طبق روش‌های استاندارد پرورش جلبک تا مرحله ارلن‌های پنج لیتری ادامه یافت.

ایجاد آلودگی مصنوعی

با توجه به اینکه این مژک داران به راحتی از طریق هوا و آب غیر استریل منتقل می‌شود جهت تهیه و ایجاد نمونه آلوده به این ترتیب عمل شد که نمونه جلبکی با تراکم یک میلیون سلول در میلی لیتر به‌صورت مستقیم با آب دریای غیر استریل تلقیح شده و با پمپ هوا بدون استفاده از فیلترهوادهی به مدت دو هفته هوادهی شد. پس از این مدت تراکم تک سلولی های مژک دار بوسیله لام بورکر(لام شمارش جلبک های تک سلولی) شمارش و سپس به تراکم ۵۰۰۰ مژک دار در هر میلی لیتر رسانده شد(۱۹).

استخراج عصاره الکلی از دانه گیاه

۵۰ گرم دانه خشک گیاه در آسیاب کاملاً خرد شده و سپس عصاره آن با روش مستقیم در سه مرحله متوالی توسط ml ۱۰۰ اتانول ۹۶٪ استخراج شد. در مرحله دوم اتانول محلول فوق بوسیله روتاری و در دمای ۴۰ درجه و تحت خلا mmHg ۱۰۰ تبخیر شده وعصاره گیاه به‌طور کامل از اتانول جدا گردید. سپس عصاره الکلی خالص شده تا زمان مصرف در تاریکی و در دمای ۴ + سانتی گراد نگهداری شد.

تهیه دزهای مختلف از عصاره

عصاره استخراج شده از گیاه به عنوان محلول ۱۰۰٪ خالص در نظر گرفته شده و غلظت‌های مورد نیاز با حل نمودن عصاره فوق در حجم ثابتی آب مقطر تهیه گردید. بدین ترتیب که با محاسبه دز مورد نیاز(رقت‌های مختلف از عصاره بر حسب میلی گرم در لیتر از عصاره الکلی خالص شده) ابتدا به مقدار محاسبه شده از عصاره خالص در مقدار کمی آب مقطر کاملاً حل شده و سپس محلول همگن تهیه شده در ابتدای آزمایش درون لوله‌های آزمایش که حاوی ۵ میلی لیتر نمونه جلبک (هر تکرار از هر تیمار) هست ریخته شد.

بررسی سمیت عصاره بر جلبک و مژک داران

مطالعه حد سمیت عصاره در درون لوله‌های آزمایش و تحت شرایط نوری اپتیمم (۵۰۰۰ – ۲۰۰۰ لوکس) و دمای ۲۰ درجه سانتی گراد با تراکم یک میلیون سلول جلبک در هر میلی لیتر صورت گرفت.

ابتدا جهت تعیین LC_{100} مژکداران، پنج میلی لیتراستوک جلبک آلوده با تراکم ۵۰۰۰ مژکدار در هشت تیمار و سه تکرار تحت تاثیر دزهای مختلفی از عصاره (۴-۳/۶-۳/۲-۲/۸-۲/۴-۲-۱/۶-۱/۲ میلی گرم در لیتر) قرار گرفته و نتیجه پس از ۲۴ ساعت بوسیله میکروسکوب Invert با درشت نمایی ۱۰ و ۲۰ مورد بررسی قرار گرفت. عدم وجود مژکداران در محیط و عدم تحرک آنها به عنوان مرگ آنان تلقی شد. درتست دوم جهت اندازه‌گیری EC_{50} جلبک، پنج میلی لیتر جلبک سالم با تراکم یک میلیون سلول در میلی لیتر به مدت ۲۴ ساعت درهشت تیمار(دزهای ۳۲-۲۴-۲۰-۱۶-۱۲- ۸-۴-۲ میلی گرم در لیتر از عصاره) و یک نمونه شاهد (نمونه جلبک بدون عصاره) همگی در سه تکرار مورد آزمایش قرار گرفت.

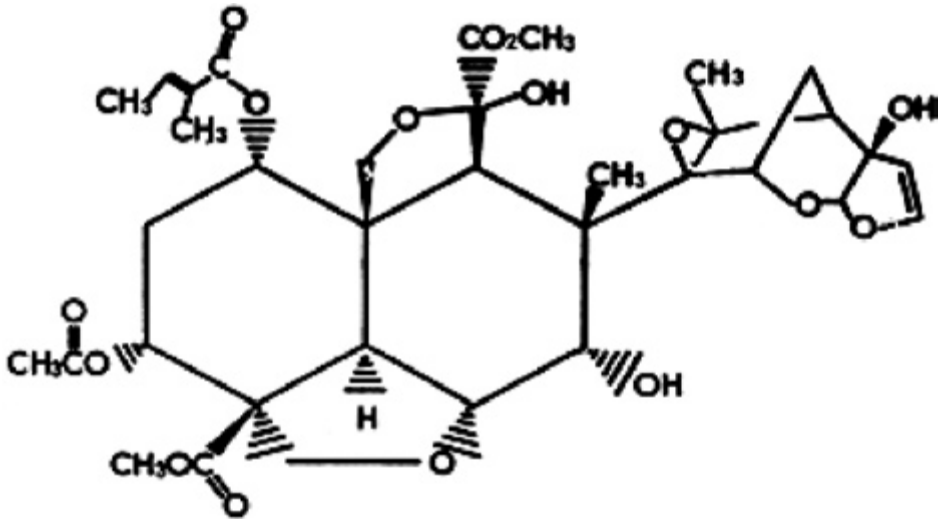
درآزمایش سوم جهت بررسی اثر همزمان و طولانی مدت عصاره بر روی سلول‌های جلبک و مژکداران، نمونه آلوده‌ای با تراکم ۵۰۰۰ مژکدار و یک میلیون سلول جلبک در هر میلی لیتر به‌صورت همزمان به مدت ۷۲ ساعت تحت تاثیر ۱۲ غلظت مختلف ازعصاره قرارگرفت. در این آزمایش تراکم سلول‌های جلبک و مژک‌داران پیش از شروع تست و در انتهای دوره پس از تثبیت با لوگول ۱٪ بوسیله لام بورکر شمارش و نسبت به نمونه شاهد (نمونه آلوده بدون استفاده از عصاره) به درصد محاسبه شد.

شکل ۱- برگ و دانه گیاه *Azadirachta indica*

نتایج

اشکال و گونه‌های مختلفی ازمژک داران مهاجم در محیط‌های کشت آلوده جلبک های تک سلولی مشاهده می‌شود. یک نمونه مژکدار شناسایی شده در نمونه جلبک آلوده در شکل- ۳ دیده می‌شود. این مژکدار که دارای فراوانی بالا (بیش از ۹۵٪ نسبت به گونه‌های دیگر) و شیوع بسیار سریع در انواع محیط‌های کشت جلبک‌های تک سلولی می‌باشد به شکل تخم مرغی با سایز ۱۰۰ میکرون و بدنه انعطاف پذیر و شیار دهانی در مقایسه با جلبک دونالیلا با اندازه ۸ تا ۱۵ میکرون کاملاً قابل شناسایی است.

آزمایش نشان داد که عصاره در غلظت ۳/۶ تا ۴ میلی گرم در لیتر طی



شکل ۲ – فرمول شیمیایی Azadirachtin از ترکیبات تری ترپنوئید

۲۴ ساعت به‌طور کامل موجب انهدام تمامی مژکداران مهاجم گردید.

در آزمایش دوم غلظت سمیت ۲۴ ساعته عصاره روی سلول‌های جلبک در ۸ تیمار درمقایسه با نمونه شاهد (نمونه بدون استفاده از عصاره) مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۵).

نتایج نشان داد که LC_{50} جلبک *D.tertiolecta* در مدت ۲۴ ساعت ۱۰ میلی گرم در لیتر می‌باشد. با توجه به افتراق کامل دز LC_{50} جلبک و LC ۱۰۰ مژکداران طی ۲۴ ساعت، درآزمایش سوم سمیت عصاره به‌صورت همزمان بر روی جلبک دونالیلا و مژک داران در مدت ۷۲ ساعت مورد بررسی قرار گرفت(شکل ۶).

بررسی‌ها نشان داد که عصاره در دزهای بالاتر از۴ تا۵ میلی گرم در لیتر قادر به حذف کامل آلودگی بوده و پس از ۲۴ ساعت اثری از آلودگی در هیچ یک از نمونه‌های آزمایشی مشاهده نشد. همچنین عصاره طی ۷۲ ساعت هیچ تاثیر منفی بر روی توده جلبک نداشته و حتی پس از گذشت ۳ روز بازماندگی سلول‌های جلبک در غلظت فوق بیش از ۷۰٪ می‌باشد. یعنی هیچ اختلاف معنی‌داری مابین درصد تلفات سلول‌های جلبک در دوره‌های مختلف زمانی (۲۴ و ۷۲ ساعت) تحت تاثیر غلظت‌های یکسانی از عصاره مشاهده نگردید ($p \leq ۰/۰۵$).

بحث

استفاده از عصاره دانه گیاه *A.indica* در کنترل مژک‌داران مهاجم کشت های انبوه جلبک‌های تک سلولی برای اولین بار در این تحقیق گزارش شد. بر همین اساس اطلاعاتی در رابطه با دز موثر و نحوه اثر این ماده بر روی جلبک‌های تک سلولی پیدا نشد.

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که تاثیر مستقل عصاره درآزمایش اول برروی مژک داران در دز ۴ – ۳/۶ میلیگرم در لیتر ۱۰۰٪ هست. اما در تاثیر مستقل عصاره بر نمونه جلبک سالم در دز ۱۰ میلی گرم در لیتر، بازماندگی توده جلبکی بیش از ۵۰ ٪ می‌باشد. بررسی تاثیر همزمان عصاره بر روی جلبک و مژک داران (نمونه آلوده شده) نشان داد غلظت‌های بالاتر از۵-۴ میلی گرم در لیتر از عصاره طی ۲۴ ساعت باعث حذف کامل مژک داران از محیط کشت می‌شود در حالیکه در همین مدت باز ماندگی تراکم توده جلبکی بیش از ۸۰٪ می‌باشد. بررسی تاثیر طولانی مدت عصاره بر روند رشد و حرکت جلبک‌ها طی ۷۲ ساعت هم نشان داد که عصاره در طولانی مدت هیچ اثر تخریبی بر جلبک‌ها ندارد اما در دزهای بالاتر قدرت رشد و تکثیر جلبک‌ها کاهش یافته و شکل جلبک‌ها از تخم مرغی به کروی تبدیل می‌شود. در این حالت حرکت جلبک‌ها کند شده و سلول‌های جلبک در یک محدوده خاص با مدار کروی شروع به چرخش می‌کنند. دلیل این نوع رفتار غیر ارادی را می‌توان به تاثیر مستقیم Azadirachtin بر روی کانال‌های یونی موثر در پدیده انتقال فعال در غشاء سلول‌ها دانست (۴). زیرا این ماده همانند سولفات گنه گنه (سولفات گوانین) با حمله به سیستم عصبی موجب اختلال در دیفوزیون سلولی شده و در نهایت موجب مرگ سلولی می‌شود (۱۳). ظاهرا این عصاره قادر است همانند مترونیدازول که در کنترل تاژک دارانی مانند .Amhelidium sp در کشت جلبک تک سلولی .Scenedesmus sp کاربرد خوبی دارد به‌صورت بسیار تخصصی بر روی بعضی ارگانیسم ها تاثیر کند (۱۶، ۲۱). مقاومت بالای جلبک‌ها به چنین موادی را عمدتاً ناشی از میزان بالای اسمولیت‌های ارگانیک سلول‌های جلبک‌های دریایی می‌دانند و گلسیرول به عنوان عمده‌ترین ترکیب تنظیم کننده کنترل اسمز درسلول‌های گیاهی مطرح می‌باشد(۱۴، ۱۸).

از طرفی اکسیده شدن Azadirachtin در مقابل نور خورشید و کاهش اثر سمیت عصاره وحذف خودبخود آن از محیط کشت می‌تواند دلیل دیگری بر عدم تاثیر منفی آن در طولانی مدت روی سلول‌های جلبک باشد (۲۳،۸) که می‌تواند راه را برای استفاده از این ماده در کشت انبوه جلبک‌های تک سلولی برای مصارف انسانی، بدون ایجاد عوارض جانبی هموارتر کند زیرا سمیت این ماده در مراحل عمل‌آوری و خشک نمودن بیومس جلبک کاملاً از بین می‌رود. با توجه به امکان کشت و استحصال ارزان *Azadirachta*

شکل ۳ – (Maupas) *Colpoda steinii* از مژکداران مهاجم محیط کشت جلبک تک سلولی .Dunaliella sp نتایج بررسی اثر سمیت عصاره بر روی مژکداران در مدت ۲۴ ساعت در شکل- ۴ ارائه شده است

indica در شـــرایط اقلیمی ایران در مقایسه با قیمت تمام شده جلبک تک ســـلولی دونالیلا (هر کیلوگرم بیومس خشک ۸۰ دلار)، استفاده از عصاره ایـــن گیـــاه با غلظت ۵ تا ۶ میلی گرم در لیتر جهت حذف کامل آلودگی در سیستم‌های پرورش متراکم جلبک تک سلولی دونالیلا توصیه می‌شود.

منابع مورد استفاده

۱- اســـماعیلی ســـاری، ع. ۱۳۷۹؛ باکتری‌ها، جلبک هـــا، قارچها و بی مهرگان آب شـــیرین. چاپ اول، انتشارات موسسه تحقیقات شـــیلات ایران ـ مدیریت اطلاعات علمی، صفحات ۵۱۰ – ۴۶۳.

۲- بونـــی، ا.دی. ۱۳۷۹؛ فیتوپلانکتون. ترجمه محمد رضا رحیمی بشـــر.چاپ اول، انتشارات شهر سبز، صفحات ۹۰ – ۲.

3-Ambasta, S.P., 1986; The useful plants of India, CRIR, New Delhi, India, P., 112.

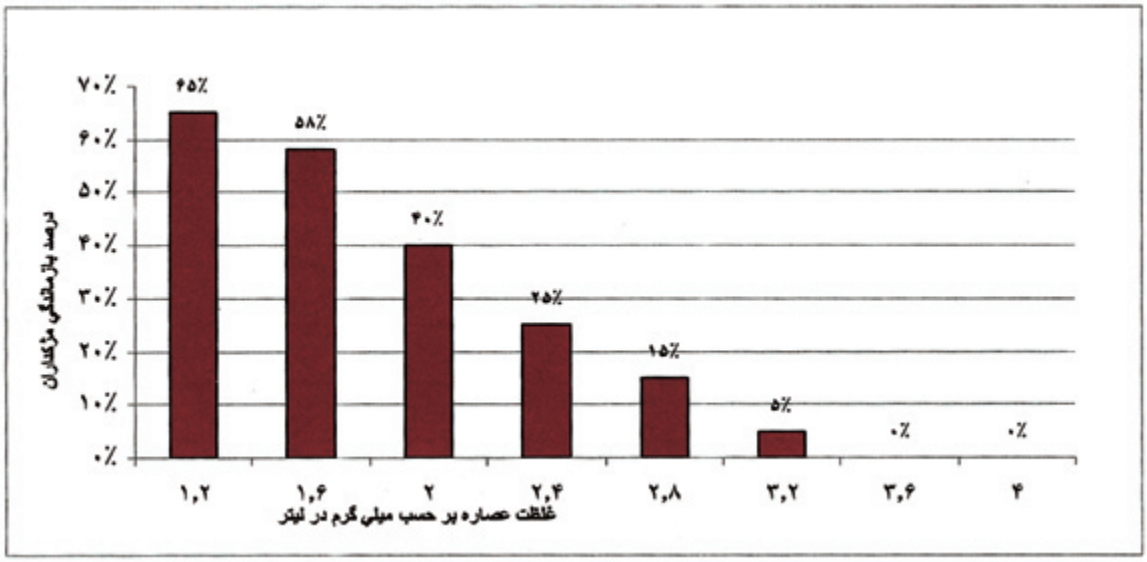
4-A. Safeek, R.P., Prasanthi, J., Hariprasad Reddy, G., Chetty, C.S. and Rajarami, R., 2003; Alterations in acetyl cholinesterase and electrical activity in the nervous system of cockroach exposed to the Neem derivative, azadirachtin, J. Ecotoxicology and Environmental Safety.

5-Azoreky, N. and Nakhara, K., 2002; Antibacterial activity of extracts from some edible plants commonly consumed in Asia, International Journal of Food Microbiology, Vol. 80, 223-230.

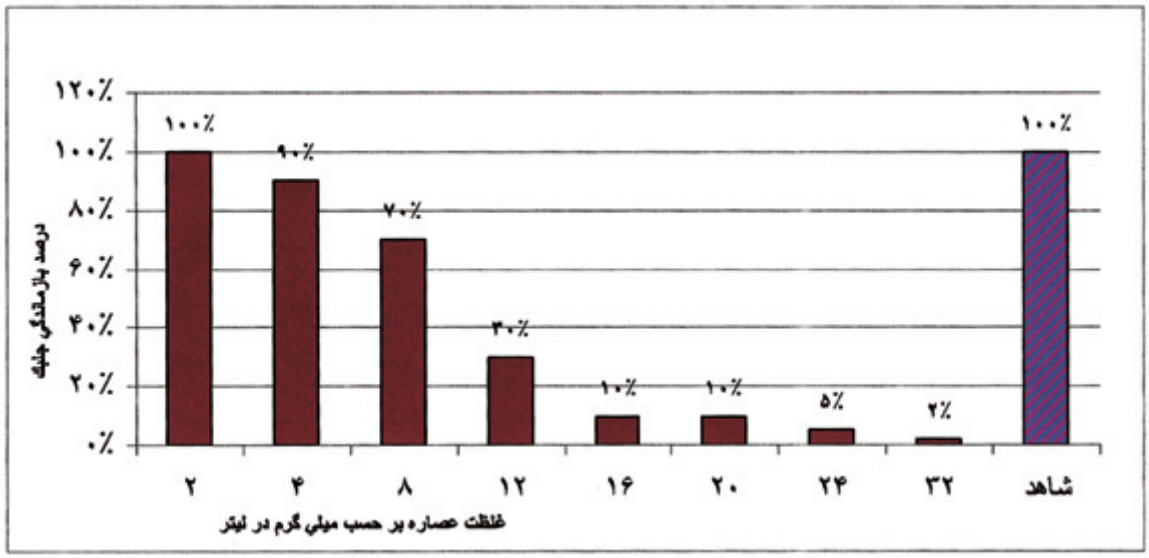
6-Bader, F.G., Tsuchiya, H.M. and Fredrickson, A.G., 1976; Grazing of Ciliates on blue-green Algae: Effects of Ciliate encystment and related phoenomena. Biotechnol. Bioeng. Vol. 12, 311 – 331.

7-Balaji, K., Veeresham, C., Srisilam, K. and Kokate, C.J., 2003; Azadirachtin, a novel biopesticide from cell culture of *Azadirachta Indica*, J. plant biotechnology. Vol.5, 121 –129.

8-Barnaby, M.A.; Yamasaki, R.B. and Klocke, J.A., 1989; Biological activity of Azadirachtin, three derivatives, and their ultraviolet radiation degradation products against tobacco bud worm (Lepidoptera: Noctuidae) larvae. J. Econ. Entomol, 82, 58-63.



شکل ۴ – تاثیر عصاره *A.indica* بر درصد مرگ و میر مژکداران طی ۲۴ ساعت



شکل ۵ – تاثیر عصاره *A.indica* بر درصد مرگ و میر جلبک طی ۲۴ ساعت

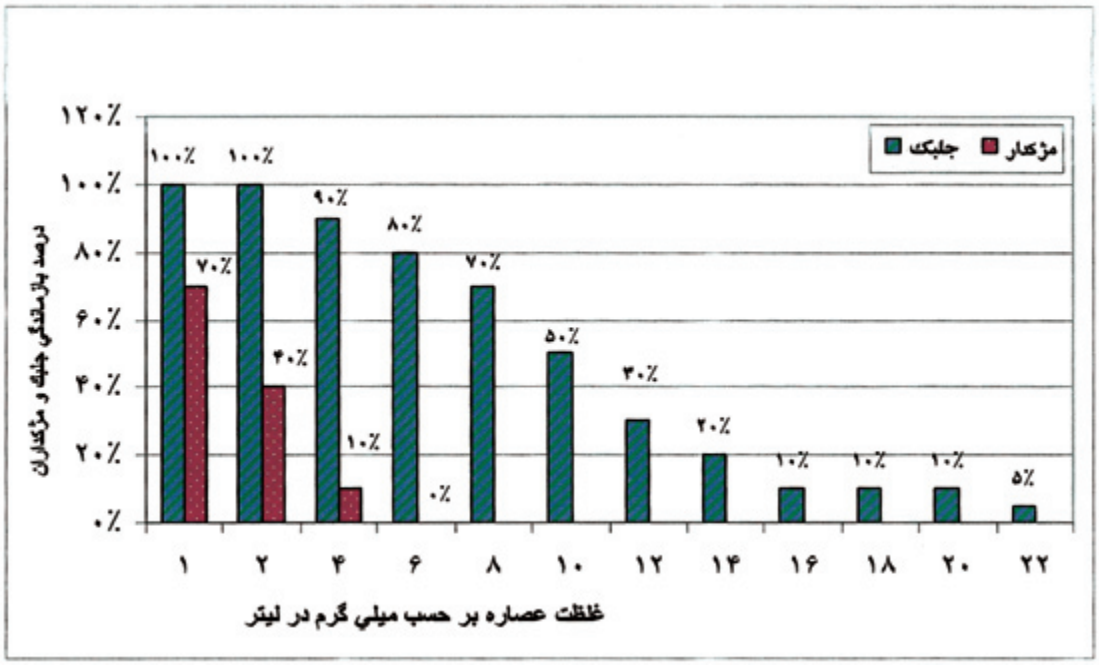
9-Bauer, A.W., Kirby, W.M.M., Sherris, J.C. and Turck, M., 1966; Antibiotic susceptitbility testing by standardized single disc method. Am. J. Clin. Pathol. 36, 493 – 496.

10-Ben Amotz, A., Katz, A. and Auron, M., 1982; Accumulation of β-carotene in falotolerant Algae: Purification and characterization of β-carotene rich globules from *Dunaliella bardawil* (chlorophyceae). Israel, J. phycol. 18, 529 – 557.

11-Butterworth, Jh. and Morgan, ED., 1968; Isolation of a substance that suppresses feeding in Locust. J. Chem. soc. Chem. Comm, 23 –24.

12-Elgayyar, M., Draughon, F.A., golden, D.A. and Mount, J.R., 2001; Antimicrobial activity of essential oils from plants against selected pathogenic and saprophytic microorganisms, J. Food Prot. 64, 1019 -1024.

13-Garrido, M. and Canavate, J.P., 2000; Assessing chemical compounds for controlling predator ciliates in outdoor mass cultures of the green algae *Dunaliella salina.* J. Aqua cultural engineering, Elsevier Science, 107 –114.



شکل ۶ – تاثیر عصاره ***A.indica*** بر جلبک و مژکداران ۷۲ ساعت

14-Ginzburg, M., 1987; Dunaliella: Green algae adapted to salt. Adv. Bot. Res. 14, 93 – 183.

15-Gvindachari, T.R., Suresh, G., Gopalakrishnan, G., Masilamani, S. and Banumathi, B., 2000; Antifungal activity of some tetranortriterpenoids, Fitoterapia, Vol. 71, 317-320.

16-Heussler, P., Castillo, S. and Merino, F.M., 1978; Parasite problems in the outdoor cultivation of Scenedesmus. Arch. Hydrobiol. Beith. 11,223 -227.

17-Katz, A., Jimenez, C., and Pick, U., 1995; Isolation and characterization of a protein Association with carotene Globules in the Algae *Dunaliella bardawil*, Plant Physiology, 108: 1657 -1664.

18-Kirst, G.O., 1989; Salinity tolerance eukaryotic marine algae. J. Plant Mol. Bio. 40, 21 – 53.

19-Lavens, P. and Sorgeloss, P., 1996; Manual on the Production and use of live food for Aquaculture. Laboratory of Aquaculture and Artemia Reference Center, University of Ghent Belgium, Published FAO.

20-Lincoln, E.P., Hall, T.W. and Koopman, B., 1983; Zooplankton control in mass algal cultures. Aquaculture 32, 331 – 337.

21-Merck, 1989; The Merck index, 11th edition.

22-Pechmanee, T. and Assavaaree, M., 1991; Use of hypochlorite to control protozoa in chlorella culture. European Aquaculture Society Abstract book, Larvi91, Gent, Begium.

23-Stokes, J.B. and Redfern, R.E., 1982; Effect of sunlight on Azadirachtin: antifeeding potency. J. Environ. Sci. Health, A17, 57-65

24-Thompson, D.G., Chartrand, D.T. and Kreutzweiser, D.P., 2003; Fate and effects of azadirachtin inaquatic mesocosms –1: fate in water and bottom sediments, J. Ecotoxicology and Environmental Safety, published by Elsevier science (USA).

25-Thompson, A.S., Rhodes, J.C. and Petman, I., 1988; Culture collection of algae and protozoa catalogue of strains, CCAP, Windermere.

26-Wernre, F., Okemo, P. and Ansorg, R., 1998; Antibacterial activity of East African medicinal plants, Journal of Ethnopharmacology, Vol. 60, 79 –84.