Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

Journal of Utilization and Cultivation of Aquatics

Online ISSN: 2345-427X
Print ISSN: 2345-4288

The Effect of different salinities on pigment content, chemical composition and growth of *Dunaliella salina* microalgae in two culture media Guillard (f/2) and Modified Johansson (DUM)

Mahsa Salehi[*1], Gholamreza Rafiei[2], Mohammad Ali Nemat Elahi[3]

1. Corresponding Author, Graduate, Dept. of Fisheries, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran. E-mail: mahsa.salehi@ut.ac.ir
2. Professor, Dept. of Fisheries, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran. E-mail: ghrafiee@ut.ac.ir
3. Professor, Dept. of Fisheries, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran. E-mail: malahi@ut.ac.ir

Article Info

Article type:
Full Length Research Paper

Article history:
Received: 04.23.2022
Revised: 05.03.2022
Accepted: 05.07.2022

Keywords:
Algae *Dunaliella salina*,
Fat,
Pigment,
Protein

ABSTRACT

The use of microalgae by human dates back to 2000 years ago in China, where it was used as food to survive famine. Microalgae are good sources of a wide range of beneficial compounds such as proteins, fats and pigments that have been used as food by humans for centuries. The aim of this study was examined to investigate amount of protein, fat, ash and cell growth and the total carotenoids by cultivating *Dunaliella salina* in Modified Johansson (DUM) and Guillard (f/2) medium under salinity stress of 100, 200, 300 ppt. The results showed that the highest protein production was 14.06 ± 0.34 at low salinity of 100 ppt and the highest fat content was 35.81±1.64% at salinity of 300 ppt. Also, the highest amount of carotenoids was produced 1.79 ± 0.30 under 300 ppt salinity stress in f/2 medium. The highest cell growth was 7808333±52041.6 cells/ml at 100 ppt salinity in Gillard culture medium. With increasing salinity to 300 ppt, the ash storage decreased by 7.18±76%. In general, the results of this study showed that *D. salina* algae is a good source of pigments and fats when exposed to salinity stress.

Cite this article: Salehi, Mahsa, Rafiei, Gholamreza, Nemat Elahi, Mohammad Ali. 2022. The Effect of different salinities on pigment content, chemical composition and growth of *Dunaliella salina* microalgae in two culture media Guillard (f/2) and Modified Johansson (DUM). *Journal of Utilization and Cultivation of Aquatics*, 11 (3), 29-40.

© The Author(s).
DOI: 10.22069/japu.2022.20146.1650
Publisher: Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

نشریه بهره‌برداری و پرورش آبزیان

شاپا آنلاین: ۲۳٤٥-٤۲۷X
شاپا چاپی: ۲۳٤٥-٤۲۸۸

اثر شوری‌های مختلف بر میزان رنگدانه، ترکیب شیمیایی و رشد ریزجلبک *Dunaliella salina* در دو محیط کشت Guillard (f/2) و Modified Johansson (DUM)

مهسا صالحی*[۱]، غلامرضا رفیعی[۲]، محمدعلی نعمت‌الهی[۳]

۱. نویسنده مسئول، دانش‌آموخته گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران. رایانامه: mahsa.salehi@ut.ac.ir
۲. استاد گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران. رایانامه: ghrafiee@ut.ac.ir
۳. استاد گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران. رایانامه: malahi@ut.ac.ir

اطلاعات مقاله

نوع مقاله:
مقاله کامل علمی- پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱٤۰۱/۰۲/۰۳
تاریخ ویرایش: ۱٤۰۱/۰۲/۱۳
تاریخ پذیرش: ۱٤۰۱/۰۲/۱۷

واژه‌های کلیدی:
پروتئین،
جلبک *Dunaliella salina*،
چربی،
رنگدانه

چکیده

استفاده از ریزجلبک‌ها توسط انسان به ۲۰۰۰ هزار سال پیش در کشور چین باز می‌گردد، که از آن به عنوان غذا برای ادامه زندگی در زمان قحطی استفاده می‌شد. ریزجلبک‌ها دارای منابع خوبی از طیف گسترده‌ای از ترکیبات مفید مانند پروتئین، چربی و رنگدانه‌ها هستند که قرن‌هاست به عنوان غذا توسط انسان استفاده می‌شود. هدف این پژوهش این است که با استفاده از پرورش جلبک دونالیلا سالینا (*Dunaliella salina*) در محیط کشت‌های Modified Johansson (DUM) و Guillard(f/2) تحت استرس شوری ppt ۳۰۰،۲۰۰،۱۰۰ میزان پروتئین، چربی، خاکستر و کاروتنوئید کل و رشد سلولی مورد بررسی قرارگرفت. نتایج حاصل نشان داد که بیش‌ترین میزان تولید پروتئین ۰/۳٤± ۱٤/۰٦ درصد در شوری پایین ppt ۱۰۰ بود و بیش‌ترین میزان چربی ۱/٦٤± ۳٥/۸۱ درصد در لیتر در شوری ppt ۳۰۰ بود. هم‌چنین، بیش‌ترین میزان کاروتنوئید کل µg/mg ۰/۳۰ ± ۱/۷۹ تحت استرس شوری ppt ۳۰۰ در محیط کشت f/2 تولید شده بود. بیش‌ترین رشد سلولی نیز ٥۲۰٤۱/٦ ± ۷۸۰۸۳۳۳ سلول در میلی‌لیتر در شوری ppt ۱۰۰ در محیط کشت گیلارد بود. با افزایش شوری ppt ۳۰۰، میزان ذخیره خاکستر ۷٦± ۷/۱۸ درصد کاهش یافت.به طور کلی، نتایج این پژوهش نشان داد که جلبک *D. salina* وقتی تحت استرس شوری قرار بگیرد منبع خوبی برای تولید رنگدانه‌ها و چربی خواهد بود.

استناد: صالحی، مهسا، رفیعی، غلامرضا، نعمت‌الهی، محمدعلی (۱۴۰۱). اثر شوری‌های مختلف بر میزان رنگدانه، ترکیب شیمیایی و رشد ریزجلبک *Dunaliella salina* در دو محیط کشت Guillard (f/2) و Modified Johansson (DUM). *نشریه بهره‌برداری و پرورش آبزیان*، ۱۱ (۳)، ۴۰-۲۹.
DOI: 10.22069/japu.2022.20146.1650

ناشر: دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

© نویسندگان.

مقدمه

جلبک‌ها موجودات ابتدایی فتوسنتزکننده‌ای هستند که به طور عمده در آب یافت می‌شوند. جلبک سبز تک‌سلولی دونالیلا متعلق به کلروفیت‌هاست (۱). طبق آمار مرکز داده‌های NCBI در حال حاضر دونالیلا در راسته کلامیدوموناس[1] و خانواده دونالیلاسه[2] قرار دارد (۲). دما، شوری و مواد مغذی فاکتورهای محدودکننده رشد دونالیلاها هستند (۳).

جلبک‌ها در حل برخی مشکلات جهانی مانند غذا، انرژی، کنترل محیط، کشفیات فضایی، ذخایر زیرزمینی، غنی‌سازی اقیانوس‌های جهان، پژوهش در مورد منابع جدید مواد خام صنعتی، مواد ساختمانی، تدارکات دارویی، مواد فعال بیولوژیک و اهداف بیوتکنولوژی دارای نقش مهمی هستند (٤). جلبک‌ها حاوی پروتئین زیادی هستند. تقریباً ۷۰ درصد وزن خشک آن‌ها را پروتئین تشکیل می‌دهد. هم‌چنین از محتویات آن‌ها می‌توان به اسید آمینه‌های ضروری اشاره نمود.

ریزجلبک‌های دریایی به عنوان منبع خوبی از لیپید با اسید چرب‌های چند غیراشباع (PUFA) محسوب می‌شوند که در جلوگیری از بسیاری از بیماری‌ها مؤثر است. اسید چرب‌های چند غیراشباع (PUFA) به‌خصوص *n*-3 PUFA مثل لینولنیک اسید (linolenic acid) (ALA, C18:3*n-3*)، ایکوزاپنتانوئیک اسید (EPA, C20:5*n-3*) (Eicosapentaenoic acid)، دکوزاپنتائنوئیک اسید (Decosapentaenoic acid) (DPA, C22:5*n-3*) و دکوزاهگزانوئیک اسید (DHA, C22:*6n-3*) (Decosahexaenoic acid) نشان داده شده که در پیشگیری از بسیاری بیماری‌ها مانند اختلالات دستگاه گردش خون و قلب، سرطان، دیابت نوع ۲، آسم، گرفتگی عروق، بیماری‌های کلیوی و پوستی، افسردگی و اختلالات روانی مؤثرند (۵).

در صنعت آبزی‌پروری کاروتنوئیدها در جیره‌های غذایی آزاد ماهیان، سخت‌پوستان و سایر ماهیان پرورشی استفاده شده‌اند تا رنگ مطلوبی را برای این موجودات پرورشی ایجاد کنند. رنگدانه‌ها در ماهیان علاوه بر قدرت رنگ‌دهی، به‌طور مستقیم یا غیرمستقیم در برخی از فعالیت‌های زیستی مهم بدن نقش دارند. برخی از این فعالیت‌ها عبارتند از: پیش‌ساز ویتامین A، نقش آنتی‌اکسیدانی، محافظت در برابر اشعه‌های مضر خورشیدی، افزایش‌دهنده قدرت سیستم ایمنی و افزایش‌دهنده رشد و بقاء لاروها و سایر موارد می‌توان اشاره کرد. بیش از چهار دهه می‌باشد که بسیاری از گونه‌های ریزجلبک برای تغذیه آبزیان مورد آزمایش قرار گرفته اند و درحال حاضر بیش از ٤٠ گونه از آن‌ها در آبزی‌پروری به‌طور گسترده مورد استفاده قرار می‌گیرند (٦). بیوماس ریزجلبک‌ها معمولاً حاوی ۳ ترکیب اصلی است: پروتئین‌ها، کربوهیدرات‌ها و لیپیدها (۷) و در میان انواع ریزجلبک‌ها در سطح جهان گونه‌های (*Arthrosphira*) *Spirulina*، *Chlorella*، *Dunaliella salina* و *Aphanizomenon flos-aquae* به‌ترتیب بیش‌ترین تولید را در میان ریزجلبک‌ها دارند چون از نظر ترکیبات پر سود بیش‌ترین تولیدات را دارند (۸).

در محیط پرورش جلبک باید کمبودهایی که در آب دریا وجود دارد را با غنی‌سازی محیط با مواد مغذی، جبران کرد. مواد مغذی مثل نیترات، فسفات و سیلیکات جزء درشت مغذی‌ها محسوب می‌شوند. سیلیکات به‌طور ویژه برای رشد دیاتومه‌ها استفاده می‌شود که هدف از این کار تولید یک لایه خارجی بر روی آن‌ها می‌باشد. مواد دیگری نیز شامل مقادیر اندکی از فلزات مختلف و ویتامین‌هایی چون تیامین (B_1)، سیانوکوبالامین (B_{12}) و بیوتین جزء ریزمغذی‌ها محسوب می‌شوند. با توجه به این‌که

1- Chlamydomonadaceae
2- Dunaliellaceae

نیازهای تغذیه‌ای انواع مختلف ریزجلبک بسته به گونه متفاوت است (۵). بنابراین برای پرورش ریزجلبک‌ها از محیط کشت‌های مختلفی استفاده می‌شود. تاکنون محیط کشت‌های مختلفی برای کشت ریزجلبک‌ها مورد استفاده قرار گرفته اند که تعدادی از آن‌ها عبارتند از: محیط کشت گیلارد (f/2)، DUM یا Modified Johnson's، والن، کانوی، TMRL، BBM و غیره. هدف از انجام این پژوهش تعیین اثر شوری‌های مختلف بر تولید جلبک دونالیلا سالینا در محیط کشت‌های گیلارد (F/2) و جانسون (DUM) و اندازه‌گیری ذخیره پروتئین، چربی و خاکستر و رشد سلولی و کاروتنوئید کل است. از یکسو، ریزجلبک‌های آبزی دارای ترکیبات زیست‌فعال بی‌شماری هستند. به‌طوری که آن‌ها را می‌توان منابع مهم پروتئینی و هم‌چنین موادی با ویژگی‌های دارویی و غذایی تلقی کرد که از آن‌ها در دنیای تجارت استفاده کرد. از سوی دیگر، اهمیتی که رنگدانه‌های موجود در جلبک‌ها علاوه بر کاربرد بسیار گسترده در صنعت شیلاتی دارند بلکه در صنایع غذایی نیز مطرح بوده که باید نسبت به آگاهی و بومی‌سازی فرایند تولید و استخراج مواد باارزش حاصل از آن اقدام کرد.

مواد و روش‌ها

جلبک دونالیلا سالینا: استوک اولیه جلبک دونالیلا سالینا از پژوهشکده آرتمیا تهیه گردید که این جلبک از دریاچه ارومیه توسط مسئولین پژوهشکده جداسازی شده بود. تیمار کنترل به این دلیل ۶۰ گرم در هزار انتخاب گردید، چون جلبک‌های دونالیلا به‌طور عمده Halophile هستند و در محیط‌های نمکی به خوبی رشد می‌کنند. دونالیلا سالینا غلظت نمک بالا را برای رشد بهینه می‌پسندد و هم‌چنین اگر میزان شوری محیط کشت یا محیط طبیعی پایین‌تر از این حد باشد، محیط کشت برای رشد رقبای غذایی یا موجودات مهاجم آماده می‌شود که این مهم عامل بازدارنده برای رشد خواهد بود. نحوه تهیه محیط کشت‌ها با توجه به مقدار مصرفی با روش اسمیت و همکاران (۱۹۹۳) مورد استفاده قرار گرفته است (۹).

کشت جلبک دونالیلا سالینا با استفاده از محیط کشت گیلارد (F/2) و Modified Johnson یا DUM: برای این منظور، ابتدا استوک جلبک *D. salina* از محیط کشت جامد به محیط کشت مایع ۱۰ میلی‌لیتری برای مدت ۵ روز، بعداز آن به محیط کشت ۱۰۰ میلی لیتری برای ۶ روز، سپس به محیط کشت ۱ لیتری برای مدت ۷ روز و سرانجام به محیط‌های کشت ۳ لیتری منتقل شد. پرورش جلبک در یک تیمار کنترل ppt ۶۰ و ۳ تیمار (هر یک با ۳ تکرار) با شوری‌های مختلف انجام شد. مقادیر شوری در تیمارهای ۱، ۲ و ۳ به ترتیب برابر با ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ گرم در هزار (PPT) در نظر گرفته شد. تیمار ۵ نیز با شوری ppt۳۵۰ بدون تکرار فقط در محیط کشت گیلارد نظر گرفته شد. برای شروع تیماربندی ابتدا آب با مقادیر شوری‌های مورد نظر تهیه شد و با اتوکلاو (دما ۱۲۱/۵ درجه سانتی‌گراد، زمان ۱۵ دقیقه و فشار ۱/۲ اتمسفر یا $pb/inch^2$۱۵) استریل شد. بعداز سرد شدن در هر ظرف به مقدار ۳ لیتر آب استریل سرد شده اضافه شد و به میزان ۱۰ درصد از حجم آب، استوک جلبک به آن اضافه شد. برای تأمین مواد مغذی جلبک دونالیلا از محیط کشت گیلارد (f/2) و DUM استفاده شد (۱۰).

رشد و شمارش سلولی: برای تعیین میزان رشد سلولی و کارایی محیط کشت‌های تهیه شده، شمارش سلولی جلبک دونالیلا سالینا انجام گرفت. به این منظور از نمونه کنترل که شوری آن ۶۰ گرم در هزار نمک است یک لام گرفته شد و با استفاده از لام نئوبار

یا هماسیتومتری میزان تراکم آن از رابطه ۱ به‌دست آمد که میزان تراکم و رشد سلولی جلبک در این دو محیط کشت سنجیده شد.

رابطه ۱- شمارش سلولی توسط لام نئوبار (هماسیتومتر)؛

تعداد کل سلول‌ها= تعداد سلول شمرده شده در ۵ مربع وسط لام نئوبار × (درصد رقت) × ۵۰۰۰۰

سانتریفیوژ و تهیه بیوماس جلبک: برای جداسازی آب و نمک جلبک دونالیلا سالینا کشت داده شده در شوری‌های زیاد حتماً باید از سرعت بالای سانتریفیوژ و در مدت زمان‌های بیش‌تر استفاده نمود. بعد از سانتریفیوژ نمودن و شستشو برای نمک زدایی بیوماس تهیه شده وزن شده و در فالکون‌های ۵۰ استریل ریخته می‌شود و برای نگهداری به بخش نگهداری مرکز ذخایر ژنتیک جهاد دانشگاهی تحویل می‌گردد. بعد از فرآیند لیوفلیز که یک نوع روش نگهداری به روش سرد است (۱۱)، بیوماس فریز شده در یخچال نگهداری می‌شود تا برای مرحله استخراج کاروتنوئید آماده شود.

استخراج کاروتنوئید: برای به انجام رساندن استخراج ابتدا ۱۰۰ میلی‌گرم از بیوماس لیوفلیز شده توسط ترازوی ٤ رقمی وزن کشی و جدا شد و داخل یک ظرف ۱۰۰ میلی‌لیتری تیره منتقل شد. برای انجام دادن استخراج از دو حلال استفاده شد. حلال‌هایی که در حین به انجام رساندن این پژوهش استفاده شدند مطابق نظر کارشناس مربوطه در مرکز ملی ذخایر ژنتیک جهاد دانشگاهی و با استفاده از روش انجام شده توسط (۱۲)، n- هگزان و متانول بودند تا استخراج را به حد بهینه نزدیک‌تر کند. نسبت حلال‌های n- هگزان به متانول ۱:۲ انتخاب شد.

اندازه‌گیری میزان کاروتنوئید کل: برای اندازه‌گیری کاروتنوئید کل، طبق رابطه ۲ ابتدا باید کلروفیل a و b اندازه‌گیری شد و سپس میزان کاروتنوئید کل براساس µg/mg محاسبه شد. برای اندازه‌گیری کاروتنوئید کل از دستگاه اسپکتروفتومتری (T80+ UV/VIS Spectrometer) موجود در مرکز ملی ذخایر ژنتیک جهاد دانشگاهی استفاده شد. برای اندازه‌گیری میزان کاروتنوئید و مشخص شدن این‌که کدام پیک متعلق به کاروتنوئید کل، کدام متعلق به کلروفیل a و کدام کلروفیل b است از روش نایک و همکاران (۲۰۱٤) استفاده می‌شود تا طول موج‌های مناسب برای اندازه‌گیری پارامترهای مورد نظر و فرمول اندازه‌گیری آن‌ها به دست بیاید و کاربردی باشد.

رابطه ۲- طریقه محاسبه کلروفیل‌ها و کاروتنوئید کل؛

$$Ch\text{-}a = ١٦/٧٢\ A_{٦٦٥/٢} - ٩/١٦\ A_{٦٥٢/٤}$$

$$Ch\text{-}b = ٣٤/٠٩\ A_{٦٥٢/٤} - ١٥/٢٨\ A_{٦٦٥/٢}$$

$$C\ x+c = (١٠٠٠\ A_{٤٧٠} - ١/٦٣\ C_a - ١٠٤/٩٦\ C_b)/٢٢١$$

که در آن، Ch-a کلروفیل a، Ch-b کلروفیل b و C x+c کاروتنوئید کل.

طبق نظر Sumantha و همکاران (۲۰۱٤) جذب طیف نوری ٦٦٥/٢ متعلق به کلروفیل a، جذب طیف نوری ٦٥٢/٤ متعلق به کلروفیل b و جذب طیف نور با طول موج ٤٧٠ نانومتر متعلق به کاروتنوئیدهاست در نظر گرفته شدند (۱۳).

تعیین میزان محتوای پروتئینی: برای اندازه‌گیری محتوای پروتئینی (درصد) از روش اسلوکومب و همکاران (۲۰۱۳) استفاده شد (١٤). مقدار ۵ میلیگرم از جلبک خشک شده (فریزدرای) درون ۰/۲ میلی‌لیتر تری‌کلرواستیک اسید (TSA) ٢٤ درصد (w/v) مخلوط و بهم زده شد، سپس مخلوط برای مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد انکوباسیون شد و در دمای اتاق سرد شد. نمونه‌ها بعد از سرد شدن در

دمای اتاق، به مدت زمان ۲۰ دقیقه و با سرعت ۱۵۰۰۰g سانتریوفیوژ شدند و جذب هر نمونه در طول موج ۶۰۰ نانومتر خوانده شد.

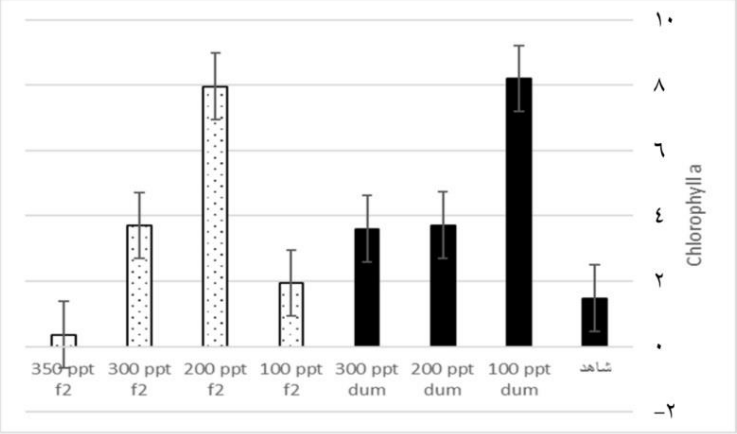
تعیین میزان چربی و خاکستر: برای اندازه‌گیری مقدار چربی کل از روش سوکسله و برای اندازه‌گیری خاکستر نمونه نیز از سوزاندن نمونه‌ها در کوره الکتریکی و در دمای ۵۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶ ساعت استفاده شد (۱۵).

آنالیز آماری: جهت بررسی اثر شوری بین تیمارها از آنالیز واریانس یکطرفه (ANOVA) با ضریب اطمینان ۹۵ درصد و جهت بررسی معنی‌دار بودن تفاوت میانگین‌ها از آزمون دانکن (Duncan) استفاده گردید (P<۰/۰۵).

نتایج

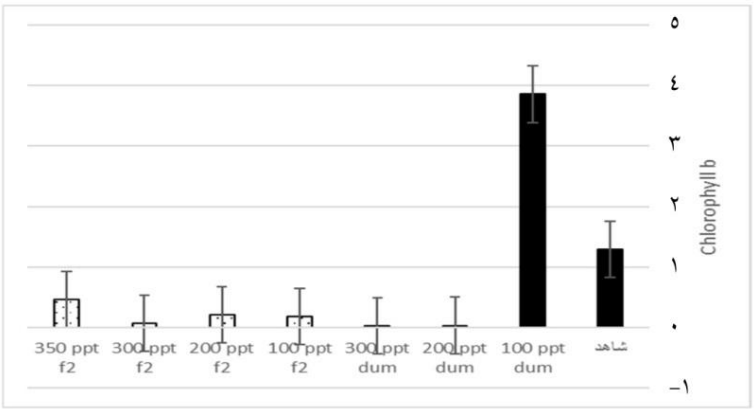
مقایسه دو محیط کشت f/2 و DUM: پس از اندازه‌گیری میزان کاروتنوئید کل (میکروگرم در میلی‌گرم) مشاهده شد که با افزایش درصد غلظت نمک در محیط کشت میزان ذخیره کاروتنوئید آن‌ها افزایش یافت که در برخی از تکرارها این مهم همراه با تغییر رنگ نمونه بود (تیمار ۸) که بیانگر این مهم است که جلبک دونالیلا سالینا دو فازی است و تحت عوامل استرس‌زای شدید کاروتنوئید تولید می‌کند، تغییر رنگ می‌دهد و از رنگ سبز به قرمز تبدیل می‌شود.

مقایسه میزان کلروفیل a: با توجه به شکل ۱ اثر شوری بر روی میزان ذخیره کلروفیل کاهشی ارزیابی می‌شود به‌جز تیمار شوری ppt ۲۰۰ در محیط کشت گیلارد و در حالت مقایسه تقریباً ذخیره کلروفیل نوع a در هر دو محیط کشت DUM و f/2 در شوری‌های مشابه خیلی به هم نزدیک بود و اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (P>۰/۰۵).



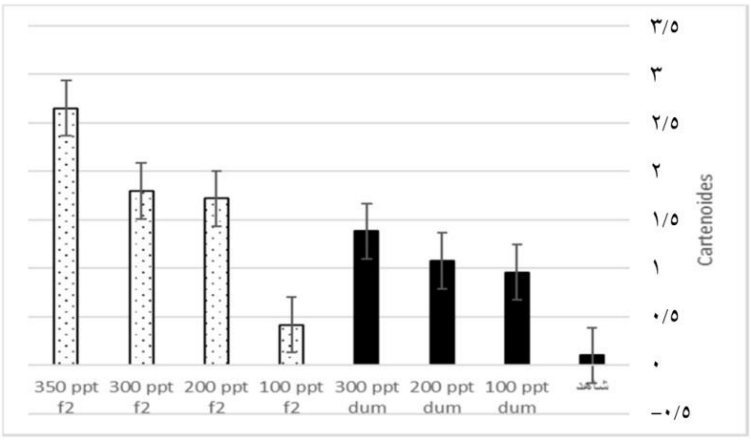
شکل ۱- مقایسه میزان کلروفیل a بین تیمارهای حاصل از محیط کشت‌های DUM و f/2.

مقایسه میزان کلروفیل b: در مقایسه تیمارهای با شوری مشابه بیش‌ترین اختلاف میان تیمار ۲ و تیمار ۶ بود که در محیط کشت جانسون میزان کلروفیل نوع b بیش‌تر مشاهده شد که می‌تواند به این دلیل باشد که سطح کلروفیل a آن پایین بود و این‌که کلروفیل‌ها با هم رابطه معکوس داشتند و با زیاد شدن یکی دیگری کاهش یافت و برعکس که برای اثبات این ادعا می‌توان میزان سطوح کلروفیل‌های a و b تیمار ۸ را که رنگش از سبز به قرمز تبدیل شده را با هم مقایسه کرد که بیانگر این بود کلروفیل‌ها با هم رابطه معکوس داشتند (شکل ۲).



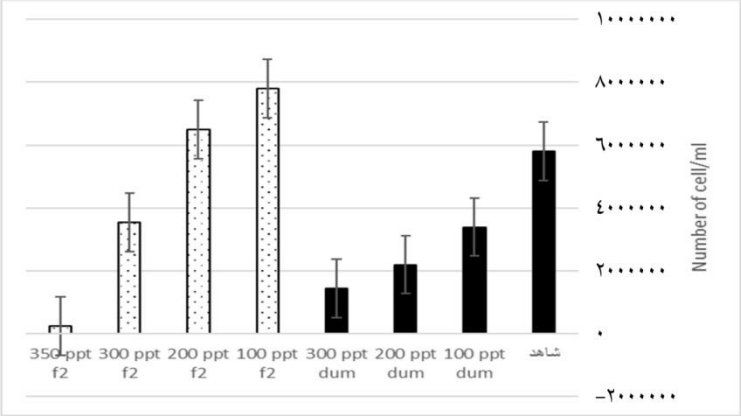
شکل ۲- مقایسه میزان کلروفیل b بین تیمارهای حاصل از محیط کشت‌های DUM و f/2.

مقایسه میزان تولید کاروتنوئید کل: مقایسه میزان ذخیره کاروتنوئید کل جلبک افزایش معنی‌داری با نمونه کنترل در هر دو محیط کشت نشان داد (P<۰/۰۵). به‌طوری‌که میزان آن از µg/mg ۰/۱ در نمونه کنترل به µg/mg ۱/۳۸ در تیمار با شوری ۳۰۰ گرم در هزار محیط کشت جانسون و µg/mg ۱/۷۹ در تیمار ۳۰۰ محیط کشت گیلارد رسید. این تفاوت بین تیمار کنترل و تیمار ۳۵۰ محیط کشت گیلارد بسیار بیش‌تر بود و به خوبی تولید کاروتنوئید در اثر تحت استرس شوری زیاد با تغییر رنگ از سبز به قرمز را نشان داد (P<۰/۰۵).



شکل ۳- مقایسه میزان کاروتنوئید کل بین تیمارهای حاصل از محیط کشت‌های DUM و f/2.

مقایسه میزان رشد و تراکم سلولی: براساس شکل ٤ فقط محیط کشت گیلارد نسبت به نمونه کنترل رشد بالاتری داشته و محیط کشت جانسون پایین‌تر از نمونه کنترل بود (P<۰/۰۵). با افزایش شوری میزان رشد و تراکم سلولی کاهش معنی‌داری را در هر دو محیط کشت گیلارد و جانسون نشان داد به گونه‌ای که بیش‌ترین رشد و تراکم سلولی در تیمار ۵ با شوری ppt۱۰۰ در محیط کشت گیلارد بود.



شکل ٤- مقایسه میزان رشد و تراکم سلولی بین تیمارهای حاصل از محیط کشت‌های DUM و f/2.

آنالیز شیمیایی: اثرات شوری‌های مختلف بر روی ترکیبات شیمیایی پروتئین، چربی و خاکستر (درصد) جلبک *D. salina* به‌دست آمد. تیمار کنترل با شوری ۱۰۰ ppt در نظر گرفته شد به دلیل این‌که غلظت بهینه نمک برای رشد مناسب میکروجلبک دونالیلا سالینا با شوری ۱۰۰ گرم در هزار در محیط کشت گیلارد اتفاق افتاد. پس از جمع‌آوری و آنالیز داده‌ها نتایج به‌صورت زیر به‌دست آمد (جدول ۱).

جدول ۱- میانگین داده‌های ترکیبات شیمیایی جلبک *Dunaliella salina* بین تیمارهای مختلف شوری.

تیمارها	شوری	پروتئین	چربی	خاکستر
۱	۱۰۰ppt	۱٤/۰٦ ±۰/۳٤ [b]	۲۱/٤٥ ±۱/۲۷ [a]	۹/٤۸ ±۰/٥٤ [b]
۲	۲۰۰ ppt	۱۲/۸۱ ±۰/۹۸ [b]	۲۸/٤۸ ±۰/٥۷ [b]	۹/۰٦ ±۰/۱۸ [b]
۳	۳۰۰ ppt	۱۰/۹۷ ±۰/٤۹ [a]	۳٥/۸۱ ±۱/٦٤ [c]	۷/۱۸ ±۷٦ [a]

[*] حروف متفاوت در هر ردیف نشانه وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارهای مورد مطالعه است (P<۰/۰٥).

با توجه به نتایج به‌دست آمده که هرچه شوری در محیط پرورش افزایش پیدا کند، از میزان ذخیره پروتئین جلبک کاسته شد. هم‌چنین در خصوص میزان مواد معدنی (خاکستر) نیز مشاهده شد که هرچه میزان شوری بالاتر برود، میزان ذخیره مواد معدنی جلبک *D. salina* رو به کاهش است (جدول ۱).

بحث

با توجه به اطلاعات به‌دست آمده در پژوهش حاضر، غلظت بهینه نمک برای رشد مناسب میکروجلبک دونالیلا سالینا با شوری ۱۰۰ گرم در هزار اتفاق افتاد. البته در غلظت‌های بالاتر نمک میزان رشد و تراکم سلولی کاهش چشمگیری را نشان داد که با نتایج کین و همکاران (۲۰۲۱) همخوانی دارد (۱٦). در تصدیق این مطلب می توان در غلظت‌های بالای نمک اشاره کرد که سلول‌ها با پدیده غالب فشار اسمزی در محیط مواجه می‌شوند و با تولید انواع متابولیت‌های ثانویه و نشان دادن مکانیزم‌های دفاعی خاصی روند رشد سلولی را کند نموده و فعالیت‌های سلولی را به حداقل می‌رسانند تا با این راه از شرایط سخت محیطی گذر نمایند (۵ و ۱۷).

با توجه به تفاوت محیط کشت‌های مورد استفاده در این پژوهش می‌توان اشاره نمود که در ساختار محیط کشت گیلارد از سدیم نیترات ($NaNO_3$) و محیط کشت جانسون (DUM) از پتاسیم نیترات (KNO_3) استفاده شده است و به دلیل این‌که میزان ماندگاری و تثبیت پتاسیم نیترات در محیط کشت بیش‌تر است، در مدت زمان مشابه میزان مصرف سدیم نیترات از پتاسیم نیترات بیش‌تر است. بهترین منبع غذایی نیتروژن برای این جلبک، نیترات است که شرایط رشد در حضور منابع نیترات‌داری مانند $NaNO_3$ و یا KNO_3 به حالت بهینه نزدیک می‌شود. هم‌چنین شوک ناشی از عدم حضور این منابع نیترات‌دار در محیط کشت یکی از عواملی است که رشد را محدود می‌کند ولی میزان تولید کاروتنوئید را افزایش می‌دهد. گرچه اگر این استرس خیلی زیاد طول بکشد باعث افزایش مرگ سلول و کاهش کاروتنوئید تولیدی توسط جلبک می‌شود. این امر باعث شد تا در ابتدا میزان رشد جلبکی که در محیط کشتی که سدیم نیترات حضور دارد زودتر رشد کند ولی به همین دلیل میزان مواد نیتراته در این محیط کشت‌ها سریع‌تر خالی شود و پس از مدتی جلبک دچار شوک مواد مغذی شود که طی پژوهش‌ها (۱۸)، شوک غذایی باعث تحریک تولید کاروتنوئید شد. اما دلیل دیگر این است که با تثبیت پتاسیم نیترات در محیط کشت پس از مصرف آن باعث کاهش pH ستون آب می‌شود که این کاهش pH در نهایت، عامل بازدارنده رشد خواهد بود که رشد سلول‌های جلبکی در محیط کشت جانسون کشت یافته‌اند را کاهش خواهد داد. البته بعد از ورود به مرحله شوک غذایی و شوری به‌صورت هم‌زمان میزان کاروتنوئید کل تولیدی چشمگیر خواهد داشت که این موضوع مطلوب است (۳). بنابراین، افزایش غلظت پتاسیم نیترات به صورت مؤثری میزان بتا کاروتن ذخیره شده در سلول را وقتی تحت شدت نور بالا قرار بگیرد، افزایش می‌دهد (۵). شدت نور بالا برای تولید بتا کاروتن مناسب است ولی میزان بیوماس را کاهش می‌دهد. این نتایج نشان‌دهنده این بود که استرس محدود شدن نیترات سبب تولید بتاکاروتن شد. کاملاً بدیهی و قابل لمس است که با استفاده از محیط کشت گیلارد (f/2) تراکم سلولی تیمارها در هر غلظت نمک با محیط کشت جانسون اختلاف معنی‌داری دارد و از نظر تراکم سلولی و رشد با توجه به نتایج حاصل از این پژوهش محیط کشت مناسب‌تری برای پرورش جلبک *Dunaliella salina* در ابعاد آزمایشگاهی است و منجر به تولید بیوماس بالاتری خواهد شد.

هرچه جلبک تحت استرس‌های شدیدتری قرار بگیرد کاروتنوئید تولیدی آن بیش‌تر می‌شود و استخراج آن نیز مطلوب تر است (٤)، کمااین‌که در تیمار شماره ۸ وقتی جلبک تحت شوری ppt ۳۵۰ پرورش یافت با این‌که از نظر رشدی، رشد مطلوبی نداشت اما میزان ذخیره کاروتنوئید آن از تمامی تیمارهای دیگر بیش‌تر بود. در حالت مقایسه بین محیط‌های کشت هم این نکته به نظر می‌آید که بر طبق نتایج حاصل از این پژوهش میزان کاروتنوئید تولیدی در تیمارهای پرورش‌یافته با محیط کشت گیلارد از تیمارهای پرورش یافته با محیط کشت جانسون با شرایط مشابه بیش‌تر بود ($P<۰/۰۵$).

ونکاتسان و همکاران (۲۰۱۳) برای کشت جلبک *دونالیلا سالینا* یک مقایسه‌ای بین چند محیط کشت مختلف انجام داد که محیط کشت گیلارد، BG، BBM و ... هم جزو این دسته بودند اما چون محیط کشت انتخابی خودشان محیط کشت Modified Dewalne است توانایی‌های آن را با سایر محیط‌های کشت سنجیده است و این‌گونه ادعا نموده که میزان تراکم سلولی در حین پرورش با این محیط کشت به $٦/٧\times١٠^{٦}$ سلول در هر میلی‌گرم زیر لام نئوبار می‌رسد که با پژوهش حاضر همخوانی دارد (۱۹).

در پژوهش انجام شده توسط تاکاگی و یوشیدا (۲۰۰۶)، که بر روی اثرات شوری بر روی میزان ذخیره چربی، کاروتنوئیدها (به‌خصوص بتاکاروتن) و گلیسرول انجام گرفته بود نتایج به‌دست آمده نشان‌دهنده این مهم بود که افزایش میزان شوری، مقدار ذخیره چربی در جلبک *Dunaliella tetriolecta* افزایش معنی‌داری داشت که با پژوهش حاضر همخوانی دارد (۲۰). هم‌چنین، طبق پژوهش‌های صورت گرفته توسط (۱۸) اعلام کردند افزایش شوری مسبب افزایش یافتن ذخیره گلیسرول و بتاکاروتن در جلبک‌ها می‌شود. در ضمن تصور می‌شود که چربی هم جزء مواد تولیدی توسط جلبک است که برای مقابله با فشار اسمزی تولید می‌گردد ولی مکانیزم تولید آن هنوز مشخص نشده است (۲۰).

دنام و دانداياتاپنی (۲۰۱۳) جلبک *D. salina* را با محیط کشت Dewalne تحت شوری‌های متفاوتی از ۰/۱ مولار تا ۲/۵ مولار کشت دادند که نتایج حاصل از آن پژوهش نشان‌دهنده این بود که بیش‌ترین میزان رشد در همان روز اول که هنوز منابع نیتروژن خالی نشده‌اند و با شوری ۱ مولار دیده شده چون تمامی مواد لازم جهت رشد و تکثیر جلبک تک‌سلولی طی چهار روز ابتدایی در آب هست اما کم‌کم وقتی به روز چهارم می‌رسند این منابع خالی شده و جلبک وارد شوک می‌شود و هم‌چنین بیش‌ترین میزان بتاکاروتن تولید شده در همین شوری است (۲۱). با توجه به این‌که معمولاً شوری‌های بالاتر محرک مؤثری برای تولید یا تحریک آن هستند و این موضوع در یکی از منابع استفاده شده در بحث هم بود و در مورد پژوهش حاضر نیز صدق می‌کند که مانند تیمار با شوری ppt ۳۵۰ کاملاً رنگ سبز خود را از دست داده بود و به رنگ قرمز در آمده بود که نشان‌دهنده ذخیره کاروتنوئید در آن بود.

در پژوهش دیگری جلبک *D. salina* کشت داده شده در محیط Modified Dewalne توسط ونکاتسان و همکاران (۲۰۱۳) که به تراکم سلولی ۶/۷×۱۰^۶ سلول در میلی‌گرم رسیده بود، در اندازه‌گیری میزان کلروفیل a و کلروفیل b هم در هنگام استفاده از این محیط کشت پاسخ بهینه داد و بیش‌ترین میزان تولیدات رنگدانه‌ای سبز را از خود بروز داد میزان کلروفیل‌ها در روز دوازدهم کشت، ۸/۷ درصد و ۷ درصد بوده است (۱۹). هم‌چنین بیش‌ترین مقدار بتاکاروتن استخراج شده در روز چهاردهم گزارش گردیده که میزان آن هم در محیط کشت Modified Dewalne ۶/۴۶ میلی‌گرم در لیتر بود. هم‌چنین بیش‌ترین میزان پروتئین، چربی و کربوهیدرات هم به ترتیب ۶۸/۶، ۱۲۶، ۷۲ درصد بود که این میزان به ترتیب در روز ۱۸، ۳۰ و ۲۰ به‌دست آمده است. در پژوهش انجام شده توسط تاکاگی و یوشیدا (۲۰۰۶)، نشان‌دهنده این مهم بود که با افزایش میزان شوری، مقدار ذخیره چربی در جلبک *Dunaliella tetriolecta* افزایش معنی‌داری یافت که با آنالیز شیمیایی پژوهش حاضر همخوانی دارد (جدول ۱) (۲۰).

با توجه به نتایج به‌دست آمده در جدول ۱ که هر چه شوری در محیط پرورش افزایش پیدا کند، از میزان ذخیره پروتئین جلبک کاسته شده که بیانگر این منظور است که این روش برای افزایش میزان پروتئین برای برداشت و جداسازی یا استفاده به عنوان مکمل کارایی ندارد. اما کاملاً مشخص است که هنگامی که عامل استرس‌زا در محیط بیش‌تر شد، میزان ذخیره چربی جلبک *D. salina* هم افزایش یافت و احتمالاً جلبک از آن به‌عنوان یک مکانیسم دفاعی برای خشک نشدن در محیط آبی استفاده می‌کند. بنابراین، اثر شوری با میزان تولید رنگدانه‌ها رابطه مستقیم دارد اما با رشد و تراکم سلولی رابطه عکس دارد. از سوی

دیگر آنالیز شیمیایی نشان داد که افزایش شوری با میزان چربی رابطه مستقیم و با میزان پروتئین و خاکستر رابطه عکس دارد.

نتیجه‌گیری

به‌طورکلی از نتایج این پژوهش می‌توان دریافت که افزایش غلظت نمک بر روی ترکیبات شیمیایی جلبک *D. salina* نیز تأثیرگذار بود. به‌طوری‌که با افزایش غلظت نمک، درصد چربی، پروتئین و مواد معدنی نسبت به وزن خشک آن دچار تغییر شد. ریز جلبک‌های دریایی منبعی غنی از رنگدانه‌های طبیعی و درصد چربی به‌شمار می‌روند و این ظرفیتی را برای کاربرد آن‌ها در محصولات غذایی، دارویی و آرایشی و بهداشتی و به‌خصوص برای تولید سوخت طبیعی به‌وجود می‌آورد که با استرس شوری روی جلبک *دونالیلا سالینا* می‌تواند تأثیر معنی‌داری روی شاخص‌های با ارزش آن از دید تجاری داشته باشد.

منابع

1. Oren, A. 2005. A hundred years of Dunaliella research: 1905-2005. Saline systems. 1: 1. p. 2.
2. Ramos, A.A., Polle, J., Tran, D., Cushman, J.C., Jin, E.S., and Varela, J.C. 2011. The unicellular green alga Dunaliella salina Teod. as a model for abiotic stress tolerance: genetic advances and future perspectives. *Algae*, 26: 1. 3-20.
3. Dolatyari, A., and Eyvazzadeh, O. 2020. Evaluation of culture conditions of Donalilla salina on its antioxidant content. *Nurse and Physician Within War*, 8: 29. 54-65.
4. Bhalamurugan, G.L., Valerie, O., and Mark, L. 2018. Valuable bioproducts obtained from microalgal biomass and their commercial applications: a review. Environ. Eng. Res. 23: 229-241. https:// doi.org/10.4491/eer.2017.220.
5. Reshma, R., Devi, K.C., Kumar, S.D., Santhanam, P., Perumal, P., Krishnaveni, N., ... and Kim, M.K. 2021. Enhancement of pigments production in the green microalga Dunaliella salina (PSBDU05) under optimized culture condition. *Bioresource Technology Reports*, 14: 100672.
6. Lavens, P., and Sorgeloos, P. 1996. Manual on the production and use of live food for aquaculture, FAO Fisheries Technical paper. No. 361, 295p.
7. Um, B.H., and Kim, Y.S. 2009. Review: A chance for Korea to advance algal-biodiesel technology. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*. 15: 1. 1-7.
8. Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E., and Isambert, A. 2006. Commercial applications of microalgae. *Journal of bioscience and bioengineering*. 101: 2. 87-96.
9. Smith, L.L., Fox, J.M., and Granvil, D.R. 1993. Intensive algae culture techniques. In CRC Handbook of mariculture. Vol 1. Crustacean Aquaculture, 2nd Edition. Mc Vey, J.P. (Ed.). CRC press, Inc., Boca Raton, Florida, USA, pp. 153-172.
10. Talebi, A.F., Mohtashami, S.K., Tabatabaei, M., Tohidfar, M., Bagheri, A., Zeinalabedini, M., Mirzaei, H.H., Mirzajanzadeh, M., Shafaroudi, S.M., and Bakhtiari, S. 2013. Fatty acids profiling: a selective criterion for screening microalgae strains for biodiesel production. *Algal Research*. 2: 3. 258-267.
11. Jennings, T.A. 1999. Lyophilization: introduction and basic principles. CrC Press.
12. Eimhjellen, K.E., and Jensen, S.L. 1964. The biosynthesis of carotenoids in Rhodopseudomonas gelatinosa. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects 82: 1. 21-40.
13. Sumanta, N., Haque, C.I., Nishika, J., and Suprakash, R. 2014. Spectrophotometric analysis of chlorophylls and carotenoids from commonly grown fern species by using various extracting solvents. *Research Journal of Chemical Sciences*. ISSN, 2231, p.606X.

14. Slocombe, S.P., Ross, M., Thomas, N., McNeill, S., and Stanley, M.S. 2013. A rapid and general method for measurement of protein in micro-algal biomass. Bioresour. Technol. 129: 51-57.
15. AOAC International. 2005. Official methods of analysis of AOAC International. AOAC International.
16. Qin, R., Li, Y., Zhang, L., and Liu, J. 2021. The effect of salinity shock on the growth and rapid light curve of dunaliella salina. *Aquaculture Research* 52: 6. 2569-2579.
17. Tammam, A.A., Fakhry, E.M., and El-Sheekh, M. 2011. Effect of salt stress on antioxidant system and the metabolism of the reactiveoxygen species in Dunaliella salina and Dunaliella tertiolecta. *African Journal of Biotechnology*. 10: 3795-3808.
18. Ben-Amotz, A., Shaish, A., and Avron, M. 1989. Mode of action of the massively accumulated β-carotene of Dunaliella bardawil in protecting the alga against damage by excess irradiation. *Plant Physiology*. 91: 3. 1040-1043.
19. Venkatesan, S., Senthil, M., Senthil, C., Bashkar, S., and Rengasamy, R. 2013. Culturing marine green microalgae *Dunaliella salina* Teod. and Dunaliella tertiolecta Masjuk in Dewalne's medium for valuable feeds stock. J. *Modern Biotechnol*. 2: 2. 40-5.
20. Takagi, M., and Yoshida, T. 2006. Effect of salt concentration on intracellular accumulation of lipids and triacylglyceride in marine microalgae Dunaliella cells. *Journal of bioscience and bioengineering*, 101: 3. 223-226.
21. Dhanam, D.S., and Dhandayuthapani, K. 2013. Original Research Article Optimization of-Carotene production by Marine Microalga-*Dunaliella salina*. Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci. 2: 3. 37-43.