

افزایش تولید گلیسرول در جلبک‌های *Dunaliella viridis* و *Dunaliella salina* بومی دریاچه ارومیه تحت تنش شوری

زهرا عسل پیشه^{۱*}، رشید جامعی^۱، رضا درویش‌زاده^۲، فرزانه نوری^۳

^۱گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.
^۲گروه تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.
^۳گروه بیولوژی و تکثیر و پرورش، پژوهشکده آرتمیا و آبزی پروری، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۴/۲۶

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۳/۱۰

چکیده

به منظور شناسایی گونه‌های جلبک جنس *Dunaliella* با قابلیت تولید بالای زی‌توده، کارتنوئید و گلیسرول، نمونه‌ها از دریاچه ارومیه جداسازی و خالص شده و با استفاده از نشانگر ملکولی ITS شناسایی شدند. دو گونه شناسایی شده در شوری بهینه کشت، و پس از رشد و تکثیر کافی در فاز لگاریتمی به شوری‌های ۱/۵، ۲، ۳، ۴/۵ و ۵/۳ مولار نمک NaCl منتقل و طی ۱۴ روز از لحاظ رشد، تولید رنگیزه مورد بررسی قرار گرفتند. محتوای کربوهیدرات‌ها و گلیسرول نیز ۲۴ ساعت و ۱۰ روز بعد از اعمال تیمارهای شوری اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد، شوری بهینه برای رشد و تکثیر *Dunaliella salina* Dsu1 ۱/۵ مولار و برای *Dunaliella viridis* DU3 ۳ مولار است. شوری کمتر از ۳ مولار در جلبک *D. viridis* منجر به تولید پالملا شد. جلبک *D. salina* نسبت به *D. viridis* کارتنوئید بیشتری تولید کرد؛ خصوصاً وقتی در شوری ۲/۵ مولار کشت شد. همچنین رابطه مثبتی بین غلظت گلیسرول درون سلولی در جلبک *D. salina* و افزایش شوری در تمام غلظت‌ها مشاهده شد. بیشترین افزایش (۲/۵) برابر غلظت اولیه گلیسرول در تیمار ۳ مولار مشاهده شد. *D. viridis* فقط در شوری‌های بالا (۳ و ۴/۵ مولار) افزایش شدید تا ۵ برابر غلظت اولیه در محتوای گلیسرول درون سلولی رخ داد. ۲۴ ساعت پس از اعمال شوری‌های مختلف، محتوای کربوهیدرات در *D. viridis* در تمام تیمارهای شوری نسبت به گونه رقیب *D. salina* بیشتر بود. محتوای کربوهیدرات ۱۰ روز پس از تیمار، در هر دو گونه *D. viridis* و *D. salina*، با افزایش شوری، کاهش یافت. به‌طور کلی گونه *D. viridis* جداسازی شده از دریاچه به دلیل سرعت تکثیر بالا و قابلیت انباشتن کارتنوئید و گلیسرول به مقدار قابل توجه در بازه زمانی ۱۴ روز گزینه مناسب‌تری نسبت به *D. salina* است.

کلید واژگان: دریاچه ارومیه، گلیسرول، کارتنوئید، کربوهیدرات

مقدمه

جلبک تک سلولی دونالیا به علت دارا بودن صفات شاخص از جمله عدم وجود دیواره، قابلیت رشد در آب‌های شور و فوق شور و قابلیت تولید مواد ارزشمندی چون کارتنوئیدها، گلیسرول، اسیدهای چرب، پروتئین‌ها و ویتامین‌ها، موضوع اصلی تحقیقات علمی در دهه‌های اخیر بوده است (Mendoza et al., 1996; Bobrov et al., 2008; Wang et al., 2016; Rismani and Shariati, 2017) از سوی دیگر گونه‌های ریز جلبک دونالیا مورد توجه صنایع مختلف غذایی، آرایشی و بهداشتی، آبزی پروری و مهم‌تر از همه تولید سوخت زیستی نیز قرار گرفته است. کشورهای پیشرفته چین، آمریکا و استرالیا از پیشگامان این عرصه هستند (Borowitzka and Siva, 2007). از این رو، تلاش برای شناسایی و یافتن سویه‌های مستعد و مناسب بومی و حتی تولید سویه‌های تغییر یافته ژنتیکی برای بهره‌مندی از ویژگی‌های ممتاز این ریز جلبک بی وقفه ادامه دارد.

یکی از روش‌هایی که برای شناسایی ملکولی جلبک دونالیا استفاده شده است، روش انگشت‌نگاری تعیین اندازه سائز اینترون‌ها در 18s-rDNA است (Olmos Soto, 2015). تلاش‌هایی نیز برای شناسایی جنس *Dunaliella* با استفاده از 16s-rDNA کلروپلاستی صورت گرفته است (سلمانی‌نژاد، ۱۳۹۳). با آزمایش شدت‌های مختلف نور و شوری روی جلبک *Dunaliella salina* به این نتیجه رسید که افزایش همزمان شدت نور و شوری باعث کاهش تکثیر و تراکم سلولی می‌شود. همچنین به منظور یافتن شرایط بهینه تولید بتاکاروتن، اثرات افزایش و کاهش مواد مغذی مثل نیترات، و همچنین تأثیر دما و نانوذرات نیز روی برخی سویه‌های دونالیا مورد مطالعه قرار گرفته است (Ayatallahzadeh et al., 2015; Wu et al., 2016).

Mendoza و همکاران (۱۹۹۶) اثر کاهش دما از ۳۰ به ۱۸ درجه سانتی‌گراد را در جلبک *D. salina* بررسی کردند. نتایج نشان داد که میزان چربی کل، اسیدهای چرب و بتاکاروتن تحریک شده و افزایش می‌یابد. با توجه به اینکه جنس دونالیا برای حیات در محیط‌های شور با غلظت‌های مختلف سازگار شده، گلیسرول در تنظیم تعادل اسمزی و حفظ حیات این تک سلولی نقش کلیدی دارد. در مطالعه‌ای که روی *D. salina* جداسازی شده از منطقه حفاظت شده Zaranik در شمال مصر انجام شد، بیشترین تراکم سلولی

و تولید بتاکاروتن در شوری ۲ مولار ولی بالاترین میزان گلیسرول انباشته شده در شوری ۴ مولار اندازه‌گیری شد (Mofeed, 2015). اما قبل از آن Chen و همکاران (۲۰۰۹) با کشت *D. salina* در غلظت‌های مختلف کلرید سدیم، غلظت ۲ مولار کلرید سدیم را به عنوان شوری بهینه برای حصول بالاترین تراکم و بالاترین غلظت گلیسرول (۶۴ میکروگرم در میلی‌لیتر) معرفی کردند. آن‌ها افزایش غلظت گلیسرول را مرتبط با افزایش شوری محیط و تجزیه و کاهش غلظت گلیسرول را نتیجه کاهش شوری گزارش کردند. مقایسه نتایج تحقیقات مختلف نشان می‌دهد احتمالاً تولید بیشینه گلیسرول و بتاکاروتن در شرایط مختلف شوری، دما و نور علاوه بر گونه، به سویه نیز بستگی دارد. اخیراً محققین در تلاش هستند تا روش‌هایی برای تبدیل گلیسرول به محصولات با ارزش بالای افزوده و استفاده از آن برای کاهش قیمت تمام شده بیودیزل حاصل از میکروجلبک بیابند (Yang et al. 2012).

دریاچه ارومیه به عنوان یک تالاب شور طبیعی در گذشته زیستگاه جنس‌های متعددی از جلبک‌ها بوده است؛ به طوری که در مطالعه‌ای که در سال‌های ۱۳۷۳ و ۱۳۷۵ توسط ریاحی و همکاران صورت گرفت، ۱۲ جنس فیتوپلانکتون از سه شاخه گزارش شده است (ریاحی و همکاران، ۱۳۷۳). امروزه از جلبک سبز *Enteromorpha intestinalis* که در گزارش Plattner (۱۹۶۰) نیز به آن اشاره شده است و در گذشته‌ای نه چندان دور برای بهره‌مندی از آثار درمانی و طبی آن، مردم را به سواحل دریاچه ارومیه می‌کشاند، گزارش جدیدی وجود ندارد. تغییرات بحث برانگیزی که طی سال‌های اخیر دریاچه ارومیه را به سوی خشکی و افزایش غلظت نمک به بیش از ۴۰۰ گرم در لیتر پیش برده است، تنوع و ترکیب موجودات زنده این دریاچه را نیز تحت تأثیر قرار داده است؛ به طوری که در مطالعات اخیر عمدتاً جلبک سبز دونالیا و باکتری‌های نمک‌دوست از دریاچه گزارش شده‌اند (Esmaeili et al., 2010).

با توجه به اهمیت بالقوه جنس دونالیا و دوام آن در شرایط فعلی دریاچه ارومیه، در این مطالعه خالص‌سازی، شناسایی و ذخیره گونه‌های آن و همچنین به بررسی برخی ویژگی‌های فیزیولوژیک در شوری‌های مختلف و معرفی گونه‌های مستعد از نظر تولید بیومولکول‌های با ارزش مثل کارتنوئید، گلیسرول و کربوهیدرات‌ها مورد بررسی قرار

گرفت.

تکرار در نظر گرفته شد و کل آزمایش دو بار تکرار شد. تعداد اولیه سلول‌های جلبک *D. salina* در شروع آزمایش ۱۶۵۰۰ سلول در میلی‌لیتر و جلبک *D. viridis* ۶۰۰۰۰۰ سلول در میلی‌لیتر بود. طی ۱۰ روز بعد از تیمار، رشد و تکثیر و تغییرات رنگی‌ها مورد بررسی قرار گرفت. محتوای گلیسرول ۲۴ ساعت و ۱۰ روز بعد از اعمال تنش شوری، با دستگاه اسپکتروفتومتر BioTek اندازه‌گیری شد. در این مدت ارلن‌ها روزانه دوبار به‌صورت دستی به‌خوبی هم زده شدند. دما در طول آزمایش 30 ± 1 درجه سانتی‌گراد در نظر گرفته شد. شمارش و تعیین تراکم سلول‌ها هر دو روز یکبار با استفاده از لام نئوبار انجام شد.

سنجش کلروفیل و کاروتنوئیدها: سنجش کلروفیل و کاروتنوئیدها با استفاده از متانول ۱۰۰٪ انجام گرفت. برای این کار هر دو روز یکبار ۵ میلی‌لیتر از محتوای ارلن‌های مربوط به هر تیمار برداشته شده و به مدت ۵ دقیقه در ۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. پس از حذف مایع رویی، ۲/۵ میلی‌لیتر متانول خالص سرد به باقی‌مانده ترکیب اضافه و ۳۰ ثانیه به شدت هم‌زده شد. بعد از نیم ساعت استراحت در تاریکی و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، مجدداً سانتریفوژ (در همان دور و مدت زمان) انجام گرفت و مایع رویی حاوی رنگی‌های مستخرج با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج‌های ۶۶۵، ۶۵۲ و ۴۷۰ نانومتر خوانش شد (Lichtenthaler, 1987). از رابطه‌های زیر جهت محاسبه غلظت کلروفیل a، b و کاروتنوئید کل استفاده شد:

$$C_a = 16.72 A_{665} - 9.16 A_{652}$$

$$C_b = 34.09 A_{652} - 15.28 A_{665}$$

$$C_{(x+c)} = (1000 A_{470} - 1.63 C_a - 1.4.96 C_b) / 221$$

سنجش محتوای گلیسرول: سنجش محتوای گلیسرول بر مبنای دو واکنش Malaprade و Hantzsch به روش پریودات/استیل استون انجام شد (Kuhn et al., 2015). با توجه به منحنی استاندارد و فرمول زیر میزان گلیسرول محاسبه گردید. ۲۴ ساعت بعد از اعمال تنش شوری ۱/۵ تا ۳/۵ مولار، حدود یک لیتر از محتوای ارلن‌ها برداشت و به مدت ۵ دقیقه در ۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. سپس ۰/۱ گرم از رسوب حاوی سلول‌ها توزین شده و ۱۰۰۰ میکرولیتر بافر فسفات ۱۰۰ میلی‌مولار افزوده شد. سوسپانسیون حاصل به مدت ۱۰ دقیقه در بن‌ماری در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد جوشانده شد تا گلیسرول موجود در سلول‌ها استخراج شود (Chow et al., 2013). پس از

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری و شرایط کشت: نمونه‌برداری از آب دریاچه ارومیه در شمال غرب ایران (37° و 42° شمالی، 45° و 49° شرقی) در بهار سال ۱۳۹۷ انجام شد. نمونه آب پس از رقیق‌سازی و افزودن محیط کشت مغذی F/2 (Guillard, 1975)، ابتدا در محیط مایع و سپس طی چند مرحله روی محیط جامد کشت و انکوبه شد. نهایتاً کلنی‌های خالص دوباره به محیط مایع منتقل و در نور ممتد فلورسنت با شدت $125 \mu\text{mol. m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ و دمای 30° درجه سانتی‌گراد کشت و تکثیر شدند (Gómez and González, 2005).

استخراج DNA و انجام واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR): ۰/۱ گرم از هر گونه خالص شده، پس از سانتریفوژ (۴۰۰۰ دور در دقیقه، به مدت ۵ دقیقه) برداشت و با استفاده از کیت‌های استخراج و خالص‌سازی شرکت زیست فناوری رنا، DNA مورد نیاز برای انجام PCR تهیه شد. به‌منظور تکثیر ناحیه ITS از الیگونوکلئوتیدهای: ITS5: F (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAGG-3') و ITS2: F (5'-GCATCGATGAAGAACGCAGC-3') و ITS4: R (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') به‌عنوان آغازگر در دستگاه PCR مدل My cyclor (BioRad- USA) استفاده شد. برنامه PCR شامل دمای واسرشتگی اولیه در ۹۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه و ۴۰ چرخه دمایی شامل دمای واسرشتگی؛ ۹۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه، دمای اتصال آغازگرها به DNA الگو؛ ۴۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه، دمای گسترش؛ ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه، و گسترش نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷ دقیقه بود. محصول واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز روی ژل آگارز ۱/۲٪ بررسی و برای تعیین توالی به روش سَنگر به شرکت ماکروژن کره جنوبی فرستاده شد.

اعمال تنش شوری و بررسی رشد و تکثیر: ابتدا هر دو گونه خالص‌سازی شده به مدت ۱۰ روز در شوری ۲ مولار NaCl کشت شدند؛ سپس سانتریفوژ شده به ارلن‌های ۲ لیتری حاوی غلظت‌های شوری ۱/۵، ۲، ۳/۵، ۳ و ۳/۵ مولار و محیط کشت مغذی انتقال یافتند. برای هر تیمار سه

Branch length:  Cladogram  Real



AY591508.1 0.25748 *Clorella vulgaris*
U66954.2 0.18426 *C. reinhardtii*
U66947.1 0.17683 *C. geitleri*
DU3 0.05381 ***Dunaliella viridis* DU3**
KJ575080.1 0.00605 *D. viridis*
KF595151.1D3 0.02321 *D. viridis*
U66956.1 -0.01271 *D. tertiolecta*
AF313439.119/9 0.05676 *D. parva*
EF695405.1 0.03631 *D. salina*
KT013271.1 0.04619 *D. Parva*
KC477401.1 0.0178 *D. salina*
Dsu1 0.01265 ***Dunaliella salina* Dsu1**

شکل ۱- درخت فیلوژنتیک که جایگاه دو گونه جداسازی شده از دریاچه ارومیه (*Dunaliella salina* Dsu1 and *Dunaliella viridis* DU3) را نشان می‌دهد. (همترازی و فیلوگرام به روش NJ (اتصال همسایه) و با استفاده از نرم‌افزار Clastal Omega انجام شده است)

عمومی (GLM) در نرم‌افزار SAS نسخه ۹/۴ انجام شد. میانگین و خطای استاندارد مربوط به تیمار محاسبه شده و اختلاف بین میانگین‌ها با آزمون توکی در سطح احتمال ۰/۰۵ تعیین شد. نمودارها در محیط نرم‌افزار Excel نسخه ۲۰۱۶ رسم شدند.

سانتریفوژ مجدد، عصاره با محلول آب و الکل اتیلیک ۵۰٪ رقیق شد. همین فرآیند روز دهم بعد از اعمال تنش شوری تکرار شد.

$$\text{Glycerol content } \left[\frac{\text{mg}}{\text{l}} \right] = \frac{\Delta A \text{ sample (25min - 15min)} - \Delta A \text{ blank (25min - 15 min)}}{\text{slope of calibration curve } \left[\frac{\text{l}}{\text{mg}} \right]}$$

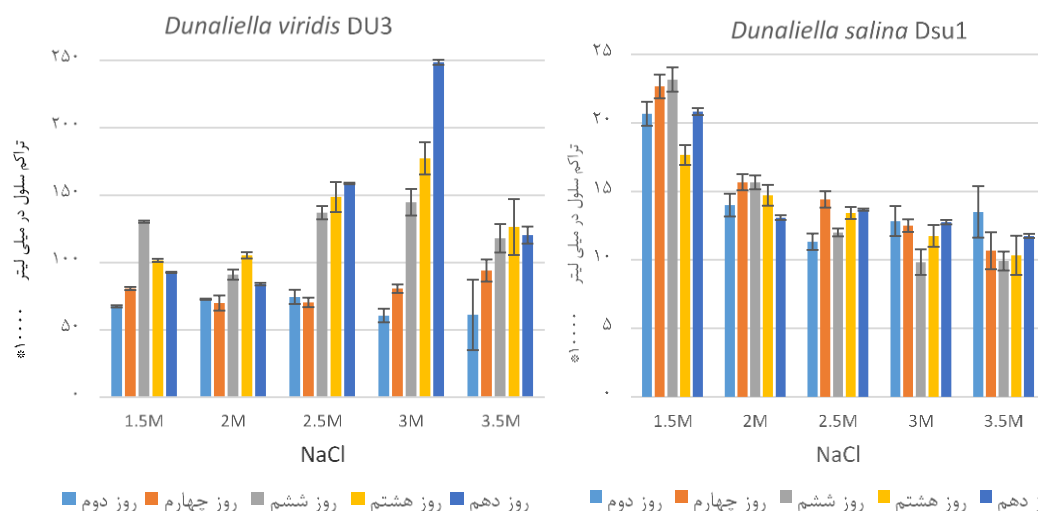
سنجش محتوی کربوهیدرات: به منظور سنجش تغییرات قندها، ۲۴ ساعت و ۱۰ روز بعد از اعمال غلظت‌های مختلف NaCl، ۰/۱ گرم از زی‌توده هر دو گونه پس از سانتریفوژ (۴۰۰۰ دور در دقیقه، ۵ دقیقه) برداشت شد. به مقدار ۵ میلی‌لیتر اتانول ۸۰٪ به آن افزوده شده و در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه جوشانده شد. از عصاره الکلی حاصل برای اندازه‌گیری کربوهیدرات‌ها به روش فنول سولفوریک اسید استفاده شد (Dubois et al., 1956).

آنالیز آماری: پس از توالی‌یابی به روش سَنگر، توالی‌های به‌دست آمده با نرم‌افزار Chromas نسخه ۲/۵ ویرایش شده و تطابق توالی‌ها با BlastN (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=TYPE=BlastSearch>) انجام شد. در انجام Blast پایگاه داده Nucleotide collection (nr/nt) انتخاب شد. سپس همترازی فیلوگرام به روش NJ (اتصال همسایه) و با نرم‌افزار آنالین Clastal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/tools/msaclustalo>) رسم شد. توالی ITS مربوط به گونه‌های شناسایی شده در پایگاه داده NCBI ثبت شد. تجزیه داده‌ها با روش مدل خطی

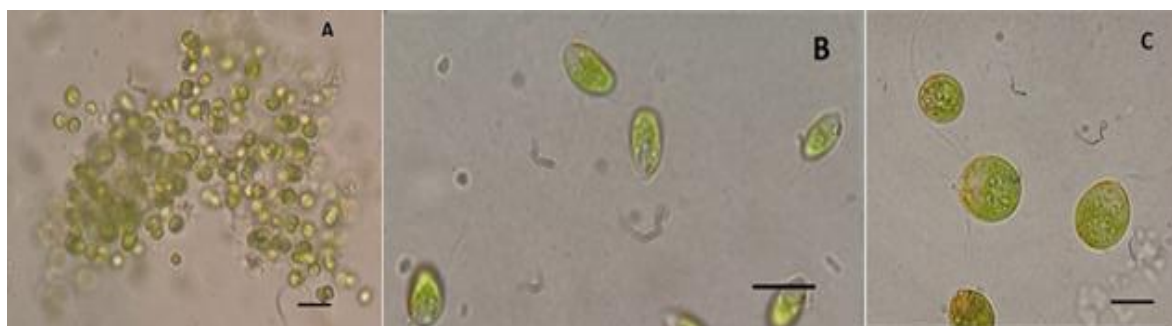
نتایج

گونه‌های جلبک مورد مطالعه با روش مولکولی به‌طور دقیق شناسایی شدند. پس از Blast توالی ناحیه ITS دو گونه خالص‌شده از دریاچه ارومیه در پایگاه داده NCBI و بررسی قرابت، گونه‌ها با کدهای MG768943.1 و MH399207.1 و *D. salina* Du1 و *D. viridis* ثبت شدند (شکل ۱).

جلبک *D. viridis* در شوری‌های مختلف تا روز چهارم اختلاف معنی‌داری از لحاظ تراکم سلولی نشان نداد ($P > 0.05$). در روز هشتم بالاترین تراکم سلولی در تیمارهای ۲/۵ و ۳ مولار نمک مشاهده شد که اختلاف معنی‌داری با تیمارهای ۱/۵، ۲ و ۳/۵ مولار نمک نشان دادند ($P < 0.05$). در روز دهم بالاترین تراکم سلولی به‌ترتیب در تیمارهای ۳ مولار نمک و ۲/۵ مولار نمک مشاهده شد. تیمارهای ۳/۵، ۲، ۱/۵ مولار نمک از لحاظ تراکم در رده‌های بعدی قرار گرفتند. براساس نتایج، غلظت ۳ مولار نمک برای تکثیر و رشد جلبک *D. viridis* به‌عنوان شوری بهینه است و جلبک با این غلظت زودتر به بیشینه تعداد سلول می‌رسد.



شکل ۲- تراکم سلولی در دو گونه جلبک مورد مطالعه در غلظت‌های ۱/۵، ۲، ۳، ۳/۵ و ۴ مولار NaCl طی ۱۰ روز کشت

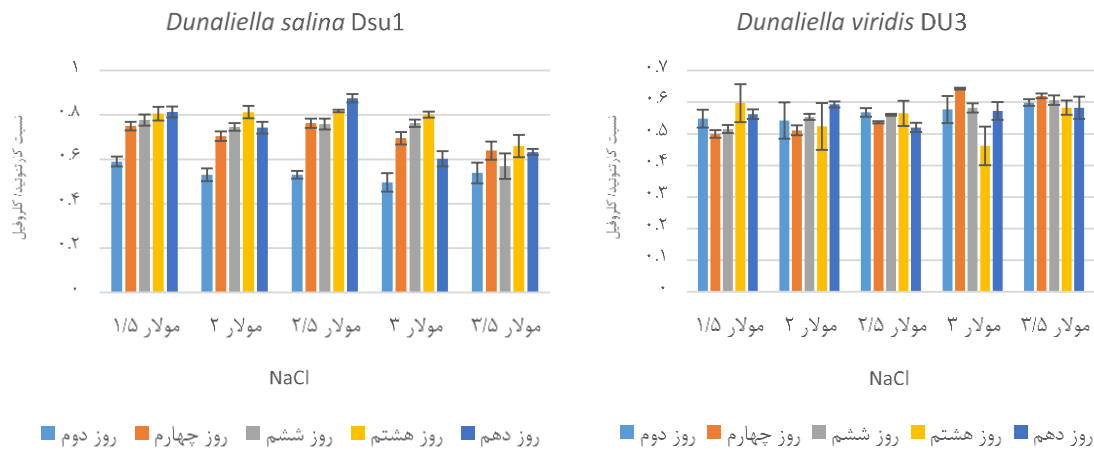


شکل ۳- A: جلبک *D. viridis* در شوری ۱/۵ مولار در مرحله پالملا. B: سلول‌های نسبتاً گرد و تاژکدار *D. viridis* در شوری ۳/۵ مولار و C: جلبک *Dunaliella salina* Dsu1 در روز ۱۰ ام کشت در شوری ۳/۵ مولار (خط مقیاس = ۱۰ میکرومتر)

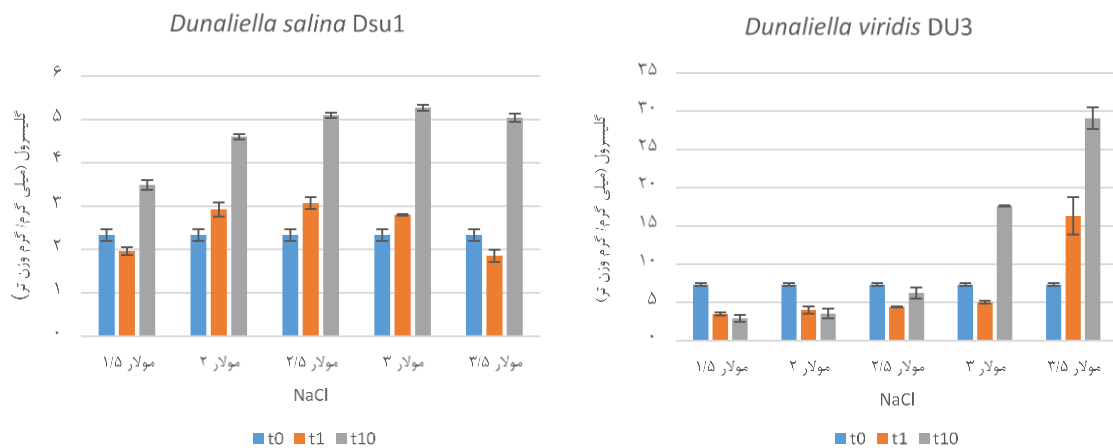
کاملاً برجسته و واضح مشاهده می‌شوند (شکل ۳). مقایسه روند تکثیر در غلظت‌های مختلف شوری در جلبک *D. salina* نشان می‌دهد، این گونه در غلظت‌های شوری پایین ۱/۵ و ۲ مولار توانایی رشد و تکثیر بیشتری دارد. به‌طوری‌که اختلاف معنی‌داری از نظر تعداد سلول در تیمار ۱/۵ مولار نمک با تعداد آن در تیمارهای ۲/۵، ۳ و ۳/۵ مولار وجود دارد ($P < 0.05$). بین روزهای مختلف اختلاف معنی‌داری از نظر تراکم سلولی مشاهده نشد ($P > 0.05$). در کل، مقایسه دو گونه *D. salina* و *D. viridis* نشان می‌دهد که رشد و تکثیر *D. viridis* بیشتر از *D. salina* است (شکل ۲).

نسبت کارتنوئید به کلروفیل در تیمارهای شوری مختلف: در گونه *D. salina* نسبت کارتنوئید به کلروفیل در تمام غلظت‌های شوری از روز دوم به بعد به‌طور معنی‌داری افزایش یافته است. نتایج نشان داد در شوری ۲/۵ مولار خصوصاً در روزهای ۸ و ۱۰ نسبت به شوری ۳/۵

پس از آن شوری ۲/۵ مولار مناسب کشت این گونه است. با افزایش شوری به ۳/۵ مولار، کاهش میزان تکثیر نسبت به شوری ۳ و ۲/۵ مولار مشاهده می‌شود. با کاهش غلظت نمک به ۱/۵ و ۲ مولار جلبک نمی‌تواند به بیشینه تراکم برسد و از روز اول تا روز ۱۰ ام پس از یک صعود در منحنی رشد، نهایتاً با کاهش تعداد روبه‌رو می‌شود. همچنین براساس مشاهدات، با کاهش غلظت شوری، جلبک *D. viridis* حالت پالملا به خود گرفته و سلول‌ها تاژک و لکه چشمی خود را از دست داده، گرد می‌شوند و توده‌های به هم چسبیده تشکیل می‌دهند (Borowitzka and Siva, 2007; Sijia et al., 2017). به‌طوری‌که در غلظت شوری ۱/۵ مولار بیشترین حالت پالملا مشاهده شد، و هرچه غلظت نمک افزوده شد از تعداد اشکال پالملا کاسته شد. در غلظت شوری ۳ و ۳/۵ مولار تقریباً هیچ سلول پالموئید مشاهده نشد و همه سلول‌ها متحرک، تاژکدار، کشیده و باریک بودند. در غلظت‌های بالای نمک، لکه‌های چشمی در این جلبک



شکل ۴- نمودارهای نسبت کارتنوئید به کلروفیل در دو گونه جلبک مورد مطالعه در غلظت‌های ۱/۵، ۲، ۲/۵، ۳ و ۳/۵ مولار NaCl طی ۱۰ روز کشت. جلبک *Dunaliella salina* Dsu1 ظرفیت تولید کارتنوئید بیشتری در مقایسه با *Dunaliella viridis* DU3 دارد



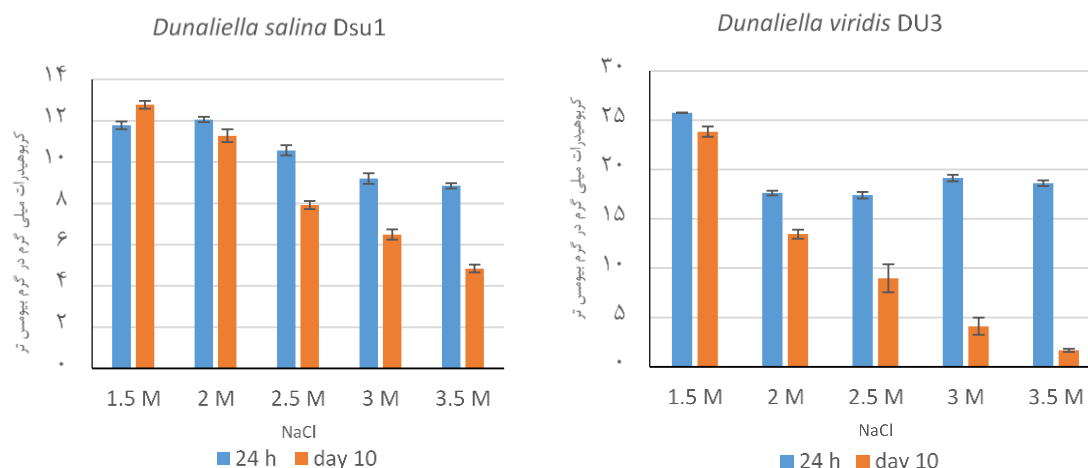
شکل ۵- غلظت گلیسرول درون سلولی در دو گونه مورد مطالعه (t0: غلظت گلیسرول قبل از اعمال تیمار غلظت‌های مختلف NaCl، t1: غلظت گلیسرول ۲۴ ساعت و t10: غلظت گلیسرول ۱۰ روز بعد از اعمال غلظت‌های ۱/۵، ۲، ۲/۵، ۳ و ۳/۵ مولار نمک ($P < 0.05$)).

در جلبک *D. viridis* یک روز بعد از اعمال تنش شوری به جز تیمار ۳/۵ مولار، افزایشی در غلظت گلیسرول مشاهده نشد. ۱۰ روز بعد از اعمال تیمارهای شوری تیمار در ۳ و ۳/۵ مولار افزایش انباشت گلیسرول مشاهده شد. در تیمار ۳/۵ مولار این افزایش محتوی گلیسرول نسبت به تیمار ۱/۵ مولار ده برابر بود. مقایسه تغییر میزان گلیسرول درون سلولی در دو گونه نشان می‌دهد که *D. viridis* در پاسخ به افزایش غلظت شوری بیشترین واکنش را از نظر تولید گلیسرول نشان می‌دهد و این افزایش در روز دهم ۶ برابر بالاترین میزان گلیسرول در کل دوره آزمایش در *D. salina* است.

بررسی میزان کربوهیدرات: غلظت کربوهیدرات درون سلولی ۲۴ ساعت و ۱۰ روز بعد از انتقال جلبک *D. salina* به غلظت‌های مختلف شوری، کاهش یافت به طوری که روز دهم شیب کاهش غلظت شدیدتر بود. در جلبک *D. viridis*، ۲۴ ساعت بعد از اعمال تیمارهای شوری بالاتر از بهینه یعنی

مولار کارتنوئید بیشتری تولید شد. در گونه *D. viridis* اختلاف معنی‌داری بین نسبت‌های کارتنوئید به کلروفیل در غلظت‌های شوری مختلف مشاهده نشد ($P > 0.05$). به طور کلی *D. salina* در مقایسه با *D. viridis* خصوصاً وقتی در غلظت ۲/۵ مولار کلرید سدیم کشت شود، کارتنوئید بیشتری تولید می‌کند (شکل ۴).

بررسی محتوای گلیسرول بعد از اعمال غلظت‌های مختلف شوری: در گونه *D. salina*، تیمارهای ۲، ۲/۵ و ۳ مولار ۲۴ ساعت بعد از اعمال تنش شوری، افزایش در میزان گلیسرول و در همین زمان در تیمارهای ۱/۵ و ۳/۵ مولار نمک، کاهش در میزان گلیسرول مشاهده شد. ده روز بعد از اعمال تنش افزایش غلظت گلیسرول نسبت به شاهد در تمام تیمارها معنی‌دار بود ($P < 0.05$). در غلظت شوری ۱/۵ مولار کمترین افزایش نسبت به شاهد در غلظت گلیسرول مشاهده شد (شکل ۵).



شکل ۶- نمودار تغییر غلظت کربوهیدرات‌های درون سلولی در دو گونه *Dunaliella* مورد مطالعه ۲۴ ساعت و ۱۰ روز بعد از اعمال تیمار غلظت‌های ۱/۵، ۲، ۳، ۳/۵ و ۴ مولار NaCl ($P < 0.05$)

۱۹۹۰ and Burford). بررسی محتوای رنگیزه‌ها طی ۱۰ روز رشد و تکثیر در غلظت‌های مختلف شوری نشان می‌دهد که *D. salina* Dsu1 در مقایسه با *D. viridis* DU3 در جلبک خصوصاً وقتی در غلظت ۲/۵ مولار کلرید سدیم کشت شود، در تولید کارتنوئید موفق‌تر عمل می‌کند. در جلبک *D. salina* با افزایش سن کشت، گلیسرول نیز انباشته می‌شود و این افزایش غلظت در شوری‌های بالا بیشتر است ولی این افزایش نهایتاً به ۲/۵ برابر غلظت اولیه گلیسرول در سلول‌ها می‌رسد. در گونه *D. viridis* افزایش غلظت گلیسرول در شوری‌های زیر ۳ مولار معنی‌دار نبود و فقط در شوری‌های بالا یعنی ۳ و ۳/۵ مولار نمک رخ می‌دهد نکته جالب توجه، افزایش بسیار زیاد و تا ۵ برابر غلظت اولیه درون سلولی این ماده است. افزایش غلظت تنظیم کننده اسمزی گلیسرول با افزایش شوری در مطالعات پیشین نیز گزارش شده است (Ben-Amotz and Avron, 1973; Ahmed et al., 2017).

بررسی تغییر محتوای کربوهیدرات درون سلولی پس از اعمال غلظت‌های مختلف NaCl نشان می‌دهد، در هر دو گونه افزایش شوری باعث کاهش تولید قندها و کاهش آن موجب افزایش محتوای قند درون سلولی می‌شود. این تغییر در ۱۰ روز پس از اعمال تنش شوری مشهودتر است. به نظر می‌رسد کاهش غلظت کربوهیدرات‌ها با افزایش تولید گلیسرول در شوری‌های بالا ارتباط داشته باشد. همچنین در غلظت‌های بالای کلرید سدیم سرعت فتوسنتز و تثبیت قندهای جدید کاهش می‌یابد؛ بنابراین سلول دونالیا با تجزیه منابع نشاسته و مصرف قند از مسیر گلیکولیز، دی

۳ و ۳/۵ مولار نمک، اندکی افزایش در غلظت قندها ملاحظه شد، اما در غلظت پایین‌تر یعنی ۱/۵ مولار نمک، افزایش غلظت قندها بسیار بیشتر بود. افزایش میزان قند بلافاصله بعد از اعمال تنش احتمالاً به دلیل تولید برخی قندها و نقش آن‌ها در تنظیم اسمزی هنگام مواجهه با تنش شوری باشد (Ahmed et al., 2017). در ۱۰ روز بعد از اعمال تنش، بیشترین غلظت کربوهیدرات در غلظت شوری کمتر (۱/۵ مولار نمک) مشاهده شد و با افزایش غلظت شوری کاهش معنی‌دار در غلظت کربوهیدرات مشاهده شد (شکل ۶).

بحث و نتیجه‌گیری

مقایسه نمودارهای رشد در دو گونه *Dunaliella* تخلص شده از دریاچه ارومیه نشان داد، گونه *D. viridis* دارای ظرفیت بالای رشد و تکثیر در زمان کوتاه‌تر نسبت به گونه *D. salina* است و زی‌توده بیشتری ایجاد می‌کند؛ به طوری که مقایسه غلظت‌های شوری بهینه دو گونه، نشان‌دهنده اختلاف تراکم سلولی ده برابری در دو گونه است. یافته این موضوع احتمالاً به دلیل بزرگی اندازه سلول‌های *D. salina* نسبت به *D. viridis* و تأخیر در مرحله رشد G1، جهت سنتز پروتئین‌های سیتوزولی و سایر متابولیت‌های اولیه و ثانویه مثل کارتنوئیدها برای ورود به دور بعدی تقسیم سلولی است (Ivanov et al., 2019). نتایج مشابهی در مطالعه مقایسه‌ای رشد و تکثیر و تولید رنگیزه‌های کارتنوئیدی *D. salina* و *D. viridis* استحصال شده از تالاب Hutt در استرالیا حاصل شده است (Moulton)

ارزشمند است. البته تغییرات شوری در کنار تغییرات هدفمند سایر عوامل مؤثر از جمله نور، اشعه UV، دما و شوک گرسنگی عناصر غذایی ضامن تولید کافی و رضایت بخش متابولیت مورد نظر خواهد بود.

سپاسگزاری

کلیه مراحل این تحقیق در پژوهشکده آرتمیا و آبزی‌پروری دانشگاه ارومیه انجام شده است. بدین‌وسیله از حمایت‌های مالی و معنوی ریاست وقت پژوهشکده جناب آقای دکتر ناصر آق تشکر می‌نماییم.

هیدروکسی استون فسفات لازم برای تولید اسمولیت گلیسرول را تأمین می‌کند (Ben-Amotz and Avron, 1973; Shariati and Reza, 2011). البته نتایج سنجش محتوی کربوهیدرات در مطالعه حاضر در مغایرت با نتایج مطالعه Ahmed و همکاران (۲۰۱۷) است که با افزایش شوری، افزایش غلظت کربوهیدرات را گزارش کرده‌اند. به‌طور خلاصه می‌توان نتیجه گرفت اگر دو گونه مورد مطالعه در شوری‌های بهینه خود کشت شوند یعنی *D. salina* در ۱/۵ مولار و *D. viridis* در ۳ مولار، جلبک *D. viridis* DU3 در مقایسه با *D. salina* Du1 به دلیل سرعت تکثیر بالا و قابلیت انباشتن کارتنوئید و گلیسرول به مقدار قابل توجه، گزینه مناسب‌تری برای تولید این متابولیت‌های

منابع

- ریاحی ح. ۱۳۷۳. مطالعه فلور جلبکی دریاچه ارومیه. پژوهش و سازندگی. ۷(۲۵): ۲۵-۲۳.
- سلمانی نژاد م. ۱۳۹۳. تأثیر محیط کشت و شدت نور بر رشد کارتنوئیدهای جلبک *Dunaliella salina* دریاچه ارومیه. مجله پژوهش‌های گیاهی. ۲۸(۴): ۷۷۱-۷۸۳.
- Ahmed R.A., He M., Aftab R.A., Zheng S., Nagi M., Bakri R., Wang C. 2017. Bioenergy application of *Dunaliella salina* SA 134 grown at various salinity levels for lipid production. *Scientific Reports* 7(1), 1-10.
- Ayatallahzadeh Shirazi M., Shariati F., Keshavarz A.K., Ramezanpour Z. 2015. Toxic effect of aluminum oxide nanoparticles on green micro-algae *Dunaliella salina*. *International Journal of Environmental Research* 9(2), 585-594.
- Ben-Amotz A., Avron M. 1973. The Role of Glycerol in the Osmotic Regulation of the Halophilic Alga *Dunaliella parva*. *Plant Physiology* 51(5), 875-878.
- Bobrov Z., Tracton I., Taunton K., Mathews M. 2008. Effectiveness of whole dried *Dunaliella salina* marine microalgae in the chelating and detoxification of toxic minerals and heavy metals. *Journal of Alternative and Complementary Medicine* 14, S8-S9.
- Borowitzka M.A., Siva C.J. 2007. The taxonomy of the genus *Dunaliella* (Chlorophyta, Dunaliellales) with emphasis on the marine and halophilic species. *Journal of Applied Phycology* 19(5), 567-590.
- Chen H., Jiang J.G., Wu G.H. 2009. Effects of salinity changes on the growth of *Dunaliella salina* and its isozyme activities of glycerol-3-phosphate dehydrogenase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57(14), 6178-6182.
- Chow Y.Y.S., Goh S. J. M., Su Z., Ng D., Lim C.Y., Lim N.Y.N., Lee Y.K. 2013. Continual production of glycerol from carbon dioxide by *Dunaliella tertiolecta*. *Bioresource Technology* 136, 550-555.
- Dubois M., Gilles K., Hamilton J. K., Rebers P.A., Smith F. 1956. A colorimetric method for the determination of sugars. *Nature* 168(4265), 167.
- Esmaili Dahesht L., Negarestan H., Eimanifar A., Mohebbi F., Ahmadi R. 2010. The fluctuations of physicochemical factors and phytoplankton populations of Urmia Lake, Iran. *Iranian Journal of Fisheries Sciences* 9(3), 368-381.
- Guillard R.R.L. 1975. Culture of Phytoplankton for Feeding Marine Invertebrates. In: Smith M.L. and Chanley M.H., Eds., *Culture of Marine Invertebrates Animals*, Plenum Press, New York, pp. 29-60.
- Gómez P., González M. 2005. The effect of temperature and irradiance on the growth and carotenogenic capacity of seven strains of *Dunaliella salina* (Chlorophyta) cultivated under laboratory conditions. *Biological Research* 38, 151-62.
- Ivanov I.N., Vítová M., Bišová K. 2019. Growth and the cell cycle in green algae dividing by multiple

- fission. *Folia Microbiologica* 64(5), 663-672.
- Kuhn J., Müller H., Salzig D., Czermak P. 2015.** A rapid method for an offline glycerol determination during microbial fermentation. *Electronic Journal of Biotechnology* 18(3), 252-255.
- Lichtenthaler H.K. 1987.** Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. In: *Methods in Enzymology* (Vol 148, pp. 350-382) Academic Press.
- Mendoza H., Jiménez Del Río M., García Reina G., Ramazanov Z. 1996.** Low-temperature-induced β -carotene and fatty acid synthesis, and ultrastructural reorganization of the chloroplast in *Dunaliella salina* (chlorophyta). *European Journal of Phycology* 31(4), 329-331.
- Mofeed J. 2015.** Effect of salinity and light intensity on production of β -carotene and glycerol from the halotolerant algae *Dunaliella salina* (Chlorophyta) isolated from Zarnik nature reserve, North Sinai (Egypt). *The Egyptian Journal of Experimental Biology (Botany)* 11(1), 21-29.
- Moulton T.P., Burford M.A. 1990.** The mass culture of *Dunaliella viridis* (Volvocales, Chlorophyta) for oxygenated carotenoids : laboratory and pilot plant studies. *Hydrobiologia* 204, 401-408.
- Olmos Soto J. 2015.** *Dunaliella* Identification Using DNA Fingerprinting Intron-Sizing Method and Species-Specific Oligonucleotides: New Insights on *Dunaliella* Molecular Identification. New Insights on *Dunaliella* Molecular Identification. *Handbook of Marine Microalgae: Biotechnology Advances*. pp. 559-568.
- Plattner F. 1960.** Provitamin "A" in seaweeds of Lake Rezayeh. *Acta Medica Iranica* 4, 26-29.
- Rismani S., Shariati M. 2017.** Changes of the total lipid and omega-3 fatty acid contents in two Microalgae *Dunaliella salina* and *Chlorella vulgaris* under salt stress. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 60, 17-22.
- Sijia W., Yangyang B., Qi Z., Sixue C., Jiawei M., Chunxia S., Kai C., Zhen X., Chuanfang Z., Weimin M., Hanfa Z., Mingliang Y., Shaojun D. 2017.** Salinity-Induced Palmella Formation Mechanism in Halotolerant Algae *Dunaliella salina* Revealed by Quantitative Proteomics and Phosphoproteomics. *Frontiers in Plant Science* 8, 810.
- Shariati M., Hadi M.R. 2011.** Microalgal Biotechnology and Bioenergy in *Dunaliella*. In: *Progress in Molecular and Environmental Bioengineering-From Analysis and Modeling to Technology Applications*. InTech. pp. 484-506.
- Wang Y., Hu B., Du S., Gao S., Chen X., Chen D. 2016.** Proteomic analyses reveal the mechanism of *Dunaliella salina* Ds-26-16 gene enhancing salt tolerance in *Escherichia coli*. *PLOS ONE* 11(5), 1-20.
- Wu Z., Duangmanee P., Zhao P., Ma C. 2016.** The effects of light, temperature, and nutrition on growth and pigment accumulation of three *Dunaliella salina* strains isolated from saline soil. *Jundishapur Journal of Microbiology* 9(1), 1-9.
- Yang F., Hanna MA., Sun R. 2012.** Value-added uses for crude glycerol—a byproduct of biodiesel production. *Biotechnol Biofuels* 5(1), 13.

Salinity induced high glycerol production in Urmia Lake *Dunaliella viridis* and *Dunaliella salina*

Zahra Asalpisheh^{*1}, Rashid Jamei¹, Reza Darvishzadeh², Farzaneh Noori³

¹Department of biology, Faculty of Sciences, Urmia University, Urmia, Iran.

²Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran.

³Department of Biology and Aquaculture, Artemia and Aquaculture Research Institute, Urmia University, Urmia, Iran.

*Corresponding author: z.asalpisheh@urmia.ac.ir

Received: 31. May.2023

Accepted: 17. Jul.2023

Abstract

To determine species with a high yield of biomass, carotenoids, glycerol, and carbohydrates, two *Dunaliella* species were isolated and genetically identified using ITS molecular marker from hypersaline Lake Urmia in northwest of Iran. Isolates were grown at optimal salinity then transferred to Erlenmeyer flasks contained 1.5M to 3.5M NaCl concentrations. After salinity treatment, cell growth and pigment changes were analyzed for the next two weeks. Carbohydrate and glycerol content also were measured 24 h and 10 days later. The results showed that optimal salinity for *D. salina* Dsu1 growth is 1.5 M NaCl, whereas *Dunaliella viridis* DU3 produces the highest biomass yield at 3M NaCl. Suboptimal salt concentration leads to palmella formation in *D. viridis*. *D. salina* Dsu1 produced a higher amount of carotenoids compared to *D. viridis* DU3 especially when it was cultured at 2.5 M. Moreover, a positive correlation was observed between *D. salina* intracellular glycerol amounts and elevated salinity, maximum increase (2.5 times) compared to the initial density was detected at 3 M NaCl. In *D. viridis* DU3 also up to 10 times increase in Glycerol content was observed at high NaCl concentrations (3 M and 3.5 M) compared to control. 24 hours following salinity treatment *D. viridis* showed higher carbohydrate content in all treatments, compared to *D. salina*. Intracellular carbohydrate concentration decreased by salinity elevation in both *D. salina* Dsu1 and *D. viridis* DU3 ten days afterwards. In general, considering higher speed of reproduction and higher amount of carotenoids and glycerol accumulation, *D. viridis* isolated from Urmia Lake is better option than *D. salina* for bio-production of those valuable metabolites.

Keywords: Urmia Lake, Glycerol, Carotenoids, Carbohydrate