بررسی اثر شوری بر تولید جلبک *Dunaliella salina* و تعیین میزان کاروتنوئید کل استخراج شده از آن

مهسا صالحی[1]، محمدعلی نعمت الهی[1*]، مصطفی نوروزی[2]، روزبه بزرگی[1]

[1]گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران.

[2]گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه الزهرا، تهران، ایران.

*نویسنده مسئول malahi@ut.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۲/۱ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۲/۳۰

چکیده

ریزجلبک‌ها یکی از مطمئن‌ترین منابع تولید پروتئین در جهان می‌باشند که دارای طیف گسترده‌ای از ترکیبات مفید بوده، که از این میان می‌توان به پروتئین، چربی و رنگدانه‌ها اشاره کرد. این تحقیق با هدف پرورش جلبک *Dunaliella salina* در محیط کشت‌های Modified Johansson (DUM) و Guillard (f/2) تحت استرس شوری ۱۰،۲۰،۳۰ درصد، جهت مطالعه کارایی محیط‌های کشت و اثر استرس شوری روی کلروفیل‌های a و b و کاروتنوئید کل مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که بیشترین میزان تولید کلروفیل‌های a و b به ترتیب ۰/۰۰۸± ۸/۲۰ و ۰/۰۶± ۳/۸۵ میکروگرم برمیلی‌گرم است که توسط نمونه پرورش یافته با محیط کشت DUM در شوری ۱۰٪ تولید شد. همچنین، بیشترین میزان کاروتنوئید کل ۰/۳۰ ± ۱/۷۹ میکروگرم برمیلی‌گرم به دست آمد که توسط نمونه پرورش یافته در محیط کشت f/2 و با غلظت شوری ۳۰٪ تحت استرس تولید شد. بیشترین رشد سلولی نیز ۵۲۰۴۱/۶ ± ۷۸۰۸۳۳۳ سلول در میلی‌لیتر، در شوری ۱۰٪ در محیط کشت گیلارد بود. نتایج این پژوهش نشان داد که جلبک *Dunaliella salina* وقتی تحت استرس شوری قرار گیرد منبع خوبی برای تولید کاروتنوئیدها خواهد بود.

واژگان کلیدی: محیط کشت f/2و DUM ، شوری، کلروفیل‌های a و b، کاروتنوئید کل.

مقدمه

ریزجلبک‌ها از جمله ارگانیسم‌های آبزی با اهمیت هستند که اساس زنجیره غذایی در اکوسیستم‌های آبی را تشکیل می‌دهند. ریز جلبک‌ها حاوی مقادیر بالای چربی، کاروتنوئیدها، رنگدانه‌های ارزشمند و ویتامین‌ها هستند که می‌توان از آنها در خوراک انسان، غذای دام، داروسازی و کارگاه‌های تولید سوخت‌های زیستی استفاده کرد (Guedes and Malcata, 2011; Aguirre *et al.*, 2013) همچنین با استفاده از نور خورشید، دی اکسید کربن و آب دریا قابلیت تولید ترکیبات ارزشمند از لحاظ اقتصادی را دارند (Dhanam and Dhandayuthapani, 2013). از جمله این جلبک‌ها می‌توان به جلبک دونالیلا (*Dunaliella salina*) اشاره کرد. فاکتورهای دما، شوری و مواد مغذی عوامل محدودکننده رشد آن‌ها می‌باشند (Dolatyari and Eyvazzadeh, 2020).

گیاهان مهم‌ترین تولیدکنندگان رنگدانه‌های کاروتنوئیدی در جهان هستند. تک سلولی‌ها و گیاهان عالی، هر یک سهم بسیار بزرگی را در تولید سالیانه کاروتنوئیدها را به خود اختصاص می‌دهند. جلبک سبز تک سلولی *Dunaliella salina* متعلق به راسته کلروفیت می‌باشد (Oren, 2005; Tran *et al.*, 2014). این جلبک می‌تواند تحت شرایط محدودکننده‌ای مثل شوری زیاد، دمای بالا و یا کاهش مواد مغذی مقادیر زیادی بتاکاروتن تولید کند. بنابراین در حجم بسیار زیاد کشت داده می‌شود (Raja *et al.*, 2007). اکنون از غذاهای زنده ریزجلبکی برای پرورش لارو و مراحل بعد از لارو ماهیان و همچنین پرورش زئوپلانکتون‌ها جهت تغذیه ماهیان جوان استفاده می‌شود (Chen, 2003).

گونه‌های جنس *Dunaliella*، *Chlorella* و

Spirulina از جمله گونه‌هایی هستند که به طور موفقیت‌آمیزی برای تولید لیپید، پروتئین و رنگدانه‌ها کشت داده می‌شوند (Abd El- Bakey *et al.*, 2002; El Baz *et al.*, 2002). اسیدهای چرب چند غیراشباعی حاصل از ریز جلبک‌ها نظیر اسید دیکوزاهگزانوئیک (DHA)، اسید ایکوزاپنتانوئیک (EPA) و آراشیدونیک اسید (AA) برای بیشتر لاروهای آبزیان ضروری می‌باشد (Brown, 2002). ریز جلبک‌ها چندین ویژگی کلیدی از جمله اندازه، هضم‌پذیری، رشد سریع، مقاوم نسبت به شرایط سخت، توان تولید ترکیبات سمی و نوع ترکیبات بیوشیمیایی دارند که در صنعت آبزی‌پروری، تعیین کننده ارزش غذایی آن‌ها است (FAO, 2007). از جلبک‌های میکروسکوپی (شامل *Spirulina* sp.، *Dunaliella salina*، *Haematococcus pluvialis*) به عنوان رنگدانه در پرورش میگو، ماهیان آزاد و ماهیان زینتی استفاده می‌شوند (Reshma *et al.*,2021). در پنج دهه گذشته از چند صد گونه ریزجلبک میکروسکوپی برای پرورش آزمایشگاهی میگو استفاده شده است. امروزه مشخص شده است که جلبک‌های میکروسکوپی از ۵۰-۷۰ درصد پروتئین، ۳۰ درصد لیپید، بیش از ۴۰ درصد گلیسرول، ۸-۱۴ درصد کاروتن و مقدار زیادی از انواع ویتامین‌ها تشکیل شده اند (Priyadarshani and Rath, 2012). بنابراین، با توجه به میزان تجارت کل کاروتنوئیدها، که در سال ۲۰۱۰، حدود ۱/۲میلیارد دلار برآورد شده است روز به روز بر اهمیت این مواد زیست فعال در صنایع مختلف افزوده می‌شود. با این وجود ایران هیچ سهمی در این تجارت نداشته و تنها یک واردکننده محسوب می‌شود. با توجه به اهمیت رنگدانه‌ها، علاوه بر کاربرد بسیار گسترده در صنعت شیلاتی (پرورش قزل‌آلا، میگو و ماهیان زینتی)، در صنایع غذایی نیز مطرح بوده و به دلیل داشتن خواص آنتی‌اکسیدانی، در علوم پزشکی و داروسازی مورد توجه واقع شده‌اند، با توجه به موارد فوق و اهمیت روزافزون ریزجلبک‌ها، این مطالعه به‌منظور تعیین اثر شوری‌های مختلف بر تولید جلبک دونالیلا سالینا در محیط کشت‌های گیلارد (F/2) و جانسون (DUM) و اندازه‌گیری ذخیره تراکم سلولی و کاروتنوئید کل انجام شد.

مواد و روش‌ها

جلبک دونالیلا سالینا: استوک اولیه جلبک دونالیلا سالینا جداسازی شده از دریاچه ارومیه از پژوهشکده آرتمیا گرفته شده است. با توجه به اینکه جلبک‌های دونالیلا به طور عمده هالوفیل هستند و در محیط‌های نمکی به خوبی رشد می‌کنند. به همین دلیل تیمار کنترل به این دلیل ۶۰ گرم در هزار انتخاب شد، دونالیلا سالینا غلظت نمک بالا را برای رشد بهینه ترجیح می‌دهد. همچنین اگر میزان شوری محیط کشت یا محیط طبیعی پایین‌تر از این حد باشد، محیط کشت برای رشد رقبای غذایی یا موجودات مهاجم که عامل بازدارنده برای رشد می‌باشند، فراهم می‌شود.

کشت جلبک دونالیلا سالینا با استفاده از محیط کشت گیلارد (F/2) و Modified Johnson یا DUM

بدین منظور، ابتدا استوک جلبک *D.salina* از محیط کشت جامد به محیط کشت مایع ۱۰ میلی لیتری 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 شدند. پرورش جلبک در ۳ تیمار (هر یک با ۳ تکرار) با شوری‌های مختلف انجام شد. مقادیر شوری در تیمارهای ۱،۲و۳ به ترتیب برابر با ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ گرم در هزار (PPT) در نظر گرفته شد. برای شروع تیماربندی ابتدا آب با مقادیر شوری‌های مورد نظر تهیه شد و با اتوکلاو (دما ۱۲۱/۵ درجه سانتی گراد، زمان ۱۵ دقیقه و فشار۱/۲ اتمسفر یا $15pb/inch^2$) 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

D. salina به آن اضافه شد. برای تأمین مواد مغذی جلبک *D.salina* از محیط کشت گیلارد (f/2) و DUM استفاده شد (Talebi *et al.*, 2013).

تراکم سلولی برای اندازه‌گیری رشد و سنجش میان محیط‌های کشت: برای تعیین میزان رشد سلولی و کارایی محیط کشت‌های تهیه شده، شمارش سلولی جلبک دونالیلا سالینا انجام گرفت. در همین راستا از نمونه شاهد که شوری آن ۶۰گرم در هزار نمک است یک لام گرفته شد و با استفاده از لام نئوبار یا هماسیتومتری میزان تراکم آن از فرمول ۱ به‌دست آمد که میزان تراکم و رشد سلولی جلبک در این دو محیط کشت سنجیده شد. نمونه‌گیری‌ها برای سنجش میزان رشد و بررسی کارایی محیط‌های کشت به این صورت بود که بعد از القاء ۱۰ درصد اینوکلوم جلبک تراکم آن به مدت ۴ روز سنجیده شد، همچنین ۴ روز قبل از برداشت بیوماس هم این شمارش توسط لام نئوبار انجام گرفت.

شمارش سلولی توسط لام نئوبار(هموسیتومتر) با استفاده از رابطه زیر محاسبه شد:

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

سانتریفیوژ کردن و تهیه بیوماس: برای جداسازی آب و نمک جلبک دونالیلا سالینا کشت داده شده در شوری‌های زیاد حتما باید از دورهای بالای سانتریفیوژ و زمان‌های بیشتر استفاده نمود. بدین منظور در نمونه شاهد که با شوری ۶۰ در هزار کشت داده شده بود سرعت دستگاه روی ۶۰۰۰rpm و زمان انجام کار ۶ دقیقه بود و بیوماس تهیه شده تنها یک مرتبه با آب مقطر شستشو داده شد. اما در تیمارهای با شوری بیشتر به دلیل اینکه جلبک به سختی از آب و نمک جدا می‌شود ، لذا سانتریفیوژ با سرعت ۷۰۰۰ برای ۷ دقیقه با ۲ بار شستشو دادن برای تیمار با شوری ۱۰۰ انجام گرفت که نتایج آن مطلوب بود، همین طور برای شوری ۲۰۰ گرم در هزار سانتریفیوژ با سرعت ۸۰۰۰ دور برای ۸ دقیقه انجام گرفت اما به خاطر داشتن مقادیر بالاتری از نمک، شستشو ۳ مرتبه صورت گرفت. برای تیمار شوری ۳۰۰ در هزار این سرعت سانتریفیوژ اما در مرتبه ابتدایی ۱۰۰۰۰rpm مدت ۸ دقیقه انتخاب شد که از مرتبه اول شستشو به ۹۰۰۰ رسید و تا مرتبه نهایی شستشو که ۴ مرتبه صورت گرفت با همین روند صورت گرفت.

آماده‌سازی و نگهداری بیوماس جلبک: بعد از سانتریفیوژ و شستشو برای نمک‌زدایی بیوماس تهیه شده وزن شده و در فالکون‌های ۵۰ استریل ریخته شد سپس برای نگهداری به بخش مرکز ذخایر ژنتیک جهاد دانشگاهی تحویل داده شد. بعد از فرآیند لیوفلیز که یک نوع روش نگهداری به روش سرد است (Jennings, 1999)، بیوماس فریز شده در یخچال نگهداری شد تا برای مرحله استخراج کاروتنوئید آماده شود.

استخراج کاروتنوئید: برای به انجام رساندن فرآیند استخراج، ابتدا ۱۰۰میلی‌گرم از بیوماس لیوفلیز شده توسط ترازوی یک ده هزارم وزن‌کشی، جدا و داخل یک ظرف ۱۰۰ میلی‌لیتری تیره منتقل شد. برای انجام فرایند استخراج، از دو حلال n- هگزان و متانول با استفاده از روش انجام شده توسط (Eimhjellen and Liaaen-Jensen,1964) صورت گرفت، نسبت حلال‌های n- هگزان به متانول ۱:۲ انتخاب شد. لایه سوپرناتانت که حاوی ماده استخراج شده مورد نظر (کاروتنوئیدها و کلروفیل‌های a,b) است با استفاده از پیپت یا با استفاده از سمپلر استریل جداسازی شد. به منظور انجام آرمایش روی محلول استخراج شده حلال اضافی (n - هگزان) جدا شد. همچنین به منظور خشک شدن و نگهداری، سوپرناتانت برداشته و وارد گوی دستگاه روتاری مجهز به پمپ خلاء، شد.

اندازه گیری کاروتنوئید کل و کلروفیل a و b: برای اندازه‌گیری کاروتنوئید کل و کلروفیل a و b از دستگاه اسپکتروفتومتری T80+ UV/VIS Spectrometer موجود در مرکز ملی ذخایر ژنتیک جهاد دانشگاهی استفاده شد. بدین منظور پس از خشک کردن مواد استخراج شده توسط وکیوم دستگاه روتاری و نگهداری آن‌ها در فریزر، هنگام اندازه‌گیری

جدول ۱- میانگین داده‌های حاصل از کشت جلبک *Dunaliella salina* در محیط کشت DUM به مدت ۳۰ روز.

تیمارها	شوری (%)	کلروفیل a (µg/mg)	کلروفیل b (µg/mg)	کاروتنوئید کل (µg/mg)	تراکم سلولی (سلول در میلی‌لیتر)
۱	۶	۱/۴۸ ± ۰/۰۳^{a}	۱/۲۹ ± ۰/۰۲^{b}	۰/۱۰ ± ۰/۰۳^{a}	۵۸۰۰۰۰۰ ± ۰/۰۰۱^{d}
۲	۱۰	۸/۲۰ ±۰/۰۰۸^{d}	۳/۸۵ ±۰/۰۶^{c}	۰/۹۵ ± ۰/۰۶^{b}	۳۳۹۶۰۰۰ ± ۶۰۰۰/۸۳^{c}
۳	۲۰	۳/۷۱ ±۰/۰۱^{c}	۰/۰۳ ± ۰/۰۰۱^{a}	۱/۰۷ ±۰/۰۲^{c}	۲۱۹۸۷۶۶ /۶۶± ۱۰۹۹/۲۸^{b}
۴	۳۰	۳/۶۰ ±۰/۰۲^{b}	۰/۰۲ ± ۰/۰۰۲^{a}	۱/۳۸ ±۰/۰۲^{d}	۱۴۴۹۵۶۶ ± ۴۰۴/۱۴^{a}

*حروف متفاوت در هر ردیف نشانه وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارهای مورد مطالعه است ($P<۰/۰۵$).

که ۲۴ ساعت پس از خشک شدن توسط کارشناس در نظر گرفته شد، به ماده استخراج شده کمی حلال n- هگزان اضافه شد سپس محلول به‌دست آمده به داخل کووت‌های تیره مخصوص توسط سمپلر ۱ سی‌سی تزریق شد. برای اندازه‌گیری میزان کاروتنوئید و مشخص شدن اینکه کدام پیک متعلق به کاروتنوئید کل، کلروفیل a و کدام کلروفیل b است از روش Sumanta و همکاران(2014) استفاده شد تا طول موج‌های مناسب برای اندازه‌گیری پارامترهای مورد نظر به‌دست آید.

$$\text{Ch-a}=16.72A_{665.2}-9.16A_{652.4}$$
$$\text{Ch-b}=34.09A_{652.4}-15.28A_{665.2}$$
$$\text{C x+c}=(1000A_{470}-1.63C_a-104.96C_b)/221$$

فرمول۲- طریقه محاسبه کلروفیل‌ها و کاروتنوئید کل؛

Ch-a= کلروفیل a ، Ch-b= کلروفیل b و C x+c= کاروتنوئید کل

بر اساس Sumantha و همکاران (2014) جذب طیف نوری ۶۶۵/۲ نانومتر متعلق به کلروفیل a، ۶۵۲/۴ نانومتر متعلق به کلروفیل b و جذب طیف نور با طول موج ۴۷۰ نانومتر متعلق به کاروتنوئیدها در نظر گرفته شد.

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

نتایج

جدول ۱، داده‌های به‌دست آمده از استخراج کاروتنوئید و کلروفیل روی جلبک *Dunaliella salina* پرورش یافته در محیط کشت DUM از نظر معنی‌دار بودن ارائه شد ($P<۰/۰۵$) (جدول۱).

محیط کشت DUM: بعد از تحویل گرفتن استوک اولیه جلبک دونالیلا سالینا، به‌منظور داشتن اینوکلوم با تراکم خوب جلبک در شوری ۶۰ گرم نمک (۶ درصد) در ۱۰۰۰ سی‌سی محیط کشت DUM کشت داده شد. در هنگام پرورش و با استفاده از محیط کشت DUM در روزهای ابتدایی کشت در تیمار شوری۱۰درصد فاز توقف کمتر از ۲۴ ساعت طول کشید و جلبک‌ها به سرعت شروع به رشد و تکثیر نمودند اما برای تیمارهای دیگر متفاوت دیده شد به طوری که تیمار شوری ۲۰ درصد نزدیک به ۳روز و تیمار شوری ۳۰ درصد نزدیک به ۶ تا ۸ روز زمان سپری تا توانستند با شرایط استرس شوری سازگار و شروع به رشد کنند و از فاز سکون وارد فاز تکثیر لگاریتمی شوند.

شمارش سلولی نشان داد که هرچه میزان غلظت نمک در محیط کشت بالاتر برود، افزایش غلظت نمک به عنوان یک عامل بازدارنده در زمان رشد و تکثیر سلول‌های جلبک دونالیلا سالینا عمل کرده و رشد و نمو این جلبک را محدود و یا متوقف می‌سازد، به طوری که با اینکه اینوکلوم القا شده در ابتدا تراکم نسبتاً بالایی داشت، اما بیشترین تراکم دیده شده در بین جلبک‌های پرورش یافته در بازه زمانی ۳۰ روزه به‌دست آمد که این مقدار به ۴ میلیون سلول در میلی لیتر هم نرسید البته کاهش این میزان با افزایش غلظت نمک به صورت شفاف مشاهده شد. با افزایش

جدول ۲- میانگین داده‌های حاصل از کشت جلبک *Dunaliella salina* در محیط کشت f/2 به مدت ۳۰ روز.

تیمارها	شوری (%)	کلروفیل a (µg/mg)	کلروفیل b (µg/mg)	کاروتنوئید کل (µg/mg)	تراکم سلولی (سلول در میلی‌لیتر)
۱	۶	۱/۴۸ ± ۰/۰۳^{ab}	۱/۲۹ ± ۰/۰۲^{c}	۰/۱۰ ± ۰/۰۳^{a}	۵۸۰۰۰۰۰ ± ۰/۰۰۱^{c}
۲	۱۰	۱/۹۴ ± ۰/۸۳^{b}	۰/۱۸ ± ۰/۱۹^{a}	۰/۴۱ ± ۰/۳۲^{a}	۷۸۰۸۳۳۳/۳ ± ۵۲۰۴۱/۶۴^{e}
۳	۲۰	۷/۹۶ ±۱/۳۳^{d}	۰/۲۱ ± ۰/۱۲^{a}	۱/۷۲ ± ۰/۲۲^{b}	۶۵۰۰۰۰۰ ±۵۰۰۰۰^{d}
۴	۳۰	۳/۷۱ ±۰/۱۰^{c}	۰/۰۶ ± ۰/۰۰۹^{a}	۱/۷۹ ± ۰/۳۰^{b}	۳۵۳۳۳۳۳/۳ ± ۲۸۸۶۷/۵۱^{b}

*حروف متفاوت در هر ردیف نشانه وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارهای مورد مطالعه است ($P<۰/۰۵$).

غلظت شوری در تیمارها افزایش میزان کاروتنوئید کل به خوبی دیده شد. همچنین به‌منظور مقایسه درست میزان کاروتنوئید کل، نمونه شاهد هم اندازه‌گیری شد که میزان آن۰/۱ بود و با افزایش شوری در تیمار ۲ که شوری آن ۱۰٪ است میزان ذخیره کاروتنوئید به ۰/۰۶ ± ۰/۹۵ رسید که این میزان برای تیمار ۳ با شوری ۲۰٪ افزایش یافته و به ۰/۰۲± ۱/۰۷ و برای تیمار ۴ با غلظت نمک ۳۰٪ به ۰/۰۲± ۱/۳۸ رسید که افزایش معنی‌داری را نشان داد ($P<۰/۰۵$) (جدول۱).

در نتایج حاصل از آنالیز داده‌های به‌دست آمده از شمارش‌های سلولی قبل از برداشت تراکم سلولی تیمار ۱۰درصد با ۳ تکرار ۶۰۰۰/۸۳ ± ۳۳۹۶۰۰۰، برای تیمار با شوری ۲۰درصد و با ۳ تکرار۱۰۹۹/۲۸ ±۶۶/ ۲۱۹۸۷۶۶ و برای تیمار با شوری ۳۰ درصد و ۳ تکرار ۴۰۴/۱۴ ± ۱۴۴۹۵۶۶ بود که با افزایش شوری محیط‌های کشت از میزان تراکم سلولی جلبک *Dunaliella salina* کاسته شده است. همراه با کشت در محیط DUM جلبک *Dunaliella salina* در محیط کشت گیلارد (f/2) نیز کشت داده شد و از نظر رشد و تراکم سلولی، کلروفیل a و b و میزان ذخیره کاروتنوئید مورد سنجش قرار گرفت که نتایج حاصل از آن در جدول ۲ ارایه شده است (جدول۲).

محیط کشت f/2: بعد از تهیه استوک اولیه از جلبک، محیط‌های کشت با غلظت نمک‌های معین شده تیماربندی شد، اینوکلوم به محیط‌های کشت القا گردید که مانند روش کشت جانسون در محیط کشت گیلارد هر تیمار فاز توقف و رشد لگاریتمی خود را طی نمود و طی دوره کشت ۳۰ روزه به تراکم رسید. با استفاده از محیط کشت گیلارد تراکم جلبک طی دوره کشت در غلظت نمک ۱۰٪ رشد چشمگیری داشت به‌طوری که حتی از استوک اولیه هم بیشتر شد اما دقیقاً مثل محیط کشت جانسون هرچه غلظت NaCl در محیط بیشتر شد میزان تراکم کاهش یافت به‌طوری که از نزدیک به ۸ میلیون سلول در میلی‌لیتر به ۳/۵ میلیون سلول در میلی‌لیتر رسید.

برخلاف نتایج به‌دست آمده از نمونه‌های پرورش یافته با محیط کشت جانسون، نتایج نشان داد که با وجود اینکه روند رشد کلروفیل از نمونه شاهد به تیمار ۲ که غلظت ۱۰٪ دارد حفظ شده اما تیماری که بیشترین میزان کلروفیلa را نشان می‌دهد تیمار ۳ با غلظت نمک ۲۰٪ با مقدار µg/mg ۸ است که در شوری‌های خیلی بالا و تحت استرس شدید این میزان کمتر می‌شود. همانطور که در جدول ۲ مشخص شد پراکندگی کلروفیل b در این محیط کشت در ابتدا با افزایش غلظت نمک از ۶٪ به ۱۰٪ کاهش یافته اما در غلظت ۲۰٪ این نرخ رشد داشته ولی در غلظت ۳۰٪ با کاهش نزولی همراه بود.

بحث

در این پرورش طی دوره ۳۰ روزه در تیمارهای با شوری ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ گرم در هزار و با ۳ تکرار انجام گرفت. طبق نتایج به‌دست آمده از این پژوهش، میزان کلروفیل a تیمارهای مختلف در زمان استفاده از محیط کشت جانسون با افزایش غلظت شوری کاهش یافته البته این کاهش بین تیمارهای با شوری

۱۰۰ گرم در هزار با بقیه تیمارها و حتی تیمار شاهد اختلاف بسیار زیادی داشت به‌طوری که در تیمار ۱۰۰گرم در هزار میانگین آن ۸/۲۰ µg/mg ولی در تیمار ۲۰۰ و ۳۰۰ به ترتیب به ۳/۷۱ و ۳/۶۰ رسید که به دلیل تراکم سلولی بالا در نمونه ۱۰۰ بود ($P<۰/۰۵$) (جدول ۱).

طبق داده‌های به‌دست آمده از تیمارهای پرورش یافته با محیط کشت گیلارد، سطح کلروفیل a در مورد تیمار با غلظت شوری ۱۰۰ گرم در هزار نسبت به تیمار شاهد با شوری ۶۰ گرم نمک در هزار تغییر چندان زیادی نداشت و فقط از غلظت ۱/۴۸ µg/mg به ۱/۹۴ µg/mg تغییر داشت، اما در تیمار با غلظت نمک ۲۰۰ گرم در هزار میزان کلروفیل نوع a به بیشترین حد خود در بین تیمارهای محیط کشت گیلارد به مقدار ۷/۹۶ µg/mg رسید، که اختلاف معنی‌داری با سایر تیمارهای محیط کشت گیلارد داشت ($P<۰/۰۵$). کلروفیل b هم نسبت به تغییرات محیطی و عوامل بازدارنده تحت تاثیر قرار گرفت و مقدار آن با افزایش غلظت شوری در ابتدا افزایش اما با ادامه روند کاهش داشت. در محیط کشت جانسون بیشترین حد کلروفیل b در تیمار با شوری ۱۰۰ گرم در هزار در حالی که در محیط کشت گیلارد در شوری ۲۰۰ گرم در هزار مشاهده شد. همچنین میزان ذخیره کاروتنوئید کل جلبک افزایش معنی‌داری با نمونه شاهد در هر دو محیط کشت نشان داد ($P<۰/۰۵$) به طوری‌که میزان آن از ۰/۱ در نمونه شاهد به ۱/۳۸ در تیمار با شوری ۳۰۰ گرم در هزار محیط کشت جانسون و ۱/۷۹ در تیمار ۳۰۰ محیط کشت گیلارد رسید. این تفاوت بین تیمار شاهد و تیمار ۳۰۰ محیط کشت گیلارد بسیار بیشتر بود و به خوبی تولید کاروتنوئید در اثر قرار گرفتن تحت استرس شوری زیاد را نشان داد.

Arun and Singh(2013) در بررسی بین گونه‌های *Dunaliella salina* و *Dunaliella tertiolecta* به منظور پی بردن به بیشترین رشد سلولی را برابر تغییر شوری، پرورش جلبک را محیط کشت‌هایی با غلظت‌های مختلف مورد مطالعه قرار دادند. نتایج آن‌ها نشان داد که با افزایش شوری، نرخ افزایش تعداد سلول‌ها کاهش می‌یابد و همچنین مشاهده نمودند که جلبک *Dunaliella tertiolecta* و *Dunaliella salina* به ترتیب در شوری ۶ درصد و ۱۵ درصد بیشترین رشد سلولی اتفاق می‌افتد. همچنین آن‌ها مشاهده کردند که میزان کلروفیل a هم در پایان یک دوره کشت ۳۰ روزه و با افزایش غلظت نمک در محیط کشت کاهش چشمگیری داشت.

جلبک سبز دونالیلا که از نظر صنعتی یک گونه مهم محسوب می‌شود به دلیل افزایش نرخ رشد و تولید کاروتنوئید، مورد اهمیت واقع شده است (Bhalamurugan *et al.*, 2018). این جلبک در شرایط نامناسب با تولید رنگدانه بتاکاروتن در واقع کربن‌های حاصل از فتوسنتز را در ساختار خود ذخیره می‌کند اما این اتفاق زمانی رخ می‌دهد که عمل تثبیت کربن حاصل از فتوسنتز هنوز ادامه داشته باشد (Borowitzka and Larkum, 1987). همچنین برای تنظیم فشار اسمزی از تولید مکانیسم‌هایی مثل گلیسرول و بتاکاروتن استفاده می‌کند (Borowitzka *et al.*, 1990). در استخراج کاروتنوئیدها نیز نوع حلال استفاده شده روی میزان رنگدانه‌های استخراجی از جلبک‌ها تاثیر مستقیم دارد. Macías- Sánchez و همکاران (2009) بیان کردند که استفاده از حلال دی متیل سولفور اکساید (DMSO) برای استخراج کاروتنوئید و به خصوص بتاکاروتن از جلبک دونالیلا نسبت به استفاده از حلال متانول به تنهایی کارایی بیشتری دارد. بر این اساس، در این پژوهش نیز با استفاده از حلال‌های n- هگزان و متانول با نسبت ۱:۲ نتایج مشابه و کاملاً مثبتی مشاهده شد.

به دلیل میزان ماندگاری و تثبیت بیشتر KNO_3 در محیط کشت، در ساختار محیط کشت گیلارد از $NaNO_3$ و در ساختار محیط کشت DUM از KNO_3 استفاده می‌شود در مدت زمان مشابه میزان مصرف $NaNO_3$ از KNO_3 نیز بیشتر است. این امر

باعث می‌شود تا در ابتدا میزان رشد جلبکی که در محیط کشتی که $NaNO_3$ حضور دارد زودتر رشد کند به همین دلیل میزان مواد نیتراته در این محیط کشت‌ها سریعتر خالی شده و پس از مدتی جلبک دچار شوک مواد مغذی می‌شود که در بررسی Ben-Amotz و Avron (1989) شوک غذایی را عامل تحریک تولید کاروتنوئید به خصوص بتاکاروتن و گلیسرول عنوان کرده‌اند. دلیل دیگر این است که با تثبیت KNO_3 در محیط کشت پس از مصرف آن pH آب کاهش می‌یابد که این کاهش در نهایت، عامل بازدارنده رشد خواهد بود. بنابراین، تحت شدت نور بالا با افزایش غلظت KNO_3 به صورت موثری میزان بتا کاروتن ذخیره شده در سلول افزایش می‌یابد (Reshma *et al.*, 2021). شدت نور بالا برای تولید بتا کاروتن مناسب است ولی میزان بیوماس را کاهش می‌دهد که نشان دهنده اینست که استرس محدود شدن نیترات سبب تولید بتاکاروتن بود.

Wu و همکاران (2015) گزارش کردند که تحت شدت بالای نور میزان کاروتنوئید افزایش می‌یابد که سبب محافظت از سلول جلبک در برابر صدمه‌های محیطی است. نتایج پژوهش حاضر با نتایج به‌دست آمده از تحقیق Rad و همکاران (2011) همخوانی داشت. بنابراین، میزان رشد و تراکم سلولی جلبک‌های نوع دونالیلا با افزایش غلظت نمک محیط زیست می‌تواند یک عامل باز دارنده برای رشد باشد، اگرچه در شوری‌های تا نزدیک ۱۲۰ گرم در هزار روند رشد آن‌ها بسیار زیاد است.

Chen و Jiang (2009) با بررسی روی جلبک دونالیلا سالینا به این نتیجه رسیدند که با افزایش غلظت نمک در محیط کشت جلبک، میزان تراکم سلولی کاهش می‌یابد. در این مطالعه تیمارها از شوری ۲۹/۲۵ گرم در هزار تا شوری ۳۲۱/۵ در نظر گرفته شده بود که روند رشد در ابتدای این بازه شوری کم بود ولی هرچه به غلظت شوری ۱۰۰ گرم در هزار نزدیک‌تر می‌شد این افزایش چشمگیرتر بود. نتایج همچنین نشان داد که بهترین شوری برای رشد سلولی و افزایش تراکم سلولی برای جلبک دونالیلا سالینا ۱۱۷ در هزار است این نتایج در مطالعه Ben Amotz و Avron (1989) هم تکرار شد و آن‌ها بیان داشتند که بهترین غلظت شوری برای افزایش رشد سلولی در جلبک ۱۱۷ گرم در هزار است. اما میزان بهینه در تحقیق Raja و همکاران (۲۰۰۴) ۱۱۹/۳۴گرم در هزار به دست آمد که با نتایج بعدی زیاد تفاوت نداشت و با نتایج به‌دست آمده در مطالعه حاضر همخوانی داشت. از طرفی، این افزایش رشد سلولی تا غلظت ۱۱۷ گرم در هزار و کاهش روند با افزایش بیشتر غلظت شوری می‌تواند به دلیل صرف انرژی بیشتر جهت مقابله با فشار ناشی از تنظیم اسمزی خود با محیط غلیظ‌تر به جای رشد و تکثیر سلولی باشد (Richmond, 2004).

De jesus و Maciel (2010) نیز در بیان توجیه برای کاهش رشد سلول‌های جلبک و تراکم سلول‌های جلبک *Dunaliella salina* در صورت تحمل استرس‌های متفاوت به خصوص استرس در معرض محیط نمکی بیان کردند که اگر سلول جلبکی در یک محیط با غلظت بیشتر قرار بگیرد و جریان اسمزی برقرار باشد آب درون سلول از داخل آن تراوش کرده و این امر باعث مرگ سلول و کاهش میزان تراکم سلولی در شوری‌های زیادتر می‌شود بنابراین سلول‌های ریز جلبک‌ها در هنگام مواجهه با این پدیده‌ها، رنگدانه که از مهمترین آن‌ها کارتنوئیدها (بتاکاروتن) است، تولید می‌کنند. از طرف دیگر، می‌تواند بر روی رشد و تکثیر و در نتیجه روی وزن خشک جلبک هم تاثیر مستقیم بگذارد. چرا که وقتی عامل محدودکننده در محیط از یک حدی بیشتر باشد، قسمت بزرگی از انرژی جلبک صرف مقابله با آن عامل استرس‌زا می‌شود و این دلیلی مبنی بر اینکه در غلظت‌های بالای نمک میزان تراکم سلولی جلبک افت زیادی داشته باشد، است. غلظت بالای نمک همچنین روی میزان رنگدانه‌های فتوسنتزکننده جلبک *D. salina* هم تاثیر منفی می‌گذارد و میزان آن‌ها کاهش می‌یابد.

نتیجه‌گیری

به عنوان نتیجه‌گیری کلی می‌توان چنان اظهار کرد که با افزایش غلظت نمک در محیط کشت جلبک *D. salina* به عنوان عامل محدودکننده موجب شد که جلبک به منظور مقابله با استرس برخی ترکیبات ساختار سلولی خود را تغلیظ یا تولید کند بنابراین، افزایش غلظت نمک در محیط کشت جلبک *D. salina* باعث افزایش میزان ذخیره کاروتنوئید کل جلبک شد که این امر می‌تواند به دلیل سازگاری با عوامل محدود کننده و حفظ بقا خود باشد.

منابع

Abd El-Baky H.H. Moawd A., El-Behairy A.N. and El-Baroty G.S. 2002. Chemoprevention of enzo[a]pyrene-induced carcinogen and lipid peroxidation in mice by lipophilic algae extracts (phycotene). *Journal of Medical Sciences* 2, 185–193.

Aguirre A.M., Bassi A., Saxena P. 2013. Engineering challenges in biodiesel production from microalgae. *Critical Reviews in Biotechnology* 33(3), 293-308.

Arun N., Singh D.P. 2013. Differential response of *Dunaliella salina* and *Dunaliella tertiolecta* isolated from brines of Sambhar Salt Lake of Rajasthan (India) to salinities: a study on growth, pigment and glycerol synthesis. *Journal of the Marine Biological Association of India* 55(1), 65-70.

Ben-Amotz A., Shaish A., 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.

Bhalamurugan G.L., Valerie O., Mark L. 2018. Valuable bioproducts obtained from microalgal biomass and their commercial applications: a review. *Environmental Engineering Research* 23, 229-241.

Borowitzka M.A., Borowitzka L.J., Kessly D. 1990. Effects of salinity increase on carotenoid accumulation in the green alga *Dunaliella salina*. *Journal of applied Phycology* 2(2), 111-119.

Borowitzka M.A., Larkum A.W.D. 1987. Calcification in algae: mechanisms and the role of metabolism. *Critical Reviews in Plant Sciences* 6(1), 1-45.

Brown M.R. 2002. *Nutritional Value of Microalgae for Aquculture*. In: Cruz-Suárez, L. E., Ricque-Marie D., Tapia-Salazar M., Gaxiola-Cortés M.G., Simoes N. (Eds.). Avances en Nutrición Acuícola VI. Memorias del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 3 al 6 de Septiembre del 2002. Cancún, Quintana Roo, México.

Chen H., Jiang J.G. 2009. Osmotic responses of *Dunaliella* to the changes of salinity. *Journal of Cellular Physiology* 219(2), 251-258.

Chen Y.C. 2003. Immobilized *Isochrysis galbana* (Haptophyta) for long-term storage and applications for feed and water quality control in clam (Meretrix lusoria) cultures. *Journal of Applied Phycology* 15(5), 439-444.

De Jesus S.S., Maciel Filho R. 2010. Modeling growth of microalgae *Dunaliella salina* under different nutritional conditions. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology* 6, 279-283.

Dhanam D.S., Dhandayuthapani K. 2013. Original Research Article Optimization of-Carotene production by Marine Microalga-*Dunaliella salina*. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 2(3), 37-43.

Dolatyari A., Eyvazzadeh O. 2020. Evaluation of culture conditions of *Donalilla salina* on its antioxidant content. *Nurse and Physician within War* 8(29), 54-65.

Eimhjellen K.E., Jensen S.L. 1964. The biosynthesis of carotenoids in *Rhodopseudomonas gelatinosa*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* 82(1), 21-40.

EL-Baz F.K., Aboul-Enein M.A., El-Baroty G.S., Youssef A.M., Abd El-baky H.H. 2002. Accumulation of antioxidant vitamins in *Dunaliella salina* 2, 220-232.

FAO. 2007. Manual on the production and use of Live Food for Aquaculture. Newyork, UN. 2007.

Guedes C.A., Malcata F.X. 2011. *Bioreactors: Design, Properties and Applications*, In: Antolli P.G., Liu Z. (Eds.), Bioreactors: Design, Properties and Applications, Nova Science Publishers. 1-51.

Jennings T.A. 1999. Lyophilization: introduction and basic principles. CrC Press.

Macías-Sánchez M.D., Mantell C., Rodriguez M.D.L., de la Ossa E.M., Lubián L.M., Montero O. 2009. Comparison of supercritical fluid and ultrasound-assisted extraction of

carotenoids and chlorophyll a from *Dunaliella salina*. *Talanta* 77(3), 948-952.

Oren A. 2005. A hundred years of *Dunaliella* research: 1905-2005. *Saline Systems* 1(1): 2.

Priyadarshani I., Rath B. 2012. Commercial and industrial applications of micro algae–A review. *Journal of Algal Biomass Utilization* 3(4), 89-100.

Pulz O. 2001. Photobioreactors: production systems for phototrophic microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology* 57(3), 287-293.

Rad F.A., Aksoz N., Hejazi M.A. 2011. Effect of salinity on cell growth and β-carotene production in *Dunaliella* sp. isolates from Urmia Lake in northwest of Iran. *African Journal of Biotechnology* 10(12), 2282-2289.

Raja R., Anbazhagan C., Ganesan V., Rengasamy R. 2004. Efficacy of *Dunaliella salina* (Volvocales, Chlorophyta) in salt refinery effluent treatment. *Asian Journal of Chemistry* 16(2), 1081.

Raja R., Hemaiswarya S., Rengasamy R. 2007. Exploitation of *Dunaliella* for β-carotene production. *Applied Microbiology and Biotechnology* 74, 517-523.

Reshma R., Devi K.C., Kumar S.D., Santhanam P., Perumal P., Krishnaveni N., Kim M. K. 2021. Enhancement of pigments production in the green microalga *Dunaliella salina* (PSBDU05) under optimized culture condition. *Bioresource Technology Reports* 14, 100672.

Richmond A. 2004. Biological principles of mass cultivation. In: Richmond A (ed) Microalgal culture: *Biotechnology and Applied Phycology*. Blackwell Science, Oxford, pp: 125-177.

Sumanta N., Haque C.I., Nishika J., Suprakash R. 2014. Spectrophotometric analysis of chlorophylls and carotenoids from commonly grown fern species by using various extracting solvents. *Research Journal of Chemical Sciences*. 2231.

Talebi A.F., Mohtashami S.K., Tabatabaei M., Tohidfar M., Bagheri A., Zeinalabedini M., Mirzaei H.H., Mirzajanzadeh M., Shafaroudi S.M., Bakhtiari S. 2013. Fatty acids profiling: a selective criterion for screening microalgae strains for biodiesel production. *Algal Research* 2(3), 258-267.

Tran D., Doan N., Louime C., Giordano M., Portilla S. 2014. Growth, antioxidant capacity and total carotene of *Dunaliella salina* DCCBC15 in a low cost enriched natural seawater medium. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 30(1), 317-322.

Wu Z., Akter R., Arirob W., Juntawong N., Ma, C. and Duangmanee, P. 2015. Effects of light intensity and the remaining nitrate concentration on the beta-carotene accumulation of a wild *Dunaliella salina* strain isolated from the saline soil. *Microbiology Research* 6(1).

Evaluation of the effect of salinity on *Dunaliella salina* production and determination of total carotenoid extracted from it

Mahasa Salehi[1], Mohammad Ali Nematollahi[1*], Mostafa Noroozi[2], Roozbeh Bozorgi[1]

[1]Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran.
[2]Department of Biotechnology, Faculty of Biological Sciences, Alzahra University, Tehran, Iran.
*Corresponding author: malahi@ut.ac.ir

Received: 2022/4/21 Accepted: 2022/5/20

Abstract

Microalgae are one of the safest sources of protein production in the world that have good sources of a wide range of beneficial compounds, including proteins, fats and pigments. This research aims to use the cultivation of *Dunaliella salina* in Modified Johansson (DUM) and Guillard (f/2) media under salinity stress of 10, 20, 30%, culture media efficiency and the effect of salinity stress on Chlorophylls a and b as well as total carotenoids should be investigated. The results showed that the highest production of Chlorophylls a and b are 8.20±0.008 and 3.85±0.06 µg/mg, respectively, which is produced by the sample grown with DUM medium at 10% salinity. Also, the highest amount of carotenoids was 1.79±0.30 µg/mg which was produced by the sample grown in culture medium f/2 with a salinity concentration of 30% under stress. The highest cell growth was 7808333±52041/6 cells/ml at 10% salinity in Gillard culture medium. The results of this study showed that *Dunaliella salina* algae is a good source of carotenoids when exposed to salinity stress.

Keywords: Culture medium f/2 and DUM, Salinity, Chlorophyll a and b, Total carotenoids.