

مقاله علمی - پژوهشی:

ارزیابی میزان رشد، توده زنده و محتوای رنگدانه‌های جلبک *Dunaliella salina* پرورش یافته در آبهای ژرف سیستان

علی خسروانی‌زاده^{*}، عبدالعلی راهداری^۱، ساحل پاکزاد توچایی^۲

*Khosravani.ali@uoz.ac.ir

۱- گروه شیلات، پژوهشکده تالاب بین‌المللی هامون، دانشگاه زابل، زابل، ایران

۲- گروه مدیریت اکوسیستم‌های طبیعی، پژوهشکده تالاب بین‌المللی هامون، دانشگاه زابل، زابل، ایران

تاریخ دریافت: آذر ۱۴۰۰

تاریخ پذیرش: دی ۱۴۰۰

چکیده

در این مطالعه میزان رشد، توده زنده، محتوای کلروفیل a و b و غلظت کارتنوئیدهای ریزجلبک *Dunaliella salina* کشت شده در ۵ تیمار مختلف (تیمار ۱: آب شهر به همراه نمک ۳۵ قسمت در هزار، تیمار ۲: آب شهر با نمک ۲۰ قسمت در هزار، تیمار ۳: آب ژرف با نمک ۳۵ قسمت در هزار، تیمار ۴: آب ژرف تغلیظ شده ۳۵ قسمت در هزار و تیمار ۵: آب ژرف ۲۰ قسمت در هزار)، در شرایط یکسان از نظر شدت نور ($33/75 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)، رژیم نوری (۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی)، دما (25 ± 1 درجه سانتی‌گراد)، pH (۸)، محیط کشت (جانسون) و هوادهی (۲۴ ساعته) به مدت ۲۴ روز مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس نتایج به‌دست آمده کمترین میزان نوسان pH در تیمارهای ۳، ۴ و ۵ (تیمارهای دارای آب ژرف) مشاهده شد. به‌علاوه، تیمارهای ۳، ۴ و ۵ وضعیت بهتری از نظر نمودار رشد داشتند و تا روز ۲۱ آزمایش روند صعودی رشد در آنها دیده شد. حداکثر تعداد سلول (R) در تیمارهای ۳، ۴ و ۵ در روز ۲۱ آزمایش ثبت شد که ۹ روز بیشتر از سایر تیمارها (تیمارها ۱ و ۲) بود. کمترین تعداد سلول شمارش شده، کمترین میزان جذب نوری، کمترین نرخ رشد ویژه (SGR)، کمترین زمان دو برابر شدن (DT)، کمترین زی‌توده خشک و بالاترین تعداد تقسیم سلولی در روز (k) برای تیمار ۲ ثبت شد. بالاترین میزان زی‌توده تولیدی در تیمار ۴ مشاهده شد. بالاترین و پایین‌ترین میانگین غلظت کلروفیل a به‌ترتیب در تیمارهای ۴ و ۲ دیده شد درحالی‌که بیشترین و کمترین میانگین غلظت کلروفیل b به‌ترتیب در تیمارهای ۲ و ۱ ثبت شد. بالاترین و پایین‌ترین میانگین غلظت کارتنوئیدها به‌ترتیب در تیمارهای ۱ و ۲ به‌دست آمد. بنابراین، طبق نتایج این مطالعه امکان استفاده از آب ژرف برای پرورش جلبک *D.salina* وجود دارد.

لغات کلیدی: کشت، جلبک، *Dunaliella salina*، آبهای ژرف، سیستان

^{*}نویسنده مسئول

مقدمه

میکرو جلبک‌ها به دلیل داشتن توانایی فتوسنتز، تثبیت کربن دی‌اکسید (در نتیجه مهار گرمایش زمین حاصل از ازدیاد گازهای گلخانه‌ای)، تثبیت ازت و حضور در تمامی زیستگاه‌های آبی از مناطق سردسیر قطبی تا بیابان‌های سوزان و چشمه‌های آب گرم، از آبهای شیرین تا دریاها و اقیانوس‌های با آب شور، یکی از تولیدکنندگان اصلی در زنجیره غذایی زمین محسوب می‌گردند و نقش مهمی در تداوم حیات در زمین ایفاء می‌کنند. در سال‌های اخیر میکرو جلبک‌ها به دلیل داشتن زی‌توده غنی از چربی‌ها، کربوهیدرات‌ها، پروتئین‌ها، آنتی اکسیدان‌ها و رنگدانه‌ها (رنگ‌های غذایی طبیعی) به‌شدت مورد توجه قرار گرفته‌اند (Chen and Vaidyanathan, 2013; Bauer et al., 2017). شرایط رشد بهینه، میزان تولید، ترکیب زی‌توده استحصالی و پروفایل رشد گونه‌های مختلف میکرو جلبک معمولاً به‌شدت متغیر است. زیرا رشد آنها تحت تأثیر فاکتورهای چندگانه‌ای نظیر دما، شدت نور، pH، شوری و ترکیب محیط کشت است (Deamici et al., 2018).

جلبک *Dunaliella salina* یک جلبک سبز تک سلولی از شاخه Chlorophyta، رده Chlorophyceae، راسته Dunaliellales، خانواده Dunaliellaceae و جنس *Dunaliella* است که در فرآیندی ۱/۵ میلیارد ساله تکامل یافته است (Borowitzka and Siva, 2007). جنس *Dunaliella* دارای گونه‌های متعددی است که ۵ گونه از آن مربوط به آبهای شیرین و ۲۳ گونه مربوط به محیط‌های دریایی یا شور می‌باشد. گونه‌های مختلف دونالیا در اکوسیستم‌های آبی ایران پراکنش وسیعی دارند، از دریاچه ارومیه تا دریاچه مهارلو، دریاچه قم و باتلاق گاو خونی (رنجبر اقدم و همکاران، ۱۳۹۱). تمامی گونه‌های جنس *Dunaliella* فتوسنتز کننده هستند و عمل فتوسنتز را از طریق کلروفیل a و b در شرایط بسیار سخت از نظر نور، شوری و مواد غذایی انجام می‌دهند. در واقع، این جلبک‌ها قادرند تا ۳ برابر بیشتر از گیاهان محصولات فتوسنتزی تولید نمایند (مددکار حق‌جو، ۱۳۹۲). جنس *Dunaliella* به عنوان مقاوم‌ترین

یوکاریوت نسبت به نمک شناخته می‌شود. این جلبک از نظر مرفولوژی شبیه جلبک کلامیدوموناس هستند ولی دیواره سلولی ندارند. گرچه این جلبک فاقد دیواره سلولی است، ولی می‌تواند دامنه وسیعی از غلظت نمک محیط را با تولید گلیسرول در سلول تحمل کنند (Shariati and Hadi, 2011). *Dunaliella* قادر به حیات در شوری با دامنه ۱۰-۱۰۰ قسمت در هزار است (Garrido and Canavate, 2001). این جلبک می‌تواند در مقابله با تنش‌های محیطی مقادیر قابل توجهی مواد شیمیایی ارزشمند نظیر کلروفیل‌ها، گلیسرول، کاروتنوئیدها، ویتامین‌ها و پروتئین‌ها، کربوهیدرات‌ها، آمینواسیدها، اسیدهای چرب ضروری، آنتی اکسیدان‌ها و ترکیبات معدنی تولید کند (Ghoshal et al., 2002). توانایی رشد در غلظت‌های بسیار بالای نمک و محتوای زیاد ترکیبات کاروتنوئید، گلیسرول یا پروتئین، این جلبک را انتخاب مناسبی برای تولیدات صنعتی بویژه برای تولید بتاکاروتن ساخته است (Celekli and Donmez, 2006). *D. salina* در شرایطی مانند شوری بالا، شدت نور زیاد و محدودیت در مواد غذایی قادر است، مقادیر زیادی بتاکاروتن تولید کند که منجر به نارنجی شدن سوسپانسیون جلبکی می‌گردد (آقایی و شریعتی، ۱۳۸۶). بتاکاروتن در صنایع غذایی، رنگ سازی، آرایشی و دارویی به عنوان آنتی اکسیدانت قوی، آنتی تومور، محافظ در برابر بیماری‌های قلبی-عروقی و پیشساز ویتامین A کاربرد دارد (Törnwall et al., 2004). از سوی دیگر، امروزه تولید *Dunaliella* به دلیل تولید چربی برای تولید سوخت زیستی نیز به کار می‌رود (Wijffels, 2008). این جلبک به دلیل مصرف به شکل مستقیم در تغذیه جانداران فیلترکننده آکواریوم نظیر مرجان‌ها، اسفنج‌ها و ماهیان زینتی در صنعت ماهیان زینتی و نیز آبی‌پروری به‌خصوص در پرورش صدف، میگو و لارو ماهیان دریایی کاربرد دارد. از سوی دیگر، با توجه به تغذیه زئوپلانکتون‌هایی نظیر دافنی، روتیفر و آرتمیا از این جلبک و کاربرد این زئوپلانکتون‌ها در تغذیه آبزیان، به شکل غیر مستقیم نیز از این جلبک‌ها در آبی‌پروری بهره گرفته می‌شود (مددکار حق‌جو، ۱۳۹۲). پرورش این

مواد و روش کار

ریز جلبک، محیط کشت و شرایط پرورش

محل انجام این آزمایش، آزمایشگاه تحقیقات ریزجلبک در پژوهشکده تالاب بین‌المللی هامون دانشگاه زابل بود. جلبک *D. salina* مورد استفاده در این مطالعه از پژوهشکده بیوتکنولوژی شمال غرب کشور تهیه شد. برای تهیه غلظت مناسب از جلبک، نمونه خریداری شده به مدت یک هفته در ارلن‌های ۵۰۰ میلی‌لیتری حاوی آب با شوری ۳۵ قسمت در هزار (تهیه شده با نمک دریاچه ارومیه) با افزودن محیط کشت Johnson et al. (1968)، با $33/75 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (تأمین شده با لامپ‌های فلورسنت) با رژیم نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی، در دمای 25 ± 1 درجه سانتی‌گراد و $\text{pH}=8$ کشت داده شد. با رسیدن تراکم جلبک‌ها به ۱۸ میلیون سلول در میلی‌لیتر آزمایش اصلی آغاز شد.

طرح آزمایش

در این مطالعه به منظور بررسی اثر شوری آب چاه ژرف شماره ۱ سیستان بر رشد میکرو جلبک *D. salina* از ۵ تیمار با شوری‌های ۳۵ و ۲۰ قسمت در هزار با منشأ شوری مختلف استفاده شد (جدول ۱)، پارامترهای فیزیکی‌وشیمیایی آب‌های مورد استفاده در تیمارهای مختلف با دستگاه فتومتر (Palintest™ 8000, Tyne & Wear, U.K.) و فلیم فتومتر (Elico Technologies CL 361, Hyderabad, India) اندازه‌گیری شد (جدول ۲). برای هر تیمار ۳ تکرار در نظر گرفته شد. پس از تهیه شوری‌های مختلف، آب‌ها و تمامی تجهیزات کشت با استفاده از اتوکلاو ضدعفونی شدند. کشت در ارلن‌های ۵۰۰ میلی‌لیتر (برای هر تکرار) حاوی ۴۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت جانسون (آب به اضافه محیط کشت) به همراه ۱۰ درصد استوک (با تراکم 18×10^6) بدست آمده از مرحله قبل انجام شد به‌طوری‌که تراکم در تمام تیمارها در ابتدای دوره $1/8 \times 10^6$ بود. آزمایش برای ۲۴ روز، در شرایط یکسان برای تمام تیمارها شامل: دمای 25 ± 1 ، شدت نور $33/75 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ، رژیم نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و هوادهی با کمک دستگاه

جلبک‌ها در انواع مختلفی از تانک‌ها و استخرهای خارج سالن، کیسه‌های پلی اتیلن یا استوانه‌های فایبرگلاس ۵۰۰-۵۰ لیتری که معمولاً داخل سالن نگهداری می‌شوند و انواع مختلفی از فتوبیوراکتورهای داخل و خارج سالن صورت می‌گیرد (Richmond, 2003). همچنین روش‌های مختلفی از جمله پرورش مرحله‌ای^۱، مداوم^۲ و نیمه مداوم^۳ برای پرورش این ریزجلبک‌ها وجود دارد (Lavens and Sorgeloos, 1996).

پرورش جلبک‌های آب شور یکی از گزینه‌هایی است که در کشورهای مختلف دنیا از جمله استرالیا برای استفاده از منابع آبی ژئوترمال به‌کار گرفته شده است. در کشور ایران نیز چند سالی است که محققان مراکز تحقیقاتی و دانشگاهی در مقیاس آزمایشگاهی و شرکت‌های مختلف در مقیاس تجاری اقدام به تولید و پرورش گونه *D. salina* با استفاده از آب‌های شور می‌کنند (Heidari et al., 2000; Hosseini Tafreshi and Shariati, 2006; Fazeli et al., 2006). یکی از منابع آبی نامتعارف در منطقه سیستان آب‌های اکتشافی ژرف (آب‌های ژرف به منابع آب‌های پنهانی گفته می‌شود که در سازندهای زمین‌شناسی، سفره‌های آبی زیرزمینی را تشکیل داده‌اند). با شوری حدود ۲۰ قسمت در هزار و گرمای ۸۷ درجه سانتی‌گراد (چاه تحقیقاتی شماره ۱) می‌باشد. معاونت علمی ریاست جمهوری در همکاری با شرکت‌های دانش بنیان و مبتنی بر آخرین استانداردهای دنیا، حفر و کشف آبخوان‌های مختلف در چاه ژرف سیستان ۱ تا عمق ۳۰۰۰ متری را در سال ۱۳۹۷ به نتیجه رسانده است. در این چاه امکان تولید ۱۵۰۰ مترمکعب آب در روز پیش‌بینی شده است. با توجه به تطابق شوری چاه اکتشافی با شوری مناسب برای رشد جلبک *D. salina*، در این پژوهش امکان کشت جلبک *D. salina* در آب چاه ژرف اکتشافی شماره ۱ سیستان مورد بررسی و میزان رشد، مقدار زی‌توده و رنگدانه‌ها تولیدی با آب شور معمولی مقایسه می‌گردد.

¹ Batch cultur

² Cotinuous

³ Semicotinuous

هواده با شدت جریان ۲ لیتر در دقیقه (بدون تزریق CO₂) انجام شد (Colusse *et al.*, 2020). در طول روند آزمایش هر سه روز یکبار میزان pH با دستگاه pH متر (pH Meter L2012, Labtron Co., Iran) در تیمارهای مختلف اندازه گیری و ثبت شد.

جدول ۱: مشخصات تیمارهای آزمایشی

Table 1. Specifications of experimental treatments

تیمار	درجه شوری	منشأ شوری
۱	۳۵ قسمت در هزار	آب شهر (کلرزدایی شده) + ۳۵ گرم در لیتر نمک ارومیه
۲	۲۰ قسمت در هزار	آب شهر (کلرزدایی شده) + ۲۰ گرم در لیتر نمک ارومیه
۳	۳۵ قسمت در هزار	آب ژرف (۲۰ گرم در لیتر) + ۱۵ گرم در لیتر نمک ارومیه
۴	۳۵ قسمت در هزار	آب ژرف تغلیظ شده (تبخیر در دمای اتاق)
۵	۲۰ قسمت در هزار	آب ژرف استحصالی از چاه ژرف

جدول ۲: ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی آب در تیمارهای مختلف.

Table 2. Physicochemical properties of water in different treatments

تیمار	فسفات (mg/L)	نیترات (mg/L)	نیتريت (mg/L)	سولفات (mg/L)	سختی کل (as CaCO ₃) (mg/L)	قلیائیت (as CaCO ₃) (mg/L)
۱	۰/۱۱ ± ۰/۰۱ ^d	۳/۱۷ ± ۰/۰۶ ^a	۰/۰۰۶ ± ۰/۰۰۳ ^b	۴۰۳/۳۳ ± ۵/۷۷ ^{bc}	۲۰۸/۳۳ ± ۲/۸۹ ^d	۹۵/۶۷ ± ۳/۰۵ ^b
۲	۰/۱۱ ± ۰/۰۰۶ ^d	۳/۱۶ ± ۰/۰۱۳ ^a	۰/۰۰۲ ± ۰/۰۰۰۱ ^a	۳۲۱/۶۷ ± ۲/۸۹ ^d	۱۸۵/۶۷ ± ۳/۰۵ ^d	۱۱۴/۰۰ ± ۳/۶۰ ^a
۳	۱/۰۴ ± ۰/۰۳ ^c	۱/۳۵ ± ۰/۰۰۴ ^b	۰/۰۰۶ ± ۰/۰۰۱ ^b	۴۱۱/۶۷ ± ۱۲/۵۸ ^b	۴۳۰/۳۳ ± ۶۵/۰۶ ^b	۳۱/۳۳ ± ۱/۵۳ ^d
۴	۱/۵۳ ± ۰/۰۳ ^b	۱/۳۹ ± ۰/۰۱۳ ^b	۰/۰۰۶ ± ۰/۰۰۰۳ ^b	۳۸۶/۶۷ ± ۱۲/۵۸ ^c	۵۰۹/۰۰ ± ۳۶/۰۶ ^a	۴۴/۶۷ ± ۱/۵۳ ^c
۵	۱/۸۴ ± ۰/۰۳ ^a	۱/۰۶ ± ۰/۰۰۶ ^c	۰/۰۰۶ ± ۰/۰۰۰۳ ^b	۴۸۱/۶۷ ± ۱۲/۵۸ ^a	۲۹۰/۳۳ ± ۳۵/۱۲ ^c	۳۰/۳۳ ± ۰/۵۸ ^d
تیمار	سدیم (mg/L)	پتاسیم (mg/L)	منیزیم (mg/L)	منیزیم (mg/L)	مس کل (mg/L)	روی (mg/L)
۱	۱۸۸۳/۳۳ ± ۱۲/۵۸ ^a	۶/۰۳ ± ۰/۲۵ ^d	۳۰/۰۰ ± ۱/۷۳ ^c	۱۲۱/۲۷ ± ۱/۱۰ ^e	۰/۴۲ ± ۰/۰۱ ^d	nd
۲	۱۳۹۸/۶۷ ± ۴/۶۲ ^d	۵/۹۷ ± ۰/۶۵ ^d	۲۹/۶۷ ± ۰/۵۸ ^c	۱۲۵/۷۷ ± ۰/۶۸ ^d	۰/۷۰ ± ۰/۰۴ ^c	nd
۳	۱۷۹۷/۰۰ ± ۶/۰۸ ^b	۲۵/۶۷ ± ۱/۴۶ ^c	۶۴/۳۳ ± ۱/۵۳ ^b	۲۶۸/۹۳ ± ۱/۰۰ ^c	۲/۳۵ ± ۰/۰۸ ^b	۰/۰۱۲ ± ۰/۰۰۳ ^b
۴	۱۷۱۶/۶۷ ± ۲۰/۸۲ ^c	۳۷/۲ ± ۰/۸۰ ^a	۷۲/۶۷ ± ۱/۵۳ ^a	۳۰۱/۴۷ ± ۱/۲۸ ^a	۳/۷ ± ۰/۰۳ ^a	۰/۰۲۲ ± ۰/۰۰۳ ^a
۵	۱۲۴۶/۶۷ ± ۱۰/۴۱ ^e	۲۸/۶ ± ۰/۵۳ ^b	۶۵/۶۷ ± ۵/۸۶ ^b	۲۷۲/۳۳ ± ۱/۱۵ ^b	۳/۸ ± ۰/۲۵ ^a	۰/۰۱۳ ± ۰/۰۰۳ ^b

حروف متفاوت در هر ستون نشان دهنده اختلاف معنی دار هستند (p < ۰/۰۵).

اندازه گیری رشد

برای اندازه گیری میزان تراکم در تیمارهای مختلف، شمارش تعداد سلول‌های جلبکی هر ۳ روز یک بار با لام نئوبار و با کمک میکروسکوپ نوری (Euromex, GE 3035, Holland) مجهز به دوربین (Euromex, CMEX, Holland) انجام شد. همچنین برای بررسی

میزان رشد سلولی در تیمارها هر ۳ روز یک بار میزان دانسیته نوری (OD) در نمونه سوسپانسیون جلبکی برداشت شده از هر یک از تیمارها اندازه گیری شد. برای این کار میزان جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۶۳۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر (Unico 2100 Spectrophotometer, USA) قرائت و ثبت شد. میزان

$$k = \frac{SGR}{0.6931} \text{ (تقسیم در روز)}$$

$$(R) = N_f - N_i \text{ حداکثر سلول تولیدی}$$

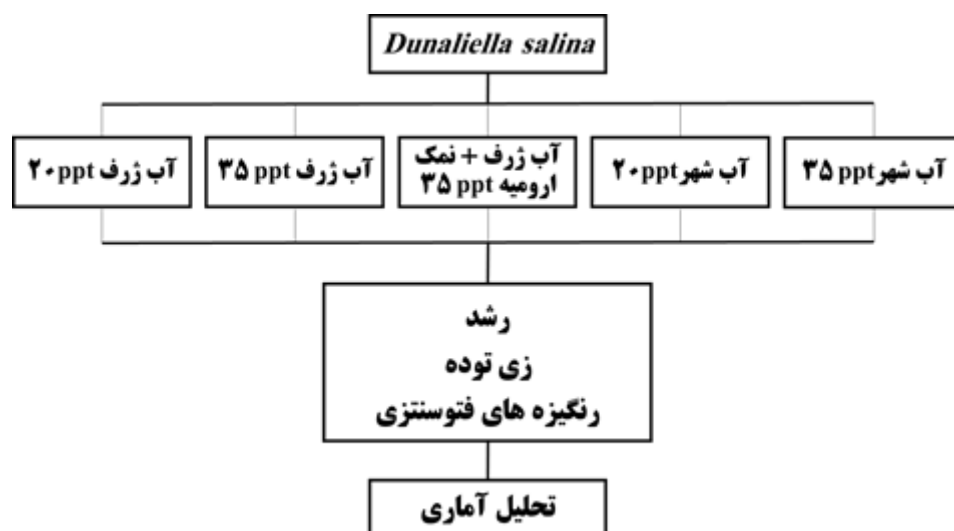
N_i و N_f = به ترتیب نشان دهنده تراکم سلولی نهایی و

ابتدایی، t_i و t_f = به ترتیب روز نهایی و روز آغازین

رشد جلبک در تیمارهای مختلف با استفاده از فرمول‌های
Guillard, 1979; Wood *et al.*,)
ذیل محاسبه شد (شکل ۱):

$$SGR = \frac{\ln(N_f - N_i)}{t_f - t_i} \text{ نرخ رشد}$$

$$DT = \frac{0.6931}{SGR} \text{ زمان دوبرابر شدن}$$



شکل ۱: نمودار مرحله به مرحله شیوه انجام مطالعه

Figure 1: Schematic step-by-step approach of this study

اندازه‌گیری و ثبت شد. محاسبه زی توده تولیدی با استفاده
از فرمول ذیل صورت گرفت (Colusse *et al.*, 2020):

$$\text{زی توده ابتدایی} - \text{زی توده نهایی} = \frac{\text{زی توده نهایی}}{\text{روز ابتدایی} - \text{روز نهایی}} \text{ (گرم در لیتر در روز) زی توده تولیدی}$$

اندازه‌گیری غلظت رنگدانه‌ها

به منظور اندازه‌گیری غلظت کلروفیل a، b و کارتنوئید
(مجموع گرانتوفیل و کاروتن) در هر یک از تیمارها، ۵
میلی‌لیتر سوسپانسیون جلبکی از هر یک از تیمارها
برداشت و به لوله‌های آزمایش منتقل شد. پس از
سانتریفیوژ لوله‌ها به مدت ۶ دقیقه و با سرعت ۳۵۰۰ دور
در دقیقه، محلول رویی خارج و به هر لوله ۵ میلی‌لیتر
استن ۸۰ درصد افزوده و به خوبی همگن شد. جهت
استخراج کامل رنگدانه‌ها لوله‌های مزبور به مدت ۲۴
۱۳۱

برآورد زی توده

هر ۶ روز یک بار ۱۰ میلی‌لیتر سوسپانسیون جلبکی (پس
از همگن شدن کل محیط کشت) از هر یک از تیمارهای
آزمایشی برداشت و به لوله‌های آزمایشی که از قبل شسته،
خشک (در دمای ۱۰۵ درجه سانتی‌گراد در آون به مدت
۳ ساعت) و با دقت ۰/۰۰۰۱ گرم توزین شده بودند،
منتقل شد. لوله‌های آزمایش به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت
۴۰۰۰ هزار در دقیقه سانتریفیوژ شدند. پس تخلیه محلول
رویی، جهت شستشوی نمک به نمونه‌ها آب مقطر افزوده و
پس از مخلوط کردن، عمل سانتریفیوژ تکرار شد. با اتمام
سانتریفیوژ و تخلیه کامل آب، محتوی لوله‌ها به مدت ۲۴
ساعت در آون با دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد خشک شدند
(محمدخانی و مددکارحق‌جو، ۱۳۹۴). وزن لوله‌های
خشک شده با ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۰۰۰۱ گرم

روز ۳ مشاهده می‌شود (شکل ۲-C، ۲-D و ۲-E) و در مقابل کمترین SGR، بیشترین DT و کمترین k در روز ۲۴ پرورش رخ داده است (شکل ۲-C، ۲-D و ۲-E). حداکثر تعداد سلول (R) برای این تیمار در روز ۱۲ قابل مشاهده است (شکل ۲-F).

مشاهده روند رشد در تیمار ۲ (آب شهر با شوری ۲۰ قسمت در هزار) نشان داد همانند تیمار یک تا روز ۱۲ آزمایش روند افزایشی در تعداد سلول‌ها و OD مشاهده می‌شود، اما طی روزهای ۱۵-۱۲ کاهش رشد و در روزهای ۲۱-۱۵ آزمایش ایستایی رشد مشاهده می‌گردد و در نهایت در سه روز پایانی با کاهش در تعداد سلول‌ها، رشد کاهش می‌یابد (شکل ۲-A و ۲-B). اگرچه روند رشد در تیمار ۲ مشابه تیمار یک می‌باشد، اما میزان رشد در این تیمار در مقایسه به تیمار یک به مراتب پایین‌تر است (شکل ۲-A) به‌طوری‌که حداکثر تعداد سلول برای این تیمار (که همانند تیمار یک در روز ۱۲ مشاهده می‌شود)، 31×10^6 سلول در میلی لیتر به‌دست آمد درحالی‌که برای تیمار یک حداکثر تعداد سلول 45×10^6 سلول در میلی لیتر بود (شکل ۲-F). بالاترین SGR، کمترین DT و بالاترین میزان k برای این تیمار نیز در روز سوم آزمایش مشاهده می‌شود (شکل ۲-C، ۲-D و ۲-E) و در مقابل کمترین SGR، بیشترین DT و کمترین k در روز ۲۴ پرورش رخ داده است (شکل ۲-C، ۲-D و ۲-E).

شمارش تعداد سلول‌ها در سومین تیمار آزمایش (آب ژرف شور شده تا ۳۵ قسمت در هزار به کمک نمک ارومیه) نشان داد تا نهمین روز آزمایش رشد جلبک *D. salina* با سرعت و شیب زیادی اتفاق می‌افتد، تا روز دوازدهم نیز روند صعودی رشد (همانند تیمار یک) مشاهده می‌گردد، طی روزهای ۲۱-۱۲ رشد در این تیمار وارد فاز ایستایی می‌گردد و از روز ۲۱ به بعد کاهش در رشد اتفاق می‌افتد (شکل ۲-A). در نمودار OD مربوط به این تیمار نیز همین روند با اندکی تفاوت مشاهده می‌گردد (شکل ۲-B). بالاترین SGR، کمترین DT و بالاترین میزان k برای این تیمار بر خلاف تیمارهای ۱ و ۲ در روز ششم آزمایش مشاهده می‌شود (شکل ۲-C، ۲-D و ۲-E) و در مقابل کمترین SGR، بیشترین DT و کمترین k در روز ۲۴

ساعت در دمای ۴ درجه و شرایط تاریکی قرار گرفتند. بعد از گذشت ۲۴ ساعت نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. با کمک دستگاه اسپکتروفتومتر میزان جذب نوری برای هر نمونه در طول موج‌های ۶۶۳، ۶۴۷ و ۴۷۰ نانومتر قرائت و با قرار دادن در معادلات ذیل غلظت رنگدانه‌های مختلف محاسبه شد:

$$C_a (\mu\text{g/ml}) = 12.21A_{663} - 2.81A_{647}$$

$$C_b (\mu\text{g/ml}) = 20.13A_{647} - 5.03A_{663}$$

$$C(x+c) (\mu\text{g/ml}) = (1000A_{470} - 3.27C_a - 104C_b) / 229$$

$$C(x+c) = \text{کاروتن + گزانتوفیل}$$

$$C_a \text{ و } C_b = \text{به ترتیب غلظت کلروفیل a و b}$$

روش تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

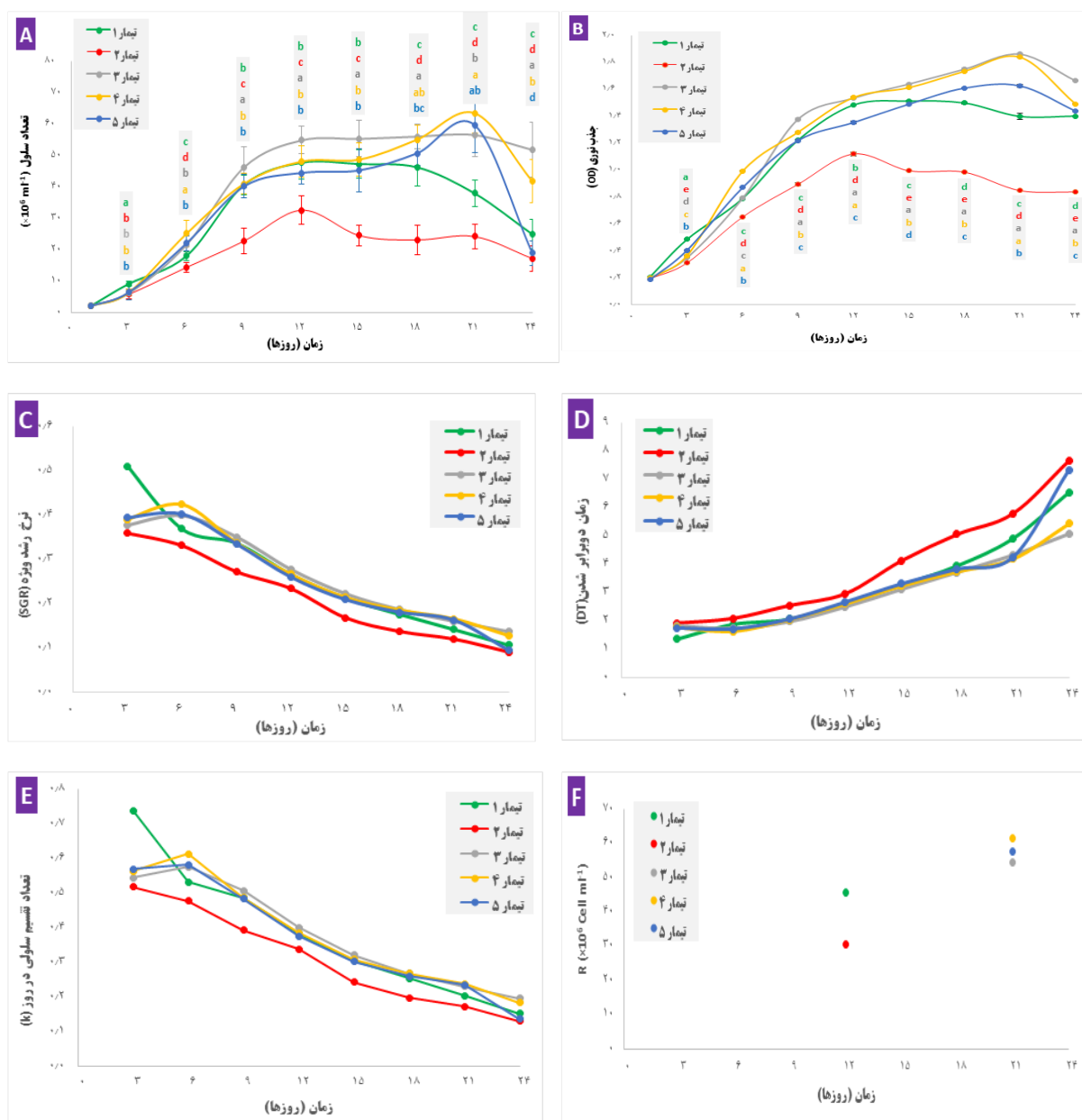
برای تجزیه و تحلیل داده‌ها و ترسیم نمودارها به ترتیب از نرم‌افزارهای SPSS نسخه ۲۵ و Exel نسخه ۲۰۱۳ استفاده شد. برای آنالیز آماری نتایج از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه ANOVA One-way و برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون تفریقی Tukey's با سطح اطمینان ۹۵ درصد استفاده شد.

نتایج

بررسی رشد و تقسیم سلولی جلبک *D. salina* در آب استحصالی از چاه تحقیقاتی ژرف شماره یک منطقه سیستان در مقایسه با آبهای با شوری ۲۰ و ۳۵ گرم در هزار در مدت ۲۴ روز انجام شد. بر اساس نتایج به‌دست آمده (شکل ۲-A و ۲-B) در تیمار یک (آب شهر با شوری ۳۵ قسمت در هزار) تا روز ۱۲ آزمایش، تعداد سلول‌ها و میزان جذب در طول موج ۶۳۰ نانومتر (OD) افزایشی است که این افزایش تا روز ۹ با شیب زیاد رخ داده و از روز ۹ تا ۱۲ با شیب ملایم‌تری پیش رفته است. از روز ۱۲ آزمایش لغایت روز ۱۸ فاز ایستایی رشد قابل مشاهده است و از روز ۱۸ به بعد کاهش در تعداد سلول‌ها با سرعت اتفاق می‌افتد (شکل ۲-A). بالاترین نرخ رشد ویژه (SGR)، کمترین زمان دو برابر شدن (DT) و بالاترین تعداد تقسیم سلولی در روز (k) برای این تیمار در

۱ و ۲ معادل 54×10^6 سلول در میلی لیتر و بر خلاف آنها در روز ۲۱ بود (شکل ۲-F).

پرورش رخ داده است (شکل ۲-C، ۲-D و ۲-E). حداکثر تعداد سلول (R) برای این تیمار بسیار بیشتر از تیمارهای



شکل ۲: شاخص‌های مختلف رشد (تعداد سلول (A)، OD (B)، SGR (C)، DT (D)، k (E) و R (F)) جلبک *D. salina* در تیمارهای مختلف

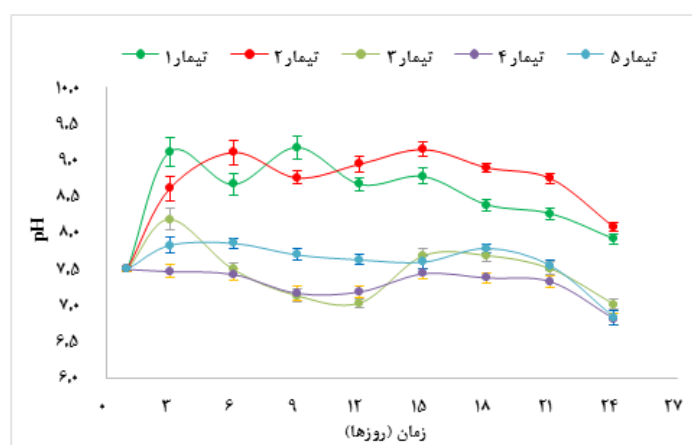
Figure 2: Different growth indices (Cell number (A), Optical density (B), Specific growth rate (C), Doubling time (D), Division per day (E) and Maximum cellular yield (F)) *D. salina* in different treatments

در سایر تیمارها مشاهده نمی‌شود، بروز می‌یابد (شکل ۲- A). تغییرات در نمودار OD مربوط به این تیمار نیز تقریباً مشابه نمودار تعداد سلول‌ها و با تفاوت اندکی به خصوص در حد فاصل روزهای ۲۴-۲۱ آزمایش بود (شکل ۲- B). بالاترین SGR، کمترین DT و بالاترین میزان k برای این تیمار همانند تیمارهای ۳ و ۴ در روز ششم آزمایش مشاهده شد (شکل ۲- C، D-۲ و E-۲) و در مقابل کمترین SGR، بیشترین DT و کمترین k در روز ۲۴ پرورش رخ داده است (شکل ۲- C، D-۲ و E-۲). حداکثر تعداد سلول (R) برای این تیمار نسبت به تیمار ۴ کمتر و در مقایسه با سایر تیمارهای آزمایش بیشتر و معادل 58×10^6 سلول در میلی لیتر بود که در روز ۲۱ آزمایش مشاهده شد (شکل ۲- F).

بررسی روند تغییرات pH در تیمارهای آزمایشی نشان می‌دهد کمترین میزان نوسان در تیمارهایی که در آنها از آب ژرف استفاده شده اتفاق افتاده است. میانگین pH در تیمار ۵ و ۴ و ۳ آزمایش به ترتیب 8.58 ± 0.31 ، 8.30 ± 0.22 و 8.48 ± 0.37 بود و عمدتاً در محدوده pH ۸-۹ نوسان می‌کرد و تنها در آخرین روز نمونه برداری به میزان ناچیزی از این محدوده خارج شد و کاهش یافت. اما در مورد تیمارهای ۱ و ۲ که بر پایه آب شهر و نمک ارومیه شکل گرفته بودند، یک افزایش ناگهانی در pH تا روز سوم آزمایش مشاهده می‌شود و از این روز به بعد pH برای این دو تیمار در محدوده ۱۰-۹ نوسان داشت (شکل ۳).

شمارش تعداد سلول‌ها در تیمار ۴ (آب ژرف تغلیظ شده با شوری ۳۵ قسمت در هزار) نشان داد تا روز نهم افزایش تعداد سلول‌ها با شیب بسیار تند اتفاق افتاد اما از روز نهم تا دوازدهم افزایش تعداد سلول‌ها با شیب ملایم‌تری دنبال، و طی روزهای ۱۵-۱۲ سکون در رشد دیده شد. بر خلاف تیمارهای ۱، ۲ و ۳ در این تیمار مجدداً طی روزهای ۲۱-۱۵ افزایش تعداد سلول‌ها با شیب ملایم ادامه یافت و از روز ۲۱ به بعد کاهش رشد بروز یافت (شکل ۲- A). تغییرات در نمودار OD مربوط به این تیمار نیز تقریباً مشابه نمودار تعداد سلول‌ها و با تفاوت اندکی مشاهده شد (شکل ۲- B). بالاترین SGR، کمترین DT و بالاترین میزان k برای این تیمار همانند تیمار ۳ در روز ششم آزمایش مشاهده شد (شکل ۲- C، D-۲ و E-۲) و در مقابل کمترین SGR، بیشترین DT و کمترین k در روز ۲۴ پرورش رخ داده است (شکل ۲- C، D-۲ و E-۲). حداکثر تعداد سلول (R) برای این تیمار بیشتر از سایر تیمارهای آزمایش، معادل 61×10^6 سلول در میلی لیتر و در روز ۲۱ آزمایش اتفاق افتاد (شکل ۲- F).

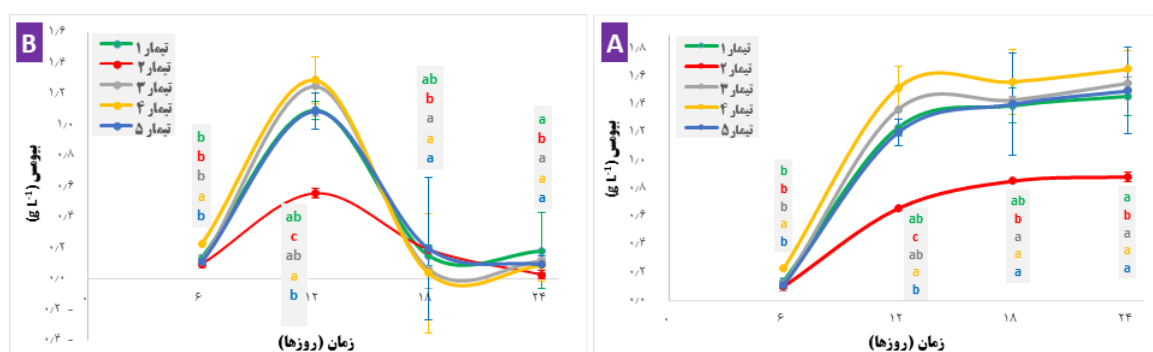
در تیمار ۵ (آب ژرف با شوری ۲۰ قسمت در هزار) نیز به مانند تیمار ۴ تا روز نهم آزمایش نمودار رشد با شیب زیاد دیده می‌شود، سپس به مدت ۶ روز فاز ایستایی رشد مشاهده می‌شود و مجدداً از روز ۱۵ آزمایش رشد با شیب ملایم آغاز و تا روز ۲۱ آزمایش ادامه دارد، از روز ۲۱ کاهش تعداد سلول‌ها در سوسپانسیون با شیب تندی که



شکل ۳: مقایسه روند تغییرات pH در طول ۲۴ روز پرورش جلبک *D.salina* در تیمارهای مختلف
Figure 3: Comparison of changes pH in different treatments of *D.salina* culture in during 24 days

۴ و ۵) از نظر میزان زی‌توده خشک مشاهده نشود. در طول آزمایش تیمار ۲ همواره از پایین‌ترین زی‌توده تولیدی برخوردار بود و در مقابل تیمار ۴ همواره بالاترین میزان تولید زی‌توده را به‌خود اختصاص داد (شکل ۴-۱). در تمام تیمارها بخش عمده زی‌توده تولیدی در فاصله روزهای ۱۲-۶ آزمایش تولید شده است (شکل ۴-۲).

نتایج حاصل از اندازه‌گیری زی‌توده خشک در روزهای ۶، ۱۲، ۱۸ و ۲۴ آزمایش نشان داد به رغم اینکه در روز ۶ آزمایش میزان زی‌توده تولیدی در تیمار ۴ با سایر تیمارها دارای اختلاف معنی‌دار بود، اما با گذشت زمان این اختلاف با تیمارهای ۱، ۳ و ۵ کم و کمتر شد تا در نهایت در روز پایانی اختلاف معنی‌داری بین این تیمارها (۱، ۳،

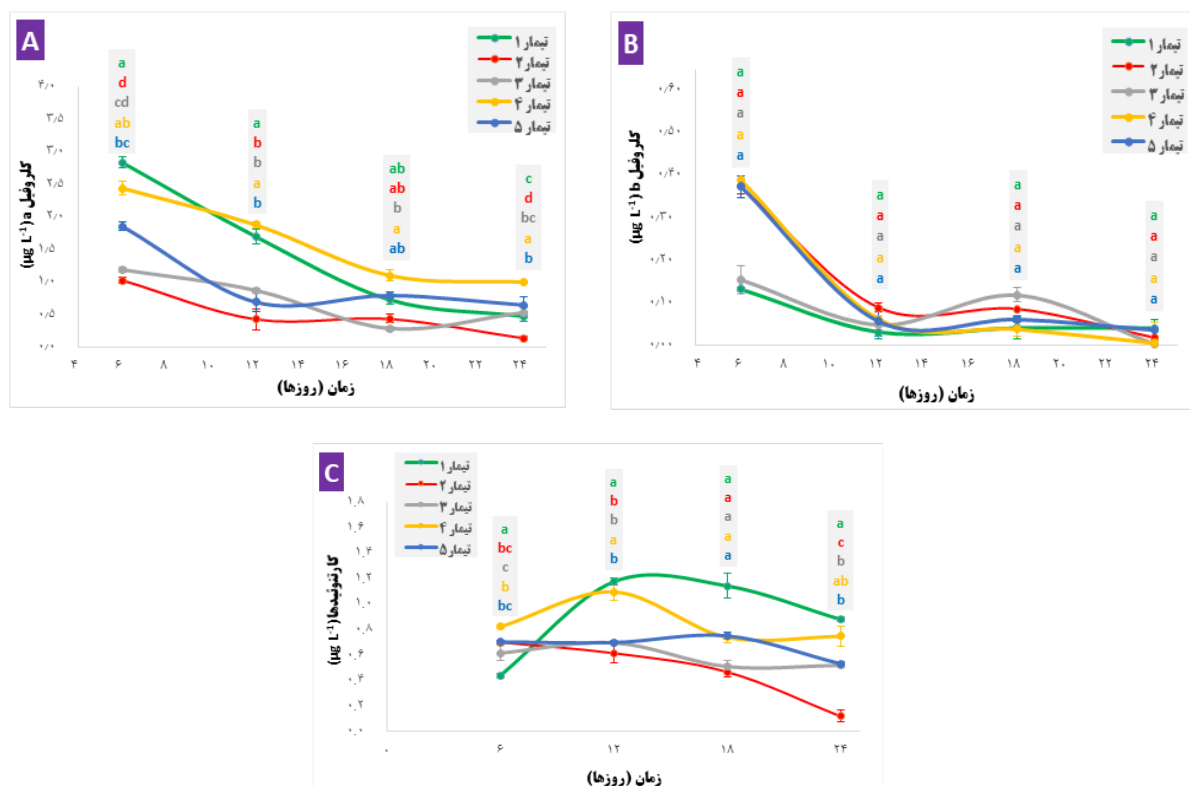


شکل ۴: مقایسه زی‌توده خشک تولیدی توسط جلبک *D.salina* در تیمارهای مختلف به دو صورت تجمعی (A) و تفکیک شده در طول دوره ۲۴ روزه (B)

Figure 4: Comparison of dry biomass of *D.salina* in different treatments in during 24 days: Cumulative graf (A) and exploded graf (B)

(B). نتایج حاصل از سنجش کارتنوئیدها در جلبک‌های پرورشی در ۴ مرحله مختلف نشان داد، در تیمار شماره ۲ با گذشت زمان از میزان کارتنوئیدها تولیدی کاسته و پایین‌ترین سطح کارتنوئید در این تیمار در روز پایانی آزمایش ثبت شد. در تیمارهای ۳ و ۵ میزان کارتنوئیدها در طول آزمایش تقریباً ثابت بود. و در تیمارهای ۱ و ۴ بعد از یک افزایش موقت در روز ۱۲ آزمایش، با کاهش در روزهای ۱۸ و ۲۴ سطح کارتنوئیدها تقریباً به سطح اولیه خود نزدیک شد (شکل ۵-۳).

نتایج حاصل از اندازه‌گیری میزان کلروفیل a در روزهای ۶، ۱۲، ۱۸ و ۲۴ آزمایش نشان داد، در تمام تیمارهای بالاترین سطح این رنگیزه در روز ۶ آزمایش ثبت شد و با گذشت زمان کاهش یافت. بالاترین میزان کلروفیل a اندازه‌گیری شده مربوط به تیمار یک و در روز ۶ آزمایش ثبت شد. در روزهای ۱۲، ۱۸ و ۲۴ آزمایش بالاترین میزان کلروفیل a ثبت شده متعلق به تیمار ۴ بود. پایین‌ترین میزان کلروفیل a در روزهای ۶، ۱۲ و ۲۴ به تیمار ۲ تعلق داشت (شکل ۵-۴). بر اساس نتایج حاصل از اندازه‌گیری میزان کلروفیل b در روزهای مختلف آزمایش، بالاترین سطح این رنگیزه در تیمار ۴ و در روز ۶ آزمایش به‌دست آمد و پایین‌ترین میزان آن نیز برای تیمار ۳ و در روز ۲۴ آزمایش ثبت شد. در تمام تیمارها بعد از روز ۶ آزمایش کاهش در میزان کلروفیل b مشاهده شد و در ادامه در فاصله روزهای ۱۲-۲۴ آزمایش در تمام تیمارها روند تقریباً ثابتی داشت. در روزهای مختلف آزمایش متوسط کلروفیل b اندازه‌گیری شده در تیمارهای مختلف با یکدیگر اختلاف معنی‌داری نداشتند (شکل ۵-۵).



شکل ۵: مقایسه میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی: کلروفیل a (A)، کلروفیل b (B) و کارتنوئیدها (C) جلبک *D. salina* در تیمارهای مختلف در طول دوره ۲۴ روزه

Figure 5: Comparison of photosynthetic pigments profile: Chlorophyll a, Chlorophyll b and carotenoids of *D. salina* in different treatments in during 24 days

بحث

جایگاه پر اهمیت و برجسته جلبک‌ها در اکوسیستم‌های گوناگون آبی و نقش انواع تولیدات جلبکی در زندگی انسان‌ها، اهمیت مطالعه مستمر در خصوص نحوه رشد آنها در شرایط مختلف پرورشی را آشکار می‌کند. بحران آب در منطقه و جهان و دشواری دسترسی به منابع آب شیرین جهت آبی‌پروری در آینده نه چندان دور، اهمیت مطالعه گونه‌های آبی ساکن آب‌های شور را دو چندان می‌کند. کشف یک منبع آبی جدید با ویژگی‌های نامتعارف در منطقه سیستان، ضرورت مطالعه در زمینه کشت آبیان شورزی نظیر میکروجلبک‌های آب شور را اجتناب‌ناپذیر کرده است. بر همین اساس در این مطالعه روند رشد جلبک *D. salina* در آب چاه ژرف شماره ۱ سیستان مورد بررسی و با سایر تیمارها مقایسه شد. نتایج به‌دست

آمده نشان داد که پرورش جلبک *D. salina* در آب ژرف (تیمار ۵) و آب ژرف تغلیظ شده (تیمار ۴) در روز ۹ ابتدایی آزمایش در فاز لگاریتمی بود، سپس تا روز ۱۵ آزمایش فاز ایستایی رشد مشاهده گردید اما طی روزهای ۱۵-۲۱ آزمایش مجدداً یک روند افزایش رشد آرام (حداکثر تراکم یا فاز پیک) مشاهده و از روز ۲۱ کاهش شدید در رشد جلبک‌ها اتفاق افتاد. در تیمارهای ۱ و ۳ نیز فاز لگاریتمی رشد تا روز ۹ آزمایش ادامه داشت و از آن پس به‌ترتیب تا روزهای ۱۸ و ۲۱ در این تیمارها فاز ایستایی رشد مشاهده شد. تنها در تیمار شماره ۲ فاز لگاریتمی رشد تا روز ۱۲ آزمایش ادامه داشت و سپس با کمی کاهش در میزان تولیدات وارد فاز ایستایی شد که تا روز ۲۱ آزمایش ادامه داشت. در مطالعه Colusse و همکاران (۲۰۲۰) مرحله رشد لگاریتمی برای جلبک *D.*

salina بین ۶-۹ روز در تیمارهای مختلف ادامه داشت که به نتایج به دست آمده در این مطالعه نزدیک بود. در مطالعه آقایی و شریعتی (۱۳۸۶) نیز رسیدن به فاز ایستایی رشد برای جلبک *D. salina* تقریباً ۷ روز به طول انجامید. در مطالعه مددکار حق جو (۱۳۹۲) که به بررسی روند رشد سویه های مختلف (ارومیه، مهارلو، گاوخونی، خلیج فارس و سویه های خارجی) جلبک *Dunaliella* اختصاص داشت، مشخص شد همه سویه ها تا روز ۷ آزمایش رشد صعودی داشتند و در ادامه نوسان در منحنی رشد آغاز شد، اما در برخی سویه ها رشد صعودی همچنان تا روز ۱۴ نیز ادامه داشت. در مطالعه Helena و همکاران (۲۰۱۶) فاز آدپتاسیون برای جلبک *D. salina* در محیط های کشت مختلف کمتر از ۴ ساعت بود و فاز لگاریتمی رشد ۳-۴ روز ادامه داشت. در مطالعه Sathasivam و Juntawong (۲۰۱۳) فاز آدپتاسیون در جلبک *D. strains* حدود یک روز و فاز لگاریتمی رشد ۲-۴ روز در محیط های کشت مختلف ادامه داشت. در مطالعه محمدخانی و مددکار حق جو (۱۳۹۴) طول دوره رشد لگاریتمی در *Dunaliella* sp. (سویه ایرانی) ۱۲ روز بود. حفظ و تدام طولانی تر رشد لگاریتمی در کشت های جلبکی یک ویژگی مناسب محسوب می شود زیرا مدت زمان طولانی تری پرورش دهنده به جلبک های جوان و تازه دسترسی دارد که برای کشت در محیط های بزرگ تر مناسب ترند و قابلیت هضم بهتری نیز برای مصرف کننده دارند (Lavens and Sorgeloos, 1996). در مطالعه حاضر پرورش جلبک در آب ژرف در قیاس با مطالعات انجام شده قبلی دوره رشد لگاریتمی ۹ روز و مناسب بوده است.

در مطالعه حاضر حداکثر تعداد سلول (R) در تیمار آب ژرف 58×10^6 سلول در میلی لیتر بود که نسبت به تیمار آب ژرف تغلیظ شده (61×10^6 سلول در میلی لیتر) پایین تر بود، ولی نسبت به تیمارهای سه (54×10^6 سلول در میلی لیتر)، دو (31×10^6 سلول در میلی لیتر) و یک (45×10^6 سلول در میلی لیتر) بالاتر بود (حداکثر تعداد سلول در تیمارهای ۴ و ۵ نسبت به تیمارهای شماره ۱ و ۲ به شکل معنی داری بالاتر بود). در مطالعه اکبری و

مددکار حق جو (۱۳۹۶) حداکثر تعداد سلول تولید شده برای گونه سالینا در شوری ۲ مولار $10^6 \times 25-20$ و در شوری ۱ مولار $10^6 \times 40$ سلول در میلی لیتر بود. همچنین در مطالعه دیگری حداکثر تعداد سلول در سویه ارومیه، *D. strains* تقریباً $10^6 \times 35$ در روز ۲۸ آزمایش بود (مددکار حق جو، ۱۳۹۲). در مطالعه Sharma و همکاران (۲۰۱۲) حداکثر تعداد سلول تولیدی از یک سویه هندی *D. strains* $10^6 \times 196$ سلول در میلی لیتر گزارش شد و در مطالعه محمدخانی و مددکار حق جو (۱۳۹۴) حداکثر تعداد سلول تولید شدی سویه ایرانی *D. strains* $10^6 \times 19$ سلول در میلی لیتر گزارش گردید که در کمترین غلظت های نمک ($1/1$ و $0/5$ مولار) به کار گرفته شده، به دست آمد. در مطالعه حاضر، حداکثر تعداد سلول در تیمارهایی که از آب ژرف در آنها استفاده کرده بودند (تیمارهای ۳، ۴ و ۵)، در روز ۲۱ آزمایش مشاهده شد در حالی که در تیمارهای یک و دو که از آب شهر و نمک ارومیه در آنها استفاده شده بود، حداکثر تعداد سلول در روز ۱۲ آزمایش مشاهده شد. از آنجایی که شرایط محیطی بر سرعت تقسیم و تعداد سلول ها تاثیر گذار است، به نظر می رسد که حضور عناصر مختلف در آب ژرف این امکان را فراهم کرده است که فرآیند صعودی رشد برای مدت زمان طولانی تری تداوم داشته باشد. مشابه این نتایج در مطالعه آقایی و شریعتی (۱۳۸۶) نیز مشاهده شد به نحوی که در تیمارهای حاوی غلظت های بالاتری از سولفات روند افزایش رشد تا روزهای پایانی آزمایش ادامه داشت در حالی که در غلظت های پایین تر سولفات نزولی شدن نمودار رشد سریع تر اتفاق افتاد. بر اساس نتایج حاصل از اندازه گیری پارامترهای فیزیوشیمیایی آب در تیمارهای مختلف در مطالعه حاضر متوسط غلظت سولفات در تیمار شماره ۲ (پایین ترین عملکرد رشد را در مقایسه با سایر تیمارها نشان داد)، $2/89 \pm 321/67$ میلی گرم در لیتر بود که نسبت به سایر تیمارهای آزمایش، غلظت پایین تری داشت. همچنین در مطالعه مددکار حق جو (۱۳۹۲) نشان داده شد که کمبود نیتрат در محیط در اغلب سویه های *D. strains* سبب کاهش تعداد سلول می گردد. از سوی دیگر، مشخص شده افزایش آهن در

محیط در اغلب سویه‌ها افزایش تقسیمات سلولی را القاء می‌کند. در مطالعه حاضر، متوسط غلظت نیترات تیمارهای ۳، ۴ و ۵ که از آب ژرف در آنها استفاده شده بود، در مقایسه با تیمارهای ۱ و ۲ کمتر بود، با این وجود رشد جلبک در این تیمارها تحت تأثیر این پارامتر قرار نگرفت. لذا، به نظر می‌رسد که میزان نیترات موجود در آب ژرف (در کنار ترکیبات ازته محیط کشت) نیازهای گونه *D. strains* را برآورده می‌کند. متوسط غلظت آهن در آبهای چاه نیمه (منبع تامین آب شهر زابل) 0.0083 میلی‌گرم در لیتر (قرایی و همکاران، ۱۳۹۵) گزارش شده است درحالی‌که در آب ژرف غلظت آهن 0.04 میلی‌گرم در لیتر (گزارش شرکت بهره‌بردار) می‌باشد. همچنین غلظت فسفات به عنوان یکی از ترکیبات مؤثر در رشد جلبک‌ها در تیمارهای حاوی آب ژرف، ۱۶-۹ برابر تیمارهای ۱ و ۲ می‌باشد که شرایط کاملاً مساعدی را برای رشد جلبک *D. strains* در این آب فراهم می‌کند. مقادیر بالای شوری کلرید سدیم از سویی، سبب افزایش انرژی مصرفی درون سلولی جلبک به منظور ایجاد تعادل اسمزی با محیط پیرامونی می‌گردد. در نتیجه، جلبک انرژی کمتری برای تقسیم سلولی در اختیار دارد و به دنبال کاهش تقسیمات سلولی کاهش رشد در محیط کشت می‌باشد (García et al., 2012). از سوی دیگر، با القاء اثر سوء بر غشاء سلولی در جذب عناصر مؤثر در تنظیم هموستازی جلبک نظیر پتاسیم اختلال ایجاد می‌کند (Tester and Davenport, 2003). به نظر می‌رسد، حضور نمک‌های سایر عناصر در آب ژرف بتواند ضمن اثرات مؤثر تغذیه‌ای در مهار اثرات منفی شوری بالای کلرید سدیم مؤثر باشد. در این مطالعه نیز ارزیابی غلظت سدیم در آب تیمارهای مختلف نیز نشان داد که در شوری‌ها یکسان، میزان غلظت این عنصر در تیمارهای حاوی آب ژرف پایین‌تر می‌باشد و در مقابل غلظت پتاسیم در این تیمارها حداقل ۴ برابر تیمارهای شماره ۱ و ۲ است. غنی‌تر بودن آب ژرف از نظر ترکیبات مؤثر در رشد نظیر فسفات، سولفات، آهن، پتاسیم، منیزیم، مس و روی (جدول ۲) می‌تواند توجیه‌کننده روند رشد بهتر تیمارهای حاوی آب ژرف در این مطالعه باشد.

در مطالعه حاضر، کمترین میزان نوسان pH در تیمارهای که در آنها از آب ژرف استفاده شده بود، اتفاق افتاده است. به‌طوری‌که pH در این تیمارها عمدتاً در محدوده ۸-۹ نوسان می‌کرد و در دو تیمار تهیه شده با آب شهر pH معمولاً در محدوده ۹-۱۰ بود. در محیط‌های کشت جلبکی به دلیل نوسانات مداوم غلظت دی اکسید کربن، pH نیز دچار نوسان می‌گردد. در این حالت، میزان نوسان pH ارتباط مستقیمی به ظرفیت بافری محیط کشت دارد به‌طوری‌که در محیط‌های با ظرفیت بافری کم عمل فتوسنتز می‌تواند pH آب را به میزان زیادی افزایش دهد. قلیائیت آب که با ظرفیت بافری آب ارتباط تنگاتنگ دارد، در تیمارهای حاوی آب ژرف در این مطالعه در دامنه $30-44$ mg/l as CaCO₃ در نوسان بود که در محدوده خوب و مناسب برای اهداف آبی‌پروری است (Meade, 1989, Tucker and Robinson, 1990). اما در تیمارهای ۱ و ۲ این مقدار بیش از ۲ برابر (۹۵-۱۱۴ میلی‌گرم در لیتر) بود که می‌تواند در مقدار تولیدات طبیعی مؤثر باشد. از سوی دیگر، افزایش pH در تیمارهای مختلف در مطالعات دیگری نیز گزارش شده است و آنرا را عاملی مطلوب برای القاء تولید کارتنوئیدها و تولید زی‌توده بیشتر می‌دانند (Lababpour et al., 2005; Colusse et al., 2020).

نتایج بررسی حاضر نشان داد، میانگین SGR و زی‌توده خشک در تیمار شماره ۲ پایین‌تر از سایر تیمارها بود. بالاترین میزان SGR در تیمارهای حاوی آب ژرف در روز ۶ آزمایش و در تیمارهای ۱ و ۲ در روز سوم آزمایش ثبت شد. همچنین در تمام تیمارها بخش عمده زی‌توده خشک تولیدی طی روزهای ۱۲-۶ آزمایش به‌دست آمد و در ادامه میزان زی‌توده خشک تولیدی در حد فاصل روزهای ۱۲-۱۸ و ۲۴-۱۸ برای تمام تیمارها کاهش یافت. کاهش وزن زی‌توده خشک طی روزهای ۲۴-۱۶ در مطالعه محمدخانی و مددکارحق‌جو (۱۳۹۴) نیز گزارش شده است که آن را با فقر غذایی محیط کشت با گذشت زمان مرتبط دانسته‌اند. در مطالعه Colusse و همکاران (۲۰۲۰) نیز در حد فاصل روزهای ۱۲-۷ بالاترین میزان زی‌توده تولیدی مشاهده گردید و پس از آن افت کرد. از

جمله دلایل این امر را می‌توان رابطه کاهش تقسیم سلولی و زی‌توده تولیدی با خود سایه افکنی جلبک‌ها و محرومیت نوری در اثر ازدیاد تراکم جلبک‌ها در محیط‌های کشت عنوان کرد. در کنار آن کاهش مواد مغذی محیط کشت و متغیرهایی نظیر کمیت و کیفیت نور نیز بر نرخ زی‌توده تولیدی اثرگذار است (Chavoshi and Shariati, 2019; Delavari Amrei et al., 2015).

نتایج اندازه‌گیری رنگی‌های فتوسنتزی نشان داد که بالاترین سطح کلروفیل a و b در تمام تیمارها در روز ۶ آزمایش ثبت شد و سپس شروع به کاهش کرد. بالاترین میانگین کلروفیل a در طول آزمایش در تیمار ۴ و کمترین آن در تیمار ۲ ثبت شد درحالی‌که بیشترین و کمترین سطح متوسط کلروفیل b به ترتیب در تیمارهای ۲ و ۱ ثبت شد. بالاترین میزان سطح کارتنوئیدها در تیمار ۱ و کمترین آن در تیمار ۲ به دست آمد. مشابه نتایج به دست آمده در این مطالعه در خصوص الگو تغییرات کلروفیل در مطالعه محمدخانی و مددکارحق‌جو (۱۳۹۴) نیز دیده می‌شود. چون بخش اعظم کلروفیل کل را کلروفیل a تشکیل می‌دهد، دنبال کردن روند تغییرات آن اهمیت بیشتری دارد. محتوای کلروفیل a جلبک‌ها در طول دوره رشد تغییر کرده و با توجه به زمان برداشت جلبک‌ها می‌تواند محتوای متفاوتی ثبت کند. در برخی موارد، با افزایش تعداد سلول‌ها میزان کلروفیل نیز افزایش می‌یابد. اما این امر عمومیت ندارد و در صورت کاهش محتوای کلروفیلی سلول‌ها، افزایش تعداد سلول با افزایش کلروفیل همراه نمی‌گردد. در تیمارهایی که تقسیم سلولی با سرعت بالایی رخ می‌دهد، اگرچه تعداد سلول‌ها در واحد حجم افزایش می‌یابد اما سرعت بالای تکثیر، فرصت لازم را برای تولید و تجمع رنگی‌های فتوسنتزی به جلبک‌ها نداده است و در نتیجه، میزان رنگی‌ها در سلول‌ها کاهش می‌یابد. به نظر می‌رسد، با افزایش تراکم سلول‌های جلبکی در محیط کشت در طول زمان، میزان نور دریافتی توسط جلبک‌های کاهش می‌یابد و در نتیجه، میزان کلروفیل و سرعت فتوسنتز نیز تحت تأثیر قرار می‌گیرد به‌طوری‌که بعد از روز ۶ آزمایش میزان کلروفیل در تیمارها کاهش می‌یابد. لذا، در برخی مطالعات رابطه مستقیم میان غلظت

کلروفیل و میزان فتوسنتز و تولیدات در گیاهان مشاهده می‌شود (عزیزی و همکاران، ۱۳۹۰) و در تعدادی از منابع، وجود رابطه معکوس (Murthy and Singh, 1979) یا فقدان ارتباط میان غلظت کلروفیل با سرعت فتوسنتز (Marini, 1986) یا محصول تولیدی (Ghobadi et al., 2011) مورد تأکید قرار می‌گیرد. در مطالعه حاضر، به نظر می‌رسد که افزایش میزان کارتنوئیدها در تیمارهای با شوری بالاتر (۳۵ قسمت در هزار) تا روز ۱۲ آزمایش، پاسخی از سوی جلبک‌های *D. strains* به تنش شوری باشد، اساساً این گونه جلبکی به علت فقدان دیواره سلولی در مواجهه با درجات بالای شوری با تولید گلیسرول، اصلاح حجم سلولی و یون‌های درون سلولی و افزایش غلظت کارتنوئیدهایی نظیر بتاکاروتن، تعادل اسمزی خود را حفظ و به تنش شوری پاسخ می‌دهد (Raja et al., 2012; Rad et al., 2011; García et al., 2007). در مطالعات مختلف اثرات آنتی اکسیدانی کارتنوئیدها و از جمله بتاکاروتن در مواقع بروز تنش‌ها ثابت شده است (Abd El-baky et al., 2004; Lamers et al., 2008). در خاتمه، به عنوان نتیجه‌گیری می‌توان اظهار کرد که در این مطالعه، میزان رشد، زی‌توده تولیدی و تجمع مقادیر کلروفیل‌های a و b و کارتنوئیدها، با توجه به نوع و مقدار شوری و زمان نمونه‌برداری، در تیمارهای مختلف، متفاوت بود. در این میان تیمارهای حاوی آب ژرف در عمده فاکتورهای مورد ارزیابی وضعیت بهتری را در مقایسه با سایر تیمارها داشتند. لذا، پرورش جلبک *D. salina* در آب ژرف امکان‌پذیر است. هرچند جهت بهبود زی‌توده جلبکی و ارتقاء کمی و کیفی تولیدات، لازم است پژوهش‌های تکمیلی در این خصوص صورت پذیرد.

تشکر و قدردانی

این مطالعه مستخرج از طرح پژوهشی «امکان‌سنجی پرورش آرتمیا در آب‌های ژرف سیستان» پیرو قرارداد شماره ۳۰۲۵۷ / ۹۹ / ۱۳ پ مورخ ۹۹ / ۰۴ / ۰۱ میان دانشگاه زابل و شرکت پرلوک پردیس پارسه می‌باشد. بدین‌وسیله، نگارندگان از شرکت پرلوک پردیس پارسه برای تأمین اعتبار این مطالعه و همکاری‌های بسیار خوب

Dunaliella sp. (جداسازی شده از آبهای ایران).

سلول و بافت، ۴(۱): ۸۵-۱۰۲.

Abd El-baky, H.H., El Baz, F.K. and El-Baroty, G.S., 2004. Production of antioxidant by the green alga *Dunaliella salina*. *International Journal of Agriculture & Biology*, 6: 49-57.

Bauer, L.M., Costa, J.A.V., da Rosa, A.P.C. and Santos, L.O., 2017. Growth stimulation and synthesis of lipids, pigments and antioxidants with magnetic fields in *Chlorella kessleri* cultivations. *Bioresource Technology*, 244: 1425-1432.

<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.06.036>.

Borowitzka, M.A. and 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.

<https://doi.org/10.1007/s10811-007-9171-x>.

Celekli, A. and Dönmez, G., 2006. Effect of pH, light intensity, salt and nitrogen concentrations on growth and β -carotene accumulation by a new isolate of *Dunaliella* sp. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22(2): 183-189. <https://doi.org/10.1007/s11274-005-9017-0>.

Chavoshi, Z.Z. and Shariati, M., 2019. Lipid production in *Dunaliella salina* under autotrophic, heterotrophic, and mixotrophic conditions. *Biologia*, 74(12): 1579-1590. <https://doi.org/10.2478/s11756-019-00336-6>.

و صمیمانه‌ای که برای انجام کلیه مراحل مطالعه داشتند، تشکر و قدردانی می‌نمایند.

منابع

اکبری، ف. و مددکار حق‌جو، م.، ۱۳۹۶. بهبود ارزش تغذیه‌ای دوگونه میکرو جلبک سبز *Dunaliella* به وسیله تغییر در فاکتورهای محیط کشت. شیلات (منابع طبیعی ایران)، ۷۰(۳): ۲۴۳-۲۶۱.

آقای، پ. و شریعتی، م.، ۱۳۸۶. اثر کمبود سولفور بر رشد سلولی، تولید بتاکاروتن، کلروفیل و فتوسنتز در جلبک *Dunaliella salina* جدا شده از مرداب شور گاوخونی اصفهان. مجله زیست‌شناسی ایران، ۲۰(۲): ۱۵۳-۱۶۳.

رنجبر اقدم، م.، حجازی، م.ا.، آیین‌فر، س. و حسین زاده، ن.، ۱۳۹۱. بررسی تأثیر چهار آنتی بیوتیک در رشد و کارایی آنها در عاری سازی آلودگی محیط کشت جلبک تک سلولی *Dunaliella* sp. علوم محیطی، ۹: ۸-۱.

عزیزی، گ.، علیمزادی، ل. و سیاهمرگویی، آ.، ۱۳۹۰. بررسی رابطه بین عدد دستگاه کلروفیل متر با محتوای کلروفیل، فتوسنتز و میزان نیتروژن برگ در سویا (*Glycine max* L.) فیزیولوژی محیطی گیاهی (پژوهش‌های اکوفیزیولوژی گیاهی ایران)، ۶(۳): ۳۴-۴۰. 20.1001.1.76712423.1390.6.23.4.6.

قرایی، ا.، میردار هریجانی، ج.، راهداری، ع.، کیخا، م. خندان بارانی، ه. و کرمی، ر.، ۱۳۹۵. تغییرات زمانی و مکانی ساختار جامعه فیتوپلانکتونی در آب‌های مخازن چاه نیمه‌های سیستان. بوم‌شناسی آبزیان، ۵(۴): ۴۰-۵۰.

محمدخانی، ر. و مددکار حق‌جو، م.، ۱۳۹۴. ارزیابی سرعت تکثیر، میزان پروتئین و برخی خصوصیات فیزیولوژیک دو سویه فیتوپلانکتون آب شور ریز جلبک *Dunaliella* تحت اثر تغییر برخی عوامل محیطی. مجله علوم و فنون دریایی، ۱۴(۲): ۲۵-۴۲.

مددکار حق‌جو، م.، ۱۳۹۲. بررسی مقایسه‌ای برخی شاخص‌های فیزیولوژیک (محتوای کلروفیلی، فعالیت فتوسنتزی ...) در گزینش سویه‌های جلبک

- Chen, Y. and Vaidyanathan, S., 2013.** Simultaneous assay of pigments, carbohydrates, proteins and lipids in microalgae. *Analytica chimica acta*, 776: 31-40.
<https://doi.org/10.1016/j.aca.2013.03.005>.
- Colusse, G.A., Mendes, C.R.B., Duarte, M.E.R., de Carvalho, J.C. and Nosedá, M.D., 2020.** Effects of different culture media on physiological features and laboratory scale production cost of *Dunaliella salina*. *Biotechnology Reports*, 27, p.e00508.
<https://doi.org/10.1016/j.btre.2020.e00508>.
- Deamici, K.M., Santos, L.O. and Costa, J.A.V., 2018.** Magnetic field action on outdoor and indoor cultures of *Spirulina*: Evaluation of growth, medium consumption and protein profile. *Bioresource Technology*, 249: 168-174.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.09.185>.
- Delavari Amrei, H., Ranjbar, R., Rastegar, S., Nasernejad, B. and Nejadebrahim, A., 2015.** Using fluorescent material for enhancing microalgae growth rate in photobioreactors. *Journal of Applied Phycology*, 27(1): 67-74.
<https://doi.org/10.1007/s10811-014-0305-7>.
- Fazeli, M. R., Tofighi, H., Samadi, N. and Jamalifar, H., 2006.** Effects of salinity on β -carotene production by *Dunaliella tertiolecta* DCCB26 isolated from the Urmia salt lake, north of Iran. *Bioresource Technology*, 97: 2453-2456.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2005.10.037>.
- García, N., López-Elías, J.A., Miranda, A., Martínez-Porchas, M., Huerta, N. and García, A., 2012.** Effect of salinity on growth and chemical composition of the diatom *Thalassiosira weissflogii* at three culture phases. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 40(2): 435-440.
<https://doi.org/10.3856/vol40-issue2-fulltext-18>.
- Ghobadi, M., Khosravi, S., Kahrizi, D. and Shirvani, F., 2011.** Study of water relations, chlorophyll and their correlations with grain yield in wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes. *International Journal of Agricultural and Biosystems Engineering*, 5(6): 353-356.
<https://doi.org/10.5281/zenodo.1085189>.
- Ghoshal, D., Mach, D., Agarwal, M., Goyal, A. and Goyal, A., 2002.** Osmoregulatory isoform of dihydroxyacetone phosphate reductase from *Dunaliella tertiolecta*: purification and characterization. *Protein Expression and Purification*, 24(3): 404-411.
<https://doi.org/10.1006/prep.2001.1588>.
- Guillard, R.R., 1979.** Methods for microflagellates and nannoplankton. Handbook of phycological methods: culture methods and growth measurements, pp. 289-311.
- Heidari, R., Saadatmand, S. and Riahi, H., 2000.** Effects of salt and irradiance stress on photosynthetic pigments and proteins in *Dunaliella salina* teodoresco. *Journal of Sciences Islamic Republic of Iran*, 11(2): 73-77.

- Helena, S., Zainuri, M. and Suprijanto, J., 2016.** Microalgae *Dunaliella salina* (Teodoresco, 1905) growth using the LED light (light limiting dioda) and different media. *Aquatic Procedia*, 7: 226-230. <https://doi.org/10.1016/j.aqpro.2016.07.031>
- Hosseini Tafreshi, A. and Shariati, M., 2006.** Pilot culture of three strains of *Dunaliella salina* for β -caroten production in open ponds in the central region of Iran. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22: 1003-1009. <https://doi.org/10.1007/s11274-006-9145-1>.
- Johnson, M.K., Johnson, E.J., MacElroy, R.D., Speer, H.L. and Bruff, B.S., 1968.** Effects of salts on the halophilic alga *Dunaliella viridis*. *Journal of Bacteriology*, 95(4): 1461-1468. <https://doi.org/10.1128/JB.95.4.1461-1468.1968>.
- Lababpour, A., Shimahara, K., Hada, K., Kyoui, Y., Katsuda, T. and Katoh, S., 2005.** Fed-batch culture under illumination with blue light emitting diodes (LEDs) for astaxanthin production by *Haematococcus pluvialis*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 100(3): 339-342. <https://doi.org/10.1263/jbb.100.339>.
- Lamers, P.P., Janssen, M., De Vos, R.C., Bino, R.J. and Wijffels, R.H., 2008.** Exploring and exploiting carotenoid accumulation in *Dunaliella salina* for cell-factory applications. *Trends in Biotechnology*, 26(11): 631-638. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2008.07.002>.
- Lavens, P. and Sorgeloos, P., 1996.** Manual on the production and use of live food for aquaculture. FAO Fisheries Technical paper. No. 361, FAO, Rome. 305 P. <http://www.fao.org/docrep/003/W3732E/W3732E00.HTM>
- Marini, R.P., 1986.** Do net gas exchange rates of green and red peach leaves differ? *Hort Science*, 21(1): 118-120.
- Meade, J.W., 1989.** Aquaculture management. Springer Science & Business Media: Van Nostrand Reinhold. New York, USA. 175 P. <https://doi.org/10.1007/978-1-4615-6470-6>.
- Moreno-Garrido, I. and Canavate, J.P., 2001.** Assessing chemical compounds for controlling predator ciliates in outdoor mass cultures of the green algae *Dunaliella salina*. *Aquacultural Engineering*, 24(2): 107-114. [https://doi.org/10.1016/S0144-8609\(00\)00067-4](https://doi.org/10.1016/S0144-8609(00)00067-4).
- Murthy, K.K. and Singh, M., 1979.** Photosynthesis, chlorophyll content and ribulose diphosphate carboxylase activity in relation to yield in wheat genotypes. *The Journal of Agricultural Science*, 93(1): 7-11. <https://doi.org/10.1017/S0021859600086068>.
- Rad, F.A., Aksoz, N. and 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. DOI:10.4314/AJB.V10I12

- Raja, R., Hemaiswarya, S., Balasubramanyam, D. and Rengasamy, R., 2007.** Protective effect of *Dunaliella salina* (Volvocales, Chlorophyta) against experimentally induced fibrosarcoma on wistar rats. *Microbiological Research*, 162(2): 177-184. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2006.03.009>.
- Richmond, A., 2008.** Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology. John Wiley & Sons, New York, USA. 566 p. DOI:10.1002/9780470995280.
- Sathasivam, R. and Juntawong, N., 2013.** Modified medium for enhanced growth of *Dunaliella* strains. *International Journal of Current Science*, 5: 67-73. <https://doi.org/10.6084/m9.doi.one.IJCSP10A1374>.
- Shariati, M. and Hadi, M.R., 2011.** Microalgal biotechnology and bioenergy in *Dunaliella*. In: A. Carpi (ed.), *Progress in Molecular and Environmental Bioengineering-From Analysis and Modeling to Technology Applications*. IntechOpen, London. pp 483-506. DOI: 10.5772/19046.
- Sharma, P., Agarwal, V., Mohan, M.K., Kachhwaha, S. and Kothari, S.L., 2012.** Isolation and characterization of *Dunaliella* species from Sambhar Lake (India) and its phylogenetic position in the genus *Dunaliella* using 18S rDNA. *National Academy Science Letters*, 35(3): 207-213. <https://doi.org/10.1007/s40009-012-0038-6>.
- Tester, M. and Davenport, R., 2003.** Na⁺ tolerance and Na⁺ transport in higher plants. *Annals of Botany*, 91(5): 503-527. <https://doi.org/10.1093/aob/mcg058>.
- Törnwall, M.E., Virtamo, J., Korhonen, P.A., Virtanen, M.J., Taylor, P.R., Albanes, D. and Huttunen, J.K., 2004.** Effect of α -tocopherol and β -carotene supplementation on coronary heart disease during the 6-year post-trial follow-up in the ATBC study. *European Heart Journal*, 25(13): 1171-1178. <https://doi.org/10.1016/j.ehj.2004.05.007>.
- Tucker, C.C. and Robinson, E.H., 1990.** Channel catfish farming handbook. Springer Science & Business Media: Van Nostrand Reinhold, New York, USA. 454 p. <https://doi.org/10.1007/978-1-4757-1376-3>.
- Wijffels, R.H., 2008.** Potential of sponges and microalgae for marine biotechnology. *Trends in Biotechnology*, 26(1): 26-31. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2007.10.002>.
- Wood, A.M., Everroad, R.C. and Wingard, L.M., 2005.** Measuring growth rates in microalgal cultures. *Algal Culturing Techniques*, 18: 269-288. <https://doi.org/10.1016/B978-012088426-1/50019-6>.

Evaluation of growth, biomass, and pigment contents of *Dunaliella salina* cultivated in a deep aquifer well waters of Sistan

Khosravanizadeh A.^{1*}; Rahdari A.¹; Pakzad Toochoaei S.²

*Khosravani.ali@uoz.ac.ir

1-Department of Fisheries, Hamoun International Wetland Research Institute, University of Zabol, Zabol, Iran.

2. Department of Natural Ecosystems Management, Hamoun International Wetland Research Institute, University of Zabol, Zabol, Iran.

Abstract

In this study, growth, biomass, concentrations of chlorophyll *a* chlorophyll *b*, and carotenoid content of *Dunaliella salina* were evaluated in five different treatments (T1: freshwater + 35 ppt salinity, T2: freshwater + 20 ppt salinity, T3: deep well water+ 35 ppt salinity, T4: 35 ppt concentrated deep well water, and T5: 20 ppt deep aquifer well water) in the same conditions, including light intensity ($33.75 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), photoperiod regime (16 h light:8 h dark), temperature ($25\pm 1^\circ\text{C}$), pH (8), cultivation medium (Johnson), and aeration (24 h) for 24 days. The results showed that the lowest pH fluctuation was observed in the T3, T4, and T5. In addition, T3, T4, and T5 had a better situation in terms of growth, and the growth rate was increased until the 21st day of the experiment. Maximum cellular yield (R) for T3, T4, and T5 was recorded on day 21, which was 9 days longer than other groups (T1 & T2). The Minimum cell number, minimum optical density, minimum specific growth rate (SGR), minimum doubling time (DT), minimum dry biomass, and maximum Division per day (k) were recorded for T2. The maximum dry biomass was observed in T4. The highest and lowest mean of chlorophyll *a* concentration appeared in T4 and T2, respectively. While the maximum and minimum mean of chlorophyll *b* level was recorded in T2 and T1, respectively. The highest and lowest mean of carotenoids concentration was obtained in T1 and T2, respectively. Based on the results of this study, the cultivation of *D.salina* with deep aquifer well water is possible.

Keywords: Cultivation, Algae, *Dunaliella salina*, Deep aquifer well, Sistan

*Corresponding author