

## تأثیر شوری بر رشد، غلظت کلروفیل و بتاکاروتن در جلبک *Dunaliella sp.* جداسازی شده از خلیج چابهار

شیروان عنایتی<sup>\*</sup>، آرش جوانشیر خویی<sup>۱</sup>، غلامرضا رفیعی<sup>۲</sup>، هادی پورباقر<sup>۳</sup>، امیرعلی مرادی نسب<sup>۳</sup>

<sup>\*</sup>enayati.shirvan@gmail.com

۱- گروه منابع طبیعی، اکولوژی آبزیان، سازمان شیلات ایران

۲- گروه شیلات، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی کرج، دانشگاه تهران

۳- موسسه تحقیقات بین‌المللی تاس‌ماهیان دریای خزر، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، رشت، ایران

تاریخ پذیرش: خرداد ۱۳۹۷

تاریخ دریافت: خرداد ۱۳۹۵

### چکیده

جلبک *Dunaliella sp.* از شاخه جلبک‌های سبز است که دارای پراکنش جهانی می‌باشد و در آب‌های ساحلی خلیج چابهار نیز به وفور گزارش شده است. از ویژگی‌های منحصر‌بفرد این جلبک، قدرت سازش در شوری و دمای زیاد است. این جلبک در مقابل کمبود نیترات مقاوم است و در پاسخ به تنش‌های محیطی با افزایش غلظت رنگدانه‌ها خصوصاً رنگریزه بتاکاروتن و گلیسرول پاسخ می‌دهد. هدف از این تحقیق، تاثیر فاکتور شوری بر نرخ رشد سلولی، میزان تولید و ذخیره‌سازی کلروفیل و بتاکاروتن در جلبک *Dunaliella sp.* بود. در این پژوهش ضمن جداسازی و خالص‌سازی جلبک *Dunaliella sp.* تاثیر شوری‌های مختلف (۰/۵، ۱، ۱/۵، ۲، ۳ و ۴ مولار کلرید سدیم) بر رشد و تکثیر جلبک، میزان تولید کلروفیل a، b و بتاکاروتن طی مدت چهار هفته مورد بررسی قرار گرفت. میزان تولید کلروفیل (a و b) و بتاکاروتن با اسپکتروفوتومتری با کمک استون اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد که جلبک *Dunaliella sp.* در غلظت‌های ۰/۵، ۱، ۱/۵، ۲، ۳ و ۴ مولار کلرید سدیم قادر به رشد است؛ ولی بیشترین رشد و تکثیر سلولی و همچنین بیشترین میزان تولید بتاکاروتن این جلبک بین شوری‌های ۱/۵ تا ۲ مولار کلرید سدیم می‌باشد ( $p < 0.05$ ). با افزایش رشد و تکثیر جلبک، میزان تولید کلروفیل a و b در تمام شوری‌ها افزایش یافت ولی به علت تولید بتاکاروتن، میزان غلظت این رنگریزه‌ها کاهش نشان داد.

**لغات کلیدی:** شوری، رشد، کلروفیل، جلبک، *Dunaliella sp.*، خلیج چابهار

\*نویسنده مسئول

**مقدمه**

موجود در *Dunaliella* در بسیاری از کشورهای دنیا از جمله استرالیا، آمریکا و فلسطین اشغالی در مقیاس تجاری و در چین، شیلی و کوبیت در مقیاس نیمه صنعتی تولید می‌شود. در سال‌های اخیر نیز گونه‌هایی دیگری از *D. viridis* از جمله *Dunaliella Moulton & Burford* به عنوان منبع کاروتوئید مطرح شده‌اند (1990). حسینی بلادی در سال ۱۳۸۲ بهینه‌سازی محیط کشت جلبک سبز *D. salina* با هدف افزایش رشد، تکثیر و تولید بتاکاروتون با استفاده از برخی مواد مغذی را مطالعه نمود. قاسمی در سال ۱۳۸۷ به مطالعه تولید گلیسرول از جلبک دریابی *Dunaliella* پرداخت. مهرابی و همکاران (۱۳۹۷)، به بررسی تاثیر غلظت‌های مختلف سدیم نیترات و سدیم بی‌کربنات بر میزان رشد و چربی کل ریزجلبک (*Neochlorisoleoabundance*) پرداختند. Marin و همکاران (۱۹۹۸)، به بررسی اثرات *D. salina* غلظت نیترات بر رشد و تولید رنگدانه در پرورش یافته در نورهای کم و شوری‌های مختلف پرداختند. Heidari و همکاران (۲۰۰۰)، اثرات شوری و نور بر تولید رنگدانه‌ها و پروتئین‌ها در جلبک *D. salina* را مورد مطالعه قرار دادند. Fazeli و همکاران (۲۰۰۶)، تجمع کاروتوئیدها توسط *D. tertiolecta* و *D. salina* را تحت شرایط استرسی مختلف مورد بررسی قرار دادند و از تیمارهای مختلف با شوری‌های مختلف و شدت تابش‌های نوری متفاوت استفاده نمودند. Tafreshi و Shariati در سال ۲۰۰۶ به کشت پایلوت سه نژاد *D. salina* برای تولید بتاکاروتون در استخراجی باز نواحی مرکزی ایران اقدام نمودند و به مقایسه میزان تولید بتاکاروتون و نرخ رشد جلبک در تیمارهای مختلف پرداختند. Garcia و همکاران (۲۰۰۷) خصوصیات فیزیولوژیکی گونه‌های *D. salina* و *D. viridis* در دریاچه‌های مکریک را بررسی نمودند. با توجه به ارزش‌های این جلبک (دارویی، تغذیه‌ای و اقتصادی) و اطلاعات کمی که در خصوص تجمع رنگدانه‌ها بخصوص بتاکاروتون در اثر تغییرات شوری وجود دارد، همچنین با توجه به اینکه تاکنون پژوهشی در خصوص جلبک *Dunaliella* sp.

در اکوسیستم‌های آبی جلبک‌ها و فیتوپلانکتون‌ها بخش مهمی از زنجیره غذایی موجودات آبزی و ماهی‌ها را تشکیل می‌دهند. جلبک‌ها موجوداتی فتوآتوتروف و تولید کننده اصلی مواد آلی در محیط‌های آبی هستند. همچنین جلبک‌ها دارای ارزش صنعتی نیز هستند. زیرا ترکیبات مهمی مانند مواد معدنی و رنگدانه‌ها از آنها تولید و جداسازی می‌شود که رنگدانه کاروتوئید قابل ذکر است (*Borowitzka&Borowitzka, 1990*). جلبک تازک‌دار تک سلولی فاقد دیواره سلولی است (Edwards, 1990) با نوسانات شوری بالا زیست می‌کند (عطاران فریمان و همکاران، ۱۳۹۶) و قادر به تحمل شوری‌های بین ۰/۵ تا ۵ مولار کلرید سدیم می‌باشد و این سازگاری را با ثابت نگه داشتن غلظت یون‌های داخلی بدن خود انجام می‌دهد. این ویژگی در کنار نرخ متابولیک بالا و تطبیق‌پذیری فیزیولوژیکی آن سبب شده است که به عنوان یک گونه با قابلیت تولید بالای بتاکاروتون شناخته شود (Raja et al., 2007). همچنین این جلبک قادر به تجمع مقادیر بالایی از بتاکاروتون (تا بیش از ۱۴ درصد وزن خشک) در شرایطی نظیر شدت نور زیاد، دما و شوری بالا و کمبود مواد مغذی است (Ben-Amotz & Shaish, 1992). جلبک تک سلولی *Dunaliella* دارای جنس‌ها و گونه‌های متعددی است که برخی در آب‌های شیرین، برخی در آب‌های شور (نظیر آب دریا) و برخی در آب‌های بسیار شور زندگی می‌نمایند. همچنین گونه‌های شورپسند *Dunaliella* حاوی غلظت بالای گلیسرول می‌باشند. گونه *D. salina* برای اولین بار توسط Massyuk به عنوان منبع تجارتی بتاکاروتون شناخته شد و بعداً به عنوان منبع گلیسرول معرفی گردید (Massyuk, 1966; Ben-Amotz et al., 1982). بتاکاروتون یک ماده غذایی بسیار ارزشمند محسوب می‌شود که نقش بسیار بسزایی در سلامتی انسان دارد و مکمل‌های زیادی از این ماده تولید و به بازار عرضه می‌شوند (Borowitzka, 1981a).

آزمایش به مقدار مساوی از محیط کشت گیلارد شامل مواد غذایی آلی و مواد معدنی مورد نیاز اضافه شد و ۱ سی سی از آب نمونه برداری شده به لوله اولی تزریق گردید و با کمک میکسر همگن شد. سپس از لوله آزمایش اولی به مقدار ۱ سی سی نمونه برداشته و به لوله آزمایش دومی تزریق گردید و پس از هم زدن با میکسر ۱ سی سی از این لوله به لوله سومی اضافه گردید و به همین طریق این عمل تا تزریق لوله دهم انجام شد و پس از اطمینان از خالص بودن نمونه، جلبک‌های خالص‌سازی شده در شرایط کاملاً استریل به ارلن‌های حاوی محیط کشت گیلارد اضافه شد. برای بررسی تاثیر شوری بر رشد و تکثیر جلبک، تعداد ۲۱ عدد ارلن آماده گردید. سپس به هر یک از ارلن‌ها ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت گیلارد اضافه شد و این ارلن‌ها به همراه محیط کشت در اتوکلاو دمای ۱۲۵ درجه سانتی‌گراد در فشار ۲۰ اتمسفر به مدت ۱۵ دقیقه استریل گردید. پس از سرد شدن، در شرایط کاملاً استریل یک میلی‌لیتر سوسپانسیون حاوی جلبک به محیط کشت استریل در ارلن‌های مورد نظر (۰/۷۵، ۰/۰۵، ۰/۷۵، ۱، ۱/۵، ۱/۵، ۳، ۲ و ۴ مولار کلرید سدیم) تزریق گردید و در دمای ۲۶ درجه سانتی‌گراد، شدت نور ۴۰۰۰ لوکس و هوادهی ثابت رشد و تکثیر شدند. پس از گذشت چهار روز، ۱ سی سی از محیط کشت حاوی جلبک به منظور شمارش افزایش تعداد سلول‌ها، تعیین غلظت کلروفیل a و b و بتاکاروتون نمونه برداری شد و هر چهار روز این عمل تکرار گردید (Borowitzka *et al.*, 1990) (شکل ۲).

جداسازی شده از خوریات چابهار صورت نگرفته است، در این تحقیق تاثیر فاکتور شوری بر نرخ رشد سلولی، میزان تولید و ذخیره‌سازی کلروفیل و بتاکاروتون در جلبک *Dunaliella sp.* مورد بررسی قرار گرفت تا مناسب‌ترین میزان شوری برای نرخ رشد سلولی و تجمع کلروفیل و بتاکاروتون آن تعیین گردد.

## مواد و روش کار

نمونه‌های آب حاوی جلبک *Dunaliella sp.* در تابستان ۱۳۹۳ از خوریات نمکی شرق اطراف چابهار تهیه گردیدند. نمونه‌برداری با استفاده از ظروف شیشه‌ای به صورت تصادفی از نقاط مختلف خور صورت گرفت. سپس نمونه‌ها بلافالصله به آزمایشگاه منتقل و تا شروع آزمایش‌ها در اتاق رشد با شدت نوری ۴۰۰۰ لوکس و دمای ۲۶ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند (شکل ۱).



شکل ۱: اتاق رشد جلبک *Dunaliella sp.*

Figure 1: Growing room of *Dunaliella sp.*

و کشت نمونه‌ها از اطلاعات ارائه شده توسط آندرسون انجام گردید. خالص سازی بدین منظور ابتدا در ۱۰ لوله



شکل ۲: جلبک *Dunaliella sp.* در حال رشد

Figure 2: Growing of *Dunaliella sp.*



و جذب نور در طول موج‌های ۴۱۲، ۴۳۱، ۴۶۰ و ۴۸۰ نانومتر با اسپکتروفوتومتر شیمادزو مدل UV-160A اندازه‌گیری گردید و با استفاده از فرمول‌های زیر، میزان غلظت کلروفیل a و b و بتاکاروتون بر حسب میکروگرم در میلی‌لیتر سوسپانسیون جلبکی محاسبه شد (Eijckelhoff & Dekker, 1997):

$$\text{Chl.a ( g/ml)} = -1.709A + 11.970A - 2.993A - 5.708A$$

$$\text{Chl.b ( g/ml)} = -0.171A - 0.230A + 11.871A - 13.216A$$

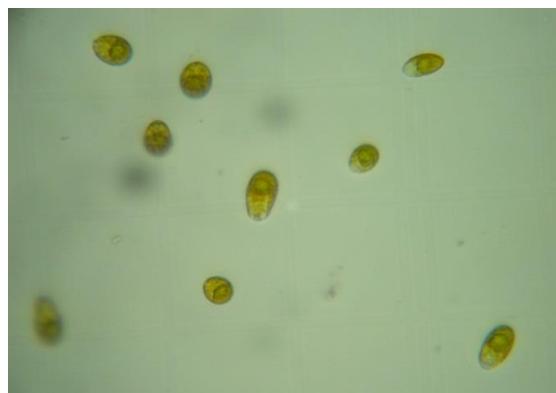
$$\beta\text{-carotene ( g/ml)} = -0.430A + 0.251A - 4.376A + 13.216A$$

در تمامی مراحل آزمایش هر تیمار داری سه تکرار بود و برای بررسی تأثیر هر تیمار شوری از آنالیز واریانس یک طرفه استفاده گردید. همچنین در صورت وجود اختلاف معنی‌دار بین سطوح شوری از آزمون توکی استفاده گردید. برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرمافزار SPSS 21.0 استفاده شد (Zar, 2010).

## نتایج

تعداد سلول‌های جلبک *Dunaliella sp.* در غلظت‌های ۰/۵، ۰/۷۵، ۱، ۱/۵، ۲، ۳ و ۴ مولار کلرید سدیم در روزهای ۴، ۸، ۱۲، ۱۶، ۲۰، ۲۴، ۲۸ و ۳۲ کشت، توسط میکروسکوپ شمارش و بررسی شد که نتایج آن در شکل زیر نشان داده شده است (شکل ۴). مقایسه تعداد سلول‌های تکثیر یافته در تیمارهای مختلف شوری (از ۰/۵ تا ۴ مولار کلرید سدیم) در روزهای مختلف آزمایش نشان داد که در شوری‌های ۰/۵ و ۰/۷۵ و ۱ مولار بین تمام روزها (از روز ۴ تا ۳۲) اختلاف معنی‌دار بود ( $p < 0/05$ ). در غلظت‌های ۰/۷۵، ۱، ۱/۵، ۲ و ۳ مولار بالاترین میانگین تعداد سلول‌ها در روز ۲۴ مشاهده شد، هر چند که به نظر می‌رسد روز ۲۰ می‌تواند به عنوان نقطه پایان رشد صعودی مدنظر قرار گیرد. آنالیزها نشان داد که در اغلب موارد بین روزهای پایانی (روزهای ۲۰، ۲۴، ۲۸ و ۳۲) تفاوت معنی‌داری از نظر تعداد سلول‌ها وجود نداشت، ولی در اغلب موارد بین این

برای شمارش جلبک‌ها از لام هموسیتومتر استفاده گردید. بدین منظور ابتدا ارلن‌های حاوی جلبک به آرامی حرکت دورانی داده شد تا جلبک‌ها به طور یکنواخت پخش گردند. سپس یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون جلبکی را به یک لوله آزمایش منتقل و ۱۰ میکرولیتر محلول لوگل حاوی ید به آن اضافه گردید تا جلبک‌ها ثابت شوند. آنگاه یک قطره از سوسپانسیون جلبکی روی محفظه مخصوص لام هموسیتومتر ریخته شد و پس از قرار دادن لام، تعداد سلول‌ها توسط میکروسکوپ با بزرگنمایی ۴۰ شمارش و محاسبه گردید (Borowitzka *et al.*, 1990) (شکل ۳).



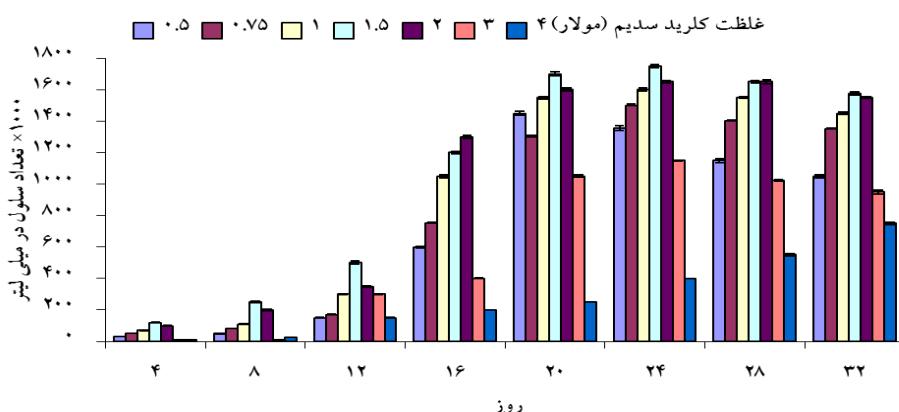
شکل ۳: جلبک *Dunaliella sp.* با بزرگنمایی ۴۰

Figure 3: *Dunaliella sp.* with magnification 40

در این سری از آزمایش‌ها، از ارلن‌های حاوی غلظت‌های مختلف کلرید سدیم (۰/۵، ۰/۷۵، ۱، ۱/۵، ۲، ۳ و ۴ مولار) در فواصل زمانی ۴ روز نمونه‌برداری انجام گرفت. برای استخراج کلروفیل و بتاکاروتون ابتدا تعدادی لوله سانتریفیوز آماده شد و به هر لوله ۲ میلی‌لیتر از سوسپانسیون جلبکی تهیه شده اضافه گردید و جلبک‌ها توسط دستگاه سانتریفیوژ به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۲۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. سپس محلول بالایی به آرامی ۸۰ جدا و به رسوب جلبکی باقیمانده ۲ میلی‌لیتر استون درصد اضافه شد. پس از بهم زدن توسط دستگاه همزن (Vortex)، مجدداً عمل سانتریفیوژ به مدت ۱۰ دقیقه تکرار گردید. آن‌گاه محلول فوقانی حاوی رنگیزه‌ها را جدا

شمارش شده وجود داشت ( $p<0.05$ ). در شوری ۴ مولار نیز بین تمام روزهای نمونه برداری از نظر تعداد سلول‌های شمارش شده تفاوت آماری معنی‌دار بود ( $p<0.05$ ). اما منحنی رشد آن تا حدود بسیار زیادی با منحنی رشد سایر تیمارها متفاوت بود و تا پایان روز ۳۲، فاز رشد تصاعدی همچنان ادامه داشت و بالاترین تعداد سلول‌ها نیز در روز ۳۲ مشاهده شد. بررسی‌های آماری نشان دادند که در مجموع بالاترین تعداد میانگین سلول‌های تکثیر یافته در تمام روزهای نمونه برداری (روز ۴ تا ۳۲) به جز روزهای ۱۶ و ۲۸ در شوری ۱/۵ مولار مشاهده شد و در روزهای ۱۶ و ۲۸ این مقدار بیشینه در شوری ۲ مولار مشاهده شد. بنابراین می‌توان شوری ۱/۵ تا ۲ را به عنوان شوری بهینه از نظر رشد سلولی برای این جلبک مدنظر قرار داد (شکل ۴).

روزهای پایانی و روزهایی ابتدایی تفاوت معنی‌داری مشاهده شد ( $p<0.05$ ). این روند تا اندازه‌ای نیز در روز ۱۶ نسبت به سایر روزها در این شوری مشاهده شده، به گونه‌ای که فقط در مقایسه با روز ۴ دارای اختلاف معنی‌داری بود ( $p<0.05$ ). در شوری ۲ مولار هم داده‌ها حاکی از آن بودند که می‌توان روز ۲۰ را به عنوان نقطه پایانی مرحله رشد در نظر گرفت و بعد از آن مرحله رشد ایستایی آغاز گردید. آنالیزهای آماری نشان دادند که در این غلظت، بین تمام روزها از نظر تعداد سلول‌های تکثیر یافته تفاوت معنی‌داری وجود دارد ( $p<0.05$ ). در شوری ۳ مولار تا حدی منحنی رشد نسبت به شوری‌های قبلی متفاوت بود، اما باز هم در مجموع می‌توان روز ۲۰ را به عنوان نقطه پایان مرحله رشد تصاعدی در نظر گرفت و از نظر آماری نیز به غیر از روزهای ۴ و ۸، بین تمام روزها تفاوت معنی‌داری از نظر تعداد سلول‌های



شکل ۴: میانگین±انحراف معیار تعداد سلول‌های جلبک *Dunaliella* sp. در غلظت‌های مختلف کلرید سدیم طی روزهای مختلف کشت

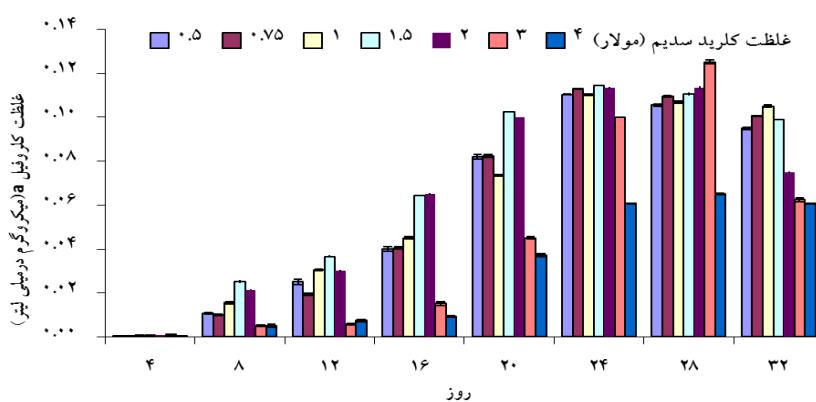
Figure 4: The mean±SD number of *Dunaliella* sp. isolated cells in different levels of NaCl during different days.

مختلف شوری (۰/۵، ۰/۷۵، ۱، ۱/۵، ۲، ۳ و ۴ مولار کلرید سدیم) بر میزان کلروفیل a بسیار ناچیز بود. اما پس از آن در تمام تیمارهای شوری غلظت کلروفیل a افزایش نشان داد. میزان غلظت کلروفیل a در شوری ۰/۵ مولار تا روز ۲۴ افزایش نشان داد. اما پس از آن تا پایان دوره کشت میزان کلروفیل a کاهش یافت. میزان غلظت کلروفیل a

میزان غلظت کلروفیل a جلبک *Dunaliella* sp. در غلظت‌های ۰/۵، ۰/۷۵، ۱، ۱/۵، ۲، ۳ و ۴ مولار کلرید سدیم در تمام روزهای کشت (از روز ۴ تا ۳۲)، با روش اسپکتروفوتومتری اندازه‌گیری شد که نتایج آن در شکل زیر نشان داده شده است (شکل ۵). همان‌طور که مشاهده می‌شود در ۴ روز اول پس از کشت تاثیر غلظت‌های

از روز ۱۶ تا ۲۸ افزایش نسبتاً قابل توجهی نشان داد ولی در هر حال میزان کلروفیل a این تیمار در تمام روزهای کشت از همه تیمارها کمتر بود. بررسی آماری نشان داد که از نظر غلظت کلروفیل a با توجه به شوری‌های مورد استفاده ( $0/05$  تا  $4$  مولار) بین اغلب روزهای آزمایش (روزهای  $4$  تا  $32$ ) اختلاف آماری معنی‌داری وجود داشت ( $p<0/05$ ) و فقط در شوری  $2$  مولار بین روزهای  $4$  تا  $28$ ، در شوری  $3$  مولار بین روزهای  $8$  با  $12$  و در شوری  $4$  مولار بین روزهای  $24$  با  $32$  اختلاف معنی‌دار نبود. آنالیز داده‌ها و بررسی میانگین‌ها، بالاترین میزان غلظت کلروفیل a در روز  $28$  نمونه‌برداری در شوری  $3$  مولار کلرید سدیم، در روز  $32$  در شوری  $1$ ، در روز  $16$  در شوری  $2$  و در سایر روزهای نمونه‌برداری ( $8$ ،  $12$ ،  $20$  و  $24$ ) در شوری  $1/5$  مولار نشان داد که می‌توان با توجه به نتایج حاصل، شوری  $1/5$  را به عنوان شوری بهینه از نظر میزان حداقل غلظت کلروفیل a معرفی نمود (شکل ۵).

در شوری  $0/75$  مولار کلرید سدیم تا روز  $16$  افزایش و از روز  $16$  تا  $24$  این افزایش همچنان با شبیه بیشتر ادامه داشت، اما پس از آن رو به کاهش بود. در شوری با غلظت  $1$  مولار نیز روند تغییرات میزان غلظت کلروفیل a همانند دو تیمار قبلی تا روز  $24$  افزایش یافت و بعد از آن با کاهش همراه بود. میزان غلظت کلروفیل a در تیمار با شوری  $1/5$  مولار کلرید سدیم تا روز  $24$  پس از کشت در مقایسه با سایر تیمارها از همه بیشتر مشاهده شد. میزان کلروفیل a در تیمار با شوری  $2$  مولار تقریباً همانند تیمار با غلظت  $1/5$  مولار مشاهده گردید. هر چند تا روز  $12$  میزان کلروفیل a این دو تیمار اختلاف معنی‌داری نسبت به هم داشت ( $p<0/05$ ). در تیمار با شوری  $3$  مولار کلرید سدیم میزان غلظت کلروفیل a تا روز  $16$  با شبیه ملایمی افزایش یافت، اما این افزایش تا روز  $28$  با شبیه تندتری ادامه داشت و به میزان حداقل غلظت در این روز رسید. در تیمار با شوری  $4$  مولار کلرید سدیم تا روز  $16$  پس از کشت افزایش اندکی در میزان کلروفیل a مشاهده شد؛ اما



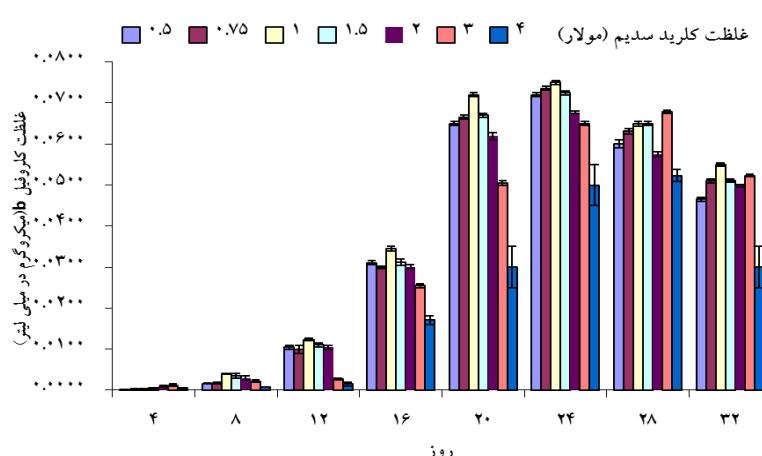
شکل ۵: میانگین±انحراف غلظت کلروفیل a جلبک *Dunaliella* sp. در غلظت‌های مختلف کلروفیل a طی روزهای مختلف کشت  
Figure 5: The mean $\pm$ SD density of *Dunaliella* sp. isolated chlorophyll a in different levels of NaCl during different days.

داده شده است (شکل ۶). همان‌گونه که ملاحظه می‌شود میزان غلظت کلروفیل b در روز  $4$  پس از کشت بسیار اندک و ناچیز بود اما پس از آن تا روز  $24$  در اکثر تیمارها افزایش قابل توجهی در میزان غلظت این رنگریزه مشاهده

با روش اسپکتروفوتومتری میزان غلظت کلروفیل b جلبک *Dunaliella* sp. در غلظت‌های  $0/05$ ،  $0/75$ ،  $1$ ،  $1/5$  و  $4$  مولار کلروفیل سدیم در تمام روزهای کشت (از روز  $4$  تا  $32$ )، اندازه‌گیری گردید که نتایج آن در شکل زیر نشان

میانگین کلروفیل b در روز ۲۴ اندازه‌گیری گردید و محدوده بین روزهای ۲۰ تا ۲۴ به عنوان محدوده بیشینه مطرح شد. در شوری ۰/۷۵ مولار تفاوت‌های آماری میزان کلروفیل b بین روزهای مختلف نمونه‌برداری دارای تغییرات خاصی بود و اغلب بین روزهای ابتدایی (روزهای ۴ تا ۱۲) و از سویی دیگر روزهای انتهایی (روزهای ۲۴ تا ۳۲) تفاوت معنی‌دار نبود و بیشتر تفاوت‌های معنی‌دار بین روزهای ۱۲ به بعد و تا روز ۲۰ مشاهده شد. در شوری‌های ۰/۰۵ (p<0/۰۵). در شوری‌های ۰/۷۵، ۱، ۱/۵ و ۲ مولار نیز بالاترین میزان میانگین این رنگدانه در روز ۲۴ و در شوری‌های ۳ و ۴ مولار در روز ۲۸ اندازه‌گیری گردید؛ که در شوری‌های ۰/۵ تا ۲ روند صعودی باز ریشه داشت. این روند در روز ۲۰ قابل توجه بود. هر چند که محدوده روزهای ۲۰ تا ۲۴ به عنوان محدوده بیشینه مطرح بود، این محدوده برای شوری‌های ۳ و ۴ مولار در روزهای ۲۴ تا ۲۸ قابل مشاهده بود. از نظر بیشینه میزان میانگین کلروفیل b داده‌ها نشان دادند که بالاترین میانگین در روز ۸ تا ۳۲ در شوری ۱ مولار مشاهده شد که می‌تواند گویای آن باشد که شوری بهینه برای دارا بودن حداقل غلظت کلروفیل b در شوری ۱ مولار است (شکل ۶).

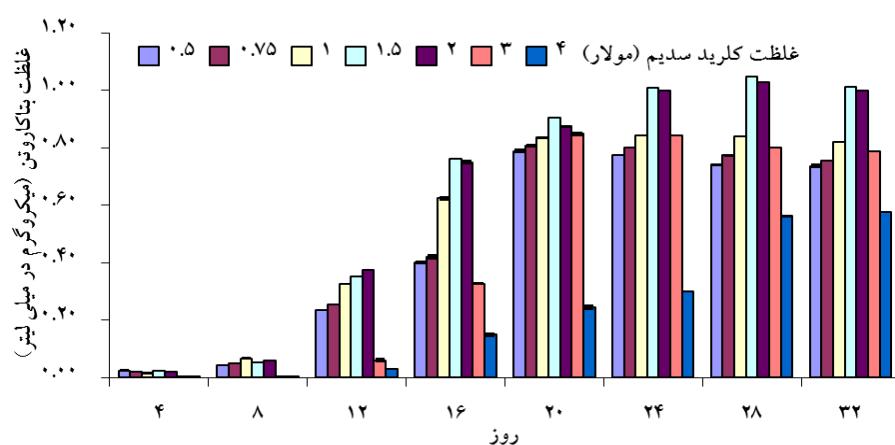
شد و بعد از آن تا روز ۳۲ کاهش داشت. میزان کلروفیل b در غلظت ۰/۵ و ۰/۷۵ مولار کلرید سدیم از روز ۱۲ تا ۲۴ افزایش چشمگیری داشت. البته این افزایش از روز ۲۰ تا روز ۲۴ با شبیه ملایم‌تر بود و پس از آن تا پایان دوره کشت کاهش نشان داد. در غلظت ۱ مولار کلرید سدیم همانند دو تیمار قبلی میزان کلروفیل b از روز ۱۲ تا ۲۴ افزایش یافت؛ اما این افزایش بین روزهای ۱۶ تا ۲۰ بسیار چشمگیر بود. اما در دو تیمار با غلظت ۱/۵ و ۲ مولار کلرید سدیم از روز ۸ افزایش قابل توجهی در میزان غلظت کلروفیل b مشاهده گردید. این افزایش تا روز ۲۴ ادامه داشت و پس از آن با شبیه بسیار ملایمی تا پایان کشت کاهش یافت. بیشترین میزان غلظت کلروفیل b در روز ۲۸ کشت در تیمار ۳ مولار کلرید سدیم ملاحظه شد. تیمار ۴ مولار دارای کمترین میزان غلظت کلروفیل b در تمام روزهای کشت بود. در بررسی آماری شوری ۰/۵ مولار بین تمام روزهای نمونه‌برداری (روزهای ۴ تا ۳۲) به جز روزهای ۴ و ۸ از نظر میزان کلروفیل b تفاوت معنی‌داری وجود داشت (p<0/۰۵) و بالاترین میزان



شکل ۶: میانگین±انحراف غلظت کلروفیل b جلبک *Dunaliella sp.* در غلظت‌های مختلف کلروفیل b طی روزهای مختلف کشت  
Figure 6: The mean±SD density of *Dunaliella sp.* isolated chlorophyll b in different levels of NaCl during different days.

نچیز بود اما از روز ۱۲ میزان بتاکاروتون با شبیه بسیار تندری افزایش یافت. همچنین میزان بتاکاروتون این تیمار در بسیاری از روزهای کشت از تیمارهای ۰/۵ و ۱ مولار بیشتر مشاهده شد. اما میزان بتاکاروتون در تیمار ۴ مولار در تمام دوره کشت از سایر تیمارها کمتر ملاحظه شد و بیشترین میزان بتاکاروتون در این تیمار در روز ۳۲ پس از کشت بود. همچنین با توجه به مقادیر میانگین بدست آمده بالاترین غلظت میانگین بتاکاروتون در شوری‌های ۰/۵، ۱/۵، ۱ و ۳ مولار در روز ۲۰ و در شوری‌های ۰/۷۵، ۰/۵ و ۰/۳ مولار در روز ۲۸ مشاهده شد. همچنین مقایسه آماری در شوری‌های مورد آزمایش ( $0/5 < 0/05$ ) در هریک از روزهای آزمایش به عنوان مثال در روز ۴ بین شوری‌های مختلف از نظر میزان بتاکاروتون اختلاف معنی‌داری را نشان داد ( $P < 0.05$ ). از سویی دیگر نتایج نشان دادند که بالاترین میانگین غلظت بتاکاروتون در روزهای ۱۶ تا ۳۲ در شوری‌های بین ۱/۵ تا ۲ مولار (غلب ۱/۵ مولار) مشاهده شد. بنابراین می‌توان این محدوده شوری را به عنوان شوری بهینه از نظر میزان بتاکاروتون برای این جلبک پیشنهاد نمود (شکل ۷).

میزان غلظت بتاکاروتون جلبک *Dunaliella sp.* در غلظت‌های ۰/۵، ۰/۷۵، ۱، ۱/۵، ۲، ۳ و ۴ مولار کلرید سدیم در تمام روزهای کشت (از روز ۴ تا ۳۲)، با اسپکتروفوتومتر اندازه‌گیری گردید که نتایج آن در شکل زیر نشان داده شده است (شکل ۷). همان‌طوری که مشاهده می‌شود در اکثر تیمارهای شوری، میزان غلظت بتاکاروتون در ۴ روز اول کشت بسیار نچیز بود. اما از روز ۸ و خصوصاً از روز ۱۲ میزان بتاکاروتون به طور قابل ملاحظه‌ای افزایش یافت. میزان غلظت بتاکاروتون در غلظت ۵/۰ مولار کلرید سدیم از روز ۴ با شبیه ملایم و از روز ۸ با شبیه نسبتاً تندری تا روز ۲۰ افزایش پیدا کرد و پس از آن تا پایان دوره کشت، کاهش نامحسوسی داشت. در غلظت ۰/۷۵ و ۱ مولار کلرید سدیم نیز همانند تیمار قبلی میزان غلظت بتاکاروتون از روز ۸ تا ۲۰ با شبیه نسبتاً ملایمی افزایش و پس از آن کاهش یافت. میزان غلظت بتاکاروتون در تیمار ۱/۵ و ۲ مولار از روز ۸ تا ۲۸ با شبیه تندری افزایش نشان داد. البته از روز ۲۰ تا ۲۸ این شبیه ملایم‌تر شد. همچنین این دو تیمار دارای بیشترین میزان بتاکاروتون از روز ۱۲ تا پایان دوره کشت بودند. در تیمار ۳ مولار کلرید سدیم میزان میزان غلظت بتاکاروتون تا روز ۸ بسیار



شکل ۷: میانگین±انحراف غلظت بتاکاروتون جلبک *Dunaliella sp.* در غلظت‌های مختلف کلرید سدیم طی روزهای مختلف کشت  
Figure 7: The mean±SD density of *Dunaliella sp.* isolated β-carotene in different levels of NaCl during different days.

## بحث

کلروفیل a با کاهش همراه بود. همچنین در این مدت از کشت، کمترین میزان کلروفیل a مربوط به تیمار ۴ مولار بود که احتمالاً به دلیل کاهش سرعت رشد و تکثیر در این تیمار ارتباط است. از طرفی هم زمان با افزایش میزان بتاکاروتون از میزان کلروفیل a نیز کاسته شد (شکل ۵) که با نتایج بدست آمده توسط Avron و Ben-Amotz در سال ۱۹۸۳ مطابقت داشت. همان‌طور که در شکل ۶ مشاهده گردید منحنی تغییرات غلظت کلروفیل b تقریباً شبیه منحنی کلروفیل a بوده و سیکمومئیدی است. البته باید در نظر گرفت که میزان غلظت آن تا روز ۲۰ کشت، افزایش سپس ثابت و در ادامه کاهش نشان داد که به نظر می‌رسد این کاهش به افزایش بتاکاروتون مرتبط باشد. همچنین با توجه به اینکه تعداد سلول در فاز لگاریتمی رشد در تمام غلظت‌ها کمتر از فاز ایستایی رشد بود، بنابراین در کلیه تیمارها میزان غلظت کلروفیل a در فاز لگاریتمی کمتر از فاز رشد ایستایی دیده شد. در تیمار ۴ مولار به علت پایین بودن رشد و تکثیر سلول کمترین میزان غلظت این رنگریزه مشاهده شد (شکل ۶). همان‌گونه که نتایج شکل ۷ نشان می‌دهد غلظت بتاکاروتون در تیمارهای ۰/۵، ۱، ۰/۷۵ و ۲ مولار شوری به علت افزایش تعداد سلول و رشد و تکثیر بیشتر است. از آن‌جا به افزایش کمتر از فاز لگاریتمی رشد کمتر از فاز ایستایی رشد بود، در تمام تیمارها میزان تولید بتاکاروتون در فاز لگاریتمی کمتر از فازهای دیگر رشد مشاهده شد. اما در هر حال هم در فاز رشد لگاریتمی و هم در فاز رشد ایستایی با افزایش غلظت کلرید سدیم تا ۲ مولار، میزان تولید بتاکاروتون افزایش یافت که این نتیجه با نتایج بدست آمده توسط Avron و Ben-Amotz در سال ۱۹۹۲ مطابقت داشت. از ویژگی‌های اصلی *D. salina* توانایی و قابلیت تجمع دادن غلظت‌های بالایی از بتاکاروتون در ساختار خود است و حتی گرارش‌هایی مبنی بر وجود غلظت‌های بسیار بالایی از بتاکاروتون در حدود ۱۴٪ وزن خشک در سلول‌های این جلبک منتشر شده است (Borowitzka *et al.*, 1984). اخیراً گونه‌هایی جدیدی از *Dunaliella* در شیلی جداسازی و شناسایی

جلبک‌های دریابی از جمله موجودات مهم دریابی هستند که در تولید مواد شیمایی مختلف و تغذیه انسان نقش دارند. امروزه بهره‌برداری از جلبک‌ها در ابعاد صنعتی، کشاورزی، دارویی و تغذیه‌ای بسیار وسیع است و تکنولوژی بسیار مدرنی برای تولید آن مورد استفاده قرار می‌گیرد (Ausich, 1997). جلبک *Dunaliella sp.* دارای پراکنش جهانی می‌باشد که در کشورهای توسعه یافته، به منظور تولید بتاکاروتون به صورت متراکم و غیر متراکم در مقیاس نیمه صنعتی و صنعتی در سواحل دریاها کشت و پرورش داده می‌شود (قاسمی، ۱۳۸۷). تعداد سلول‌ها در غلظت‌های مختلف (۰/۵ تا ۴ مولار) هر ۴ روز یک بار با میکروسکوب شمارش و مشاهده شدند و منحنی رشد در اکثر غلظت‌ها سیکمومئیدی و دارای فاز تاخیر، فاز رشد، فاز ایستایی و فاز مرگ بود. همچنین فاز رشد این جلبک از روز ۴ آغاز و تا روز ۲۰ ادامه داشت و پس از آن وارد فاز ثابت شد که در آن بر تعداد سلول‌ها افزوده نمی‌گردد (شکل ۴).

همان‌طوریکه نتایج شکل ۵ نشان می‌دهد در غلظت‌های مختلف کلرید سدیم، منحنی رشد دارای شبکهای متفاوتی بود و با افزایش غلظت نمک، رشد و تکثیر جلبک افزایش یافت. در این منحنی بهترین شبکه مربوط به غلظت ۱/۵ و ۲ مولار بود که دارای بیشترین تعداد سلول بود. با توجه به نتایج بدست آمده از منحنی رشد، غلظت *Dunaliella sp.* مناسب و بهینه برای رشد و تکثیر جلبک sp. بین ۱/۵ تا ۲ مولار تعیین شد که با نتایج بدست آمده Van-Auken & (McNulty, 1973; Borowitzka, 1981b) توسط سایر محققین مطابقت داشت. در تمام موجوداتی که قادر به فتوسنتر هستند کلروفیل a وجود دارد. هر گونه تغییر که در میزان فتوسنتر رخ دهد بر میزان کلروفیل a اثر می‌گذارد. همان‌طور که نتایج شکل ۵ نشان می‌دهد میزان غلظت کلروفیل a در تمام تیمارها با گذشت زمان افزایش یافت. البته باید توجه نمود که به علت بالا بودن سرعت رشد و تکثیر در غلظت‌های ۰/۵، ۰/۷۵، ۱، ۰/۵ و ۲ مولار کلرید سدیم میزان غلظت

- تشکر و قدودانی**
- نویسنده‌گان بر خود لازم می‌دانند از تمام کسانی که در این تحقیق با ما همکاری نمودند، تشکر نمایند.
- منابع**
- حسینی بلداحی، ا.، ۱۳۸۲. بهینه‌سازی محیط کشت جلبک سبز *Dunaliella salina* جهت افزایش رشد، تکثیر و تولید بتاکاروتون. پایان‌نامه، دانشگاه شیراز، ۱۲۸ صفحه.
- عطاران فریمان، گ.، صادقی، پ.، شیرزادی، ر.، ۱۳۹۶. جداسازی و شناسایی سیست *Dunaliella salina* (Chlorophyceae) از رسوبات ساحلی لیپار (دریای عمان) با استفاده از آنالیز مولکولی، مجله علمی شیلات ایران، سال ۲۶، شماره ۴، ۵۶-۴۷. DOI: 10.22092/ISFJ.2017.113922
- فاسمی، ح.، ۱۳۸۷. تولید گلیسرول از جلبک دریابی *Dunaliella*. پایان‌نامه، دانشگاه تربیت مدرس، ۸۷ صفحه.
- مهرابی، ف.، جعفرپور، س.ع.، نعمت‌زاده، ق.، ۱۳۹۷. بررسی تاثیر غلظت‌های مختلف سدیم نیترات و سدیم بی‌کربنات بر میزان رشد و چربی کل ریزجلبک (*Neochloris oleoabundance*). شیلات ایران، سال ۲۷، شماره ۱، ۸۰-۷۱. DOI: 10.22092/ISFJ.2018.116407
- Ausich, R., 1997.** Commercial opportunities for carotenoid production by biotechnology. Pure and Applied Chemistry, 69: 2169-2173.
- Avron, M. and Ben-Amotz, A., 1992.** *Dunaliella: Physiology, Biochemistry and Biotechnology*. CRC Press, Boca Raton, 220P.
- Ben-Amotz, A. and Avron, M., 1983.** On the factors which determine the massive B-carotene accumulation in the halotolerant

شده‌اند که غلظت‌های بالایی از بتاکاروتون را در خود نداشته‌اند، اما غلظت‌های بالایی از آلفا کاروتون (-carotene) را در خود تجمع داده‌اند. باید توجه نمود که تجمع مقداری بالای بتاکاروتون نیاز به شوری، دمای بالا و نور زیاد دارد (Ramazanov *et al.*, 1988). فاکتورهایی است که برای تولید بتاکاروتون ضروری است (Ben-Amotz & Shaish, 1992). اما بیشترین میزان تولید بتاکاروتون در سلول بستگی به شوری دارد. تشکیل کاروتونئید بسیار سریع است برای مثال هنگامی که شوری محیط کشت *D. salina* از ۱۵ به ۲۵ درصد نمک افزایش یافت، میزان کاروتونئید کل به صورت خطی از ۱۰ تا ۲۶۰ میلی‌گرم در طی یک دوره ۴ تا ۶ روزه افزایش یافت و به همین نسبت میزان بتاکاروتون در این دوره از ۵۰ تا ۹۰ درصد افزایش یافت (Borowitzka *et al.*, 1990). محدودیت مواد غذایی مورد نیاز در محیط کشت و به خصوص کمبود ازت می‌تواند به طور قابل توجهی میزان تشکیل کاروتونئید را تحت تاثیر قرار دهد (Ben-Amotz & Shaish, 1992). به طور کلی در زمانی که شرایط رشد و نمو در حد کمتر از حالت بهینه باشد، میزان تولید کاروتون در بیشترین حالت خود قرار دارد و این درست زمانی است که میزان رشد ویژه کم است و این در واقع یک رابطه معکوس جالب است که باید در مدیریت تولید با توجه به هدف تولید نهایی محصول (جلبک و یا میزان کاروتون موجود در آن) به آن توجه خاص نمود و می‌توان نتیجه گرفت که در بسیاری از موقع افزایش بیوماس جلبک رابطه عکس با میزان کاروتون موجود در سلول‌های جلبکی خواهد داشت (حسینی بلداحی، ۱۳۸۲). بنابراین نتیجه گرفته می‌شود که بیشترین رشد و تکثیر سلولی و بیشترین میزان تولید بتاکاروتون این جلبک بین شوری‌های ۱/۵ تا ۲ مولار کلرید سدیم دیده می‌شود. همچنین با افزایش رشد و تکثیر جلبک، میزان تولید کلروفیل‌های a و b در تمام شوری‌ها افزایش می‌یابد.

- alga *Dunaliella bardawil*. Plant Physiology, 72(3): 593-597
- Ben-Amotz, A., Sussman, I. and Avron, M., 1982.** Glycerol production by *Dunaliella*. Experientia, 38: 49-52.
- Ben-Amotz, A. and Shaish, A., 1992.**  $\beta$ -Carotene biosynthesis. In: Avron, M. and Ben-Amotz, A., (eds). *Dunaliella: Physiology, Biochemistry and Biotechnology*. CRC Press, Boca Raton, pp. 205-216.
- Borowitzka, L.J., 1981a.** The microflora. Adaptations to life in extremely saline lakes. Hydrobiologia, 81: 33-46. DOI: 10.1007/BF00048704.
- Borowitzka, L.J., 1981b.** Solute accumulation and regulation of cell water activity. In: Paleg, L.G. and Aspinall, D., (eds). *The Physiology and Biochemistry of Drought Resistance in Plants*. Academic Press, Sydney, pp: 97-130.
- Borowitzka, L.J., Borowitzka, M.A. and Moulton, T., 1984.** Mass culture of *Dunaliella*: from laboratory to pilot plant. Hydrobiologia, 116/117: 115-121.
- Borowitzka, L.J. and Borowitzka, M.A., 1990.** Commercial production of B-carotene by *Dunaliella salina* in open ponds. Bulletin of Marine Science, 47: 244-252.
- Borowitzka, L.J. and Brown, A.D., 1974.** The salt relations of marine and halophilic species of the unicellular green alga, *Dunaliella*. The role of glycerol as a compatible solute. Archives of Microbiology, 96(1): 37-52.
- Borowitzka, M.A., Borowitzka, L.J. and Kessly, D., 1990.** Effect of salinity increase on carotenoid accumulation in the green alga *Dunaliella salina*. Journal of Applied Phycology, 2(2): 111-119.
- Edwards, C.E., 1990.** *Microbiology of Extreme Environments*. Open University Press, Milton Keynes, 128 p.
- Eijckelhoff, C. and Dekker, J. P., 1997.** A routine method to determine the chlorophyll a, pheophytin  $\alpha$  and  $\beta$ -carotenes of isolated photosystem II reaction center complexes. photosyntsis Reserch, 52(1): 69-73. DOI: 10.1023/A:1005834006985.
- Garcia, F., Freile Pelegrine, Y.P. and Robledo, D., 2007.** Physiological characterization of *Dunaliella* sp. (Chlorophyta, Volvocales) from Yucatan, Mexico. Bioresource Technology, 98(7): 1359-1365. DOI:10.1016/j.biortech.2006.05.051.
- Heidari, H., Riahi, H. and Saadatmand, S., 2000.** Effects of salt and irradiance stress on photosynthetic pigments and proteins *Dunaliella salina* teodoresco. Journal of Sciences Islamic Republic of Iran, 11(2): 73-77.
- Marin, N., Morales, F., Lodeiros, C. and Tamigneaux, E., 1998.** Effect of nitrate concentration on growth and pigment synthesis of *Dunaliella salina* cultivated under low illumination and preadapted to different salinities. Journal of Applied Phycology, 10(4): 405-411. DOI: 10.1023/a:1008017928651.

- Massyuk, N.P., 1966.** Mass culture of the carotene containing alga *Dunaliella salina* Teod. Ukrayins'kyi Botanichnyi Zhurnal, 23: 12-19.
- Moulton, T.P. and Burford, M.A., 1990.** The mass culture of *Dunaliella viridis* (Volvocales, Chlorophyta) for oxygenated carotenoid: Laboratory and pilot plant studies. *Hydrobiologia*, 204(1): 401-408. DOI:10.1007/BF00027649.
- Raja, R., Hemaiswarya, S. and Rengasamy, R., 2007.** Exploitation of *Dunaliella* for beta-carotene production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 74(3): 517-523. DOI:10.1007/s00253-006-0777-8.
- Ramazanov, Z.M., Klyachko-Gurvich, G.L., Ksenofontov, A.L. and Semenenko, V.E., 1988.** Effect of suboptimal temperature on content of  $\beta$ -carotene in the halophilic alga *Dunaliella salina*. *Fiziologiya Rastenii*, 35: 864-869.
- Tafreshi, A.H. and Shariati, M., 2006.** Pilot culture of three strains of *Dunaliella salina* for  $\beta$ -carotene production in open ponds in the central region of Iran. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22(9): 1003-1006. DOI:10.1007/s11274-006-9145-1.
- Van-Aeken, O.W. and McNulty, I.B., 1973.** The effect of environmental factors on the growth of a halophytic species of algae. *Biological Bulletin*, 145(1): 210-222.
- Zar, J.H., 2010.** Biostatistical analysis. Prentice Hall, New Jersey, USA. 946P.

**Effects salinity on growth, chlorophyll and  $\beta$ -carotene concentration in *Dunaliella* sp. isolated from Chabahar Gulf**

Enayati Sh.<sup>\*1</sup>; Javanshir Khoei A.<sup>2</sup>; Rafiee Gh.<sup>2</sup>; Pourbagher H.<sup>2</sup>; Moradinasab A.<sup>3</sup>

<sup>\*</sup>enayati.shirvan@gmail.com

1- Natural Resource-Aquatics Ecology, Iran Fisheries Organization, Tehran, Iran

2-Department of Fisheries, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran

3-International Sturgeon Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (Areeo), Rasht, Iran

**Abstract**

*Dunaliella* sp. is from division of chlorophyte algae that has a global distribution and is abundantly reported in the coastal waters of Chabahar Bay. This algae is a euryhalin species which may support high temperatures and lack of Nitrogen conditions in the sea. Also as a response to environmental stresses it fluctuates pigment reserves specially the Beta-Carotene. The aim of this study was effects of salinity on growth, chlorophyll and  $\beta$ -carotene concentration in *Dunaliella* sp. In this study in beyond the separation and purification of *Dunaliella* sp. from seawater, the impact of different levels of salinity (0.5, 0.75, 1, 1.5, 2, 3 and 4 mol NaCl) on growth, the amount of chlorophyll and  $\beta$ - carotene were measured during a period of 4 weeks. Chlorophyll a, b and  $\beta$ -carotene contents were determined spectrophotometrically from algal pellets using 80% (v/v) acetone/water mixture. Results showed that the *Dunaliella* sp. in treatments of 0.5, 0.75, 1, 1.5, 2, 3 and 4 mol NaCl could grow, but the maximum growth of this algae and the maximum amount of  $\beta$ -carotene were observed in salinities between 1.5 to 2 mol NaCl ( $p<0.05$ ). Parallel to growth of the algae the production of chlorophyll a and b was increased in all salinities treatments but their production causes a decrease in  $\beta$ - carotene production.

**Keywords:** salinity, growth, chlorophyll, *Dunaliella* sp, Chabahar Gulf

<sup>\*</sup>Corresponding author