تاثیر محیط کشت و شدت نور بر رشد و کاروتنوئیدهای جلبک *Dunaliella salina* دریاچه ارومیه

معصومه سلمانی‌نژاد

نور، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده منابع طبیعی، گروه زیست شناسی دریا

تاریخ دریافت: ۹۲/۹/۱۱ تاریخ پذیرش: ۹۳/۲/۲۵

چکیده

تحقیق فوق اختصاص یافته به تاثیر محیط کشت و شدت نور بر میزان رشد و کاروتنوئیدهای جلبک *Dunaliella salina* دریاچه ارومیه است. در این مطالعه ابتدا گونه دونالیلا از دریاچه ارومیه جمع آوری گردید و سپس به روش پلیت آگار خالص سازی شد. جهت مطالعه تاثیر محیط کشت های مختلف بر میزان رشد و کاروتنوئیدهای این گونه، شش تیمار هر کدام با سه تکرار از محیط های کشت با شوری ۱/۰۳، ۲/۹۹ و ۴/۹۶ مولار در شدت نور ۴۰ ، ۱۲۰ و ۲۰۰ میکرومول فوتون بر متر مربع در ثانیه ،در اتاقکهای مخصوص کشت قرار داده شدند. شمارش سلولی در سه تکرار با استفاده از لام هموسیتومتر و به صورت روزانه انجام شد و منحنی رشد با استفاده از نرم افزار اکسل ترسیم گردید. منحنی مقدار کاروتنوئیدهای سنتز شده جلبک با استفاده از نرم افزار اکسل ترسیم گردید و توسط آزمون آنالیز واریانس دو طرفه بین تیمار ها مقایسه شد. نرخ رشد ویژه اختلاف معنی داری در تیمارهای مختلف داشت ($P < 0.05$). حداکثر نرخ رشد ($2/45\ d^{-1}$) در شدت نور ۴۰ میکرومول و شوری ۲/۹۹ مولار و حداقل آن ($0/6\ d^{-1}$) در شوری 4/96 و ۱۲۰ میکرومول فوتون بر متر مربع در ثانیه ثبت شد. نتایج نشان داد که افزایش شدت نور در محیط کشت با شوری ۲/۹۹، سبب کاهش تراکم سلولی و نرخ رشد در *D. salina* می شود، ولی افزایش شدت نور از ۴۰ به ۲۰۰ میکرومول فوتون بر متر مربع در ثانیه در محیط کشت ۱/۰۳، سبب افزایش تراکم سلولی و نرخ رشد در این جلبک می گردد. آنالیز واریانس نتایج حاصل نشان داد که میزان کاروتنوئیدهای دونالیلا در غلظتهای مختلف نور و شوری و تاثیر متقابل آنها اختلاف معنی‌دار دارد ($p<0/05$). وجود تاثیر متقابل معنی‌دار بین سطوح مختلف نور و شوری نشان داد که حداکثر مقدار کاروتنوئید سنتز شده در تیمار با شدت نور ۲۰۰ میکرومول و شوری ۲/۹۹ مولار به مقدار ۵/۰۷ میکروگرم بر میلی لیتر و کم‌ترین مقدار در شدت نور ۱۲۰ میکرومول با شوری ۱/۰۳ مولار به مقدار ۱/۰۲ میکروگرم بر میلی لیتر می‌باشد. نتایج نشان داد که افزایش شدت نور از ۴۰ به ۲۰۰ میکرومول در هر سه شوری مورد آزمایش سبب افزایش سنتز مقدار کاروتنوئیدها در این جلبک *D. salina* می گردد و مناسبترین شدت شوری جهت سنتز کاروتنوئیدها شوری ۲,۹۹ مولار می باشد.

واژه‌های کلیدی: *Dunaliella salina* ، دریاچه ارومیه، شدت نور،شوری، کاروتنوئید، نرخ رشد.

نویسنده مسئول، تلفن: ۰۳۱-۳۳۱۹۰۰۷ ، پست الکترونیکی: m.salmaninejad@yahoo.com

مقدمه

جنس دونالیلا متعلق به رده Chlorophyceae، راسته Volvocales و شاخه Chlorophyta می‌باشد. قبل از این جلبک را در خانواده Polyblepharidaceae و برخی به علت شباهت آن با جلبک *Chlamydomonas* آن را در خانواده Chlamydomonadaceae قرار داده‌اند (۱۸).

ریزجلبک *Dunaliella salina*، مقاومترین موجود یوکاریوتی نسبت به شوری است که در بسیاری از محیط-های حاوی نمک نظیر دریاچه‌ها و مرداب‌های آب شور یافت می‌شود. میزان شوری جهت رشد مناسب دونالیلا سالینا بین ۳ مولار (۱۷۴ مولار) است، ولی نقاط بحرانی

شوری را ۰/۵ مولار (۲۹ مولار) و ۵ مولار (۲۹۰ مولار) ذکر نموده اند (۲۹). گونه‌های دونالیلا در اکوسیستم‌های آبی ایران نیز با توجه به خصوصیات فیزیکوشیمیایی مختلف آن‌ها به طور گسترده پراکنده شده‌اند (۱).

کاروتنوئیدها ترکیباتی هیدروفوب هستند که اساس فعالیت‌های متنوعی را در موجودات زنده تشکیل می‌دهند. این ترکیبات دارای ساختار تتراترپنوئید (دارای ۴۰ اتم کربن می‌باشند، از ۴ واحد تتراپن ساخته شده‌اند که هر کدام از این واحدها دارای ۱۰ اتم کربن می‌باشد) هستند که بطور طبیعی درون کلروپلاست‌ها و کروموپلاست‌های گیاهان و برخی از ارگان‌های فیتوپلانکتونیک مثل جلبک‌ها، برخی باکتری‌ها و برخی از قارچ‌ها ذخیره و جمع‌آوری می‌شوند.

کاروتنوئیدها نورهای مرئی با طول موج بین ۵۵۰-۴۰۰ نانومتر را جذب می‌کنند (۲۲). بدون وجود این ترکیبات فتوسنتز و زندگی غیرممکن است. هم اکنون شواهدی وجود دارد که کاروتنوئیدها می‌توانند نقش‌های مهمی در سلامت انسان داشته باشند. این ترکیبات به عنوان پیش‌ساز ویتامین A می‌باشند که نقش این ویتامین در رشد و نمو عمومی تمام سیستم‌های بدن انسان و از جمله سیستم بینایی واضح و بدیهی است. از سوی دیگر کاروتنوئیدها به علت خاصیت ضد اکسیدانی خود، انسان را در مقابل بیماری‌هایی مانند سرطان و اختلالات قلبی محافظت می‌کنند. اثرات این ترکیبات بر روی سیستم ایمنی و در اتصالات باز سلولی جالب توجه است (۹).

کاروتنوئیدها شامل دو دسته از ترکیبات هستند:

۱- هیدروکربن های غیر اشباع محلول در چربی که تحت عنوان کاروتن‌ها نامیده می‌شوند (کاملا" هیدروکربنی و فاقد اتم اکسیژن).

۲- هیدروکربن‌های غیر اشباع محلول در چربی که به صورت اکسید شده درآمده‌اند و تحت عنوان زانتوفیل‌ها نامیده می‌شوند (دارای اتم اکسیژن می باشند).

بیشترین اهمیت دونالیلا سالینا به دلیل قابلیت زیاد آن در جمع‌آوری سطوح مختلف بتاکاروتن است (۱۴). این ویژگی دونالیلا سالینا به قابلیت رشد این جلبک در محیط-های ایزوله‌ای چون دریاچه‌های هایپرسالین و دریاچه‌های نمک وابسته است (۱۳). برخی از سویه‌ها بیش از ۱۴٪ از وزن خشک خود را بتاکاروتن ذخیره می‌کنند (۲۱). علاوه بر اینکه بتاکاروتن تولید شده در دونالیلا سالینا نشان دهنده قابلیت انعطاف‌پذیری زیاد این جلبک است و احتمالا" این ویژگی در اثر جهش‌های زیادی حاصل شده است (۲۵). به این دلیل جدا کردن سویه جهش یافته از سویه طبیعی جلبک دونالیلا سالینا روش بهینه‌ای است که مقدار بتاکاروتن تولیدی از این جلبک را بهبود می‌بخشد (۲۴).

مواد و روشها

جهت تحقیق فوق از ۳ نقطه دریاچه ارومیه در دی ماه ۱۳۸۹ نمونه‌برداری صورت گرفت. شوری آب در این سه نقطه بین ۳۱۰ تا ۳۵۰ مولار و اسیدیته نیز بین ۷/۹-۷/۱ متغییر بود. خالص‌سازی با استفاده از روش پلیت آگار و کشت سریالی صورت گرفت (۲۹). از آنجا که میزان شوری جهت رشد مناسب دونالیلا سالینا را ۳ مولار (۱۷۴ مولار) و نقاط بحرانی شوری را ۰/۵ مولار (۲۹ مولار) و ۵ مولار (۲۹۰ مولار) ذکر نموده‌اند (۲۹). در مطالعه حاضر، غلظت‌های نمک به صورت ۶۰ (۱/۰۳ مولار)، ۱۷۵ (۲/۹۹ مولار) و ۲۹۰ (۴/۹۶ مولار) مولار انتخاب شد و نمونه‌های آماده شده در ژرمیناتور تحت تابش نورهای ۴۰، ۱۲۰ و ۲۰۰ میکرومول فوتون قرار داده شدند و برای جلوگیری از خطا در آزمایش مورد نظر از هر نمونه سه تکرار تهیه شد و هر کدام با سه تکرار مورد آزمایش قرار گرفتند.

جهت اندازه گیری میزان رشد جلبک دونالیلا سالینا شمارش سلول ها، با نمونه برداری از ۳ تکرار هر تیمار،

به صورت روزانه انجام گرفت و از سه سری داده شمارش شده میانگین گرفته شد. شمارش سلول ها با استفاده از لام هموسیتومتر انجام شد. فاکتور نرخ رشد ویژه (μ) با فرمول $\mu = \ln x_n - \ln x_0 (t_n - t_0)^{-1}$ محاسبه شد (۱۵)، که در آن X_0: میانگین تعداد سلول ها در زمان t_0 ، X_n : میانگین تعداد سلول ها در زمان t_n و μ: نرخ رشد ویژه (d^{-1}) است (۸). جهت محاسبات آماری از نرم‌افزارهای EXCEL و SPSS استفاده شد. جهت آنالیز آماری داده‌های مربوط به فاکتورهای فیزیکوشیمایی از آنالیز واریانس دو طرفه (ANOVA) و Mann-Whitney استفاده شد. برای پی بردن به این نکته که تفاوت آماری موجود در بین کدام دسته از گروه‌های مورد مطالعه می‌باشد از آزمون دنباله‌ای در هنگام تحلیل واریانس استفاده می‌شود از جمله آزمون Tukey که جهت تخمین معنی دار بودن اختلاف بین تیمارها استفاده شد.

جهت اندازه‌گیری میزان رنگیزه‌ها پس از رسیدن به نقاط تعادل ظرفیت تیمارهای تعریف شده، از روش زیر استفاده شد:

ابتدا ۱۰ میلی‌لیتر از سوسپانسیون جلبکی با دور g ۱۲ سانتریفیوژ شد. پس از سانتریفیوژ رسوب حاصله از مایع جدا گردید و به رسوب بدست آمده ۳ میلی‌لیتر استن ۱۰۰٪ اضافه شد سپس به مدت ۵ دقیقه ورتکس انجام شد تا رسوب باقیمانده کاملا" بیرنگ گردد. پس از سانتریفیوژ دوباره نمونه‌ها و جدا کردن محلول رویی، میزان جذب در طول موج ۳۰۰–۷۵۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر مدل ShimadzoUV-2600 اندازه‌گیری شد. در نهایت با استفاده از فرمول زیر میزان کاروتنوئیدها محاسبه شد.

Eijckelhoff and Dekker (۱۹۹۷)(۱۰)

$$Car = -\,۰/۴۳۰\,(A۴۱۲) + ۰/۲۵۱\,(A۴۳۱) - ۴/۳۷۶(A۴۶۰) + ۱۳/۲۱۶(A۴۸۰)$$

تجزیه و تحلیل داده‌های حاصل از این تحقیق با استفاده از نرم‌افزارهای Minitab 15 و spss (version۱۷) و رسم نمودارها با استفاده از Excel 2010 انجام شد. به منظور تعیین نرمالیتی داده‌ها و و تجزیه واریانس از نرم افزارMinitab استفاده شد. داده‌های حاصله در قالب آزمایش فاکتوریل ۲ عاملی با طرح پایه کاملا" تصادفی با ۳ تکرار تجزیه واریانس شدند: فاکتور A (شوری) در ۳ سطح (۱/۰۳، ۲/۹۹، ۴/۹۶ مولار)، فاکتور B (نور) در ۳ سطح (۴۰، ۱۲۰، ۲۰۰ میکرومول فوتون بر متر مربع در ثانیه) و برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون دانکن در نرم افزار spss استفاده شد.

نتایج

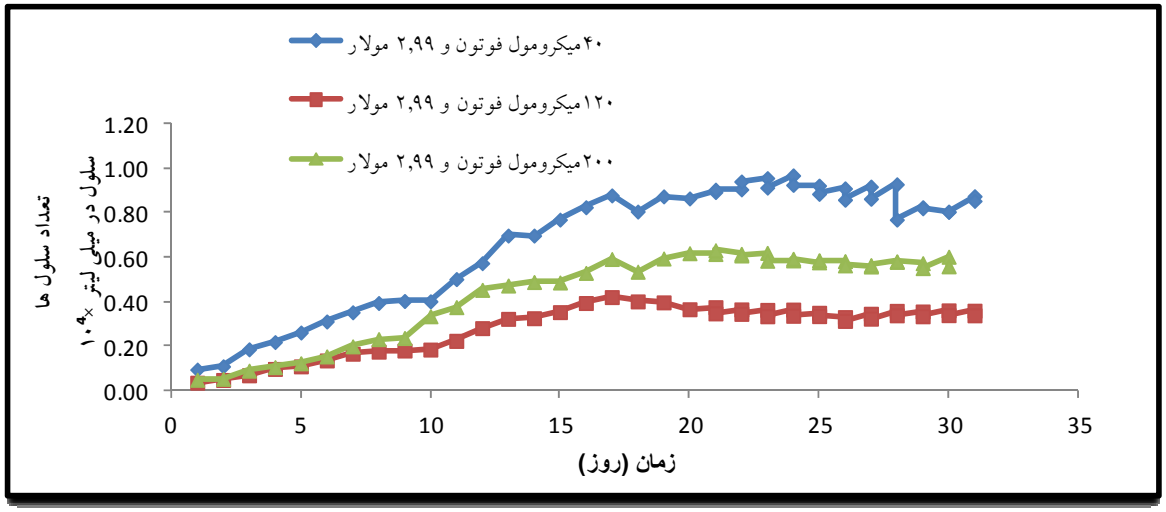
با شمارش سلول های *D. salina*، منحنی رشد در شدت نور ۴۰ و ۱۲۰ و ۲۰۰ میکرومول و شوری ۱/۰۳ و ۲/۹۹ مولار ، تحت دوره تاریکی : روشنایی ۲۴:۰ ساعت، ترسیم شد. (شکل شماره ۱- ۳).

طولانی ترین دوره رشد در بین تیمارها مربوط به شدت نور ۲۰۰ میکرومول در شدت شوری ۱/۰۳ مولار بود که در آن حداکثر تعداد سلول ها در روز سی ام به $۱۰^{۶}$ × ۱/۰ ±۰/۶۷ سلول در هر میلی لیتر رسید. در شدت شوری ۱/۰۳ مولار ، با کاهش شدت نور به ۱۲۰ میکرومول، دوره رشد کوتاهتر شد. در این تیمار، حداکثر تعداد سلول ها در روز چهاردهم به $۱۰^{۶}$ × ۰/۸۵ ±۰/۶۷ سلول در هر میلی لیتر رسید که کوتاهترین دوره رشد در بین تیمارها به شمار می رود.

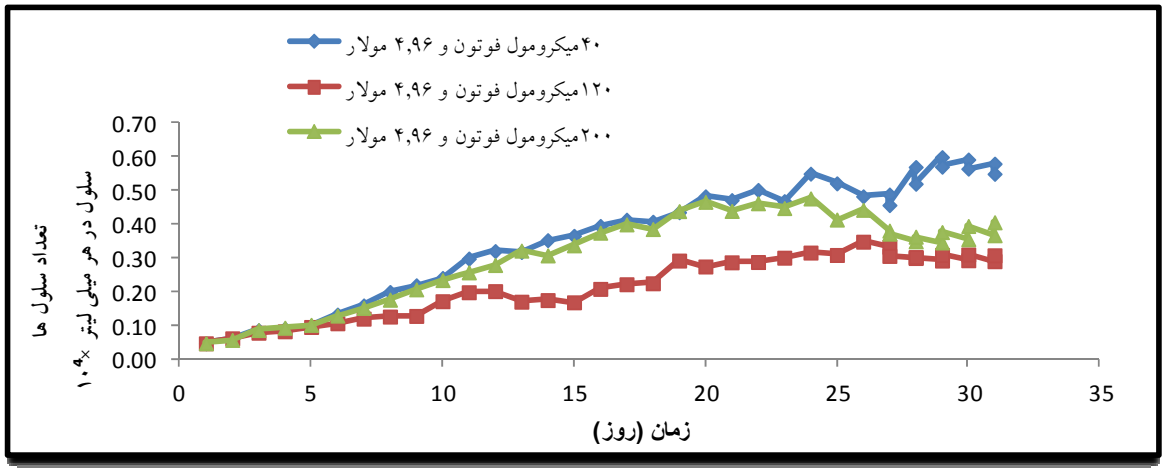
کمترین تعداد سلول ها در شدت نور ۴۰ میکرومول و شوری ۱/۰۳ مولار مشاهده شد که در آن، حداکثر تعداد سلول ها در روز بیستم به $۱۰^{۶}$ × ۰/۶۲ ±۰/۰ سلول در هر میلی لیتر رسید. در شدت شوری ۲/۹۹ مولار با کاهش شدت نور، تعداد سلول ها افزایش یافت. حداکثر تعداد سلول ها در روز بیست و سوم به $۱۰^{۶}$ × ۲/۴ ±۱/۶۷ سلول

در هر میلی لیتر رسید که بیشترین تعداد سلول ها در بین تیمارهای مورد مطالعه است.

شکل ۱- مقایسه رشد میکروجلبک دونالیلا سالینا در شوری ۱,۰۳ مولار و شدت نورهای مختلف

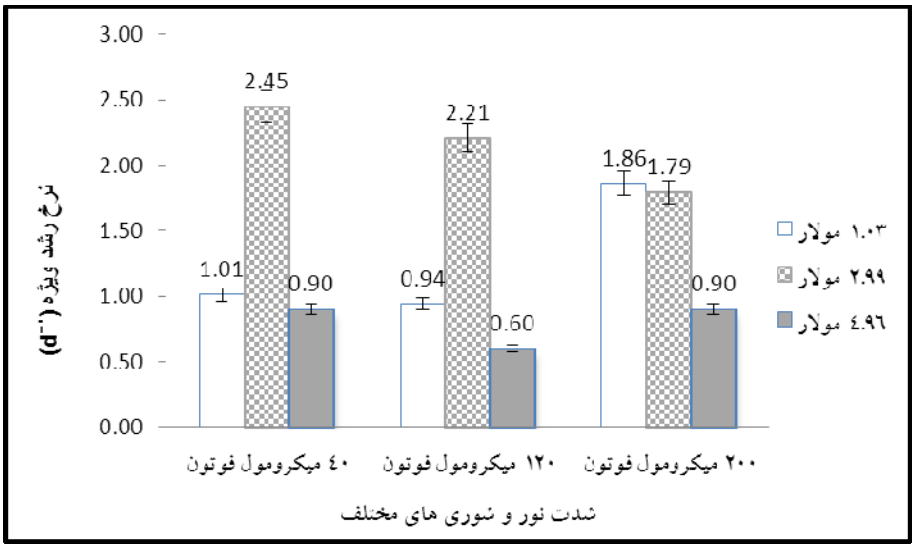


شکل ۲ - مقایسه رشد میکروجلبک دونالیلا سالینا در شوری ۲/۹۹ و نورهای مختلف



شکل ۳- مقایسه رشد میکروجلبک دونالیلا سالینا در شوری ۴,۹۶ مولار در نورهای مختلف

نرخ رشد ویژه اختلاف معنی داری در بین تیمارها داشت. ($P<0.05$). بیشترین نرخ رشد ویژه ($2/45\ d^{-1}$) در شدت نور ۴۰ میکرومول و شوری ۲/۹۹ مولار و کمترین آن (d^{-1} ۰/۹۴) در شوری ۱/۰۳ مولار و شدت نور ۱۲۰ میکرومول مشاهده شد. (شکل ۴).



شکل ۴- مقایسه نرخ رشد ویژه میکروجلبک دونالیلا سالینا در محیط کشت‌ها و شدت نورهای مختلف

مقدار کاروتنوئید در شدت نور و شوری‌های مورد آزمایش متفاوت بود (شکلهای ۵ تا ۸). آنالیز واریانس نتایج تحقیق حاضر نشان داد که هر دو فاکتور مورد مطالعه (شوری و نور) و اثرات متقابل آن‌ها بر میزان کاروتنوئید در جلبک دونالیلا سالینای کشت داده شده اختلاف معنی‌داری دارد (جدول ۱، $p<0/05$).

جدول ۱ - تجزیه واریانس فاکتورهای مورد بررسی (شوری و نور)

منبع تغییرات	درجه آزادی	MS کارتنوئید
بلوک	۲	۰/۶۵۸۷*
شوری	۲	۰/۸۳۵۷*
نور	۲	۶/۵۴۶۹***
شوری × نور	۴	۱/۳۹۷۵**
خطا	۱۶	۰/۱۷۶۳
کل	۲۷	
CV%		۲۰/۹

:اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد*

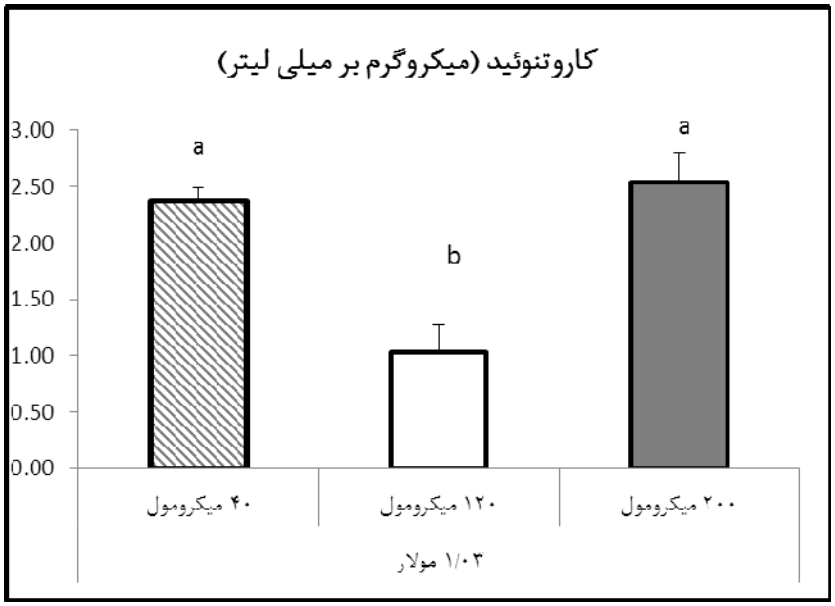
: اختلاف معنی‌دار در سطح ۱ درصد**

***: اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۱ درصد

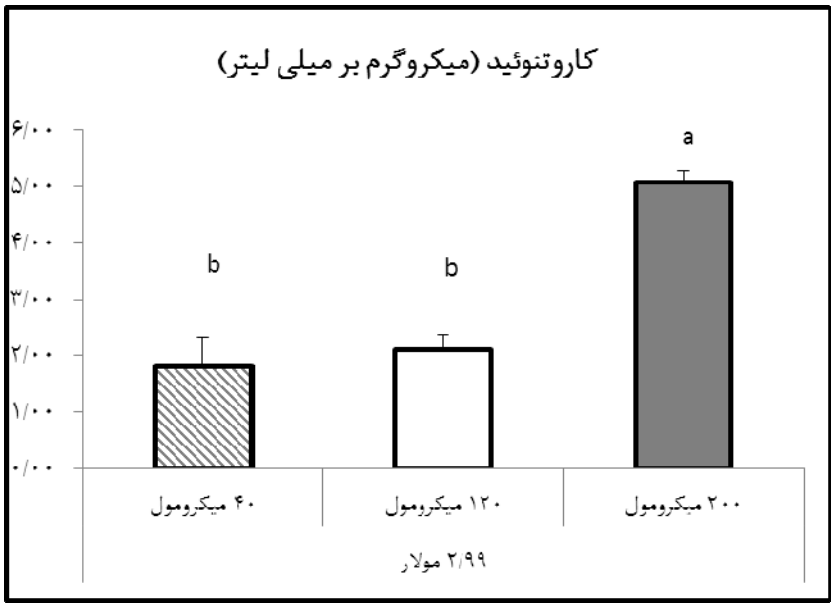
مقایسه میانگین‌های مقدار کاروتنوئید در شوری ۱/۰۳ مولار، اختلاف معنی‌داری را نشان داد($p<0/05$). بیشترین مقدار کاروتنوئید در تیمار نوری ۲۰۰ میکرومول به مقدار $2/58\ \mu g\ ml^{-1}$ و این مقدار در تیمارهای نوری ۱۲۰ و ۴۰ میکرومول، به ترتیب به مقدار ۱/۰۲ و ۲/۳۸ مشاهده شد (شکل ۵).

بیشترین مقدار کاروتنوئید در شوری ۲/۹۹ و نور ۲۰۰ به مقدار $5/07\ \mu g\ ml^{-1}$ و کمترین آن در تیمار نور ۴۰ به مقدار $1/82\ \mu g\ ml^{-1}$ سنتز گردید. در این تیمار شوری با افزایش شدت نور مقدار کاروتنوئید به طور معنی‌داری ($p<0/05$) افزایش یافت (شکل ۶).

مقایسه میانگین‌های مقدار کاروتنوئید در شوری ۴/۹۶ مولار، اختلاف معنی‌داری را بین تیمارهای نوری مورد بررسی، نشان داد ($p<0/05$). حداکثر مقدار کاروتنوئید در تیمار نوری ۲۰۰ میکرومول به مقدار $2/57\mu g\ ml^{-1}$ و کمترین مقدار کاروتنوئید در تیمار نوری ۴۰ به مقدار μg $1/72ml^{-1}$ تولید شد (شکل ۷).



شکل ۵- مقایسه میانگین مقدار کاروتنوئید درشوری ۱/۰۳ مولار



شکل ۶- مقایسه میانگین مقدار کاروتنوئید درشوری ۲/۹۹ مولار

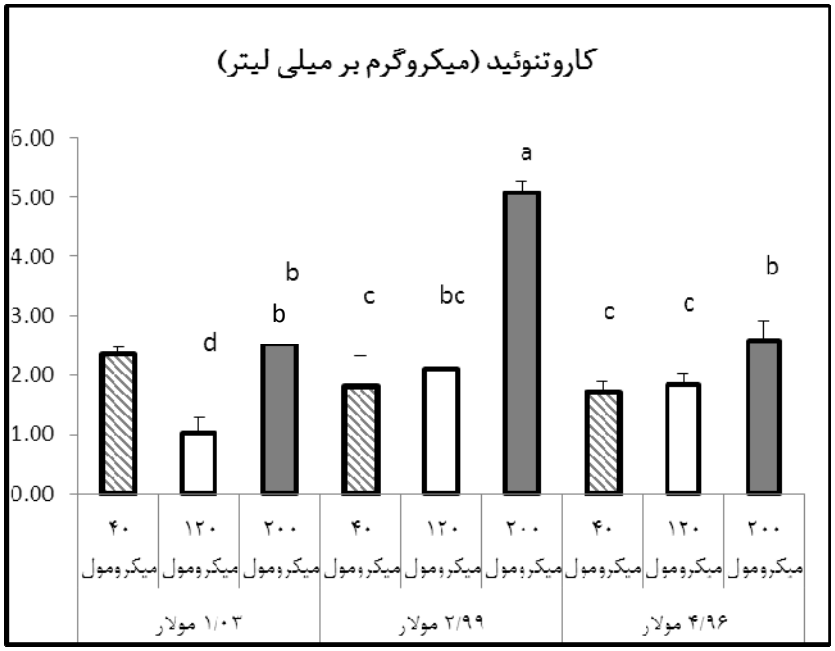
تاثیر معنی‌دار سه سطح نوری متفاوت (۴۰، ۱۲۰ و ۲۰۰ میکرومول) بر میزان کاروتنوئید با استفاده از تفاوت بین میانگین سه سطح نوری نشان می‌دهد که بیشترین میزان کاروتنوئید در شدت نور ۲۰۰ میکرومول و کمترین میزان آن مربوط به شدت نور ۴۰ و ۱۲۰ میکرومول می‌باشد.

مقایسه میانگین‌ها جهت سنجش تفاوت بین شوری‌های مختلف با استفاده از آزمون دانکن نشان می‌دهد که کمترین میزان کاروتنوئید مربوط به شوری ۱/۰۳ مولار و بیشترین میزان آن مربوط به ۲/۹۹ مولار می‌باشد.

وجود تاثیر متقابل معنی‌دار بین سطوح مختلف نور و شوری نشان می‌دهد که حداکثر مقدار کاروتنوئید سنتز

شده در تیمار با شدت نور ۲۰۰ میکرومول و شوری ۲/۹۹ مولار به مقدار $۵/۰۷\mu g\ ml^{-1}$ و کم‌ترین مقدار در شدت نور ۱۲۰ میکرومول با شوری ۱/۰۳ مولار به مقدار μg $۱/۰۲ml^{-1}$ می‌باشد (شکل ۸).

شکل ۷- مقایسه میانگین مقدار کاروتنوئید درشوری ۴/۹۶ مولار



شکل ۸- مقدار کاروتنوئید در سه شدت نور و شوری مورد آزمایش (روش Eijckelhoff and Dekker، ۱۹۹۷).

بحث

فاکتورهای مختلفی از جمله نور، دما، pH و شوری در رشد جلبک‌ها تاثیر به سزایی دارند. دقت در تنظیم فاکتورهای فوق می‌تواند کمک شایانی به کشت بهتر آن‌ها بنماید. نور و شوری از عوامل مهمی هستند که نوسان مقدارشان در میزان کلروفیل، کاروتنوئید و رشد سلول تاثیرگذار است (۶). کاروتنوئیدها به عنوان گیرنده‌های فرعی نور عمل کرده و نورهای مرئی با طول موج ۴۰۰ تا ۵۵۰ نانومتر را جذب می‌کنند. این ترکیبات نقش‌های حیاتی از جمله حفاظت سلول در برابر تشعشاعات بالا،از بین بردن رادیکال‌های آزاد و .... را دارا می‌باشند. در تنش-های شیمیایی نظیرفقر مواد غذایی و شوری زیاد و در تنش‌های حاصل از افزایش نور، جلبک دونالیالا سالینا قادر به افزایش سنتز و تجمع کاروتنوئیدها تا ۴۲ پیکوگرم در سلول می‌باشد (۲۸). که اهمیت متمرکز شدن مطالعات بر روی *D. salina* جهت بررسی تنش‌های فیزیولوژیک کاروتنوئیدها و از جمله بتاکاروتن هنگام تنش‌ها را نشان میدهد (۲۶).

نتایج حاصل از منحنی رشد *D. salina* در دو محیط کشت مورد مطالعه، نشان داد که با افزایش شدت شوری از ۱/۰۳ به ۲/۹۹، میانگین تعداد سلول ها افزایش یافت. اما در این شرایط سلول‌های جلبک در میانگین زمانی طولانی تری به حداکثر تراکم سلولی خود رسیدند.

همچنین نتایج حاصل از این تحقیق نشان می‌دهد که با افزایش شدت نور از ۴۰ میکرومول به ۲۰۰ در هر دو تیمار شوری (۱/۰۳ و ۲/۹۹ مولار)، زمان رسیدن به حداکثر تعداد سلولی افزایش می‌یابد. از نظر تراکم سلولی در تیمار شوری ۱/۰۳ مولار، با افزایش شدت نور ، افزایش تراکم سلولی نیز مشاهده می‌گردد اما در تیمار شوری ۲/۹۹ مولار بیشترین تراکم سلولی در شدت نور ۴۰ میکرومول مشاهده می‌گردد و این مقدار در شدت نور ۱۲۰ و ۲۰۰ میکرومول کاهش چشمگیری را نشان می‌دهد بنابراین شدت نور وشوری، عوامل موثری بر تراکم سلولی در این جلبک هستند.

مطالعات مختلف نشان می دهند شدت نور و شوری مورد نیاز برای گونه های مختلف *Dunaliella* sp. متفاوت است (۴) و (۲۷). میزان شوری جهت رشد مناسب برای *D.salina* تقریبا ۳ مولار (۱۷۴ واحد در هزار) است. ولی نقاط بحرانی شوری را ۰/۵ مولار (۲۹ واحد در هزار) و ۵ مولار (۲۹۰ واحد در هزار) ذکر نموده‌اند (۲۳). Nikokar و همکاران (۲۰۰۴) طی بررسی جلبک دونالیلا سالینای جدا شده از دریاچه مهارلو شیراز، تحت غلظت‌های متفاوتی از شوری (۰/۵. ، ۱، ۲، ۳، ۴ مولار) مشاهده نمودند که بیشترین رشد این جلبک در شوری ۲ مولار رخ می‌دهد و با افزایش میزان شوری میزان رشد کاهش پیدا می‌کند. Rad و همکاران (۲۰۱۱) تاثیر شوری بر روی میزان رشد و مقدار بتاکاروتن *Dunaliella*.sp جداسازی شده از دریاچه ارومیه را در غلظت‌های مختلف شوری (۱، ۲ و ۳ مولار) بررسی کردند و بیشترین تعداد سلول (بیشترین رشد سلولی) را در شوری ۱ مولار و بیشترین مقدار بتاکاروتن را در شوری ۳ مولار مشاهده کردند. نتایج حاصل از مطالعه Abu-Rezq و همکاران (۲۰۱۰) جهت بررسی شرایط اپتیمم برای خالص‌سازی جلبک *D.salina*، از دو گونه جداسازی شده از آب‌های کویت و استرالیا، تحت شرایط مختلف دمایی، شوری ، نور و pH، حاکی از آن بود که با افزایش میزان شوری و نور، رشد نیز افزایش می‌یابد.

لذا در این مطالعه شوری‌های ۱/۰۳ و ۲/۹۹ مولار انتخاب گردید و نتایج بدست آمده حاکی از آن بود که افزایش شوری باعث افزایش تراکم سلولی در جلبک دونالیلا سالینا می‌گردد .

همچنین نتایج مطالعات مختلف نشان می دهد در شرایط و گونه‌های مختلف محدوده تحمل جلبک نسبت به شدت نور متفاوت است (۲۲) و (۲۳). در مطالعه Ak و همکاران

(۲۰۰۸) روی میزان رشد *D. viridis* در شدت نور ۵۰ و ۷۰ میکرومول، حداکثر نرخ رشد و غلظت سلولی در شدت نور ۵۰ بدست آمد. افزایش شدت نور باعث کاهش در تعداد سلول ها شد (۴). مطالعه Tang و همکاران (۲۰۱۰) روی میزان رشد *D. tertiolecta* با سه منبع نور مختلف (لامپ دو قطبی سفید، لامپ دو قطبی قرمز، لامپ فلوئورسنت) در شدت نور ۱۰۰ میکرومول، دوره تاریکی: روشنایی ۹: ۱۵ ساعت، غلظت ۴٪ دی اکسید کربن و دمای ۲۵ درجه سانتی گراد تفاوتی در میزان رشد مشاهده نشد. در این مطالعه، با تعیین سه سطح از شدت نور (۱۰۰، ۳۰۰ و ۲۰۰ میکرومول) با منبع فلوئورسنت بیشترین میزان رشد بین شدت نور۱۰۰ و ۲۰۰ ثبت شد (۲۷). در مطالعه Trenkenshu و همکاران (۲۰۰۵) نقاط بحرانی شدت نور برای رشد *D.salina* را ۱۰ و ۲۵۰ میکرومول و اپتیمم شدت نور برای رشد این گونه ۱۲۰ میکرومول بیان شده است بنابراین، سه شدت نور ۴۰، ۱۲۰ و ۲۰۰ لوکس انتخاب شد و نتایج بدست آمده نشان داد که در صورتیکه شوری محیط کشت پایین باشد (۱/۰۳ مولار) با افزایش شدت نور افزایش تراکم سلولی را خواهیم داشت اما در شوری بالاتر (۲/۹۹ مولار) شدت نور پایین تراکم سلولی بالاتری خواهد داشت.

نرخ رشد مهم ترین راه برای بیان موفقیت اکولوژیک یا توانایی سازگاری یک گونه نسبت به تغییر شرایط محیط طبیعی یا آزمایشگاهی است (۱۴). بیشترین نرخ رشد ویژه (d^{-1} ۲/۴۵) در شدت نور ۴۰ میکرومول و شوری ۲/۹۹ مولار و کمترین آن (d^{-1}۰/۹۴) در شوری ۱/۰۳ مولار و شدت نور ۱۲۰ میکرومول مشاهده شد. (شکل شماره ۴).

لذا در این مطالعه به منظور تعیین بهترین شدت نور و شوری، به مقایسه نرخ رشد ویژه بین تیمارهای مختلف پرداخته شد. در شوری ۱/۰۳ مولار، کندترین رشد مربوط به شدت نور ۱۲۰ میکرومول، با آهنگ رشد d^{-1} ۰/۹۴ بود که کندترین نرخ رشد ویژه در این تیمار شوری، با افزایش شدت نور به ۲۰۰ میکرومول، نرخ رشد ویژه به d^{-1} ۱/۸۶ افزایش یافت، برعکس در تیمار شوری ۲/۹۹، با افزایش شدت نور، شاهد کاهش نرخ رشد بودیم بطوریکه بیشترین نرخ رشد ویژه در بین دو تیمار شوری، در شوری ۲/۹۹ با شدت نور ۴۰ میکرومول مشاهده شد.

درمطالعه صورت گرفته توسط Trenkenshu و همکاران (۲۰۰۵) بر روی گونه دوناليلا سالینا مبنی بر تاثیر شدت نور ۲۰۰ میکرومول بر رشد این نتایج مشابهی را بیان نموده اند (۸). در بررسی انجام شده بر این گونه توسط Abd El-Baky و همکاران نیز تاثیر نور ۱۲۰ میکرومول بر تراکم سلولی نشان داد که تقریباً چنین نتایجی بدست آمده است (۲). در گزارش تیم Ben-Amotz و همکاران نیز نتایج تاثیر شدت نور ۴۰ میکرومول مشابهت یافت را انجام شده در این مطالعه را تائید می نماید.

در تحقیق حاضرجدول تجزیه واریانس نتایج حاصل ازتاثیر فاکتورهای شوری و نور بر میزان کاروتنوئید نشان داد که هردو فاکتور مورد مطالعه و همچنین اثر متقابل آن‌ها بر میزان کاروتنوئید سنتز شده تاثیر معنی‌داری داشته (جدول ۱، $p<0/05$). بطوریکه با افزایش شدت نور بر مقدار کاروتنوئید سنتز شده افزوده شد علت این افزایش شاید وجود شرایط استرس‌زا در این شدت نور باشد. همچنین طبق نتایج کلی حاصل از شکل ۴ برخلاف افزایش شدت نور، افزایش شوری موجب افزایش مقدار کاروتنوئید نمی-گردد شاید به دلیل کاهش فتوسنتز و کاهش رشد سلولی باشد. مطالعات مختلف نشان می دهند شدت نور و شوری مورد نیاز برای گونه های مختلف *Dunaliella* sp. متفاوت است (۴) و (۲۷). در مطالعه Nikokar و همکاران (۲۰۰۴) که تاثیرتنش شوری را بر روند رشد، رنگیزه‌ها و آسکوربات پراکسیداز مورد بررسی قراردادند. در این تحقیق، شوری‌های ۰/۵، ۱، ۲، ۳ و ۴ مولار بکار گرفته شد بیشترین مقدار کلروفیل a و بتاکاروتن در روز بیست و هشتم رشد و در شوری ۲ مولار مشاهده شد. این محققین

پیشنهاد کردند که افزایش بتاکاروتن با افزایش شوری رابطه مستقیم دارد اما کاروتنوئید کل به دلیل کاهش فتوسنتز و رشد سلولی که هر دو عامل باعث کاهش بیومس جلبکی می‌شود، افزایش چشمگیری ندارند. Rad و همکاران (۲۰۱۱) با ارزیابی تاثیر شوری بر روی میزان رشد و مقدار بتاکاروتن *Dunaliella* sp. جداسازی شده از دریاچه ارومیه، در غلظت‌های مختلف شوری (۱، ۲ و ۳ مولار) بیشترین میزان رشد سلولی را در شوری ۱ مولار مشاهده کردند. همچنین نتایج بدست آمده نشان دهنده‌ی بیشترین مقدار بتاکاروتن در شوری ۳ مولار و حداکثر مقدار کاروتنوئید در شوری ۲ مولار بود. Gomez و همکاران (۲۰۰۳) طی بررسی تاثیر شوری بر کمیت و کیفیت کاروتنوئید تولید شده در دو گونه از جلبک دونالیلا (*D. salina* سویه CONC-007 و *D. bardawil* سویه ATCC 30861 از دو محیط کشت (ART و PES) و شوری (۱، ۲ و ۳ مولار) مشاهده کردند که افزایش یا کاهش شوری بر روند تولید کاروتنوئید تاثیر خاصی ندارد و پیشنهاد نمودند که تاثیر تغییرات شوری درمقدار کاروتنوئید از رابطه خاصی پیروی نمی‌کند. Araujo و همکاران (۲۰۰۸) طی ارزیابی تاثیر شوری و تابش در حضور مصرف دی‌اکسید کربن و تولید کاروتنوئید در دونالیلا سالینا، مشاهده کردند که این جلبک در شوری‌های بالا و تابش شدید نور میزان سنتز کاروتنوئید را افزایش می‌دهد و رشد سلولی را کند می‌نماید. در حالیکه نتایج بدست آمده در تحقیق حاضر در شوری ۲/۹۹ مولار، افزایش شدت نور باعث افزایش میزان کاروتنوئید گردید. Fazeli و همکاران (۲۰۰۶) توانایی ذخیره کاروتنوئیدها را در جلبک *D. tertiolecta* جداسازی شده از دریاچه ارومیه و دو سویه از جلبک *D.salina* را تحت غلظت‌های متفاوت شوری (۰/۳-۲ مولار) و شدت-های نوری ۵۰ تا ۱۵۰ میکرومول بررسی کردند. در هر دو سویه از جلبک دونالیلا سالینا، با افزایش شوری مقدارکاروتنوئیدها افزایش یافت و در شوری دو مولار به بیش‌ترین مقدار خود رسید. Hadi و همکاران (۲۰۰۸) تولید گلیسرول و بتاکاروتن را در جلبک سبز *Dunaliella salina* و*D.viridis* جدا شده از تالاب گاوخونی ارزیابی کردند. آن‌ها در این آزمایش از پنج غلظت شوری (۰/۱۷، ۱، ۲، ۳، ۴ مولار) استفاده نمودند. نتایج بدست آمده نشان دهنده این بود که افزایش شوری سبب افزایش میزان کاروتنوئید جلبک دونالیلا سالینا شده است. نتایج این مطالعات نشان می دهد در شرایط و گونه های مختلف محدوده تحمل جلبک نسبت به شدت نور و شوری متفاوت است (۲۲) و (۲۳). بنابراین، جهت فراهم نمودن شرایط بهینه کشت لازم است گونه های مختلف جلبک مورد مطالعه قرار گیرند.

نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از شمارش سلولی نشان داد که افزایش شدت نور در محیط کشت Artaria، سبب کاهش تراکم سلولی و نرخ رشد در *D. salina* می شود، اما افزایش شدت نور از ۴۰ به ۲۰۰ میکرومول در محیط کشت Trenkenshu، سبب افزایش تراکم سلولی و نرخ رشد در این جلبک می گردد همچنین نتایج حاصل از سنجش کاروتنوئید نشان داد که افزایش شدت نور از ۴۰ به ۲۰۰ میکرومول در هر سه شوری مورد آزمایش سبب افزایش سنتز مقدار کاروتنوئیدها در این جلبک *Dunaliella salina* می گردد به طور کلی نتایج بدست آمده از این تحقیق نشانگر آن است که تاثیر شدت نور و محیط کشت های مختلف موجب به وجود آمدن اختلال در شاخص های رشد و رنگیزه‌ها می گردد. لذا با توجه به کاربرد گونه دونالیلا سالینا در بخش های مختلف اقتصادی نظیر شیلات، دارو سازی، محیط زیست و غیره مطالات گسترده در این راستا از اهمیت خاصی بر خوردار است.

تشکر و قدردانی

از مسئولین آزمایشگاه تحقیقاتی دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان و آزمایشگاه دانشکده علوم دریایی دانشگاه تربیت مدرس که در انجام این پروژه همکاری صمیمانه

داشته اند کمال تشکر را داریم.

منابع

۱- زارعی دارکی، ب. ۱۳۹۰: جلبک‌های اکوسیستم‌های آبی ایران. انتشارات پیام علوی. ۳۲۳ص.

2- 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 and Biology, 1:49-57.

3- Abu-Rezq, T. S., Al-Hooti, S. and Jacob, A.,2010: Optimum culture conditions required for the locally isolated Dunaliella salina. Journal of Algal Biomass Utilization. 1(2): 12-19.

4- AK I., Cirik S. and Goksan T., 2008. Effect of light intensity, salinity and temperature on growth in Camalti starin of Dunaliella viridis Teodoresco from Turkey. J. Biological Sciences. 8: 1356-1359.

5- Arau´jo, O. Q. F., Gobbi, C. N., Chaloub, R. M., Coelho, M. A. Z., 2008: Assessment of the impact of salinity and irradiance on the combined carbon dioxide sequestration and carotenoids production by *Dunaliella salina*: Amathematical model, Biotechnology and Bioengineering. 102(2): 425-435.

6- Ben-Amotz, A., Katz, A. and Avron, M. 1982. Accumulation of β-carotene in halotolerant algae: Purification and characterization of β-carotene-rich globules from Dunaliella bardawil (Chlorophyceae). Journal of Phycology, 18: 529-537.

7- Ben-Amotz, A, Shaish A, Avron M., 1989: Mode of action of the massively accumulated beta-carotene of Dunaliellabardawil in protecting the alga against damage by excess irradiation. Journal of the Plant Physiology . 91(3): 1040–1043.

8- - Bouck, J., Miller, W., Gorrell, J.H., Muzny, D. and Gibbs, R.A. 1998. Analysis of the quality and utility of random shotgun sequencing at low redundancies. Genome Research, 8: 1074-1084.

9- Britton, G., 1995:Structure and properties of carotenoids in relation to function. The Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology. 9: 1551-1558.

10- Eijckelhoff, C., Dekker, J. P., 1997: A routine method to determine the chlorophyll a, pheophytin a and carotene contents of isolated photosystem II reaction center complexes, Photosynthesis Reasearch. 52: 69-73.

11- Fazeli, M.R., Tofighi, H., Samadi, N., Jamalifar, H., Fazeli, A., 2006: Carotenoids accumulation by *Dunaliellatrtiolecta* (Lake urmia isolate) and *Dunaliellasalina*(CCAP19/18&WT) under stress condition. Journal of Pharmaceutical Sciences. 14(3): 146-150.

12- Gomez, P. I. Barriga, A. Cifuentes, A. S. Gonzalez, N. A., 2003:Effect of salinity of the quantity and quality of carotenoids accumulated by *Dunaliella salina* (strain CONC-007) and *Dunaliella bardawil* (strain ATCC 30861). Chlorophyta.Biology Reaserch. 36(2): 185-192.

13- González, M. A.,Coleman, A. W.,Gómez, P. I. and Montoya, R., 2001: Phylogenetic relationship among various strains of *Dunaliella* (Chlorophyceae) based on nuclear ITC rDNA sequences. *Journal of Phycology*. 37(4): 604-611.

14- Guevara, M., Lodeiros, C., Gómez, O., Lemus, N., Núñez, P., Romero, L., Vásquez, A and Rosales, N. 2005: Carotenogénesis de cinco cepas del alga *Dunaliella* sp. (Chlorophyceae) aisladas de lagunas hipersalinas de Venezuela. *Revista de Biología Tropical*. 53(5-4): 331-337.

15- Guillard R.L., 1973. Division rates. In: Stein (ed) Handbook of phycological methods. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 289-312.

16- Hadi, M., Shariati, M., Afsharzadeh, S., 2008: Microalgal biotechnology: Carotenoid and glycerol production by the green algae *Dunaliella* isolated from the Gave-khooni salt marsh, Iran. Journal of Biotechnology and Bioprocess Engineering. 13: 540-544.

17- Nikokar, K., Moradshahi, A. and Kharati, M., 2004: Infuence of salinity on the growth, pigmentation and ascorbate peroxidase activity Dunaliella salina isolated from Maharlu salt lake in Shiraz. Iranian Journal of Science & Technology, Transaction, A. 28: 117-125.

18- Oren, A., 2005:A hundred years of *Dunaliella* research: 1905-2005. Salina system.1-2.

19- Phadwal, K. and Singh, P. K., 2003: Isolation and characterization of an indigenous isolate of *Dunaliella* sp for β-carotene and glycerol production from hypersaline lake in India. Journal of Basic Microbiology. 43(5): 423-429.

20- Rad, F R., 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.

21- Raja, R. Heimaiswarya, R. and Rengasamy, R., 2007: Exploitation of *Dunaliella* for β-carotene production. Applied Microbiology and Biotechnology. 74(3): 517-523.

22- Richmond A., 2004: Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology.Blackwell Publishing Company, pp 566.

23- Rivkin R.B., 1989. Influence of irradiance and specteral quality on the carbon metabolism of phytoplankton. I. Photosynthesis, chemical composition and growth. J. Marine Ecology Progress Series. 5:291- 304

24- Phadwal, K. and Singh, P. K., 2003: Isolation and characterization of an indigenous isolate of Dunaliella sp for β-carotene and glycerol production from hypersaline lake in India. Journal of Basic Microbiology. 43(5): 423-429.

25- Shaish, A., Ben-Amotz, A. and Avron, M., 1991: Production and selection of high β-carotene mutants of *Dunaliella bardawil* (Chlorophyta). Journal of Phycology. 27(5): 652-656.

26- Shariati, M. and Yahyaabadi, S., 2001: Study of beta-carotene synthesis in response to different concentration of heavy metal copper in unicellular green alga *Dunaliella salina*. Proceeding of 2nd Iranian National Conference of Biotechnology, Karaj, Iran. 2: 1610-1617.

27- Tang H., Abunasser N., Garcia M.E.D., Chen M., Simon Ng K.Y. and Salley S. O., 2010. Potential of microalgae oil from *Dunaliella tertiolecta* as a feedstock for biodiesel. J. Applied Energy.1-7.

28- Trenkenshu, R.P., 2005: Simpliest models of microalgae growth.2 Queasycontinuous culture. Ekologia moray. 67: 98-110.

29- Trenkenshu, R.P., Gevorgiz, R.G. and Borovkov, A.B., 2005:The experience of industrial cultivation *Dunaliella salina*. Sevastopol. 90-97.

Effect of culture mediums and light intensity on growth and carotenoides of *Dunaliella salina* in Urmia Lake

Salmaninejad M.

Faculty of Marine Biology, University of Tarbiat Modaress, Noor, I.R. of Iran

Abstract

In the present research project effect of three culture medium and light intensity on carotenoides of algae, *Dunaliella salina*.In this study, *Dunaliella* species were collected from the lake and then was purified agar plate method. To study the effect of culture medium on the carotenoides of this species six treatments in triplicateof each culture medium by salinity 1.03, 2.99, 4.96 M in light intensity of 40, 120 and 200 micromol photon. $m^{-2}.s^{-1}$special culture module. Algae cells were counted regularly using Hemocitometry counting chamber in 3 replicates on daily basis. The growth curve was plotted out in Microsoft Excel software. The carotenoides synthesized curve was plotted out in Microsoft Excel software and compared within treatments by means of two ways ANOVA Analysis. Specific growth rate showed significant differences in various treatments ($P<0.05$). The maximum growth rate (2.45 d^{-1}) was recorded in light intensity of 40 µmol.photon.$m^{-2}.s^{-1}$and salinity 2.99 M and the minimum (0.94 d^{-1}) in 120 µmol.photon.$m^{-2}.s^{-1}$ at salinity of 1.03 M. The obtained results showed that increase light in culture medium 1.03 M from 40 to 200 µmol photon $m^{-2}.s^{-1}$ correlates with decrease in cell concentration and growth rate in D. salina. While, increase in light intensities in culture medium 2.99 M from 40 to 200 µmolphoton.$m^{-2}.s^{-1}$ resulted in reduction of cell concentration and growth rate in this algae. Analysis of Varianceresults obtained showed a significant variation between different treatments of salinity and light on scale carotenoides has a direct relation with salinity.and light intensity and Interaction ($P<0.05$). Significant interaction between the different levels of light and salinity showed that the greatest scale of carotenoides in the culture medium is in light intensity 200 µm and salt concentration 2.99 M The amount 5.07 µg.ml-1 and least scale of carotenoides in light intensity 120 µm and salt concentration 1.03 M The amount 1.02 µg.ml-1 . The obtained results showed that increase in light intensity from 40 to 200 µm resulted in increase Synthesis of carotenoides in D. salina. and The influence best of salt concentration pro production of carotenoides is salinity of 2.99 M.

Key words: carotenoide, *Dunaliella salina*, light intensity, salty, Urmia lake