شیلات، مجله منابع طبیعی ایران
دوره ۷۴، شماره ۴، زمستان ۱۴۰۰
صفحات ۵۷۳-۵۵۷

تاثیرسطح مختلف شوری، دما و pH بر رشد جلبک دونالیلا سالینا جدا سازی شده از دریاچه ارومیه

یاسر حمدی احمدآباد[۱]، عبدالمجید لیاقت[۲*]، تیمور سهرابی[۲]، احمدعلی پوربابائی[۳]

۱. دانشجوی دکترا گروه آبیاری و زهکشی، دانشکده مهندسی و فناوری کشاورزی، دانشگاه تهران، کرج، ایران
۲. استاد گروه آبیاری و زهکشی، دانشکده مهندسی و فناوری کشاورزی، دانشگاه تهران، کرج، ایران
۳. دانشیار گروه علوم و مهندسی خاک، دانشکده مهندسی و فناوری کشاورزی، دانشگاه تهران، کرج، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰ /۰۳/۲۲ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۵/۲۱

چکیده

تحقیق حاضر به منظور بهینه کردن شرایط محیطی رشد جلبک دونالیلا سالینا انجام شد. در این تحقیق شاخص‌های محیطی مؤثر در رشد از جمله دما در دو سطح ۲±۱۸ و ۲±۲۸ درجه سانتی‌گراد، pH در سه سطح ۷/۰، ۷/۵ و ۸/۰، غلظت شوری در ۷ سطح ۰/۵، ۱/۰، ۱/۵، ۲/۰، ۲/۵، ۳ و ۴ مولار NaCl در دوره رشد ۳۰ روزه مورد بررسی قرار گرفت. دوره تاریکی: روشنایی ۲۴:۰۰ ساعت و شدت نور ثابت و برابر با ۱۳۰ µ molPAR.m-2.s-1 در نظر گرفته شد. نتایج نشان داد افزایش دما سبب افزایش نرخ رشد ویژه و کاهش زمان دو برابر شدن سلول‌ها خواهد شد. بیشترین مقدار نرخ رشد ویژه و کمترین مقدار زمان دو برابر شدن سلول‌ها در pH=۷/۵ به دست آمد. با توجه به نتایج مذکور، بیشترین و کمترین مقدار نرخ رشد ویژه به ترتیب در غلظت‌های شوری ۱/۵ (۰/۵۹ در روز) و ۴/۰ (۰/۰۴ در روز) مولار بود. زمان دو برابر شدن سلول‌ها در غلظت شوری ۱/۵ مولار کمترین مقدار (در حدود ۱/۵ روز) و در ۴/۰ مولار (از حدود ۱۰ روز تا ۱۹ روز) بیشترین مقدار بود. با افزایش غلظت شوری از۰/۵ تا ۱/۵ مولار زمان دو برابر شدن کاهش و از ۱/۵ مولار تا ۴/۰ مولار افزایش یافت. غلظت تراکم سلولی جلبک، با افزایش دما افزایش یافت. مقایسه غلظت تراکم سلولی در سطح pH، در اکثر نمونه‌ها بیانگر تفاوت معنی‌دار بین مقادیر به دست آمده بود. افزایش و کاهش pH از ۷/۵ سبب کاهش تراکم سلولی گردید. بنابراین، حداکثر تراکم سلولی درتیمارها در pH=۷/۵ به دست آمد و با افزایش دما در pH=۷/۵، غلظت تراکم سلولی در زمان کمتری نسبت به بقیه نمونه‌ها به مراحله حداکثر مقدار خود رسید. با افزایش غلظت شوری از ۰/۵ تا ۱/۵ مولار، غلظت تراکم سلولی افزایش و از ۲ تا ۴ مولار نتایج عکس بود، به طوری که حداکثر تراکم سلولی در غلظت شوری ۱/۵ مولار در محدوده $۴/۳۵\times۱۰^{۶}$ تا $۵/۷۴\times۱۰^{۶}$ سلول در هر میلی‌لیتر و حداقل آن در غلظت شوری ۴/۰ مولار در حدود $۰/۵۳\times۱۰^{۶}$ تا $۰/۷۲\times۱۰^{۶}$ سلول در هر میلی‌لیتر به دست آمد. با توجه به نتایج حاصل از این پژوهش، بهترین شرایط رشد جلبک دونالیلا سالینا جهت تکثیر حداکثری در غلظت شوری ۱/۵ مولار با دمای ۲±۲۸ درجه سانتیگراد و pH=۷/۵ به دست آمد و غلظت‌های شوری ۱/۰ و ۲/۰ مولار در شرایط دمایی و pH مذکور می‌توانند گزینه‌های بعدی جهت تولید این جلبک باشند.

واژگان کلیدی: جلبک، دونالیلا سالینا، شرایط محیطی، تراکم سلولی

* نویسنده مسئول: عبدالمجید لیاقت
Email: aliaghat@ut.ac.ir

Journal of Fisheries
Vol. 74, No. 4, Winter 2021
pp. 557-573

Effect of different salinity, temperature and pH levels on the growth of *Dunaliella Salina* Algae isolated from Lake Urmia

Yaser Hamdi Ahmadabad[1], Abdolmajid Liaghat[2*], Tymor Sohrabi[2], Ahmadali Pourbabaei[3]

1.Ph.D. Student, Department of Irrigation and Reclamation Engineering, Faculty of Agricultural Engineering & Technology, College of Agriculture and National Resources, University of Tehran, Karaj, Iran
2. Professor, Department of Irrigation and Reclamation Engineering, Faculty of Agricultural Engineering & Technology, College of Agriculture and National Resources, University of Tehran, Karaj, Iran
3.Associate Professor, Department of Soil Science, Faculty of Agricultural Engineering & Technology, College of Agriculture and National Resources, University of Tehran, Karaj, Iran

Received: 11-Jun-2021 **Accepted: 11-Aug-2021**

Abstract

The main objective of this study was to optimize the environmental conditions for maximum growth of *Dunaliella salina* algae. In this study, effective environmental parameters in algae growth, such as temperature in two levels of 18± °C and 28±2 °C, pH in three levels of 7.0, 7.5, and 8.0 and salinity seven levels of 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3, and 4 molar NaCl in a 30-day culture period were investigated. The dark: light cycle and the constant light intensity were considered 24:0 and 130 130 molPAR. $m^{-2}.s^{-1}$, respectively. Results depicted that an increase in temperature affecting specific growth rate and a decrease in cell's population doubling time. The highest specific growth rate and the shortest cell's doubling time were observed under the condition of pH = 7. Furthermore, the highest specific growth rate was obtained in the salinity of 1.5 molar (0.59 per day) while the lowest specific growth rate in the salinity of 4molar (0.04 per day). The shortest (approximately 1.5 day) and longest (from 10 to 19 days) cell's doubling time were recorded in salinities of 1.5 and 4molar, respectively, such that by increasing salinity from 0.5 to 1.5 molar, doubling time decreased while by increasing salinity from 1.5 to 4 molar, the doubling time showed a decrease trend. The algae cell concentration increased by an increase in temperature. There were significant differences among cell concentrations in various pH levels. pHs higher and lower than 7.5 led to a decrease in cell concentration. Therefore, in most samples, the maximum cell concentration was observed at pH of 7.5. An increase in temperature when pH was 7.5 let cell concentration to reach its maximum amount faster. By increasing salinity from 0.5 to 1.5 molar, cell concentration increased. In comparison, an adverse effect was observed when salinity increased from 2 to 4 molar. Cell concentration in 1.5 molar salinity condition ranged from 4.35×10^6 cell. ml^{-1} to 5.74×10^6 cell. ml^{-1} and in 4 molar salinity, cell concentration varied from 0.53×10^6 cell. ml^{-1} to 0.72×10^6 cell. ml^{-1}. Based on the results of this study, the optimum environmental condition for growth of *Dunaliella salina* recorded under the salinity = 1.5 molar, temperature = 28±2 °C, and pH = 7.5. Condition of 1and 2 molar salinities with the aforementioned temperature and pH, is suggested as the further option for production of this algae.

Keywords: Algae, *Dunaliella* spp, Environmental condition, Cellular density.

Corresponding author: Abdolmajid Liaghat Email: aliaghat@ut.ac.ir

۱. مقدمه

گونه‌های *Dunaliella spp.* از نظر شکل (تخم‌مرغی، کروی، گلابی شکل، دوکی شکل و بیضی) و اندازه (بین ۳ تا ۱۳ میکرومتر پهنا و ۵ تا ۲۵ میکرومتر دراز) بسیار متغیر دارند. این میکروجلبک‌ها فاقد دیواره سلولی اند و دارای یک پیرنویید مرکزی و یک کلروپلاست بزرگ و منفرد هستند و به گروه یوکاریوتی تک سلولی تعلق دارند (Borowitzka and Siva, 2007). در تراکم‌های بالا بدون محدویت فصلی (Kadkhodaei *et al.*, 2011) روزانه بین ۰/۴۷ تا ۱/۲۲ تکثیر و تقسیم می شوند (Oren, 2005). همچنین توانایی رشد در طیف گسترده‌ای از غلظت شوری (از ۰/۵۱۷ مولار تا ۵/۳۴۴ مولار NaCl) در pH یک تا ۱۱ و دمای ۲۰ تا ۴۰ درجه سانتی‌گراد دارند (Cadoret *et al.*, 2012; Borowitzka, 2013; Cai *et al.*, 2013). گونه جلبکی *Dunaliella salina* به منظور انجام فتوسنتز و رشد به منبع نور، دی اکسید کربن، آب و نمک های معدنی مختلف و دمای مناسب نیاز دارد (Borowitzka *et al.*, 1984; Balat, 2010; Amrei *et al.*, 2015) و بر خلاف جلبک‌های آب شیرین، غلظت قابل توجه‌ای از NaCl باید در محیط کشت آن وجود داشته باشد (Borowitzka *et al.*, 1984; Oren, 2005). تقریباً نیمی از وزن خشک این جلبک از کربن تشکیل شده است (Demirbas, 2011). کربن به طور معمول از دی اکسید کربن اتمسفر تأمین می‌شود (Chisti, 2008). لذا دی اکسید کربن باید به طور پیوسته در دوره روشنایی در اختیار جلبک قرار گیرد (Demirbas, 2011). از آنجا که این جلبک در محیط های دریایی آب شور باعث تولید لیپیدها، ویتامین‌ها، بتا کاروتن و گلیسرول می‌شود، به عنوان یک منبع طبیعی برای تولید زیست‌توده و بتاکارون مطرح است (Hosseini Tafreshi and Shariati, 2009; Ghasemi *et al.*, 2011; Borowitzka, 2013). با توجه به ارزش اقتصادی و کاربری های مختلف این جلبک در صنایع مختلف، پژوهشگران به فکر بهینه سازی محیط کشت این جلبک بوده‌اند.

Fazeli و همکاران (۲۰۰۶) به منظور تعیین غلظت شوری مناسب در تولید جلبک دونالیلا سالینا، نمونه‌های این جلبک در منطقه لاد هیبت (Laadhibet) در تونس جنوبی را مورد مطالعه قرار دادند. نمونه‌ها تحت شرایط کنترل شده، در دمای ۲۵/۱۸ درجه سانتی‌گراد (شب/روز)، دوره روشنایی تاریکی ۱۲:۱۲ ساعت و شدت نور ۱۳۵ $\mu molPAR.m^{-2}.s^{-1}$ در آب دریای مصنوعی در ۴ غلظت شوری (۰/۶، ۱/۵، ۳/۰ و ۴/۵ مولار NaCl) با غلظت سلولی اولیه ۳۰۰×۱۰^{۳} سلول در هر میلی‌لیتر کشت شدند. نتایج نشان داد در غلظت شوری پایین (۰/۶ مولار) به علت تنش رقیق سازی و در غلظت شوری بالا (۴/۵ مولار) به دلیل تنش شدید شوری، رشد دونالیلا سالینا به طور قابل توجهی نسبت به حالت بهینه کاهش یافته است. این محققین بیان کردند غلظت شوری ۳/۰-۱/۵ مولار، بهینه‌ترین غلظت شوری برای رشد جلبک می‌باشد (Farhat *et al.*, 2011). در همین راستا و به منظور بررسی اثر شوری در سال ۲۰۰۶، Fazeli و همکاران اثر شوری بر روی رشد و تولید بتاکارون از جلبک *D. tertiolecta* در دریاچه ارومیه را مورد مطالعه قرار دادند. در این تحقیق نمونه‌ها به مدت هفت روز در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد، و دوره دوشنایی: تاریکی ۱۰:۱۴ ساعت و شدت نور ۵۰ میکرومول فوتون بر مترمربع در ثانیه قرار گرفتند. سپس نمونه ها در آب دریای مصنوعی با غلظت‌های شوری مختلف (۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۵، ۱، ۲ و ۳ مولار) و pH=۷/۵، دمای حدود ۲۶ درجه سانتی‌گراد و شدت نور ۱۵۰ میکرومول فوتون بر متر مربع در ثانیه کشت شدند. با توجه به نتایج، بیشترین تراکم سلولی در پایان دوره رشد، برای شوری ۰/۵ مولار (۶۱۰×۱۰^{۴} سلول در هر میلی‌لیتر) و کمترین تراکم سلولی برای غلظت شوری ۳ مولار (۴۲×۱۰^{۴} سلول در هر میلی‌لیتر) به دست آمد (Fazeli *et al.*, 2006). به منظور بهینه کردن شرایط رشد جلبک دونالیلا سالینا در تحقیقی دیگر، اثر ۶ دمای مختلف (۱۸، ۲۲، ۲۶، ۳۰، ۳۴ و ۳۸ درجه سانتی‌گراد) و ۶ غلظت شوری مختلف (۱۰٪، ۱۵٪، ۲۰٪، ۲۵٪، ۳۰٪ و ۳۵٪) به صورت جداگانه بر روی این

جلبک مورد بررسی قرار گرفت. در شرایط دمایی مختلف، غلظت شوری و شدت نور برای تمام نمونه‌ها ثابت و به ترتیب برابر با ۲۰ درصد NaCl (در حدود ۳/۵ مولار) و ۱۸۰ میکرومول فوتون بر مترمربع در ثانیه، همچنین برای شرایط غلظت شوری مختلف، دما، شدت نور و دوره روشنایی: تاریکی ثابت و به ترتیب برابر با ۳۰ درجه سانتی‌گراد، ۸۰ میکرومول فوتون بر مترمربع در ثانیه و ۱۲: ۱۲ ساعت در نظر گرفته شد. نتایج تحقیق نشان داد تراکم سلولی در شرایط دمایی ۲۲ درجه سانتی‌گراد و نرخ رشد در غلظت شوری ۱۰ درصد NaCl (در حدود ۱/۵ تا ۲ مولار) بیشترین مقدار بوده است و با افزایش شوری نرخ رشد ویژه کاهش می‌یابد (García *et al.*, 2007; Hamed et al., 2017).

Valencia و همکاران (۲۰۱۸) تأثیر غلظت شوری و دوره روشنایی بر روی رشد یک گونه جدید بومی از جلبک دونالیلا سالینا در ونزوئلا را مورد مطالعه قرار دادند. در این تحقیق، از جلبک دونالیلا سالینا بومی (*ARAYA Salt Works*) استفاده شد. به منظور ارزیابی رشد، جلبک دونالیلا به مدت ۲۲ روز در محیط کشت F/2 در دمای ۲۷±۲ درجه سانتی‌گراد، pH=۷/۸، دوره روشنایی ۱۲:۱۲ ساعت روشنایی: تاریکی، هوادهی مداوم در دو سطح شوری ۴۰ و ۲۵۰ و دو سطح تابش $molphotons.m^{-2}.s^{-}$ ^{1} ۱۹۵ µ و ۲۹۵ قرار گرفت. نتایج تحقیق نشان داد نرخ رشد گونه جدید دونالیلا سالینا، با افزایش شوری و شدت نور کاهش می یابد (Guevara *et al.*, 2016). در همین راستا، در شدت نور و غلظت‌های مختلف شوری، رشد گونه دیگری از جلبک دونالیلا سالینا در مکزیک (San Quintin, Baja California) مورد مطالعه قرار گرفت که از محیط کشت جانسون برای کشت آن استفاده شد. جلبک دونالیلا در اتاقک با دمای ۲۲-۱۹ درجه سانتی‌گراد در ارلن‌های ۱۰۰۰ میلی‌لیتری حاوی ۵۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت جانسون کشت داده شد. برای ارزیابی رشد جلبک، از سه سطح غلظت شوری (۱۰۰، ۵۰۰ و ۳۰۰۰ میلی مولار NaCl) و دو دوره روشنایی با لامپ LED (۱۸:۶ و ۲۴:۰ تاریکی:روشنایی) استفاده شد.

نتایج نشان داد در دوره آزمایش (۲۰ روز) تراکم سلول‌ها در تمام شرایط‌های اعمال شده به جز شوری ۳۰۰۰ میلی‌مولار و دوره روشنایی ۱۸:۶ روند افزایشی داشته است. میزان رشد در غلظت شوری بالا در مقایسه با غلظت شوری پایین کاهش قابل توجهی نشان داد (حدود سه برابر) از طرف دیگر، بیشترین تراکم سلولی برای شرایط شوری پایین (۱۰۰ و ۵۰۰ میلی‌مولار) با دوره روشنایی ۲۴:۰۰ (نور مداوم) به دست آمد (Valencia *et al.*, 2018).

در تحقیق Chen و همکاران (۲۰۰۹)، اثر تغییرات شوری بر روی رشد جلبک دونالیلا سالینا مورد مطالعه قرار گرفت. جلبک‌ها در غلظت شوری ۲ مولار NaCl، دمای ۲۶ درجه سانتی‌گراد، شدت نور ۸۰۰۰ لوکس در یک دوره روشنایی ۱۴:۱۰ ساعت (تاریکی: روشنایی) کشت شدند. به منظور اعمال تیمارها، جلبک‌ها به محیط کشت با غلظت‌های مختلف شوری (۰/۵، ۱/۰، ۱/۵، ۲/۰، ۲/۵، ۳/۰، ۳/۵، ۴/۰، ۴/۵ یا ۵/۰ مولار) منتقل شدند. نتایج تحقیق نشان داد غلظت شوری ۲ مولار NaCl بهینه‌ترین غلظت شوری برای رشد جلبک بوده است (Chen *et al.*, 2009).

Gomez and Gonzalez (۲۰۰۵) اثر دما و شدت نور بر روی رشد جلبک دونالیلا سالینا از کشورهای مختلف (سه گونه از شیلی و ۴ گونه از کشورهای استرالیا، مکزیک، چین و اسرائیل) تحت دو شدت نور (۴۰ و ۱۱۰ میکرومول بر متر مربع در ثانیه) و دو دما (۱۵ و ۲۶ درجه سانتی‌گراد) مورد مطالعه قرار دادند. نمونه‌ها با غلظت سلولی اولیه ۵×۱۰^{۳} سلول در هر میلی‌لیتر و غلظت شوری NaCl ۱۲/۵ w/v درصد (در حدود ۲ مولار) کشت شدند. نتایج نشان داد تمام گونه‌های غیرشیلی و یک گونه از شیلی بالاترین میزان رشد و حداکثر تراکم سلولی را داشته است. از طرفی دیگر، در تمام گونه‌های مورد مطالعه، حداکثر سرعت رشد و تراکم سلولی در دمای ۲۶ درجه سانتی‌گراد (مستقل از شدت نور) و شدت نور ۱۱۰ (Fu *et al.*, 2013) به دست آمد (Gómez and González, 2005). در همین راستا Wu و همکاران (۲۰۱۶) اثر شدت نور و دما بر روی رشد جلبک دونالیلا

سالینا جداسازی شده از خاک شور در مزارع تایلند را مورد مطالعه قرار دادند. در این تحقیق، از سه شدت نور (۶۸/۵، ۱۳۵/۳ و ۲۴۵/۶ میکرومول بر مترمربع) و سه درجه دمایی (۱۵، ۲۲ و ۳۰ درجه سانتی‌گراد) استفاده شد. در ابتدا، جلبک‌ها در محیط کشت جانسون با pH=۷/۵، غلظت اولیه سلولی ۵۰×۱۰^{۴} سلول در هر میلی‌لیتر و شوری ۲ مولار NaCl، شدت نور ۶۸/۵ میکرومول برمتر مربع در ثانیه و دوره روشنایی: تاریکی ۱۲:۱۲ ساعت با دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد کشت شدند. سپس جلبک‌ها به محیط کشت با شرایط تحقیق منتقل شدند. نتایج نشان داد با افزایش دما، pH محیط کشت در ابتدا به سرعت افزایش یافته و سپس به تدریج روند کاهشی داشته است. از طرف دیگر، افزایش دما اختلاف معنی‌داری در رشد جلبک‌ها ایجاد نکرد. با تحلیل نتایج، مشخص گردید با اینکه شدت نور یک فاکتور اساسی اثر گذار بر رشد جلبک دونالیلا سالینا می‌باشد (Khadim *et al.*, 2018; Han *et al.*, 2019) اما فاکتور دما اثرگذاری قوی‌تری نسبت به فاکتور شدت نور در رشد جلبک‌ها داشته است (Bonnefond et al., 2016). بنابراین، محققین دما ۲۲ درجه سانتی‌گراد و شدت نور ۱۳۵/۳ میکرومول بر مترمربع در ثانیه را شرایط بهینه برای رشد جلبک بیان کردند (Wu *et al.*, 2016). در تحقیق دیگر در همین راستا، Saha و همکاران (۲۰۱۸) بیشترین تراکم سلولی را در شدت نور ۲۴۰ میکرومول فوتون بر متر مربع در ثانیه گزارش کردند.

با توجه به مطالعات انجام شده، پارامتر های آزمایشگاهی و هزینه‌های محیط کشت و مواد لازم برای کشت جلبک سبب محدودیت در زمینه تولید این جلبک می‌گردد. با توجه به مطالعات قبلی انجام شده شرایط مختلف محیطی از جمله دما، شدت نور، pH، غلظت شوری و نحوه کشت می‌تواند بر روی متابولیسم جلبک دونالیلا سالینا اثر گذار باشد و سبب ایجاد هزینه‌هایی برای تولید آن شود (Dunstan *et al.*, 1993; Ahmed *et al.*, 2017; Vickers, 2017; Srinivasan *et al.*, 2018)، در تمام تحقیقات انجام شده در زمینه بهینه کردن شرایط کشت جلبک دونالیلا سالینا، تأثیر عوامل مختلف اثرگذار بر روی رشد جلبک (دما، pH، غلظت شوری) به صورت توأمان بررسی نشده است. بنابراین، هدف از این پژوهش، بهینه کردن عوامل محیطی اثرگذار روی رشد جلبک دونالیلا سالینا موجود در آب دریاچه ارومیه (بومی) بود. برای همین منظور، سطوح مختلف این عوامل از جمله دما، شوری و pH به صورت توأمان جهت بهینه کردن شرایط محیطی و رسیدن به رشد حداکثری، مورد بررسی قرار گرفت.

۲. مواد و روش‌ها

۲,۱. محل اجرای پژوهش

این پژوهش در آزمایشگاه میکروبیولوژی گروه خاکشناسی و آزمایشگاه زهکشی گروه مهندسی آبیاری و آبادانی دانشکده مهندسی و فناوری کشاورزی دانشگاه تهران انجام شد.

۲,۲. نمونه برداری، جداسازی و کشت اولیه

نمونه آب حاوی جلبک دونالیلا سالینا از دریاچه ارومیه تهیه گردید. نمونه برداری با استفاده از ظروف شیشه‌ای یک لیتری از مکان های مختلف انجام گرفت. پس از شناسایی و جداسازی جلبک‌ها توسط پژوهشکده آرتیمای ارومیه، استوک آن جهت کشت و تکثیر به آزمایشگاه میکروبیولوژی خاکشناسی دانشگاه تهران منتقل گردید. استوک‌ها تا مهیا شدن شرایط مناسب کشت در دمای پایین (۸ درجه سانتی‌گراد) در یخچال نگهداری شدند تا شرایط مناسب جهت کشت فراهم گردد.

جهت کشت جلبک دونالیلا سالینا از محیط کشت اصلاح شده جانسون (جدول ۱) استفاده شد (Borowitzka and Borowitzka, 1988).

جدول ۱- نمک‌های بکار رفته جهت آماده سازی محیط کشت اصلاح شده جانسون

ترکیبات	مقادیر
محلول عناصر پر مصرف (اضافه کردن ۹۸۰ میلی‌لیتر به ارلن محیط کشت)	
منیزیم کلرید ($MgCl_2.6H_2O$)	۱/۵ گرم
منیزیم سولفات ($MgSO_4.7H_2O$)	۰/۵ گرم
پتاسیم کلرید (KCl)	۰/۲ گرم
$CaCl_2.2H_2O$	۰/۲ گرم
KNO_3	۰/۱ گرم
$NaHCO_3$	۰/۰۴۳ گرم
KH_2PO_4	۰/۰۳۵ گرم
NaCl	۸۷/۷ گرم
در یک لیتر آب مقطر حل شود.	
Fe-solution (اضافه کردن ۱۰ میلی‌لیتر به محیط کشت)	
Na_2EDTA	۱۸۹ میلی‌گرم
$FeCl_3.6H_2O$	۲۴۴ میلی‌گرم
در یک لیتر آب مقطر حل شود.	
محلول عناصر کم‌مصرف (اضافه کردن ۱۰ میلی‌لیتر به محیط کشت)	
اسید بوریک (H_3BO_3)	۶۱ میلی‌گرم
مولبیدات آمونیوم ($((NH_4)6MO_7O_{24}.4H_2O$)	۳۸ میلی‌گرم
سولفات مس ($CuSO_4.5H_2O$)	۶ میلی‌گرم
کلرید کبالت ($CoCl_2.6H_2O$)	۵/۱ میلی‌گرم
کلرید روی ($ZNCL_2$)	۴/۱ میلی‌گرم
منگنز کلرید ($MnCl_2.4H_2O$)	۴/۱ میلی‌گرم
در یک لیتر آب مقطر حل شود.	

پس از آماده شدن محیط کشت (جدول ۱)، میزان اسیدیته آن با استفاده از دستگاه pH متر و محلول NaOH و HCL یک نرمال در محدود ۷/۵ تنظیم شد. به منظور استریل کردن، محیط کشت به همراه تمامی وسایل مورد نیاز آزمایش و آب مقطر جهت هوادهی، در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد، فشار ۱/۶ اتمسفر به مدت یک ساعت اتوکلاو شدند.

پس از تکثیر، جلبک دونالیلا سالینا در ۷ غلظت شوری (۰/۵، ۱/۰، ۱/۵، ۲/۰، ۲/۵، ۳/۰ و ۴/۰ مولار NaCl) در ارلن‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری، در دو دمای مختلف ۲۸ ±۲ درجه سانتی‌گراد و ۱۸ ±۲ درجه سانتی‌گراد و در سه سطح pH (۷/۰، ۷/۵ و ۸/۰) کشت داده شد. ارلن‌ها جهت کشت طوری در نظر گرفته شده که حداقل ۵۰ درصد حجم آن جهت هواددهی خالی باشد. برای تمام نمونه‌ها دوره روشنایی و شدت نور ثابت و به ترتیب ۲۴:۰۰ ساعت (تاریکی: روشنایی) و ۱۳۰ میکرومول فوتون بر متر مربع در ثانیه در نظر گرفته شد. ۱۰۰ میلی‌لیتر از محیط کشت با غلظت‌های شوری مذکور، به ارلن‌های استریل شده ۲۵۰ میلی لیتری اضافه شد و حدود ۱۰ میلی‌لیتر (۱۰ درصد محیط کشت شامل $۰/۲۵\times۱۰^۶$ سلول در هر میلی‌لیتر) از سلول‌های خالص سازی شده، به هر ارلن حاوی محیط کشت تزریق گردید. ارلن‌ها با ۳ تکرار به اتاق کشت منتقل شدند و در هر اتاقک با یک تیمار دمایی و pH خاص به مدت ۳۰ روز قرار گرفتند. شمارش سلول‌ها از سه تکرار هر تیمار، در ۱۵ روز اول به صورت روزانه و در ۱۵ روز پایانی هر دو روز یکبار انجام و با استفاده از لام هموسایتومتر و در زیر میکروسکوپ نوری با لنز ۴۰ انجام شد. از سه سری داده شمارش شده

میانگین گرفته شد. تراکم سلول با استفاده از معادله (۱) محاسبه شد که در آن X: تراکم سلولی (سلول در میلی‌متر) و n: تعداد سلول‌های شمارش شده در مربع بزرگ (۱۶×۱۶ میلی‌متر مربع) است (Guillard, 1973; Wood *et al.*, 2005):

$$X = n \times 1000/10^{-1} \quad (۱)$$

مقادیر نرخ رشد ویژه (μ بر حسب d^{-1})، زمان دو برابر شدن سلول‌ها (G) و حداکثر عملکرد سلولی (R) در مرحله رشد نمایی به ترتیب با استفاده از معادله (۲) تا (۴) محاسبه شدند (Guillard, 1973; Wood *et al.*, 2005):

$$\mu = (\ln x_2 - \ln x_1)/(t_2 - t_1) \quad (۲)$$

$$G = 0.6931/\mu \quad (۳)$$

$$R = N_f - N_i \quad (۴)$$

که در آن x_1 و x_2 تعداد سلول‌ها در زمان‌های t_1 و t_2 بر حسب روز و N_f و N_i به ترتیب غلظت نهایی و غلظت اولیه سلول می‌باشد.

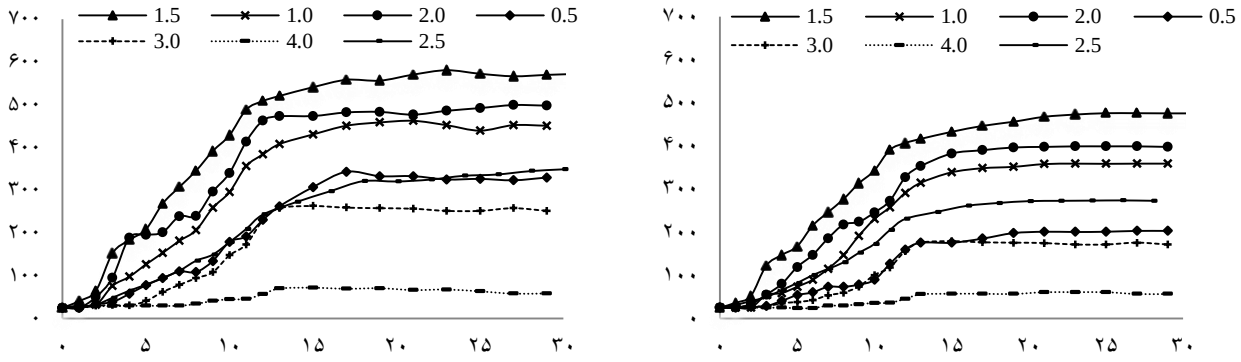
۲،۳. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

از نرم‌افزار اکسل جهت ترسیم منحنی تغییرات جمعیت دونالیلا سالینا طی مرحله رشد استفاده شد. همچنین از آزمون تجزیه واریانس یک طرفه (One- way ANOVA) جهت تخمین معنی‌دار بودن اختلاف بین تیمارها استفاده شد ($p<0.05$ معنی‌دار در نظر گرفته شد).

۳. نتایج

به منظور بهینه کردن شرایط رشد جهت تکثیر جلبک دونالیلا سالینا، شمارش سلول‌ها در دماهای ۲±۱۸ و ۲±۲۸ درجه سانتی‌گراد و در pHهای ۷/۰، ۷/۵ و ۸/۰ در شدت نور ثابت μ ۱۳۰molPAR.m^{-2}.s^{-1} تحت دوره تاریکی: روشنایی ۲۴:۰۰ ساعت در غلظت‌های شوری مختلف (۰/۵، ۱/۰، ۱/۵، ۲/۰، ۲/۵، ۳/۰، ۴/۰ مولار NaCl) انجام شد. منحنی تغییرات جمعیت در طول دوره رشد ۳۰ روزه، میانگین نرخ رشد ویژه در مرحله رشد نمایی، حداکثر نرخ رشد ویژه و زمان دو برابر شدن سلول‌ها محاسبه گردید.

شکل (۱) نشان‌دهنده منحنی تغییرات رشد جلبک دونالیلا سالینا در شرایط غلظت شوری مختلف در دماهای ۲±۱۸ و ۲±۲۸ درجه سانتی‌گراد در pH=۷/۵ می‌باشد.



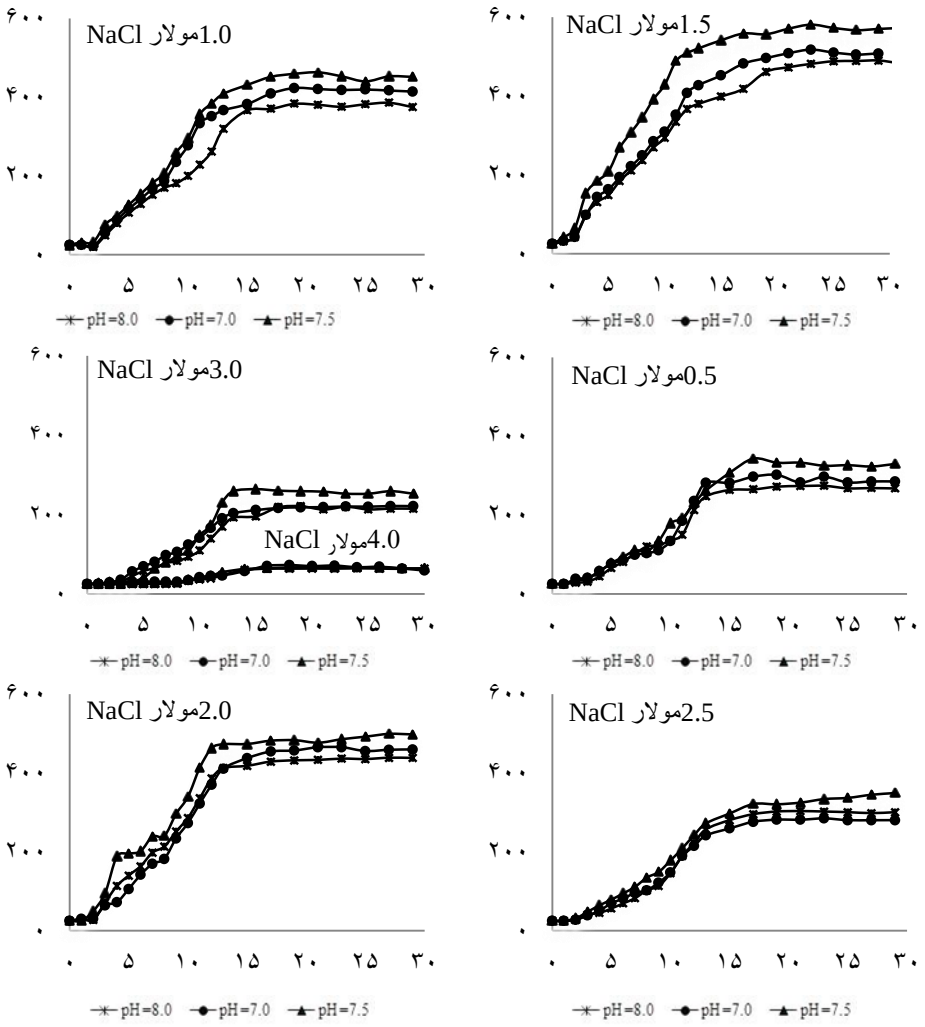
شکل ۱– نمودارهای رشد جلبک دونالیلا سالینا در غلظت‌های شوری مختلف، pH=7.5 و دمای ۲±۱۸ (سمت راست) و ۲±۲۸ درجه سانتی‌گراد (سمت چپ) (محور افقی دوره رشد بر حسب روز و محور عمودی تراکم سلولی (cell.ml-1 ×10^4))

شکل‌های (۲) و (۳) روند رشد جلبک و جدول (۲) حداکثر تراکم سلولی را در غلظت‌های شوری مختلف، pH مختلف (۷/۰، ۷/۵ و ۸/۰)، دمای ۲±۱۸ و ۲±۲۸ درجه سانتی‌گراد و در شدت نور ثابت μ ۱۳۰molPAR.m^{-2}.s^{-1} نشان می‌دهد. با توجه به جدول (۲) مقایسه بین غلظت‌های شوری مختلف نشان می‌دهد حداکثر تراکم سلولی در سطح غلظت‌های شوری مختلف از نظر آماری در اکثر نمونه‌ها دارای اختلاف معنی‌داری بوده و بیشترین

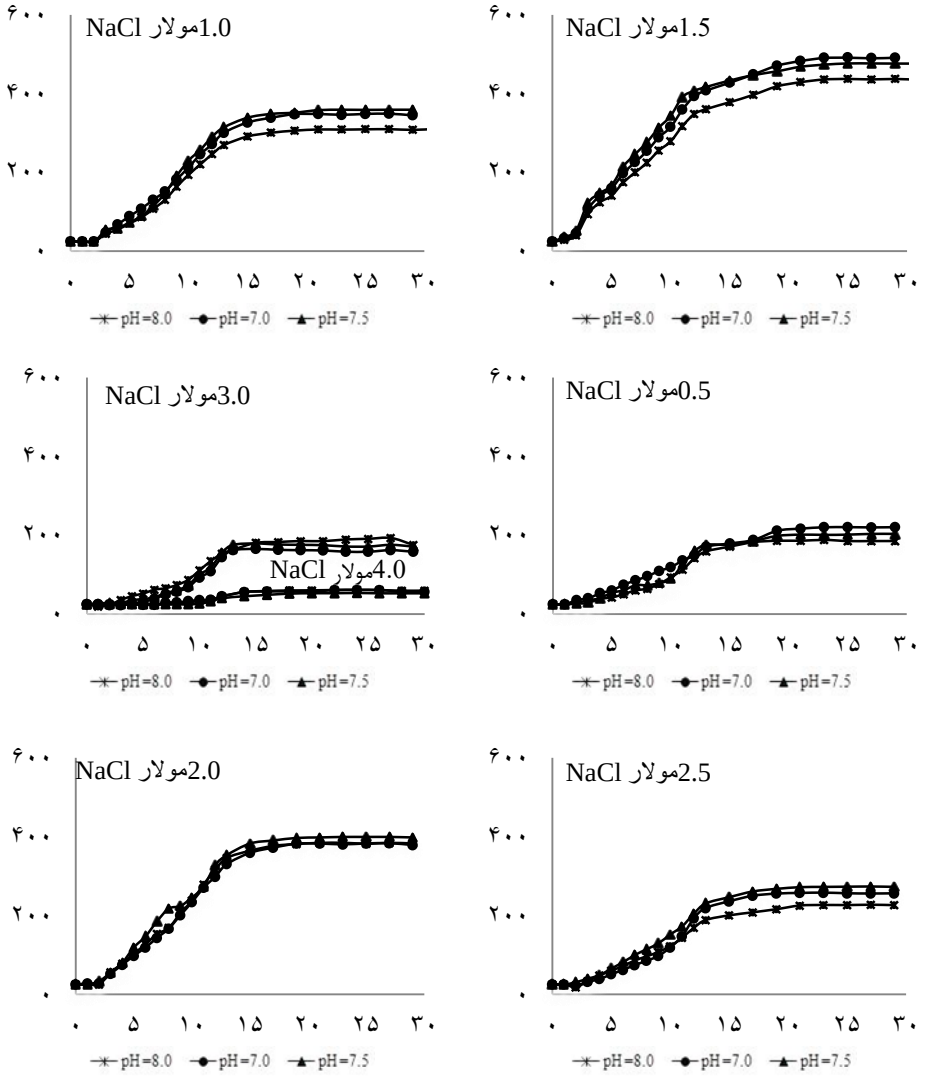
و کم‌ترین غلظت تراکم سـلولی به ترتیب برای غلظت‌های شوری ۱/۵ و ۰/۵ مولار NaCl به دست آمده است.

جدول ۲- مقایسه حداکثر عملکرد سلولی (R) جلبک دونالیلا سالینا طی مرحله رشد نمایی در غلظت‌های شوری، pH و دمای مختلف (خطای استاندارد± میانگین) *دارای اختلاف معنی دار در سطح ۰/۰۵ وجود حرف a به معنی عدم اختلاف معنی‌دار بین نمونه‌ها

میانگین عملکرد سلولی ± خطای استاندارد ($\times 10^6$ cell.ml^{-1})						
غلظت شوری	دما: ۲±۲۸ درجه سانتی‌گراد			دما: ۲±۱۸ درجه سانتی‌گراد		
(مولار NaCl)	pH=۷/۰	pH=۷/۵	pH=۸/۰	pH=۷/۰	pH=۷/۵	pH=۸/۰
۰/۵	۲/۹۶±۰/۰۴*	۳/۳۶±۰/۰۳*	۲/۷۲±۰/۰۱*	۲/۲۰±۰/۰۱*	۲/۰۳±۰/۰۱*	۱/۸۷±۰/۰۱*
۱/۰	۴/۲۱±۰/۰۱*	۴/۵۹±۰/۰۲*	۳/۸۴±۰/۰۱*	۳/۴۸±۰/۰۱*	۳/۵۹±۰/۰۰*	۳/۵۹±۰/۰۰*
۱/۵	۵/۱۱±۰/۰۲*	۵/۷۴±۰/۰۲*	۴/۸۶±۰/۰۲*	۴/۹۰±۰/۰۱a	۴/۷۶±۰/۰۱a	۴/۷۶±۰/۰۱*
۲/۰	۴/۶۳±۰/۰۱*	۴/۹۵±۰/۰۳*	۴/۳۸±۰/۰۱*	۳/۸۲±۰/۰۱a	۳/۹۹±۰/۰۰*	۳/۹۹±۰/۰۰a
۲/۵	۲/۸۲±۰/۰۱*	۳/۳۹±۰/۰۴*	۳/۰۲±۰/۰۱*	۲/۵۴±۰/۰۲*	۲/۷۳±۰/۰۰*	۲/۷۳±۰/۰۰*
۳/۰	۲/۲۰±۰/۰۰a	۲/۶۰±۰/۰۱*	۲/۱۹±۰/۰۱a	۱/۶۱±۰/۰۱*	۱/۷۷±۰/۰۱*	۱/۷۷±۰/۰۱*
۴/۰	۰/۶۷±۰/۰۰*	۰/۷۲±۰/۰۱*	۰/۶۴±۰/۰۰*	۰/۵۳±۰/۰۰*	۰/۶۰±۰/۰۱a	۰/۶۰±۰/۰۱a



شکل ۲- نمودارهای تراکم سلولی جلبک دونالیلا سالینا در pH=8.0, pH=7.5, pH=7.0 و غلظت‌های شوری مختلف (۰/۵، ۱/۰، ۱/۵، ۲/۰، ۳/۰ و ۴/۰ مولار NaCl) در شدت نور ثابت ۱۳۰ میکرومول فوتون بر مترمربع در ثانیه و دما ۲±۲۸ درجه سانتی‌گراد در دوره ۳۰ روزه رشد (محور افقی دوره رشد بر حسب روز و محور عمودی تراکم سلولی ($\times 10^4$ cell.ml-1))

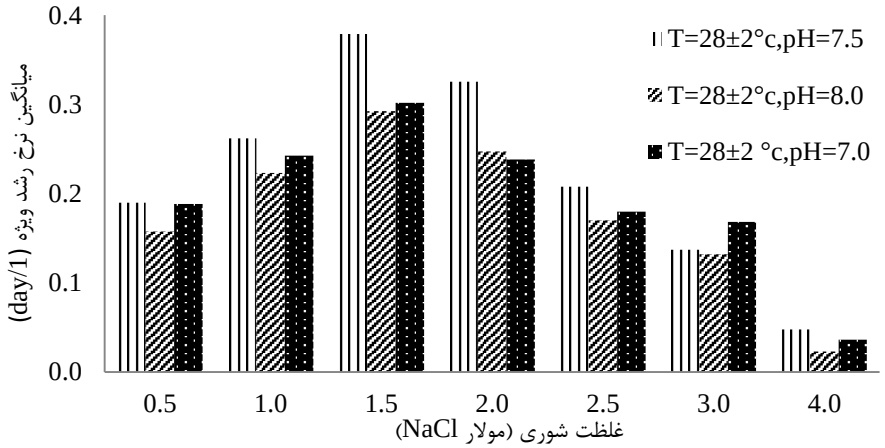


شکل ۳- نمودارهای تراکم سلولی جلبک دونالیلا سالینا در pH=8.0, pH=7.5, pH=7.0 و غلظت‌های شوری مختلف (۰/۵، ۱/۰، ۱/۵، ۲/۰، ۲/۵، ۳/۰ و ۴/۰ مولار NaCl) در شدت نور ثابت ۱۳۰ میکرومول فوتون بر مترمربع در ثانیه و دما ۲±۱۸ درجه سانتی‌گراد در دوره ۳۰ روزه رشد (محور افقی دوره رشد بر حسب روز و محور عمودی تراکم سلولی ($\times 10^4$ cell.ml-1))

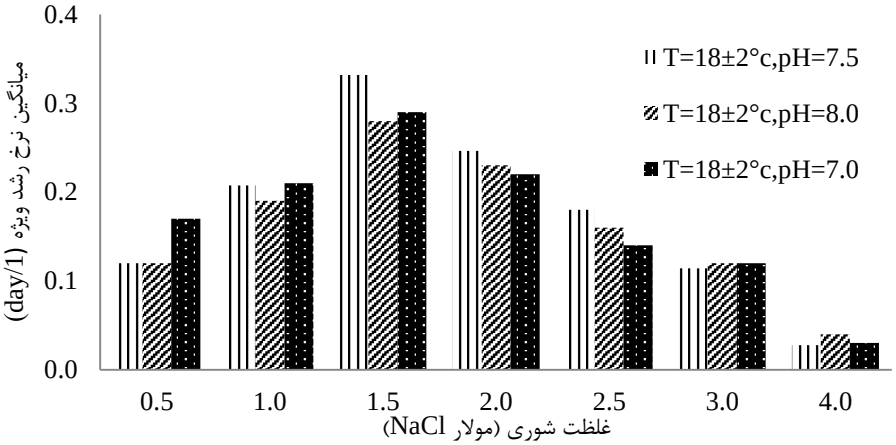
در این تحقیق به منظور تعیین بهترین د ما، pH و غلظت شوری به مقایسه نرخ رشد ویژه سلول‌ها در تیمارهای مختلف پرداخته شد. برای تمامی شرایط محیطی مذکور در تحقیق، نرخ رشد ویژه محاسبه و به لحاظ معنی دار بودن یا نبودن در بین تیمارهای مختلف مورد آزمون آماری قرار گرفت. نمونه‌ها به صورت سطری (حروف کوچک) و ستونی (حروف بزرگ) از لحاظ معنی‌داری مورد مقایسه قرار گرفتند و نتایج آن در جدول (۳) ارایه شده ا ست. جدول (۳) ن شان‌دهنده حداکثر نرخ رشد ویژه و شکل‌های (۴) و (۵) نشان‌دهنده میانگین نرخ رشد ویژه جلبک دونالیلا سالینا در شرایط مختلف محیطی ر شد ا ست. با توجه به نتایج، بیشترین و کمترین نرخ ر شد ویژه از لحاظ غلظت شوری، به ترتیب مربوط به غلظت شوری ۱/۵ و ۴/۰ مولار NaCl بوده است.

جدول ۳- مقایسه حداکثر نرخ رشد ویژه (μmax) جلبک دونالیلا سالینا طی مرحله رشد نمایی در غلظت‌های شوری، pH و دمای مختلف (خطای استاندارد± میانگین)

غلظت شوری (مولار NaCl)	میانگین نرخ رشد ویژه ± خطای استاندارد (day^{-1})					
	دما: ۲±۲۸ درجه سانتی‌گراد			دما: ۲±۱۸ درجه سانتی‌گراد		
	pH=۷/۰	pH=۷/۵	pH=۸/۰	pH=۷/۰	pH=۷/۵	pH=۸/۰
۰/۵	^{D}۰/۲۱±۰/۰۰^{a}	^{D}۰/۲۲±۰/۰۱^{a}	^{D}۰/۲۰±۰/۰۰^{ab}	^{C}۰/۱۸±۰/۰۰^{b}	^{E}۰/۱۵±۰/۰۳^{cd}	^{D}۰/۱۴±۰/۰۰^{d}
۱/۰	^{BC}۰/۳۰±۰/۰۲^{b}	^{C}۰/۳۶±۰/۰۱^{a}	^{C}۰/۲۸±۰/۰۱^{b}	^{B}۰/۲۵±۰/۰۰^{c}	^{C}۰/۲۴±۰/۰۱^{c}	^{C}۰/۲۱±۰/۰۲^{d}
۱/۵	^{A}۰/۴۲±۰/۰۲^{bc}	^{A}۰/۵۹±۰/۰۱^{a}	^{A}۰/۴۱±۰/۰۲^{b}	^{A}۰/۴۲±۰/۰۲^{bc}	^{A}۰/۵۰±۰/۰۱^{ac}	^{A}۰/۳۸±۰/۰۳^{b}
۲/۰	^{C}۰/۲۹±۰/۰۱^{c}	^{B}۰/۴۹±۰/۰۱^{a}	^{B}۰/۳۶±۰/۰۲^{b}	^{B}۰/۲۶±۰/۰۰^{c}	^{B}۰/۳۰±۰/۰۰^{c}	^{B}۰/۲۸±۰/۰۱^{c}
۲/۵	^{D}۰/۲۰±۰/۰۰^{bd}	^{D}۰/۲۳±۰/۰۱^{a}	^{D}۰/۱۸±۰/۰۰^{bc}	^{CD}۰/۱۶±۰/۰۱^{c}	^{D}۰/۲۰±۰/۰۰^{d}	^{CD}۰/۱۸±۰/۰۱^{c}
۳/۰	^{D}۰/۱۹±۰/۰۰^{a}	^{E}۰/۱۸±۰/۰۰^{ab}	^{D}۰/۱۷±۰/۰۰^{bd}	^{D}۰/۱۴±۰/۰۰^{c}	^{E}۰/۱۵±۰/۰۱^{cd}	^{D}۰/۱۴±۰/۰۱^{c}
۴/۰	^{E}۰/۰۶±۰/۰۰^{ac}	^{F}۰/۰۷±۰/۰۰^{c}	^{E}۰/۰۶±۰/۰۰^{ac}	^{E}۰/۰۴±۰/۰۰^{b}	^{F}۰/۰۵±۰/۰۰^{a}	^{E}۰/۰۵±۰/۰۰^{ab}



شکل ۴- نمودار میانگین نرخ رشد ویژه (μ) جلبک دونالیلا سالینا طی مرحله رشد نمایی در دمای ۲±۲۸ درجه سانتی‌گراد و غلظت‌های شوری، pH مختلف



شکل ۵- نمودار میانگین نرخ رشد ویژه (μ) جلبک دونالیلا سالینا طی مرحله رشد نمایی در دمای ۲±۱۸ درجه سانتی‌گراد و غلظت‌های شوری، pH مختلف

زمان دو برابر شدن سلول‌های جلبک دونالیلا سالینا در جدول (۴) ارایه شده است. این شاخص رشد سلول، به صورت سطری و ستونی از نظر آماری بررسی شده است به طوری‌که حروف بزرگ مشابه نشان‌دهنده اختلاف غیرمعنی‌دار در ستون و حروف کوچک مشابه نشان‌دهنده اختلاف غیر معنی‌دار بین تیمارها در سطر (در سطح معنی‌داری ۰/۰۵) می‌باشد. با توجه به نتایج به دست آمده و با در نظر گرفتن دما و pH ثابت، بیشترین و کمترین زمان دو برابر شدن سلول‌ها به ترتیب در سطح غلظت شوری ۴/۰ مولار (در محدوده ۱۳ تا ۱۸ روز) و ۱/۵ مولار (در محدوده ۱ تا ۲ روز) بوده است. در اکثر نمونه‌ها، زمان دو برابر شدن در بازه ۱/۲ تا ۳/۵ روز قرار گرفته است.

جدول ۴- مقایسه زمان دو برابر شدن سلول‌های دونالیلا سالینا در غلظت‌های شوری، دما و pH مختلف در دوره رشد ۳۰ روزه (خطای استاندارد± میانگین)

غلظت شوری (مولار NaCl)	میانگین زمان دو برابر شدن سلول‌ها ± خطای استاندارد (day)					
	دما: ۲±۲۸ درجه سانتی‌گراد			دما: ۲±۱۸ درجه سانتی‌گراد		
	pH=۷/۰	pH=۷/۵	pH=۸/۰	pH=۷/۰	pH=۷/۵	pH=۸/۰
۰/۵	^{BD}۳/۳۳±۰/۰۹^{d}	^{B}۳/۲۳±۰/۱۱^{d}	^{BD}۳/۵۰±۰/۰۴^{cd}	^{BC}۳/۸۳±۰/۰۸^{c}	^{BF}۴/۵۵±۰/۱۰^{b}	^{B}۵/۱۵±۰/۰۹^{a}
۱/۰	^{BC}۲/۳۵±۰/۰۶^{c}	^{C}۱/۹۳±۰/۰۳^{d}	^{BC}۲/۴۸±۰/۰۵^{c}	^{BC}۲/۸۵±۰/۰۳^{b}	^{CE}۲/۹۸±۰/۱۱^{b}	^{BC}۳/۳۰±۰/۰۲^{a}
۱/۵	^{C}۱/۶۵±۰/۰۶^{ac}	^{C}۱/۱۸±۰/۰۳^{b}	^{C}۱/۷۰±۰/۰۸^{ac}	^{B}۱/۶۸±۰/۱۱^{ac}	^{D}۱/۳۸±۰/۰۲^{ab}	^{C}۱/۸۸±۰/۱۴^{c}
۲/۰	^{BC}۲/۴۰±۰/۰۸^{a}	^{C}۱/۴۵±۰/۰۵^{d}	^{C}۱/۹۳±۰/۰۵^{c}	^{BC}۲/۶۸±۰/۰۷^{b}	^{CD}۲/۳۳±۰/۰۴^{a}	^{C}۲/۵۳±۰/۰۵^{ab}
۲/۵	^{D}۳/۵۸±۰/۱۳^{d}	^{B}۳/۰۵±۰/۰۶^{c}	^{BD}۳/۹۰±۰/۰۷^{b}	^{C}۴/۲۵±۰/۰۵^{a}	^{BE}۳/۵۳±۰/۰۳^{d}	^{BC}۴/۰۰±۰/۰۶^{ab}
۳/۰	^{D}۳/۶۰±۰/۱۱^{c}	^{B}۳/۹۳±۰/۱۰^{c}	^{D}۴/۲۳±۰/۰۸^{bc}	^{C}۵/۰۵±۰/۱۷^{a}	^{F}۴/۷۵±۰/۱۲^{ab}	^{B}۵/۱۸±۰/۳۱^{a}
۴/۰	^{A}۱۱/۲۰±۰/۶۲^{b}	^{A}۱۰/۴۵±۰/۵۰^{b}	^{A}۱۲/۸۰±۰/۸۲^{b}	^{A}۱۸/۷۵±۰/۸۷^{a}	^{A}۱۳/۵۳±۰/۶۱^{b}	^{A}۱۴/۱۸±۰/۹۳^{b}

۴. بحث و نتیجه‌گیری

در غلظت‌های شوری ۱/۰، ۱/۵ و ۲/۰ مولار در حدود دو روز اول شدت رشد ثابت (مرحله القاء) و از روز دوم تا روز دهم در مرحله نمایی رشد و پس از آن رشد ثابت و غلظت تراکم سلولی به حداکثر مقدار خود رسیده است (مرحله سکون). غلظت‌های شوری ۰/۵ و ۲/۵ مولار NaCl با توجه به شکل‌های مذکور، روند رشد مشابه و یکسانی داشته‌اند در حالی که در غلظت‌های شوری بالا (۳/۰ و ۴/۰ مولار) تغییرات چندانی در رشد و تکثیر جلبک‌ها مشاهده نشد. در غلظت‌های شوری مذکور، از روز اول کشت تا روزهای هشتم و نهم کشت، جلبک‌ها در مرحله القاء بوده و هیچ گونه رشد و تکثیری نداشته و سپس با رشد اندکی بعد از یک الی دو روز به مرحله نهایی رشد رسیده و نمودار رشد به حالت سکون درآمده است. در دمای ۲±۱۸ درجه سانتی‌گراد و با در نظر گرفتن شرایط ثابت (مانند دمای ۲۸ درجه)، روند رشد مشابه دمای ۲±۲۸ درجه سانتی‌گراد بوده است ولی غلظت تراکم سلولی از نقاط حداکثر فاصله چشمگیری پیدا کرده است. همچنین، رشد جلبک در غلظت‌های ۰/۵ و ۲/۵ مولار در مرحله سکون که بیانگر حداکثر غلظت تراکم سلولی می‌باشد از هم فاصله گرفته و در غلظت شوری ۲/۵ مولار بالاتر از ۰/۵ مولار قرار گرفته است. با توجه به شکل (۱)، در تمام غلظت‌های شوری رسیدن به حالت سکون، در دمای ۲±۲۸ درجه زودتر از دمای ۲±۱۸ سانتی‌گراد اتفاق افتاده است که این موضوع سبب شیب تندتر مرحله نمایی رشد، در دمای ۲±۲۸ درجه نسبت به دمای ۲±۱۸ درجه سانتی‌گراد می‌گردد.

مقایسه تراکم غلظت سلولی در دمای ۲±۱۸ و ۲±۲۸ درجه سانتی‌گراد نشان داد، در هر غلظت شوری و pH مشابه، به طور متوسط بیشترین تراکم سلولی در دمای

۲±۲۸ درجه سانتی‌گراد و کمترین مقدار آن در دمای ۲±۱۸ درجه سانتی‌گراد در غلظت شوری ۴/۰ مولار برابر با ۰/۵۳×۱۰^{۶} سلول در هر میلی‌لیتر حاصل شده است. بنابراین در تمام نمونه‌ها، افزایش دما سبب افزایش تراکم سلولی و کوتاه شدن مرحله نمایی رشد شده است (Bonnefond *et al.*, 2016)، به طوری‌که در دمای ۲±۲۸ درجه سانتی‌گراد نمونه‌ها بعد از حدود ۱۲ الی ۱۵ روز به حداکثر تراکم سلولی رسیده‌اند ولی در دمای ۲±۱۸ درجه سانتی‌گراد این مرحله به حدود ۲۰ الی ۲۲ روز رسیده است. با توجه به افزایش pH از ۷ به ۷/۵ و ۸ در هر دو دمای مورد مطالعه و در تمام غلظت‌های شوری مورد مطالعه، بیشترین مقدار تراکم سلولی در pH=۷/۵ حاصل شده است. با افزایش و کاهش pH از ۷/۵، تراکم سلولی کاهش پیدا کرد. به طوری‌که کاهش تراکم سلولی با افزایش pH نسبت به کاهش آن، شدیدتر بوده است. بنابراین حداکثر و حداقل غلظت تراکم سلولی به ترتیب در pH=۷/۵ و در pH=۸/۰ اتفاق افتاده است. حداکثر تراکم سلولی در pH=۷/۵ با دمای ۲±۲۸ درجه سانتی‌گراد برای غلظت شوری ۱/۵مولار NaCl برابر با ۵/۷۴×۱۰^{۶} سلول در هر میلی‌لیتر به دست آمد. همچنین در شرایط مذکور (pH=۷/۵ و T=28±2°c) بعد از غلظت شوری ۱/۵ مولار بیشترین غلظت تراکم سلولی مربوط به غلظت‌های شوری ۲/۰ و ۱/۰ به ترتیب برابر با ۴/۹۵×۱۰^{۶} و ۴/۵۹×۱۰^{۶} سلول در هر میلی‌لیتر بوده است. با مقایسه بین غلظت‌های شوری مشخص شد با افزایش غلظت شوری از ۰/۵ تا ۲/۰ مولار تراکم سلولی افزایش می‌یابد. از طرفی دیگر، افزایش غلظت شوری از ۲/۰ تا ۴/۰ به دلیل اعمال تنش شوری بالا، سبب کاهش تراکم سلولی شده است(Farhat *et al.*, 2011). مقایسه غلظت تراکم سلولی در غلظت‌های شوری ۰/۵ و ۲/۵ مولار اختلاف بسیار اندکی را نشان داد. کمترین غلظت تراکم سلولی در شرایط مذکور برای غلظت شوری ۴/۰ مولار برابر با ۰/۶۷×۱۰^{۶} سلول در هر میلی‌لیتر به دست آمد. Valencia و همکاران (۲۰۱۸) از بین سطح‌های شوری ۰/۱، ۰/۵ و ۳/۰ مولار، کمترین غلظت تراکم سلولی را در غلظت شوری ۳/۰ مولار گزارش کردند که با نتایج تحقیق هم‌خوانی دارد(*Valencia et al., 2018*). در همین راستا در تحقیق انجام شده توسط Sathasivan and Juntawong بیشترین تراکم جلبک دونالیلا سالینا را ۵/۰۸×۱۰^{۶} سلول در هر میلی‌لیتر گزارش کردند (Sathasivam andJuntawong, 2013). Shamra و همکاران (2012) ماکزیمم تعداد سلول‌های به دست آمده از یک سویه استخراج شده از هند، طی ۸ روز از آغاز کشت در مولاریته ۱/۷ مولار با نرخ رشد برابر ۰/۵ در روز گزارش کردند (Sharma *et al.*, 2012) همچنین در تحقیقات مشابه، بیشترین غلظت سلولی را در محدوده ۱/۵ تا ۲/۰ مولار گزارش شده است (Bhumibhamon *et al.*, 2003; Celekli andDönmez, 2006; Aksoy and Koru, 2012; Ahmed *et al.*, 2017). با توجه به نتایج تحقیقات فوق، در تحقیق حاضر بیشترین تراکم سلولی در غلظت شوری ۱/۵ مولار برابر با ۵/۷۴×۱۰^{۶} سلول در هر میلی‌لیتر به دست آمد (Farhat *et al.*, 2011). بعد از غلظت شوری ۱/۵ مولار، غلظت‌های ۱ و ۲ مولار بالاترین تراکم سلولی (در محدوده ۳/۰۷ تا ۴/۵۹) را در غلظت‌های شوری مورد مطالعه به دست دادند. Rad و همکاران (۲۰۱۱) بیشترین غلظت سلولی را در شوری ۱/۰ و ۲/۰ مولار NaCl (۲/۳۰×۱۰^{۶} سلول در هر میلی‌لیتر) به دست آوردند (Rad *et al.*, 2011). همچنین در تحقیقی دیگر، محققان حداکثر عملکرد و غلظت سلولی جلبک دونالیلا سالینا در محیط کشت‌های مختلف در شوری ۰/۵ مولار NaCl را در حدود ۲/۳۰×۱۰^{۶} سلول در هر میلی‌لیتر گزارش کردند (Colusse *et al.*, 2020). مقایسه غلظت تراکم سلولی تحقیق حاضر با مطالعات قبلی انجام شده بیانگر افزایش تراکم سلولی در این تحقیق بوده است که دلیل آن می‌تواند سویه انتخاب شده و انتخاب شرایط بهینه رشد باشد. همچنین بهینه کردن شرایط محیطی از جمله دما، pH، دوره رشد و انتخاب غلظت شوری مناسب در این افزایش تراکم سلولی بسیار تأثیر گذار بوده است.

با در نظر گرفتن تمام شرایط محیطی اعمال شده

جهت بهینه کردن شرایط رشد، بیشترین نرخ رشد ویژه برای غلظت شوری ۱/۵ مولار، دمای ۲±۲۸ درجه سانتی‌گراد برابر با ۰/۵۹ روز و pH=۷/۵ و کمترین نرخ رشد برای غلظت شوری ۴/۰ مولار، دمای ۲±۱۸ درجه سانتی‌گراد و pH=۷/۰ برابر با ۰/۰۴ روز به دست آمد. در همین راستا Jimenez and Niell (1991) بیشترین نرخ رشد جلبک دونالیلا سالینا را در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد تحت شدت نور ۱۷۵ میکرومول بر مترمربع در ثانیه و در شوری ۹ ٪ NaCl (در حدود ۱/۵ مولار) گزارش کردند (Jiménez andNiell, 1991) که با نتایج به دست آمده در این تحقیق همخوانی دارد. نتایج تحقیق Oren (2005) نشان داد این جلبک در شرایط مناسب رشد، نرخ رشد ویژه بیش از ۰/۴۷ در روز دارد (Oren, 2005) همچنین براساس نتایج به دست آمده از تحقیق (Hosseini Tafreshi andShariati, 2009) حداکثر نرخ رشد ویژه بر روی سویه ایرانی از ۰/۲ تا ۰/۵ در روز متغییر بوده است که با حداکثر نرخ رشد ویژه در این تحقیق هم‌خوانی دارد. همچنین در غلظت شوری ۰/۵ مولار، بیشترین و کمترین نرخ رشد به ترتیب مربوط به دمای ۲±۲۸ درجه سانتی‌گراد و pH=۷/۵ و دمای ۲±۱۸ درجه سانتی‌گراد و pH=۸/۰ بوده است. هر چند در دمای ۲±۲۸ درجه سانتی‌گراد اختلاف بین pH ها معنی‌دار نبوده است و تفاوت اندکی با هم داشته‌اند، از طرفی در دمای ۲±۱۸ درجه سانتی‌گراد همانند دمای ۲±۲۸ درجه اختلاف بین نرخ رشد ویژه اندک بوده و تفاوت معنی‌داری در بین نمونه‌ها مشاهده نگردید. در غلظت شوری ۱/۰ مولار بیشترین و کمترین نرخ رشد ویژه به ترتیب برای دمای ۲±۲۸ درجه سانتی‌گراد و pH=۷/۵ و دمای ۲±۱۸ درجه سانتی‌گراد و pH=۸/۰ برابر با ۰/۳۶ و ۰/۲۱ در روز بوده است که در مقایسه با بقیه نمونه‌ها، تنها در این دو نمونه اختلافات نرخ رشد ویژه معنی‌دار بوده است. در غلظت شوری ۱/۵ مولار که دارای بیشترین نرخ رشد ویژه نسبت به بقیه غلظت‌های شوری بوده در سطح pH ثابت اختلافات غیرمعنی‌دار و در سطح pH متفاوت (۷/۵ در مقایسه با ۷ و ۸) اختلاف معنی‌داری نشان داد. غلظت‌های ۲/۰ و ۲/۵ مولار حالتی مشابه ۱/۵ مولار داشته‌اند. در سطح غلظت ۳/۰ و ۴/۰ مولار با توجه به اختلافات اندک نرخ رشد ویژه نمونه‌ها، اختلافات بیشتر غیر معنی‌دار بوده است. مقایسه نرخ رشد ویژه بین سطح غلظت‌های شوری (مقایسه نمونه‌ها به لحاظ ستونی) در هر دو شرایط دمایی و هر سه حالت pH، در غلظت ۱/۵ مولار با تمام سطح‌های غلظت شوری مورد مطالعه دارای اختلاف معنی‌داری بوده است (مقایسه حروف بزرگ در هر ستون). در اکثر شرایط pH و دمایی، نرخ رشد در غلظت ۰/۵، ۲/۵ و ۳/۰ مولار به دلیل نزدیک بودن اعداد به هم اختلاف معنی‌داری با هم نداشته‌اند. غلظت شوری ۴/۰ مولار به دلیل داشتن کمترین مقدار نرخ رشد ویژه در تمام شرایط مورد مطالعه با تمام غلظت‌های شوری، اختلاف معنی‌داری داشته است. با مقایسه بین شکل‌های (۴) و (۵) و جدول (۳) مشاهده گردید غلظت ۱/۰ و ۲/۰ مولار دارای روند رشد مشابهی بوده و به لحاظ نرخ رشد ویژه بعد از غلظت ۱/۵ مولار دارای بیشترین مقدار می‌باشند و در مقایسه با بقیه غلظت‌های شوری اعداد نزدیک به غلظت ۱/۵ مولار را دارا می‌باشند. مقایسه آماری حداکثر نرخ رشد ویژه بین این دو غلظت بیانگر این است که از ۶ حالت مورد مقایسه، نمونه‌ها در دو حالت دارای اختلاف غیر معنی‌دار و در ۴ حالت دارای اختلاف معنی‌دار با هم بوده‌اند. با توجه به شکل‌های (۴) و (۵) بیشترین میانگین نرخ رشد ویژه برای غلظت شوری ۱/۵ مولار با ۰/۳۸ در روز بوده است.کمترین میانگین نرخ رشد ویژه برای غلظت شوری ۴/۰ مولار برابر با ۰/۰۲ در روز به دست آمده است. Gercia و همکاران (2007) گزارش کردند که با افزایش غلظت شوری از ۱۰ تا ۳۵ درصد، نرخ رشد ویژه کاهش پیدا کرده و بیشترین نرخ رشد ویژه را در غلظت شوری ۱/۵ مولار به دست آوردند که با نتایج بدست آمده همخوانی دارد (García *et al.*, 2007). با افزایش غلظت شوری، میزان تولید ترکیباتی مانند گلیسرول در دونالیلا سالینا افزایش یافته و این افزایش نیازمند کاهش رشد و صرف انرژی سلول در مسیر تولید گلیسرول به جای تقسیمات سلولی است (Jones andGalloway, 1979; Arun andSingh, 2013).

مقایسه زمان دو برابر شدن بین غلظت‌های شوری مختلف (به صورت ستونی) از لحاظ آماری بیانگر اختلاف معنی‌دار غلظت ۴/۰ مولار با تمام غلظت‌های شوری مورد مطالعه می‌با شد به طوری که اختلاف در حدود ۷ الی ۱۴ روز می‌باشد. در بقیه سطح‌های غلظت شوری، اختلاف در حدود ۳ الی ۴ روز بوده که نتایج آماری نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار بین نمونه‌ها می‌باشد. در سطح غلظت ۱/۰ و ۲/۰ مولار زمان دو برابر شدن بیشتر در محدوده ۲/۵ تا ۳/۰ روز قرار گرفته است. تأثیر دما بر روی زمان دو برابر شدن سلول‌ها نشان داد با افزایش دما این عدد کاهش می‌یابد. این کاهش در pHهای مشابه مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد اختلاف بین اعداد در pH مشابه و دمای مختلف، در اکثر نمونه‌ها معنی‌دار بوده است (به عنوان مثال مقایسه زمان دو برابر شدن در pH=۷/۵ در دمای ۲±۱۸ و ۲±۲۸ درجه سانتی‌گراد در غلظت شوری ۰/۵ مولار NaCl). در pH=۷/۵ به جز در غلظت‌های ۱/۵ و ۴/۰ مولار، در بقیه غلظت‌ها اختلاف میان زمان دو برابر شدن سلول‌ها معنی‌دار بوده است. در pH=۷/۰ اختلاف زمان دو برابر شدن بین تمام غلظت‌ها به جز غلظت ۱/۵ مولار معنی‌دار شد. هم‌چنین در pH=۸/۰ در غلظت‌های ۱/۵ و ۲/۵ و ۴/۰ مولار، اختلاف زمان دو برابر شدن معنی‌دار نبوده است. مقایسه زمان دو برابر شدن بین نمونه‌ها بیانگر اختلاف معنی‌دار در دمای ۲±۲۸ درجه سانتی‌گراد و pH=۷/۵ با دو سطح pH=۷/۰ و pH=۸/۰ بوده است. بررسی تغییرات سطح pH بر روی زمان دو برابر شدن سلول‌ها نشان داد افزایش pH از ۷/۵ به ۸ و کاهش آن از ۷/۵ به ۷ سبب افزایش در زمان دو برابر شدن سلول‌ها می‌شود. این افزایش، در سطح دمای ۲±۲۸ درجه سانتی‌گراد و در غلظت‌های شوری ۰/۵، ۳/۰ و ۴/۰ مولار معنی‌دار نبوده است ولی در بقیه غلظت‌های شوری این افزایش سطح معنی‌داری را نشان داده است. افزایش زمان دو برابر شدن سلول‌ها از pH=۷/۰ به pH=۸/۰ در دمای ۲±۲۸ درجه سانتی‌گراد، در تمام غلظت‌های شوری مورد مطالعه (به جز غلظت شوری ۲/۰ و ۲/۵ مولار) غیر معنی‌دار بوده است. در دمای ۲±۱۸ درجه سانتی‌گراد با افزایش pH روند منظمی در افزایش یا کاهش زمان دو برابر شدن سلول‌ها مشاهده نگردید. به طوری که در غلظت شوری ۰/۵ و ۱/۰ مولار با افزایش pH، زمان دو برابر شدن به صورت معنی‌دار افزایش یافته است. این روند در غلظت‌های شوری بیشتر از ۲/۰ مولار حالت عکس به خود گرفته است. بنابراین در حالت کلی، در شرایط دمایی ۲±۱۸ درجه سانتی‌گراد، افزایش pH از ۷/۵ به ۸/۰ در غلظت‌های شوری ۰/۵، ۱/۰، ۱/۵ و ۲/۵ مولار و کاهش pH از ۷/۵ به ۷/۰ ، در غلظت‌های ۰/۵، ۲/۰، ۲/۵ و ۴/۰ مولار سبب افزایش معنی‌داری در زمان دو برابر شدن سلول‌ها شده است.

نتیجه‌گیری کلی

نتایج تحقیق نشان داد با افزایش دما، نرخ رشد ویژه افزایش پیدا می‌کند. همچنین بررسی روند نرخ رشد ویژه در pHهای مختلف نشان داد با افزایش و کاهش pH از ۷/۵، مقدار نرخ رشد ویژه کاهش پیدا می‌کند. حداکثر تراکم سلولی در سطح غلظت‌های شوری مختلف، در اکثر نمونه‌ها اختلاف معنی‌داری را نشان داد، به طوری که بیشترین و کم‌ترین غلظت تراکم سلولی به ترتیب برای غلظت‌های شوری ۱/۵ و ۰/۵ مولار NaCl به دست آمد. از طرف دیگر، افزایش دما سبب افزایش غلظت تراکم سلولی در اکثر نمونه‌ها گردید. بنابراین بهینه‌ترین شرایط کشت جهت تکثیر حداکثری جلبک دونالیلا سالینا در غلظت شوری ۱/۵ مولار و بعد از آن در غلظت‌های شوری ۱/۰ و ۲/۰ مولار با دمای حدود ۲±۲۸ درجه سانتی‌گراد در pH=۷/۵ با دوره ۲۴:۰۰ (تاریکی: روشنایی) ساعت پیشنهاد می‌گردد.

References

۵. منابع

Ahmed, R.A., He, M., Aftab, R.A., Zheng, S., Nagi, M., Bakri, R., Wang, C., 2017. Bioenergy application of Dunaliella salina SA 134 grown at various salinity levels for lipid production. *Scientific Reports* 7, 1-10.

Aksoy, F., Koru, E., Year. Physiological characterization of Dunaliellasp.(Chlorophyta, Volvacales) From Camalti salt work (izmir-turkey). In: (Eds.), Proceeding of International Symposium on Sustainable Development.

Amrei, H.D., Ranjbar, R., Rastegar, S., Nasernejad, B., Nejadebrahim, A., 2015. Using fluorescent material for enhancing microalgae growth rate in photobioreactors. *Applied phycology* 27, 67-74.

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

Balat, H., 2010. Prospects of biofuels for a sustainable energy future: a critical assessment. *Energy Education Science and Technology Part a-Energy Science and Research* 24, 85-111.

Bhumibhamon, O., Sittiphuprasert, U., Boontaveeyuwat, N., Praiboon, J., 2003. The optimum use of salinity, nitrate and pond depth for β-carotene production of Dunaliella salina. *Agriculture and Natural Resources* 37, 84-89.

Bonnefond, H., Moelants, N., Talec, A., Bernard, O., Sciandra, A., 2016. Concomitant effects of light and temperature diel variations on the growth rate and lipid production of Dunaliella salina. *Algal research* 14, 72-78.

Borowitzka, L., Moulton, T., Borowitzka, M., Year. The mass culture of Dunaliella salina for fine chemicals: from laboratory to pilot plant. In: (Eds.), Proceeding of Eleventh international seaweed symposium, pp. 115-121.

Borowitzka, M.A., 2013. Dunaliella: biology, production, and markets. Handbook of Microalgal Culture: *Applied Phycology and Biotechnology*, 359-368.

Borowitzka, M.A., 2013. High-value products from microalgae—their development and commercialisation. *Applied phycology* 25, 743-756.

Borowitzka, M.A., Borowitzka, L.J., 1988. Micro-algal biotechnology. Cambridge University Press.

Borowitzka, M.A., Siva, C.J., 2007. The taxonomy of the genus Dunaliella (Chlorophyta, Dunaliellales) with emphasis on the marine and halophilic species. *Applied Phycology* 19, 567-590.

Cadoret, J.-P., Garnier, M., Saint-Jean, B., 2012. Microalgae, functional genomics and biotechnology. *Advances in botanical research* 64, 285-341.

Cai, M., He, L.-H., Yu, T.-Y., 2013. Molecular clone and expression of a NAD+-dependent glycerol-3-phosphate dehydrogenase isozyme gene from the halotolerant alga Dunaliella salina. PloS one 8, e62287.

Celekli, A., 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, 183-189.

Chen, H., Jiang, J.-G., Wu, G.-H., 2009. Effects of salinity changes on the growth of Dunaliella salina and its isozyme activities of glycerol-3-phosphate dehydrogenase. *Agricultural and food chemistry* 57, 6178-6182.

Chisti, Y., 2008. Biodiesel from microalgae beats bioethanol. *Trends in biotechnology* 26, 126-131.

Colusse, G.A., Mendes, C.R.B., Duarte, M.E.R., de Carvalho, J.C., Noseda, M.D., 2020. Effects of different culture media on physiological features and laboratory scale production cost of Dunaliella salina. Biotechnology Reports 27, e00508.

Demirbas, M.F., 2011. Biofuels from algae for sustainable development. *Applied energy* 88, 3473-3480.

Dunstan, G., Volkman, J., Barrett, S., Garland, C., 1993. Changes in the lipid composition and maximisation of the polyunsaturated fatty acid content of three microalgae grown in mass culture. *Applied Phycology* 5, 71-83.

Farhat, N., Rabhi, M., Falleh, H., Jouini, J., Abdelly, C., Smaoui, A., 2011. Optimization of salt concentrations for a higher carotenoid production in dunaliella salina (chlorophyceae) 1. *Journal of phycology* 47, 1072-1077.

Fazeli, M., Tofighi, H., Samadi, N., Jamalifar, H., 2006. Effects of salinity on β-carotene production by Dunaliella tertiolecta DCCBC26 isolated from the Urmia salt lake, north of Iran. *Bioresource Technology* 97, 2453-2456.

Fu, W., Guðmundsson, Ó., Paglia, G., Herjólfsson, G., Andrésson, Ó.S., Palsson, B.Ø., Brynjólfsson, S., 2013. Enhancement of carotenoid biosynthesis in the green microalga Dunaliella salina with light-emitting diodes and adaptive laboratory evolution. *Applied microbiology and biotechnology* 97, 2395-2403.

García, F., Freile-Pelegrín, Y., Robledo, D., 2007. Physiological characterization of Dunaliella sp.(Chlorophyta, Volvocales) from Yucatan, Mexico. *Bioresource technology* 98, 1359-1365.

Ghasemi, Y., Rasoul-Amini, S., Morowvat, M., 2011. Algae for the production of SCP. Bioprocess Sciences and Technology: Nova Science Publishers, Inc, 163-84.

Ghezelbash, F., Farboodnia, T., Heidari, R., Agh, N., 2008. Biochemical effects of different salinities and luminance on green microalgae Tetraselmis chuii. *Research Journal of Biological Sciences* 3, 217-221.

Gómez, P.I., González, M.A., 2005. The effect of temperature and irradiance on the growth and carotenogenic capacity of seven strains of Dunaliella salina (Chlorophyta) cultivated under laboratory conditions. *Biological research* 38, 151-162.

Guevara, M., Pinto, R., Villarroel, J., Hernández, E., Díaz, R., Gotera, B., Cortez, R., 2016. Influencia de la salinidad y la irradiancia sobre el crecimiento y composición bioquímica de una nueva cepa de Dunaliella salina, proveniente de las salinas de Araya, Venezuela. Saber 28(3), 494-501.

Guillard, R., 1973. Handbook of phycological methods. JR Stein Cambridge University press, London. Division rates, 289-311.

Hamed, I., Ak, B., Isık, O., Uslu, L., 2017. The effects of salinity and temperature on the growth of Dunaliella sp. isolated from the Salt Lake (Tuz Gölü), Turkey. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 17, 1367-1372.

Han, S.-I., Kim, S., Lee, C., Choi, Y.-E., 2019. Blue-Red LED wavelength shifting strategy for enhancing beta-carotene production from halotolerant microalga, Dunaliella salina. *Microbiology* 57, 101-106.

Hosseini Tafreshi, A., Shariati, M., 2009. Dunaliella biotechnology: methods and applications. *Applied microbiology* 107, 14-35.

Jiménez, C., Niell, F.X., 1991. Growth of Dunaliella viridis Teodoresco: effect of salinity, temperature and nitrogen concentration. *Applied phycology* 3, 319-327.

Jones, T.W., Galloway, R.A., 1979. Effect of light quality and intensity on glycerol content in DUNALIELLA TERTIOLECTA (chlorophyceae) and the relationship to cell growth/osmoregulation1. *Phycology* 15, 101-106.

Kadkhodaei, S., Ariff, A.B., Memari, H.R., Ramakrishnan, N.R., Ebrahimi, M., Year. Construction of an expression vector for production of tissue plasminogen activator (t-PA) in a transgenic microalgae bioreactor. In: (Eds.), Proceeding of International Conference on Biomedical Engineering and Technology (ICBET), pp. 193-196.

Khadim, S.R., Singh, P., Singh, A.K., Tiwari, A., Mohanta, A., Asthana, R.K., 2018. Mass cultivation of Dunaliella salina in a flat plate photobioreactor and its effective harvesting. *Bioresource technology* 270, 20-29.

Oren, A., 2005. A hundred years of Dunaliella research: 1905–2005. *Saline systems* 1, 1-14.

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

Saha, S.K., Kazipet, N., Murray, P., 2018. The carotenogenic Dunaliella salina CCAP 19/20 produces enhanced levels of carotenoid under specific nutrients limitation. BioMed research international 2018.

Sathasivam, R., Juntawong, N., 2013. Modified medium for enhanced growth of Dunaliella strains. *International Journal of Current Research* 5, 67-73.

Sharma, P., Agarwal, V., Mohan, M.K., Kachhwaha, S., Kothari, S., 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, 207-213.

Srinivasan, R., Mageswari, A., Subramanian, P., Suganthi, C., Chaitanyakumar, A., Aswini, V., Gothandam, K.M., 2018. Bicarbonate supplementation enhances growth and biochemical composition of Dunaliella salina V-101 by reducing oxidative stress induced during macronutrient deficit conditions. *Scientific reports* 8, 1-14.

Valencia, R., Giffard-Mena, I., Cruz-López, R., García-Mendoza, E., Stephano-Hornedo, J.L., 2018. Growth Profiles, Nutrient composition and Pigments Analysis of Dunaliella salina strain San Quintin. *CICIMAR Oceánides* 33, 1-11.

Vickers, N.J., 2017. Animal communication: when i'm calling you, will you answer too? *Current biology* 27(14), 713-715.

Wood, A.M., Everroad, R., Wingard, L., 2005. Measuring growth rates in microalgal cultures. *Algal culturing techniques* 18, 269-288.

Wu, Z., Duangmanee, P., Zhao, P., Juntawong, N., Ma, C., 2016. The effects of light, temperature, and nutrition on growth and pigment accumulation of three Dunaliella salina strains isolated from saline soil. *Jundishapur journal of microbiology* 9.