شیلات، مجله منابع طبیعی ایران

دوره ۷۰، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۶

صفحات ۲۶۱-۲۴۳

بهبود ارزش تغذیه‌ای دوگونه میکروجلبک سبز *Dunaliella* به‌وسیله تغییر در فاکتورهای محیط کشت

فروغ اکبری[۱]، مریم مددکار حق‌جو[۲]*

۱. دانش آموخته کارشناسی ارشد گروه زیست‌شناسی (فیزیولوژی)، دانشکده علوم پایه، دانشگاه لرستان، خرم آباد، ایران.

۲. استادیار، گروه زیست‌شناسی (فیزیولوژی)، دانشکده علوم پایه، دانشگاه لرستان، خرم آباد، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۵/۲۹ تاریخ تصویب: ۱۳۹۶/۱۰/۱۴

چکیده

جلبک‌های تک‌سلولی به‌عنوان فیتوپلانکتون منابع مهم و کارآمدی در تغذیه لاروها و آبزیانی نظیر ماهی و میگو می‌باشند. در این تحقیق ارزیابی شاخص‌های سرعت تکثیر، مقدار رنگدانه‌ها، میزان قند و پروتئین دو گونه جلبک *Dunaliella salina* و *D. bardawil* در درون سه محیط کشت Ramaraj(R), Johnson(J), Shaish(S) انجام شد و نتایج مورد مطالعه قرار گرفتند. در هر سه محیط، سرعت رشد سلول‌ها در ۱ مولار نمک NaCl، بیش از ۲ و سرعت تکثیر در گونه *D. salina* نیز تقریباً در حدود دو برابر گونه *D. bardawil* بود. تاثیر تیمار محیط‌کشت در تحریک تقسیمات سلولی، غالباً با برتری محیط J، سپس S و نهایتاً R مشاهده گردید. در مولاریته ۱، بیشترین سرعت رشد ویژه جلبک، در محیط‌کشت‌های J و S و در مولاریته ۲ در محیط J همگی تا روز ۸، مشاهده گردید. حجم سلولی در گونه *D. bardawil* دو برابر گونه *D. salina* و بیشترین افزایش حجم سلولی در ۲مولار، برای هر دو گونه، در محیط کشت S مشاهده شد. تغییرات مقدار وزن تر و خشک، با الگوی تقریباً افزایشی در طول زمان، بویژه در دو محیط‌کشت S و J و با برتری تاثیر مثبت محیط کشت S دنبال شد. بیشترین میزان کاروتنوئیدکل بر میلی‌لیتر و بر وزن خشک در ۱مولار *D. bardawil*، به‌ترتیب در محیط‌های S و R مشاهده گردید. تغییرات بتاکاروتن بر اثر مولاریته و نوع محیط‌کشت، الگویی تقریباً مشابه کاروتنوئیدکل داشت. بیشترین مقدار کلروفیل بر میلی‌لیتر در محیط‌های S و J و بیشترین مقدار این شاخص بر وزن خشک، در محیط R مشاهده گردید. بیشترین تاثیر در افزایش مقدار پروتئین سلول‌ها مربوط به محیط J بود که با تاثیر القایی بالاتر محیط R در تولید قند کل، تفاوت داشت. به‌طور کلی یافته‌ها، تاثیر معنی‌دار نوع محیط کشت و میزان غلظت نمک، بر افزایش مواد مغذی جلبک تک‌سلولی آب شور را علاوه بر نوع گونه، پیشنهاد می‌کنند.

واژگان کلیدی: پرورش فیتوپلانکتون، پروتئین، جلبک *Dunaliella* ، قند کل، کاروتنوئید، محیط کشت.

* نویسنده مسئول: تلفن: ۰۹۸۹۱۲۵۲۶۶۵۶۳+ ایمیل: madadkar.m@lu.ac.ir

۱. مقدمه

افزایش جمعیت جهان و نیاز به بهبود شرایط تغذیه‌ای بشر، دو دلیل عمده برای تلاش در جهت ارتقای کیفیت غذای آبزیان بوده و افزایش مصرف سرانه آبزیان به معنی بالا بردن ضریب امنیت بهداشت غذایی کشور است. در این زمینه تلاش‌ها بر آن است که خوراک تولید شده برای آبزیان ضمن تأمین نیازهای اساسی آن‌ها، سبب رشد بهتر و بیشتر شده و در عین حال اقتصادی و مقرون به صرفه نیز باشد. در این زمینه، کشت فیتوپلانکتون‌ها یکی از جنبه‌های مهم تجاری در بیوتکنولوژی مدرن بوده و همچنین دارای پتانسیل کاربردی فوق العاده‌ای هم از نظر تولیدات دارویی و هم در غنی‌سازی غذای آبزیان و دام-ها به عنوان افزودنی تکمیلی می‌باشد (Abu-Rezq *et al*., 2010; Phang, 1992; Boda, 1990).

جلبک‌های تک‌سلولی (Microalgae) به‌علت داشتن قدرت فتوسنتز و توانایی تثبیت دی‌اکسیدکربن نقش مهمی در اکوسیستم‌های آبی ایفا نموده (Volkman *et al*., 1989) و به‌همین دلیل اساس اکوسیستم‌های آبی می‌باشند. این میکروارگانیسم‌ها تقریباً در تمام زیستگاه‌ها، از مناطق قطبی گرفته تا مناطق بیابانی، چشمه‌های آب گرم و دریاها ساکن بوده و به‌عنوان تولیدکنندگان اصلی زنجیره غذایی و نیز تثبیت‌کنندگان ازت، در ایجاد زیستگاه‌های مناسب برای آبزیان دارای نقش حیاتی هستند (Raven and Falkowski, 1999; Volkman *et al*., 1989). امروزه میکروجلبک‌ها در صنعت آبزی‌پروری به‌عنوان غذای زنده برای رشد انواع آبزیان نظیر ماهی، میگو، زئوپلانکتون و نرم‌تنان مورد استفاده قرار گرفته و به-عنوان غذای زنده در سلامت، افزایش سرعت رشد و کاهش بیماری‌ها در آبزیان حائز اهمیت هستند. از اینرو در بیشتر مراکز تکثیر و پرورش موجودات آبزی، بخشی از مساحت مرکز تولیدی، به تولید این فیتوپلانکتون‌ها اختصاص می‌یابد (Gharibi *et al*., 2013). در بسیاری از کشورهای صنعتی تولید جلبک‌ها نه‌تنها به‌عنوان یک منبع پروتئینی بلکه به-منظور تولید مکمل‌های غذایی انجام می‌گیرد، به-طوریکه طی دهه‌های اخیر، ۷۵ درصد از بیومس میکروجلبک‌ها در دنیا، برای تولید پودر، قرص، کپسول و پاستیل مورد استفاده قرارگرفته است (Pulz and Gross, 2004). از جمله مزایای میکروجلبک‌ها، می‌توان به سرعت رشد بالا، کشت آسان، هزینه تولید پایین و امکان کشت انبوه در فوتوبیوراکتورها اشاره کرد (Janssen *et al*., 2003).

میکروجلبک *Dunaliella* یک جلبک تک‌سلولی بدون دیواره اسکلتی، از شاخه جلبک‌های سبز (Chlorophyceae) بوده (Leliaert *et al*., 2012) و نظر به توانایی فراوان در سازگاری با شوری محیط زیست، یکی از مهمترین جلبک‌هایی است که امروزه به شکل مدرن و در سطح وسیع کشت می‌شود (Becker, 2007). تحقیقات مختلف نشان داده است که گونه‌های مختلف این جلبک به‌عنوان غذای زنده می‌تواند منبع غذایی مهمی از مواد با ارزشی نظیر کاروتنوئیدها، پروتئین‌ها، آنتی‌اکسیدان‌ها، گلیسرول، قندها، لیپیدها، ویتامین‌ها و مواد معدنی در پرورش آبزیان و دام‌ها باشند (Wang *et al*., 2006; Brown *et al*., 1997). برخی دیگر از تحقیقات نیز نشان داده که سرعت رشد و میزان تجمع ترکیبات مختلف مغذی در درون این فیتوپلانکتون‌ها، می‌تواند تحت تاثیر مقدار شوری محیط زیست قرار گیرد (Hui *et al*., 2009; Gomez *et al*., 2003; Karni and Avron, 1988). علاوه بر مصرف جلبک *Dunaliella* به-صورت زنده توسط آبزیان، این جلبک همچنین می تواند به‌صورت پودر خشک شده به محیط پرورش آبزیان افزوده گردد (Takaichi, 2011; Vilchez *et al*,. 2011; Wijffels and Barbosa 2010; Tafreshi and Shariati, 2006). جلبک مزبور همچنین به‌عنوان یک سیستم مدل در تولید پروتئین-های نوترکیب، دارای کاربردهای صنعتی و غذایی می‌باشد (Borowitzka and Siva, 2007).

یکی از مهمترین مواد مغذی درون سلولی در *Dunaliella*، ماده بتاکاروتن بوده که یک ترکیب با ارزش در صنایع غذایی، دارویی و بهداشتی می‌باشد (Francavilla *et al*., 2012). تحقیقات نشان داده‌اند که برخی سویه‌های جلبک *Dunaliella* دارای توانایی تجمع مقادیر زیاد بتاکاروتن می‌باشند (Raja *et al*., 2007) و به‌عنوان منبع غذایی بر فاکتورهای رشد و کیفیت گوشت ماهی تأثیرگذار هستند، به‌طوری که آزمایشاتی که توسط Wang و همکاران (۲۰۰۶)

صورت گرفته است، نشان داده که بتاکاروتن موجود در جلبک *Dunaliella* سبب افزایش کیفیت پوست، گوشت و همچنین افزایش وزن و خاصیت آنتی-اکسیدانی در ماهی قزل‌آلا (*Oncorhynchus mykiss*) شده است. آزمایشاتی که توسط Tachibana و همکاران (۱۹۹۷) در مورد تأثیر پودر خشک شده جلبک *Dunaliella* در رشد و عملکرد آن بر سیستم ایمنی یک گونه از میگو (*Litopenaeus vannamei*) صورت گرفت، نیز نشان داد که استفاده از جلبک مزبور سبب افزایش وزن و کاهش شیوع بیماری در میگوها گردید.

استفاده از این جلبک در مناطق تکثیر آبزیان به‌عنوان غذا و یا در ترکیب با زئوپلانکتون‌هایی نظیر آرتمیا (*Artemia*) و یا روتیفر (*Brachionus plicatilis*)، علاوه بر تأثیر افزایشی در وزن و فعالیت آنتی‌اکسیدانی (نظیر فعالیت آنزیم‌های سوپراکسیداز دیسموتاز و پراکسیداز) موجودات دریایی، سبب افزایش و جلای رنگ پوست، کاهش عفونت، کاهش استرس و همچنین بالا بردن محتوای چربی در آن‌ها می‌گردد (Wang *et al*., 2006).

بنابراین کشت جلبک *Dunaliella*، به‌دلایل مختلفی نظیر کاربرد در صنایع غذایی، بهداشتی و دارویی و نیز صنعتی می‌تواند حائز اهمیت بوده و مورد توجه محققان و پرورش دهندگان آبزیان قرار گیرد. از سویی، نوع محیط کشت و پرورش جلبک، به‌دلیل دارا بودن انواع و نیز مقادیر متفاوتی از عناصر معدنی، می تواند به‌عنوان یک عامل اساسی بر مقدار رشد و شاخص‌های فیزیولوژیک میکروجلبک‌ها تاثیر بگذارد. از اینرو شناسایی یک محیط کشت مناسب برای پرورش هر گونه میکروجلبک بسیار حائز اهمیت است (Srinivasakumar and Rajashekhar, 2009).

در تحقیق حاضر، نوع محیط کشت مناسب برای افزایش شاخص‌های رشد، تکثیر و افزایش مواد مغذی نظیر رنگدانه‌ها، پروتئین و قند در دو گونه میکروجلبک آب شور *Dunaliella*، یعنی *Dunaliella salina* UTEX-200 و *Dunaliella bardawil* UTEX-2538 در طول یک دوره رشد ۲۴ روزه، در قالب یک طرح کاملاً تصادفی با پایه فاکتوریل در سه سطح از محیط کشت، به نام محیط کشت Ramaraj (R)، محیط کشت تغییر یافته Johnson (J) و محیط کشت Shaish (S)، و دو سطح شوری نمک کلرید سدیم (1 M و 2 M)، در سه تکرار مورد بررسی قرار گرفت. به-منظور مقایسه بهتر و امکان ارزیابی صحیح‌تر ترکیبات تولید شده جلبکی، این مقادیر برحسب مقدار ماده مغذی در میلی لیتر سوسپانسیون جلبکی و نیز برحسب مقدار ماده در وزن خشک جلبک ارائه گردید.

۲. مواد و روش‌ها

دو گونه جلبک *Dunaliella* با نام‌های علمی *Dunaliella salina* UTEX-200 و *Dunaliella bardawil* UTEX-2538 از دانشگاه اصفهان (به-عنوان نمونه‌های هدیه گرفته شده از دانشگاه تگزاس) تهیه شدند. به‌عنوان یک آزمون اولیه، دو گونه نامبرده در چهار مولاریته مختلف نمک NaCl (به‌صورت مقادیر کم تا زیاد)، ۰/۵، ۱، ۲ و ۳ مولار تلقیح شده و آزمون تا روز ۲۴ ادامه یافت و تعداد سلول‌ها شمارش و روند رشد آن‌ها بررسی گردید. انتخاب مولاریته ۱، به جهت وجود بیشترین میزان تکثیر در هر دو گونه و انتخاب مولاریته نمکی ۲ مولار به‌منظور سنجش رفتار فیزیولوژیک گونه‌ها در مولاریته نمکی بالاتری که سبب بازدارندگی زیاد رشد نیز نگردد، صورت گرفت. سپس در آزمون بعدی، تیمارهای طراحی شده بر هر یک از دو مولاریته مزبور ، اعمال شدند و نتایج بررسی و مقایسه گردیدند.

طراحی شرایط آزمون با تهیه ۳ نوع محیط کشت مایع، براساس محیط کشت Sathasivam and Juntawong (2013) به نام محیط کشت Ramaraj (R) و محیط کشت تغییر یافته Johnson Shariati and Lilley (1994) به-صورت محیط کشت (J) و محیط کشت Shaish *et al*., (1992) به نام محیط کشت (S)، در دو سطح مولاریته نمکی (۱ و ۲ مولار نمک NaCl) صورت گرفت. کلیه مواد مورد نیاز برای تهیه محیط‌های کشت جلبکی (جدول ۱) از شرکت سیگما یا مرک تهیه گردیدند.

مقادیر مشخص آماده شده از هر یک از سه محیط کشت، تحت شرایط کاملاً استریل به ارلن مایرهای ۲۵۰ میلی لیتری اتوکلاو شده انتقال یافت و تلقیح دو گونه جلبکی در داخل ارلن مایرها، به نحوی

جدول ۱- ترکیبات تشکیل دهنده محیط کشت‌های R, J, S

ترکیبات معدنی	نوع محیط کشت		
	(R)	(J)	(S)
H_3BO_3	150 µM	-	-
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0.21 µM	1.0 µM	1.0 µM
$ZnCl_2$	0.8 µM	1.0 µM	1.0 µM
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	10.0 µM	7.0 µM	7.0 µM
Na_2MoO_4	2.4 µM	-	-
$NaVO_3$	2.0 µM	-	-
$CuCl_2 \cdot 6H_2O$	0.2 µM	1.0 µM	1.0 µM
$(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$	-	1.0 µM	1.0 µM
$MgSO_4.7H_2O$	5.0 mM	5.0 mM	-
KCl	2.7 mM	-	5.0 mM
KNO_3	5.0 mM	5.0 mM	-
$CaCl_2.2H_2O$	0.3 mM	0.2 mM	0.2 mM
KH_2PO_4	0.1 mM	0.2 mM	0.2 mM
$FeCl_3.6H_2O$	3.0 µM	2.0 µM	2.0 µM
Na_2-EDTA	5.0 µM	5.0 µM	5.0 µM
$NaNO_3$	-	-	5.0 mM
$MgCl_2$	-	-	5.0 mM
Na_2SO_4	-	-	5.0 mM
$NaHCO_3$ (g/L)	2.1	4.0	4.0
NaCl (g/L)	Depends on the treatments		
pH	7.4	7.2	8.0

صورت گرفت که نهایتاً تعداد ۲×۱۰^{۵} سلول در هر میلی‌لیتر از محیط کشت جدید را فراهم نماید. ارلن‌های تلقیح شده در شرایط استریل، سپس به شرایط آزمایش با شدت نور $۵۰\ \mu mol.\ m^{-2}s^{-1}$ و دمای ۲۵/۲۱±۲ درجه سانتی‌گراد، (شب/روز) و با فتوپریود (۱۶/۸ ساعت، تاریکی/نور) منتقل شدند. دوره آزمون تا مدت ۲۴ روز، ادامه یافت به‌طوری‌که، مراحل آغاز رشد، بخش لگاریتمی و نیز مرحله ایستایی رشد سلول‌ها را شامل گردد. در این مدت برداشت نمونه از هر یک از ارلن‌ها به‌منظور انجام شمارش سلولی، اندازه‌گیری مقدار بتاکاروتن و رنگدانه‌های کلروفیل کل، کاروتنوئید کل، سنجش وزن تر، وزن خشک، میزان پروتئین، قند کل و حجم سلول به‌ترتیب در زمان صفر (تلقیح جلبک در محیط جدید)، روز ۸، ۱۶ و روز ۲۴ تحت شرایط کاملاً استریل انجام شد.

طراحی آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی به‌صورت فاکتوریل، در سه تکرار صورت گرفت. محاسبه و دسته‌بندی داده‌های آزمون با استفاده از نرم‌افزار Excel انجام شد، سپس نتایج حاصله با کمک نرم‌افزار SPSS (16) مورد آنالیز آماری واریانس و مقایسات میانگین چند دامنه‌ی دانکن ($P<0.05$) قرار گرفتند.

شمارش سلولی، پس از رقیق‌سازی نمونه‌ها و سپس ثابت کردن آن‌ها توسط بلورهای ید، بوسیله لام آینه‌ای هموسایتومتر و با استفاده از میکروسکوپ نوری (با بزرگ نمایی ۴۰۰x) انجام شد و نتایج برحسب تعداد سلول در میلی‌لیتر براساس $۱۰^{۶}$ سلول گزارش گردیدند (Martines *et al.*, 1975). ارزیابی حجم سلول، با استفاده از روش Berube و همکاران (۱۹۹۴) با استفاده از تکنیک ویدئو میکروسکوپی صورت گرفت و میانگین حجم ۱۰ عدد سلول (به‌طور تصادفی) از طریق اندازه‌گیری ابعاد سلول برای هر تکرار محاسبه و نتایج برحسب میکرومتر مکعب ارائه گردید.

برای اندازه‌گیری وزن تر، ده میلی لیتر از سوسپانسیون جلبکی در یک لوله آزمایش توزین شده،

ریخته و سانتریفوژ گردید (Ramakrishna, 2011)، محلول رویی خارج شد و پس از دو مرتبه شستشوی نمک از سطح رسوب با آمونیوم استات ۰/۵ درصد (Spektorov and Nazarenko, 1989) و خارج کردن مجدد محلول رویی، لوله‌های آزمایش حاوی رسوب جلبکی مجدداً توزین شدند و از اختلاف وزن لوله آزمایش و وزن ثانویه، وزن تر براساس میلی‌گرم در میلی لیتر سوسپانسیون جلبکی به‌دست آمد. برای ارزیابی وزن خشک، لوله آزمایش حاوی بیومس تر به مدت ۴۸ ساعت، در درون آون با دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و سپس توزین گردید.

سرعت رشد ویژه سلولی (Specific growth rate, SGR) در تیمارهای مختلف آزمایش از طریق رابطه (۱) ارائه شده توسط Omori و Ikeda (۱۹۸۴) و زمان دو برابر شدن تعداد سلول‌ها (Doubling Time, DT) در طول دوره آزمایش براساس روش James و Al-Khars (۱۹۸۶)، (رابطه ۲) برای هر تکرار محاسبه گردید. بر طبق رابطه (۱) N_1 تعداد سلول‌های جلبک در زمان t_1 و N_2 تعداد سلول‌های جلبک در زمان t_2 و Δt مدت زمان انجام آزمایش می‌باشد.

(1) $SGR= \mu = (lnN_2-lnN_1)/ \Delta t$

(2) $DT= ln\ 2/ SGR$

اندازه‌گیری مقدار پروتئین به‌روش Bradford (۱۹۷۶) و با استفاده از محلول پروتئین آلبومین گاوی، به‌عنوان استاندارد و اندازه‌گیری جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۹۵ نانومتر صورت گرفت. سنجش مقدار قند کل سلول با استفاده از اسید سولفوریک غلیظ، مطابق روش Albalasmeh و همکاران (۲۰۱۳)، انجام شد و از D-glucose برای ترسیم منحنی استاندارد (در طول موج ۳۱۵ نانومتر) استفاده گردید. اندازه‌گیری میزان بتاکاروتن براساس روش Eijckelhoff و Dekker (۱۹۹۷)، و سنجش رنگدانه‌های کلروفیل کل و میزان کاروتنوئید کل براساس روش Lichtenthaler و Buschmann (۲۰۰۱)، با استفاده از استون ۸۵ درصد به‌عنوان حلال و توسط دستگاه میکروپلیت ریدر ۹۶ چاهکی (Biotec مدل Epoch) انجام شد. به‌منظور نتیجه‌گیری دقیق‌تر و مقایسه داده‌ها، مقادیر به‌دست آمده قند کل، پروتئین و رنگدانه‌ها، برحسب میکروگرم بر وزن خشک جلبک و نیز بر اساس میکروگرم بر میلی‌لیتر سوسپانسیون جلبکی ارائه گردیدند.

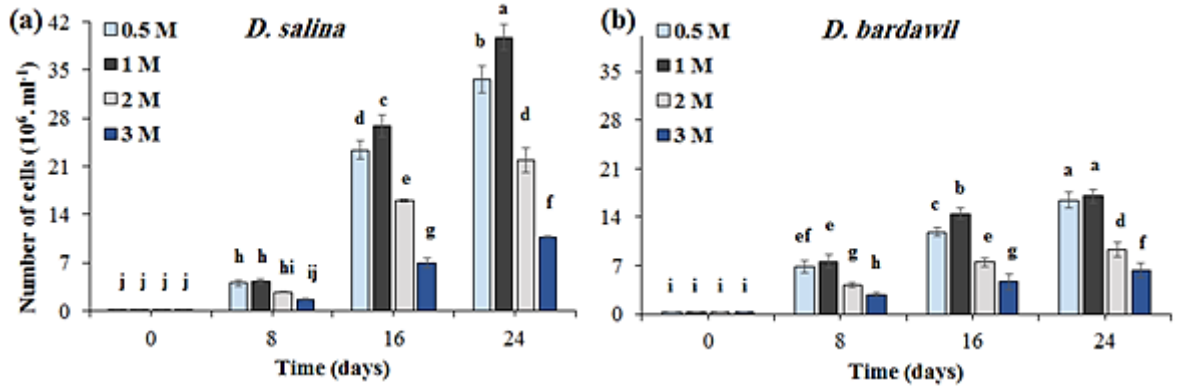
۳. نتایج

بررسی نتایج آنالیز واریانس مندرج در جدول ۲، نشان داد که کلیه تأثیرات اصلی و متقابل گونه جلبک، مولاریته نمک، نوع محیط کشت و زمان تیمار، بر تعداد سلول‌ها معنی‌دار بوده است ($P<0.01$). شکل ۱، روند تغییرات در تعداد سلول‌ها را در طی یک دوره ۲۴ روزه برای هر دو گونه جلبک در چهار مولاریته ۰/۵، ۱، ۲ و ۳ مولار نمک کلرید سدیم نشان می‌دهد. مولاریته ۱ بیشترین میزان رشد را تقریباً در هر دو سویه نشان داد و مولاریته ۰/۵ مولار در رتبه بعدی قرار گرفت. از میان مولاریته‌های کم تا متوسط، مولاریته ۱ مولار و از میان مولاریته‌های بالاتر (یعنی ۲ و ۳ مولار)، مولاریته ۲ مولار با سرعت رشدی بالاتر از ۳ مولار، برای انجام آزمون‌های بعدی انتخاب شدند.

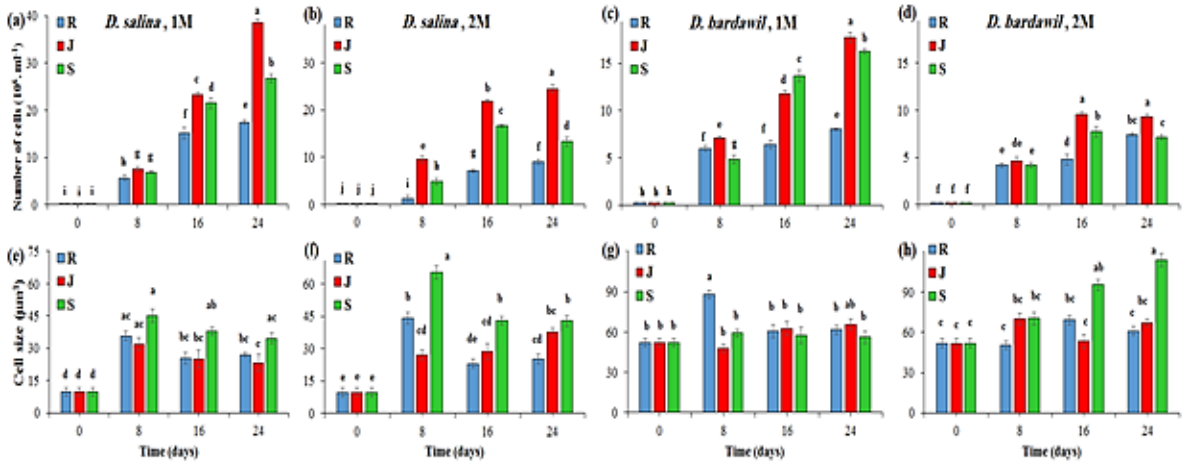
شکل ۲، تاثیر تیمارها بر تعداد سلول‌ها و نیز اندازه و حجم سلول‌ها در طول یک دوره ۲۴ روزه را نشان می‌دهد. روند افزایشی تعداد سلول‌ها با افزایش سن کشت، تقریباً در هر دو گونه و هر دو مولاریته مشاهده گردید، اما سرعت رشد سلول‌ها در مولاریته ۲ مولار کمتر از ۱ مولار بوده و بنابراین در مولاریته ۲ مولار، تعداد سلول‌ها در روز ۲۴ نسبت به تعداد سلول‌ها در روز ۱۶، مشابهت بیشتری نشان داد. سرعت تکثیر در گونه *D. salina* نیز تقریباً در حدود دو برابر گونه *D. bardawil* بود. بیشترین تعداد سلول‌های *D. salina* در ۲ مولار نمک، تقریباً $۲۰-۲۵\times۱۰^۶$ و *D. bardawil*، تقریباً ۱۰×۱۰^۶ سلول در هر میلی لیتر از سوسپانسیون سلولی بود. درحالی‌که، در مولاریته ۱، گونه *D. salina* بیشترین تعداد سلول‌ها معادل ۴۰×۱۰^۶ و برای *D. bardawil*، حدوداً ۱۷×۱۰^۶ در هر میلی لیتر از سوسپانسیون سلولی شمارش گردید که هر دو مورد مربوط به محیط کشت J بود. به‌عبارت دیگر تاثیر تیمار محیط کشت در تحریک تقسیمات سلولی در اغلب اوقات با برتری محیط J و سپس محیط S و در رتبه آخر محیط کشت R مشاهده گردید (شکل ۲، a-d). در یک جمع بندی، بیشترین تعداد سلول، در محیط کشت J ، مولاریته ۱

جدول ۲ - میانگین مربعات جدول تجزیه واریانس شاخص‌های ارزیابی شده جلبک *Dunaliella* تحت تأثیر نوع گونه جلبک (*D. bardawil, D. salina*)، مولاریته نمک (۱ مولار و ۲مولار NaCl)، نوع محیط کشت (R, J, S) و زمان یا روز نمونه‌برداری در طول دوره رشد (۰، ۸، ۱۶، ۲۴).

	درجه آزادی	شمارش سلولی	حجم سلول μm^3	وزن تر $mg.ml^{-1}$	وزن خشک $mg.ml^{-1}$	کاروتنوئید کل $\mu g.ml^{-1}$	کاروتنوئید کل $\mu g.mg\ dw^{-1}$	بتا کاروتن $\mu g.ml^{-1}$	بتا کاروتن $\mu g.mg\ dw^{-1}$	کلروفیل کل $\mu g.ml^{-1}$	کلروفیل کل $\mu g.mg\ dw^{-1}$	قند کل $\mu g.ml^{-1}$	قند کل $\mu g.mg\ dw^{-1}$	پروتئین $\mu g.ml^{-1}$	پروتئین $\mu g.mg\ dw^{-1}$
گونه جلبک	۱	۷۰۲/۷۶**	۲۹۳۲۲/۲**	۱۱/۰۶**	۰/۰۰۷^{ns}	۰/۱۱۲^{ns}	۱/۷۱^{ns}	۰/۳۳۱*	۰/۳۹۱^{ns}	۷/۰۴۳**	۳۶/۶۲۴**	۹۲۶/۹^{ns}	۱۷۳۵/۷^{ns}	۵۹۹/۳۳**	۸۸۰/۱۱^{ns}
زمان	۳	۱۳۴۲/۱**	۲۴۸۹/۴**	۲۴۸/۱**	۵/۴۴۲**	۴۳/۵۰۱**	۵۰/۶۸۹**	۷۸/۱۱۷**	۹۴/۲۶۷**	۵۴۳/۲۱**	۶۲۶/۸۳**	۱۴۷۲۱/۷۷**	۱۴۶۷۳۶۴**	۵۴۱۱۹/۴**	۴۷۵۶۴/۹**
مولاریته نمک	۱	۲۷۹/۰۱**	۸۵۱/۶**	۱/۲۴۴*	۰/۱۵**	۲/۴۵۷**	۱۹/۰۳۳**	۳/۶۴۷**	۳۵/۳۱۱**	۱۶/۱۲۲**	۱۵۴/۳۳**	۸۶۹۸۷/۱**	۳۶۲۱۸۳**	۱۸۳۶/۰۵**	۱۵۲۲۲/۵**
نوع محیط کشت	۲	۳۱۹/۴۸**	۱۱۶۶/۷**	۱۷/۸۳**	۱/۰۵۸**	۵/۸۲۸**	۲/۵۹۶**	۷/۹۱۳**	۸/۴۳۲**	۸۲/۳۲۷**	۱۵/۲۲**	۷۸۱۴۴/۷**	۴۷۰۴۱۸**	۱۴۶۲۲/۴**	۱۲۷۲۶/۴**
گونه جلبک × زمان	۳	۲۱۲/۲۸**	۴۴۱/۸**	۱/۳۱۶**	۰/۰۶۴**	۱/۱۶۳**	۲/۷۵۶**	۳/۴۳۱**	۶/۱۹۷**	۱۵/۳۱۲**	۳۴/۴۸**	۴۰۵۶/۵*	۷۸۱۶/۳^{ns}	۴۶۱/۶۲**	۵۶۱/۱۱^{ns}
گونه جلبک × مولاریته نمک	۱	۱۶/۷۷**	۶۴/۷^{ns}	۵/۷۶۷**	۰/۲۲**	۰/۰۵۶^{ns}	۲/۰۰۱^{ns}	۰/۱۱۳^{ns}	۷/۴۰۶**	۲/۲۸۹^{ns}	۱۸/۰۸۳*	۹۹۹۸/۶**	۸۴۶۱۱/۱**	۱۰۹/۵۷**	۲۲۲۱/۳۶**
گونه جلبک × نوع محیط کشت	۲	۹۶/۶۳**	۲۲/۸^{ns}	۳/۰۴۱**	۰/۰۲۵^{ns}	۰/۳۹۵**	۰/۰۳۷^{ns}	۰/۳۰۲*	۰/۱۴۱^{ns}	۹/۵۲۲**	۲/۲۴۸^{ns}	۱۴۵۲۷/۱**	۲۹۸۱/۵^{ns}	۱۲۰/۰۷۴**	۷۶۹/۰۲*
زمان × مولاریته نمک	۳	۷۶/۸۶**	۱۹۵/۶^{ns}	۱/۰۸۵**	۰/۰۹۲**	۰/۲۹۹**	۲/۴۶۸**	۰/۴۳۹**	۴/۸۳**	۲/۴۲۶*	۱۸/۵۷۱**	۳۱۴۲۶/۳**	۸۲۳۹۳/۹**	۲۳۹/۴۱**	۱۶۹۲/۱**
زمان × نوع محیط کشت	۶	۸۰/۸۷**	۲۱۹/۷*	۸/۲۸۹**	۰/۱۳۶**	۲/۲۱**	۴/۶۳۲**	۳/۰۵۳**	۸/۶۳۵**	۳۱/۰۳**	۴۱/۱۱۱**	۱۵۱۳۵۴/۸**	۲۸۶۳۵۹/۲**	۳۲۹۷/۲**	۳۴۹۷/۹**
مولاریته نمک × نوع محیط کشت	۲	۷/۷۳**	۸۹۴/۹**	۲/۴۷۳**	۰/۰۷۱**	۱/۱۵۲**	۶/۰۴۷**	۲/۳۷۲**	۱۲/۴۲۱**	۲۱/۷۵۷**	۶۳/۸۶۳**	۱۵۴۸۲/۸**	۵۵۳۸۵/۹**	۴۱۷/۰۹۳**	۵۵۰/۳۹^{ns}
گونه × زمان × مولاریته	۳	۱۰/۶۷۱**	۱۵۰/۶^{ns}	۲/۰۱۲**	۰/۰۳۳**	۰/۱۰۶**	۰/۵۴۹^{ns}	۰/۳۶۹**	۱/۳۱۹^{ns}	۱/۴۷۳^{ns}	۵/۶۸۴^{ns}	۹۴۸۱/۴**	۱۲۷۰۶/۳^{ns}	۱۹/۸۷۴^{ns}	۵۱۳/۳۴^{ns}
گونه × زمان × نوع محیط کشت	۶	۲۸/۵۸**	۱۱۹/۹^{ns}	۲/۳۶۲**	۰/۰۴۶**	۰/۳۹۵**	۱/۵۴۱*	۰/۳۵۴**	۲/۹۷۹*	۶/۳۲۶**	۱۶/۴۱۳**	۱۱۰۰۹/۹**	۲۸۰۳۸**	۹۶/۳۷۲**	۴۱۶/۰۱^{ns}
گونه × مولاریته × محیط کشت	۲	۱۳/۷۹**	۳۶۹/۵*	۰/۰۶۴^{ns}	۰/۰۱۸^{ns}	۰/۷۶۵**	۱/۹۴۸*	۲/۱۰۱**	۴/۶۱۴*	۶/۹۰۹**	۱۸/۸۵۸**	۱۳۵/۲^{ns}	۹۵۸/۳۲^{ns}	۱۱۸/۱۲**	۲۸۸/۳۱^{ns}
زمان × مولاریته × محیط کشت	۶	۱۱/۳۱۸**	۱۸۳/۸**	۰/۹۵۶**	۰/۰۳۶*	۰/۴۳۸**	۲/۷۳۹**	۰/۶۹۳**	۵/۱۴۷**	۵/۴۲۷**	۲۶/۰۴۱**	۱۶۴۲۵/۸**	۲۴۶۳۶/۲**	۹۷/۴۸**	۳۸۲/۵۰^{ns}
گونه × زمان × مولاریته × محیط کشت	۶	۲/۷۷۳**	۳۶۱/۸**	۲/۱۰۴**	۰/۰۲^{ns}	۰/۳۶۹**	۰/۹۸۹^{ns}	۰/۶۱۴**	۱/۷۲۱^{ns}	۴/۲۳۸**	۱۱/۵۶۷**	۶۱۸۹/۹**	۲۹۳۰۴/۶**	۱۵/۰۳۹^{ns}	۳۴۳/۳۱^{ns}
خطا	۴۸	۰/۰۹۲	۸۷/۷	۰/۲۳۹	۰/۰۱۲	۰/۰۳	۰/۵۰۱	۰/۰۶۹	۰/۹۸۴	۰/۵۷۷	۳/۰۵۶	۱۲۷۰/۷	۴۹۲۸/۱	۱۴/۳۲	۲۳۵/۱۸
کل	۹۶														



شکل ۱ - تغییرات تعداد سلول در دو گونه جلبک *Dunaliella salina* و *Dunaliella bardawil* در مولاریته‌های مختلف نمک NaCl در محیط کشت S، طی یک دوره رشد ۲۴ روزه. مقادیر میانگین سه تکرار ±SD می‌باشند.



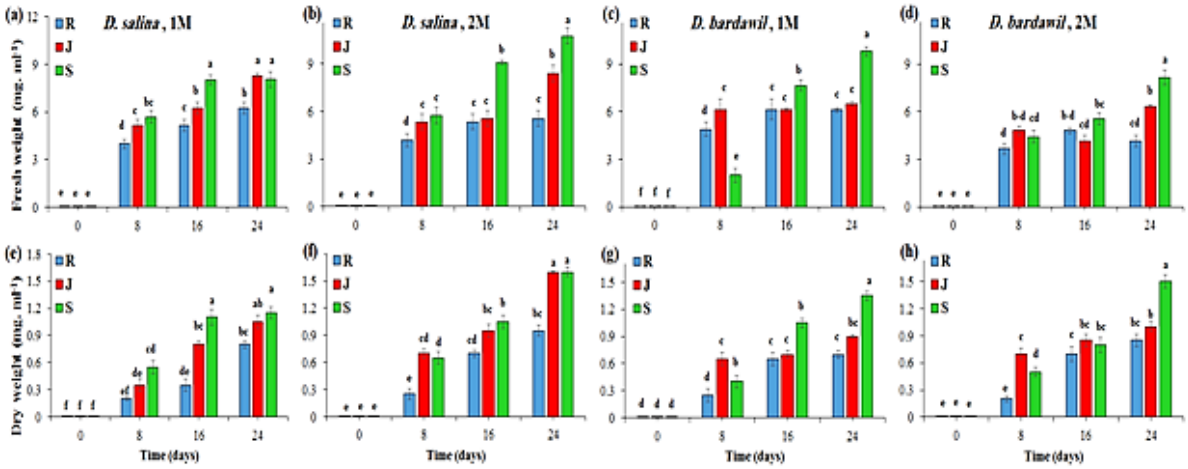
شکل ۲ - روند تغییرات تعداد سلول (a-d) و حجم سلول (e-h)، در دو گونه جلبک *D. salina* و *D. bardawil* در مولاریته‌های ۱ و ۲ مولار نمک NaCl، در سه محیط کشت متفاوت (R, J, S) طی یک دوره رشد ۲۴ روزه. مقادیر میانگین سه تکرار ±SD می‌باشند.

مولار، گونه *D. salina* و غالباً در روز ۲۴ رشد مشاهده شد.

نتایج آنالیز واریانس (جدول ۲) همچنین نشان داد که تاثیرات اصلی تیمارها، از جمله تاثیر نوع محیط کشت، بر شاخص حجم سلول معنی‌دار است ($P<0.01$). بررسی میزان حجم سلول در گونه‌ها بر اساس شکل ۲، نشان می‌دهد که اولاً حجم سلولی در گونه *D. bardawil* بسیار بزرگتر از گونه *D. salina* بوده (در حدود دو برابر) و ثانیاً بیشترین افزایش حجم سلولی در مولاریته ۲، برای هر دو گونه، در محیط کشت S حاصل می‌شود (شکل ۲. f, h). محیط کشت R در افزایش حجم سلول‌ها، بعضاً در روز هشتم، موثر بود (شکل ۲، g). به‌طور کلی گونه *D. salina* بیشترین افزایش حجم را در روز هشتم و گونه *D. bardawil* آن‌را در روزهای انتهایی نشان داد.

نتایج آنالیز واریانس (جدول ۲) همچنین نشان داد که تاثیرات اصلی تیمارها، از جمله تاثیر نوع محیط کشت، بر شاخص حجم سلول معنی‌دار است ($P<0.01$). بررسی میزان حجم سلول در گونه‌ها بر اساس شکل ۲، نشان می‌دهد که اولاً حجم سلولی در گونه *D. bardawil* بسیار بزرگتر از گونه *D. salina* بوده (در حدود دو برابر) و ثانیاً بیشترین افزایش حجم سلولی در مولاریته ۲، برای هر دو گونه، در محیط کشت S حاصل می‌شود (شکل ۲. f, h). محیط کشت R در افزایش حجم سلول‌ها، بعضاً در روز هشتم، موثر بود (شکل ۲، g). به‌طور کلی گونه *D. salina* بیشترین افزایش حجم را در روز هشتم و گونه *D. bardawil* آن‌را در روزهای انتهایی نشان داد.

جدول ۳، سرعت رشد ویژه و نیز زمان دو برابر شدن تعداد سلول‌ها در سوسپانسیون را در سه محدوده



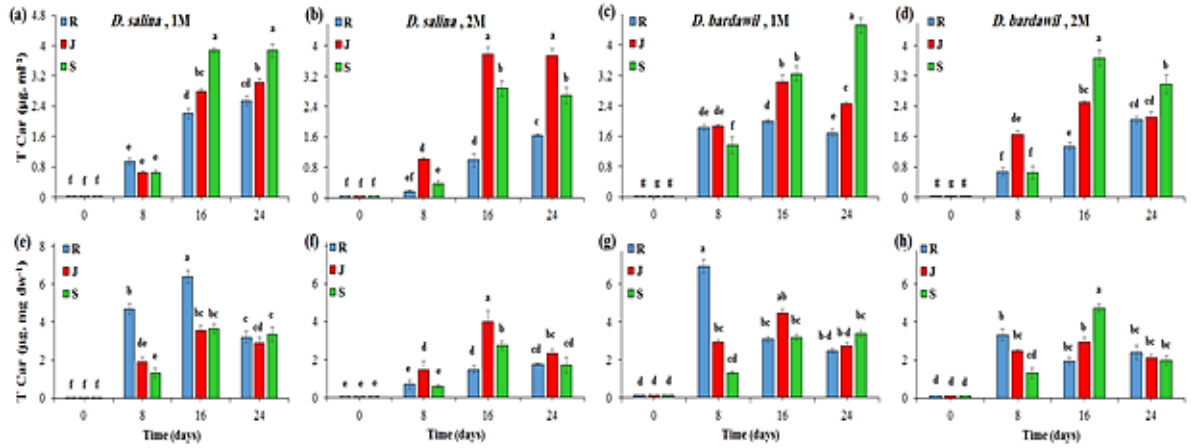
شکل ۳ - روند تغییرات وزن تر سلول (a-d) و روند تغییرات وزن خشک سلول (e-h)، در دو گونه جلبک *D. salina* و *D. bardawil* در دو مولاریته ۱ و ۲ مولار نمک NaCl، در سه محیط کشت متفاوت (R, J, S) طی یک دوره رشد ۲۴ روزه. مقادیر میانگین سه تکرار ±SD می‌باشند.

جدول ۳- سرعت رشد ویژه (SGR, μ) و زمان دو برابر شدن سلول‌ها (DT) برحسب روز، در دو جلبک *D. salina* و *D. bardawil* در دو مولاریته ۱ و ۲ مولار نمک NaCl، در سه نوع محیط کشت (R, J, S) ، در سه محدوده زمانی ۸-۰، ۱۶-۸، ۲۴-۱۶ و در طی یک دوره رشد ۲۴ روزه. مقادیر میانگین سه تکرار ±SD بوده و حروف کوچک غیرمشابه بر اساس آزمون دانکن، نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار میان داده ها در هرمولاریته نمک حاوی یک گونه جلبکی ($P<0.05$) می‌باشند.

Dunaliella bardawil			*Dunaliella salina*				
SGR			SGR				
زمان (روز)						نوع محیط کشت	مولاریته نمک
۱۶-۲۴	۸-۱۶	۰-۸	۱۶-۲۴	۸-۱۶	۰-۸		
۰/۰۱۹^{fg}	۰/۰۰۴^{f}	۰/۴۱۸^{b}	۰/۰۱۸^{e}	۰/۱۲۳^{c}	۰/۴۱۸^{b}	R	1 M
۰/۰۴۴^{e}	۰/۰۶۳^{d}	۰/۴۵۳^{a}	۰/۰۶۹^{d}	۰/۱۴۲^{c}	۰/۴۵۳^{a}	J	
۰/۰۲۲^{f}	۰/۱۳۱^{c}	۰/۴۴۲^{a}	۰/۰۲۸^{e}	۰/۱۴۲^{c}	۰/۴۴۲^{a}	S	
۰/۰۵۶^{e}	۰/۰۱۷^{f}	۰/۲۲۴^{c}	۰/۰۳۱^{f}	۰/۲۲۱^{c}	۰/۲۲۴^{c}	R	2 M
-	۰/۰۹۱^{d}	۰/۴۸۳^{a}	۰/۰۳۲^{f}	۰/۱۰۹^{e}	۰/۴۸۳^{a}	J	
-	۰/۰۷۶^{de}	۰/۳۹۹^{b}	-	۰/۱۵۳^{d}	۰/۳۹۹^{b}	S	
DT			DT				
۱۹/۲۹^{b}	۹۵/۰۸^{a}	۰/۷۲۱^{b}	۱۹/۰۳^{a}	۲/۴۸۸^{c}	۰/۷۲۱^{c}	R	1 M
۶/۸۱۷^{b}	۴/۷۵۵^{b}	۰/۶۶۵^{b}	۴/۳۵۷^{bc}	۲/۱۲۹^{c}	۰/۶۶۵^{c}	J	
۱۴/۲۴۷^{b}	۲/۳۰۴^{b}	۰/۶۸۱^{b}	۱۰/۹۴^{b}	۲/۱۱۸^{c}	۰/۶۸۱^{c}	S	
۵/۴۰۶^{a}	۲۰/۶۶^{a}	۱/۳۵۲^{a}	۹/۹۵۵^{a}	۱/۳۶۷^{cd}	۱/۳۵۲^{cd}	R	2 M
-	۳/۳۴۳^{a}	۰/۶۲۳^{a}	۹/۴۵۲^{a}	۲/۷۶۷^{b}	۰/۶۲۳^{d}	J	
-	۳/۹۶۳^{a}	۰/۷۵۵^{a}	-	۱/۹۶۴^{bc}	۰/۷۵۵^{d}	S	

خطی روزهای صفر تا ۸، ۸-۱۶ و ۱۶-۲۴ نشان می-دهد. بیشترین سرعت رشد ویژه در هر دو گونه جلبک *Dunaliella* در مولاریته ۱ و محدوده زمانی ۸-۰ در محیط‌های کشت J و S، و در مولاریته ۲ مولار در همین محدوده زمانی و در محیط کشت J مشاهده گردید. بیشترین زمان دو برابر شدن سلول‌ها در هر دو جلبک نیز غالبا در محدوده زمانی ۲۴-۱۶ یعنی پس از طی شدن فاز لگاریتمی رشد (تقریباً تا روز ۸)، مشاهده گردید.

داده‌های حاصل از آنالیز واریانس (جدول ۲) نشان داد که به غیر از اثر متقابل سه تایی؛ گونه جلبک، مولاریته نمک و نوع محیط کشت، باقی اثرات اصلی و متقابل در رابطه با وزن تر معنی‌دار بوده‌اند ($P<0.01$, 0.05). در رابطه با وزن خشک نیز به غیر از تاثیر اصلی

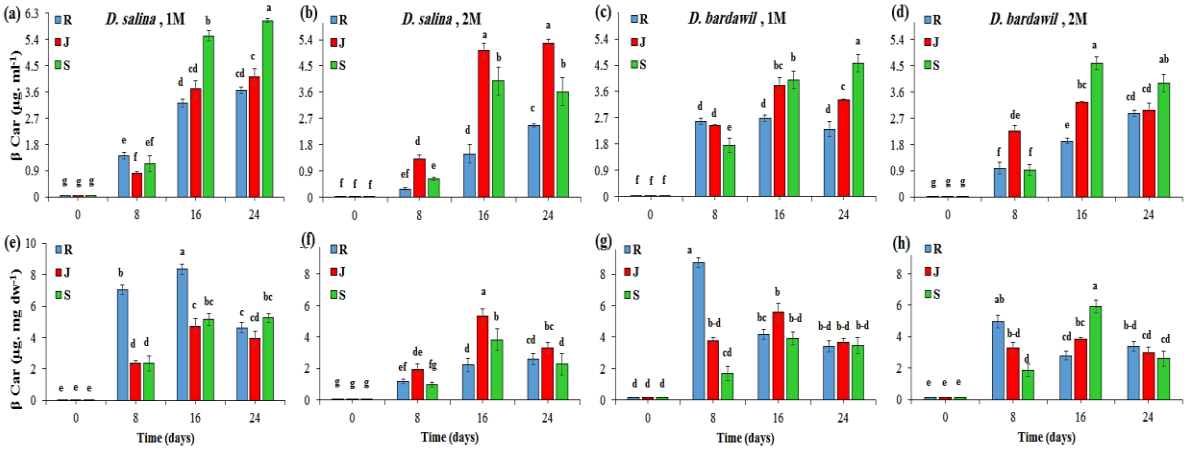


شکل ۴- روند تغییرات کاروتنوئید کل سلول (a-d) برحسب میکروگرم در میلی لیتر سوسپانسیون جلبک و (e-h) برحسب میکروگرم در میلی گرم وزن خشک جلبک، در دو گونه جلبک *D. salina* و *D. bardawil* در دو مولاریته ۱ و ۲ مولار نمک NaCl، در سه محیط کشت متفاوت (R, J, S) طی یک دوره رشد ۲۴ روزه. مقادیر میانگین سه تکرار ±SD می‌باشند.

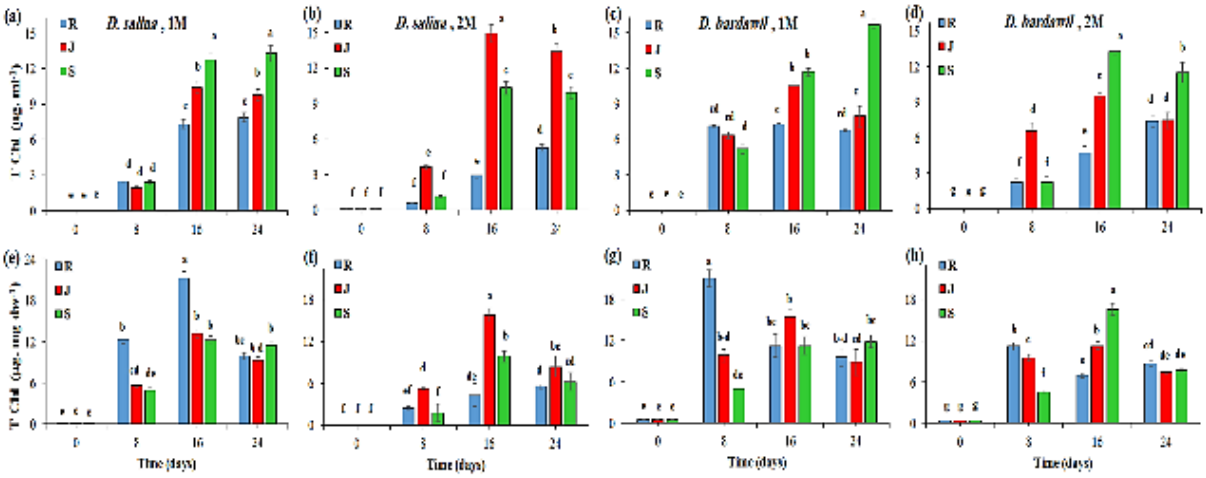
نوع گونه بر میزان وزن خشک و نیز تاثیر دوتایی نوع گونه جلبک و نوع محیط کشت، اثرات اصلی و متقابل دوتایی معنی دار ($P<0.01, 0.05$) بوده‌اند (جدول ۲). روند تغییرات وزن تر و خشک سلول با توجه به‌شکل ۳، a-h، بیانگر آنست که تغییرات مقدار وزن تر و وزن خشک جلبک، با الگوی تقریباً افزایشی در طول زمان، به‌ویژه در دو محیط کشت S و J و با برتری تاثیر مثبت محیط کشت S دنبال شد که بیشترین مقادیر را غالباً در روزهای ۱۶ و ۲۴ نشان داد. بیشترین مقدار وزن تر در هر دو گونه مجدداً در محیط کشت S مشاهده گردید (شکل ۳، b و c). گونه *D. salina* بیشترین میزان هر دو شاخص را در غلظت نمکی ۲ مولار نشان داد (به‌ترتیب ۱۱ و ۱/۵ میلی گرم بر میلی لیتر، شکل ۳، b و f)، درحالیکه گونه *D. bardawil* در ۱ مولار دارای وزن تر بیشتری بود (۱۰ میلی گرم بر میلی لیتر، شکل ۳، c). وزن خشک این گونه در هر دو مولاریته تقریباً مشابهت نشان داد (شکل ۳، g و h). به طور کلی محیط کشت S در مقایسه با دو محیط دیگر، برتری خود را در افزایش وزن تر و خشک سلول‌ها همگام با افزایش زمان، نشان داد (شکل ۳، a-h).

بر اساس جدول آنالیز واریانس (جدول ۲)، مقدار کاروتنوئید کل بر میلی لیتر سوسپانسیون جلبکی و یا بر میلی گرم وزن خشک جلبک، میان دو گونه تفاوتی نشان نداد، درحالیکه تاثیر محیط کشت بر این دو شاخص معنی‌دار بود ($P<0.01$). به‌عبارتی بیشترین مقدار شاخص اول در محیط کشت S (شکل ۴، c) و بیشترین مقدار شاخص بعدی، در محیط R به‌دست آمد (شکل ۴، g و e). همچنین تاثیر متقابل نوع گونه در نوع مولاریته نمک، برای این دو شاخص معنی‌دار نبود. با اینحال کلیه اثرات اصلی و متقابل بررسی شده برای این شاخص‌ها، از نظر معنی‌داری، یکسان نبوده و تاثیرات معنی‌دار بیشتری در رابطه با میزان کاروتنوئید بر میلی لیتر نسبت به کاروتنوئید بر وزن خشک، مشاهده گردید. این مسئله احتمالاً می‌تواند به وجود تفاوت‌های کمتر در مقدار کاروتنوئید برحسب وزن خشک سلول، میان تیمارها نسبت داده شود (شکل۴، e-h). برخی تفاوت‌ها نظیر بالاتر بودن مقدار کاروتنوئید در میلی‌لیتر، در روزهای پایانی رشد که به افزایش تعداد سلول‌ها در این روزها باز می‌گردد (شکل۴، a-d)، و بالعکس بالاتر بودن مقدار کاروتنوئید در میلی گرم وزن خشک، در روزهای ابتدائی و میانی رشد نیز قابل مشاهده هستند (شکل۴، e-h). در رابطه با تاثیر مولاریته و محیط کشت، بیشترین میزان کاروتنوئید بر میلی لیتر و بر وزن خشک به‌ترتیب در مولاریته ۱ مولار *D. bardawil* و در محیط کشت‌های S و R مشاهده گردید (شکل ۴ c و g).

تغییرات بتاکاروتن بر میلی لیتر سوسپانسیون جلبکی و نیز بر میلی گرم وزن خشک جلبک، بر اساس جدول آنالیز واریانس (جدول ۲)، به‌صورت معنی‌داری ($P<0.01$) اثرات اصلی زمان، مولاریته نمک و نوع محیط کشت در هر دو شاخص مشاهده شد. بر اساس شکل ۵، بیشترین میزان بتاکاروتن در میلی لیتر در روزهای ۱۶ و ۲۴ آزمون (شکل ۵، a) و بر وزن خشک در روزهای ۸ و ۱۶ آزمون (شکل ۵، e,g) مشاهده شد.



شکل ۵- روند تغییرات بتا کاروتن سلول (a-d) برحسب میکروگرم در میلی لیتر سوسپانسیون جلبک و (e-h) برحسب میکروگرم در میلی گرم وزن خشک جلبک، در دو گونه جلبک *D. salina* و *D. bardawil* در دو مولاریته ۱ و ۲ مولار نمک NaCl، در سه محیط کشت متفاوت (R, J, S) طی یک دوره رشد ۲۴ روزه. مقادیر میانگین سه تکرار ±SD می‌باشند.

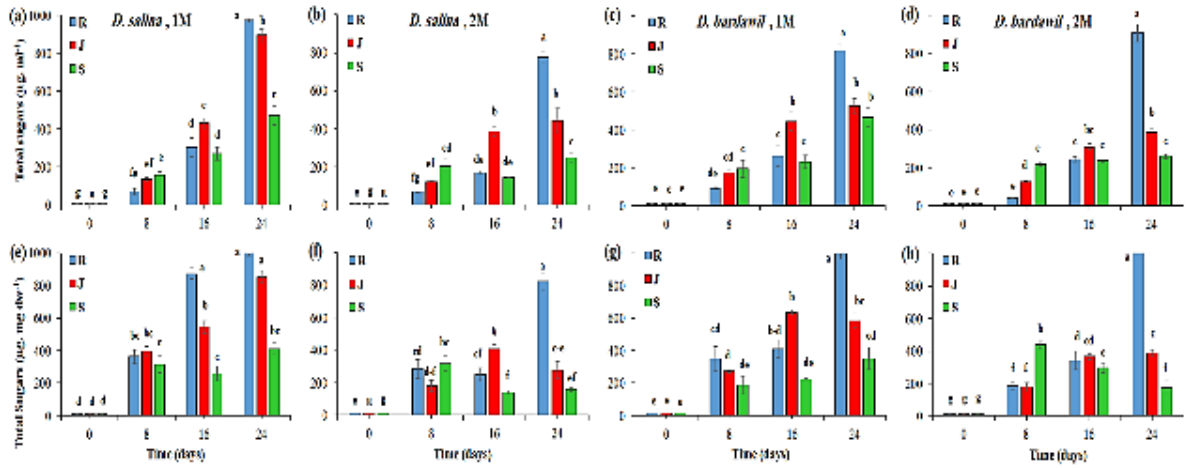


شکل ۶- روند تغییرات کلروفیل کل سلول (a-d) برحسب میکروگرم در میلی لیتر سوسپانسیون جلبک و (e-h) برحسب میکروگرم در میلی گرم وزن خشک جلبک، در دو گونه جلبک *D. salina* و *D. bardawil* در دو مولاریته ۱ و ۲ مولار نمک NaCl، در سه محیط کشت متفاوت (R, J, S) طی یک دوره رشد ۲۴ روزه. مقادیر میانگین سه تکرار ±SD می‌باشند.

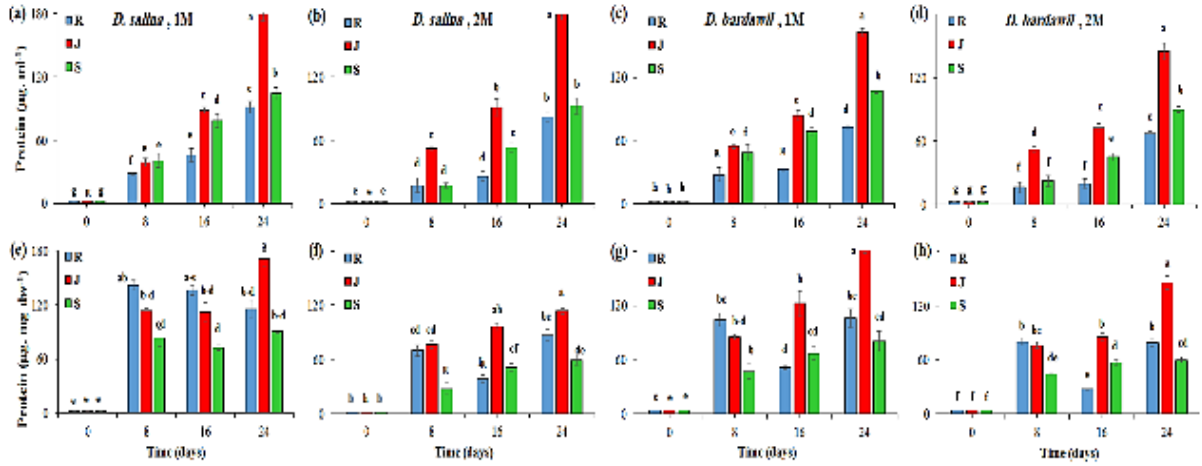
کلیه اثرات اصلی و متقابل بررسی شده برای این شاخص‌ها، از نظر معنی‌داری، یکسان نبوده و تاثیرات معنی‌دار بیشتری در رابطه با میزان بتاکاروتن بر وزن خشک، همانند وضعیت کاروتنوئید کل بر وزن خشک، مشاهده گردید (جدول ۲). در رابطه با تاثیر مولاریته و نوع محیط کشت، تغییرات بتاکاروتن الگویی تقریباً مشابه با کاروتنوئید کل را از خود نشان داد (شکل ۵، a-d).

داده‌های حاصل از آنالیز واریانس جدول ۲، برای کلروفیل کل در دو حالت بر میلی لیتر سوسپانسیون جلبکی و بر میلی گرم وزن خشک جلبک، در تمامی اثرات اصلی معنی‌داری را نشان داد ($P< 0.01$). بر اساس شکل ۶، مجدداً بیشترین میزان کلروفیل کل برحسب میلی لیتر در روزهای ۱۶ و ۲۴ آزمون به میزان تقریباً ۱۵ میکروگرم بر میلی لیتر (b,c) و مقدار آن بر حسب وزن خشک، به میزان ۲۱ میکرو گرم بر میلی گرم وزن خشک در روزهای ۱۶ و ۸ مشاهده شد (e, g). بیشترین مقدار کلروفیل بر میلی لیتر در محیط کشت S و J (شکل ۶، b, c) و بیشترین مقدار این شاخص بر وزن خشک در محیط کشت R مشاهده گردید (شکل ۶، e, g).

در رابطه با تغییرات قند کل و پروتئین بر میلی لیتر سوسپانسیون جلبکی و نیز بر میلی‌گرم وزن خشک جلبک، بر اساس جدول آنالیز واریانس (جدول ۲)، تاثیر اثرات اصلی زمان، مولاریته نمک و نوع محیط کشت در هر دو شاخص معنی‌دار بود ($P<0.01$).



شکل ۷- روند تغییرات قند کل سلول (a-d) برحسب میکروگرم در میلی لیتر سوسپانسیون جلبک و (e-h) برحسب میکروگرم در میلی گرم وزن خشک جلبک، در دو گونه جلبک *D. salina* و *D. bardawil* در دو مولاریته ۱ و ۲ مولار نمک NaCl و در سه محیط کشت متفاوت (R, J, S) طی یک دوره رشد ۲۴ روزه. مقادیر میانگین سه تکرار ±SD می‌باشند.



شکل ۸- روند تغییرات پروتئین سلول (a-d) برحسب میکروگرم در میلی لیتر سوسپانسیون جلبک و (e-h) برحسب میکروگرم در میلی گرم وزن خشک جلبک، در دو گونه جلبک *D. salina* و *D. bardawil* در دو مولاریته ۱ و ۲ مولار نمک NaCl و در سه محیط کشت متفاوت (R, J, S) طی یک دوره رشد ۲۴ روزه. مقادیر میانگین سه تکرار ±SD می‌باشند.

همچنین بررسی‌ها نشان داد که تاثیرات معنی‌دار بیشتری در رابطه با میزان تغییرات قند کل و پروتئین بر میلی لیتر نسبت به زمانی که همین شاخص‌ها بر وزن خشک محاسبه می‌شوند، مشاهده می‌گردد (جدول ۲). حداکثر میزان قند کل سلول بر میلی لیتر سوسپانسیون جلبکی همانگونه که در شکل ۷ در نمودارهای a-d مشاهده می‌گردد، با افزایش زمان افزایش یافته و در روزهای آخر مشاهده می‌گردد. در این رابطه محیط کشت R در غالب مواقع (شکل ۷، a-d)و نیز J در یک مورد (شکل ۷، a) بیشترین مقدار قند را موجب شدند. بیشترین مقدار قند بر وزن خشک جلبک نیز مجدداً بر اثر رشد در محیط کشت R حاصل شد (شکل ۷، e-h)

در رابطه با تغییرات پروتئین کل سلول در طی دوره ۲۴ روزه آزمون (شکل ۸)، مقدار پروتئین سلول بر میلی لیتر سوسپانسیون جلبکی با افزایش زمان، افزایش یافت، درحالی‌که این روند برای مقدار پروتئین بر وزن خشک سلول تنها در محیط کشت J به‌صورت افزایشی با گذشت زمان دنبال شد (شکل ۸، e-h). همچنین به‌طور غالب بیشترین تاثیر در افزایش مقدار پروتئین سلول‌ها در رابطه با محیط کشت J مشاهده گردید که با تاثیر القایی بیشتر محیط R در تولید قند کل، متفاوت بود. تاثیر متقابل گونه جلبک و مولاریته نمک بر روی پروتئین معنی‌دار بود ($P<0.01$)، به‌طوریکه بیشترین مقدار پروتئین بر وزن خشک سلول، در هر دو گونه در مولاریته ۱ مشاهده گردید (شکل ۸،

جدول ۴- ضرایب همبستگی بین صفات مورد مطالعه در دو گونه جلبک *D. salina* و *D. bardawil* در دو مولاریته ۱ و ۲ مولار نمک NaCl و در محیط کشت R، طی یک دوره رشد ۲۴ روزه.

	شمارش سلولی	حجم سلول μm^3	وزن تر $mg.ml^{-1}$	وزن خشک $mg.ml^{-1}$	کاروتنوئید کل $\mu g.ml^{-1}$	کاروتنوئید کل $\mu g.mg\ dw^{-1}$	بتا کاروتن $\mu g.ml^{-1}$	بتا کاروتن $\mu g.mg\ dw^{-1}$	کلروفیل کل $\mu g.ml^{-1}$	کلروفیل کل $\mu g.mg\ dw^{-1}$	قند کل $mg.ml^{-1}$	قند کل $mg.mg\ dw^{-1}$	پروتئین $\mu g.ml^{-1}$	پروتئین $\mu g.mg\ dw^{-1}$
شمارش سلولی	۱													
حجم سلول μm^3	-۰/۰۷۹	۱												
وزن تر $mg.ml^{-1}$	۰/۷۴۴**	۰/۲۷۸	۱											
وزن خشک $mg.ml^{-1}$	۰/۶۴۳**	۰/۱۳۹	۰/۸۱۱**	۱										
کاروتنوئید کل $\mu g.ml^{-1}$	۰/۸۸۳**	۰/۲۶۴	۰/۸۳۵**	۰/۷۵۹**	۱									
کاروتنوئید کل $\mu g.mg\ dw^{-1}$	۰/۵۹۵**	۰/۳۰۷	۰/۵۴۹**	۰/۱۵۴	۰/۶۶۲**	۱								
بتا کاروتن $\mu g.ml^{-1}$	۰/۹۰۰**	۰/۲۳۸	۰/۸۳۹**	۰/۷۶۰**	۰/۹۹۸**	۰/۶۶۸**	۱							
بتا کاروتن $\mu g.mg\ dw^{-1}$	۰/۶۰۱**	۰/۲۸۴	۰/۵۴۸**	۰/۱۴۶	۰/۶۵۰**	۰/۹۹۹**	۰/۶۵۹**	۱						
کلروفیل کل $\mu g.ml^{-1}$	۰/۸۰۵**	۰/۳۵۸*	۰/۸۱۶**	۰/۷۴۵**	۰/۹۷۶**	۰/۶۴۲**	۰/۹۶۵**	۰/۶۲۴**	۱					
کلروفیل کل $\mu g.mg\ dw^{-1}$	۰/۶۳۵**	۰/۳۵۷*	۰/۶۰۶**	۰/۲۲۲	۰/۷۲۲**	۰/۹۸۱**	۰/۷۲۳**	۰/۹۷۷**	۰/۷۲۷**	۱				
قند کل $\mu g.ml^{-1}$	۰/۶۵۴**	۰/۰۷۹	۰/۶۰۰**	۰/۸۳۶**	۰/۷۳۴**	۰/۱۴۲	۰/۷۳۲**	۰/۱۳۳	۰/۷۲۲**	۰/۲۰۴	۱			
قند کل $\mu g.mg\ dw^{-1}$	۰/۷۷۳**	۰/۱۲	۰/۶۹۸**	۰/۷۲۷**	۰/۸۲۳**	۰/۴۳۳*	۰/۸۲۵**	۰/۴۲۹*	۰/۷۹۵**	۰/۴۸۴**	۰/۹۱۵**	۱		
پروتئین $\mu g.ml^{-1}$	۰/۸۱۶**	۰/۰۲۴	۰/۷۳۶**	۰/۸۱۷**	۰/۸۲۴**	۰/۳۴۲	۰/۸۳۲**	۰/۳۴	۰/۷۸۶**	۰/۳۸۹*	۰/۹۳۶**	۰/۹۲۳**	۱	
پروتئین $\mu g.mg\ dw^{-1}$	۰/۷۱۸**	۰/۱۱۳	۰/۶۷۵**	۰/۳۴۴	۰/۶۷۳**	۰/۸۱۹**	۰/۶۹۱**	۰/۸۳۳**	۰/۶۱۹**	۰/۸۰۳**	۰/۴۳۷*	۰/۶۹۵**	۰/۶۵۰**	۱

** و *، به‌ترتیب نشانه همبستگی و عدم همبستگی معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪ و ۵٪.

جدول ۵- ضرایب همبستگی بین صفات مورد مطالعه در دو گونه جلبک *D. salina* و *D. bardawil* در دو مولاریته ۱ و ۲ مولار نمک NaCl و در محیط کشت J، طی یک دوره رشد ۲۴ روزه.

	شمارش سلولی	حجم سلول μm^3	وزن تر $mg.ml^{-1}$	وزن خشک $mg.ml^{-1}$	کاروتنوئید کل $\mu g.ml^{-1}$	کاروتنوئید کل $\mu g.mg\ dw^{-1}$	بتا کاروتن $\mu g.ml^{-1}$	بتا کاروتن $\mu g.mg\ dw^{-1}$	کلروفیل کل $\mu g.ml^{-1}$	کلروفیل کل $\mu g.mg\ dw^{-1}$	قند کل $mg.ml^{-1}$	قند کل $mg.mg\ dw^{-1}$	پروتئین $\mu g.ml^{-1}$	پروتئین $\mu g.mg\ dw^{-1}$
شمارش سلولی	۱													
حجم سلول μm^3	-۰/۱۵۲	۱												
وزن تر $mg.ml^{-1}$	۰/۷۹۴**	۰/۲۰۶	۱											
وزن خشک $mg.ml^{-1}$	۰/۷۸۷**	۰/۲۳۲	۰/۹۱۲**	۱										
کاروتنوئید کل $\mu g.ml^{-1}$	۰/۸۱۱**	۰/۱۸۲	۰/۸۳۹**	۰/۸۸۹**	۱									
کاروتنوئید کل $\mu g.mg\ dw^{-1}$	۰/۵۹۸**	۰/۲۴۸	۰/۷۶۱**	۰/۶۵۹**	۰/۸۷۴**	۱								
بتا کاروتن $\mu g.ml^{-1}$	۰/۸۲۵**	۰/۱۸۷	۰/۸۴۶**	۰/۹۰۹**	۰/۹۹۵**	۰/۸۴۲**	۱							
بتا کاروتن $\mu g.mg\ dw^{-1}$	۰/۶۳۳**	۰/۲۵۹	۰/۷۸۹**	۰/۶۹۹**	۰/۸۹۳**	۰/۹۹۳**	۰/۸۷۴**	۱						
کلروفیل کل $\mu g.ml^{-1}$	۰/۷۷۴**	۰/۱۸۵	۰/۷۹۹**	۰/۸۷۷**	۰/۹۹۰**	۰/۸۵۷**	۰/۹۹۰**	۰/۸۸۴**	۱					
کلروفیل کل $\mu g.mg\ dw^{-1}$	۰/۵۸۲**	۰/۲۵۴	۰/۷۳۱**	۰/۶۶۸**	۰/۸۸۱**	۰/۹۸۶**	۰/۸۵۸**	۰/۹۹۰**	۰/۸۸۹**	۱				
قند کل $\mu g.ml^{-1}$	۰/۹۰۵**	۰/۱۰۵	۰/۸۰۲**	۰/۷۵۹**	۰/۸۰۷**	۰/۶۶۳**	۰/۸۱۲**	۰/۶۹۳**	۰/۷۵۴**	۰/۶۳۱**	۱			
قند کل $\mu g.mg\ dw^{-1}$	۰/۷۷۹**	۰/۱۴۶	۰/۷۸۸**	۰/۶۲۱**	۰/۷۴۵**	۰/۷۸۸**	۰/۷۳۳**	۰/۸۰۲**	۰/۶۸۹**	۰/۷۳۹**	۰/۹۲۰**	۱		
پروتئین $\mu g.ml^{-1}$	۰/۸۴۲**	۰/۲۱۹	۰/۸۶۵**	۰/۹۰۰**	۰/۸۱۸**	۰/۵۸۶**	۰/۸۴۰**	۰/۶۲۶**	۰/۷۶۵**	۰/۵۵۳**	۰/۸۹۲**	۰/۷۵۳**	۱	
پروتئین $\mu g.mg\ dw^{-1}$	۰/۷۲۱**	۰/۲۹	۰/۸۹۱**	۰/۷۶۰**	۰/۷۵۳**	۰/۷۵۳**	۰/۷۵۳**	۰/۷۷۳**	۰/۶۹۱**	۰/۶۹۴**	۰/۸۴۴**	۰/۸۹۵**	۰/۸۷۶**	۱

** و *، به‌ترتیب نشانه همبستگی و عدم همبستگی معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪ و ۵٪.

e, g) و در مولاریته ۲ گونه *D. salina*، در کل، مقادیر کمتری از پروتئین را در هر سه محیط دارا بود (f).

جداول ۴، ۵ و ۶، بررسی روابط همبستگی میان شاخص‌ها در هر یک از محیط های کشت به‌طور جداگانه را نشان می‌دهند. بررسی همبستگی میان شاخص‌های ارزیابی شده با یگدیگر در محیط R (شکل ۴) نشان داد که کلیه شاخص‌ها به جز تعداد سلول‌ها، بر حسب هر دو واحد (بر میلی لیتر و نیز بر میلی‌گرم وزن خشک)، با شمارش سلولی رابطه مثبت و معنی‌دار داشتند ($P<0.01$, r = +۰/۵ تا ۰/۹) در حالی‌که به جز کلروفیل کل، شاخص های دیگر با حجم سلول همبستگی معنی‌داری نشان ندادند ($P<0.05$). همچنین کلیه شاخص ها بر حسب هر دو واحد، با وزن تر جلبک نیز رابطه مثبت و معنی‌دار داشتند ($P<0.01$)، درحالیکه در خصوص وزن خشک، غالباً شاخص‌هایی که بر حسب میلی‌لیتر محاسبه شده بودند، با وزن خشک همبستگی معنی دار نشان دادند.

برخلاف محیط کشت R، در محیط کشت J (جدول ۵) کلیه شاخص‌ها یعنی کاروتنوئید کل، بتاکاروتن و کلروفیل، قند و پروتئین با تعداد سلول‌ها، وزن تر و وزن خشک بر حسب هر دو واحد (یعنی بر میلی لیتر سوسپانسیون جلبکی و بر واحد وزن

جدول ۵- ضرایب همبستگی بین صفات مورد مطالعه در دو گونه جلبک *D. salina* و *D. bardawil* در دو مولاریته ۱ و ۲ مولار نمک NaCl و در محیط کشت S، طی یک دوره رشد ۲۴ روزه.

	شمارش سلولی	حجم سلول μm^3	وزن تر $mg.ml^{-1}$	وزن خشک $mg.ml^{-1}$	کاروتنوئید کل $\mu g.ml^{-1}$	کاروتنوئید کل $\mu g.mg\ dw^{-1}$	بتا کاروتن $\mu g.ml^{-1}$	بتا کاروتن $\mu g.mg\ dw^{-1}$	کلروفیل کل $\mu g.ml^{-1}$	کلروفیل کل $\mu g.mg\ dw^{-1}$	قند کل $\mu g.ml^{-1}$	قند کل $\mu g.mg\ dw^{-1}$	پروتئین $\mu g.ml^{-1}$	پروتئین $\mu g.mg\ dw^{-1}$
شمارش سلولی	۱													
حجم سلول μm^3	-۰/۰۳۵	۱												
وزن تر $mg.ml^{-1}$	۰/۷۹۲**	۰/۲۷۱	۱											
وزن خشک $mg.ml^{-1}$	۰/۷۰۹**	۰/۳۵۸*	۰/۸۶۰**	۱										
کاروتنوئید کل $\mu g.ml^{-1}$	۰/۸۴۸**	۰/۲۹۸	۰/۸۰۲**	۰/۸۰۹**	۱									
کاروتنوئید کل $\mu g.mg\ dw^{-1}$	۰/۷۵۰**	۰/۳۸۲*	۰/۶۷۷**	۰/۶۰۸**	۰/۹۱۳**	۱								
بتا کاروتن $\mu g.ml^{-1}$	۰/۹۰۳**	۰/۲۶۲	۰/۷۹۷**	۰/۷۹۴**	۰/۹۷۴**	۰/۹۰۶**	۱							
بتا کاروتن $\mu g.mg\ dw^{-1}$	۰/۷۸۹**	۰/۳۴۳	۰/۶۷۲**	۰/۵۸۰**	۰/۸۶۷**	۰/۹۷۶**	۰/۹۰۷**	۱						
کلروفیل کل $\mu g.ml^{-1}$	۰/۸۲۰**	۰/۳۰۲	۰/۸۱۳**	۰/۸۲۷**	۰/۹۸۳**	۰/۸۸۱**	۰/۹۵۳**	۰/۸۳۱**	۱					
کلروفیل کل $\mu g.mg\ dw^{-1}$	۰/۷۴۴**	۰/۳۷۰*	۰/۷۰۵**	۰/۶۳۷**	۰/۹۰۹**	۰/۹۷۶**	۰/۸۹۷**	۰/۹۵۰**	۰/۹۱۶**	۱				
قند کل $\mu g.ml^{-1}$	۰/۷۹۶**	۰/۲۸۳	۰/۷۷۴**	۰/۷۷۴**	۰/۸۱۰**	۰/۷۰۶**	۰/۸۰۱**	۰/۶۹۵**	۰/۸۱۶**	۰/۷۳۲**	۱			
قند کل $\mu g.mg\ dw^{-1}$	۰/۵۳۰**	۰/۳۵۳*	۰/۵۶۸**	۰/۴۳۰*	۰/۴۷۲**	۰/۵۷۷**	۰/۴۹۴**	۰/۶۱۸**	۰/۴۷۰**	۰/۵۹۴**	۰/۷۹۳**	۱		
پروتئین $\mu g.ml^{-1}$	۰/۸۳۹**	۰/۲۴۴	۰/۸۵۸**	۰/۹۱۰**	۰/۸۹۵**	۰/۷۰۷**	۰/۸۸۵**	۰/۶۹۱**	۰/۸۹۸**	۰/۷۲۹**	۰/۸۷۳**	۰/۵۰۵**	۱	
پروتئین $\mu g.mg\ dw^{-1}$	۰/۷۷۰**	۰/۲۸۶	۰/۷۷۸**	۰/۶۹۳**	۰/۷۵۷**	۰/۷۶۵**	۰/۷۸۰**	۰/۸۰۴**	۰/۷۵۳**	۰/۷۸۷**	۰/۸۱۴**	۰/۷۶۶**	۰/۸۳۲**	۱

** و *، به‌ترتیب نشانه همبستگی و عدم همبستگی معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪ و ۵٪.

خشک)، رابطه مثبت و معنی‌دار ($P<0.01$) نشان دادند. تنها رابطه شاخص‌ها با حجم سلولی معنی دار نبود ($P<0.05$). در محیط کشت S (جدول ۶)، در اکثر موارد روابط مثبت و معنی‌دار میان شاخص‌ها ملاحظه گردید و صرفا برخی روابط در زمینه شاخص ها با وزن تر سلول‌ها معنی‌دار نبودند ($P<0.05$). به طور کلی بررسی روابط همبستگی میان شاخص ها در هر یک از محیطهای کشت مورد بررسی به طور جداگانه، بیانگر وجود تفاوت های وابسته به نوع محیط در روابط همبستگی میان شاخص ها بوده، اما در خصوص عدم وجود همبستگی شاخص‌ها با سایز و حجم سلولی ($P<0.05$)، در هر سه محیط کشت مشابهت‌های بیشتری مشاهده گردید.

۴. بحث و نتیجه گیری

با توجه به نقش بسیار مهم و کلیدی جلبک‌ها به عنوان تولیدکننده در زنجیره‌های غذایی و اکوسیستم‌ها (Bowden *et al*., 2007) و نیز ارزش اقتصادی تولیدات جلبکی بویژه در آب‌های شور، همواره مطالعه و بررسی شرایط بهبود مقدار رشد میکروجلبک‌ها از اهمیت بسیاری برخوردار بوده است (Said, 2009; Mishra *et al*., 2008). مقدار و نوع عناصر میکرو و ماکروالمان مغذی و فاکتورهایی از جمله شوری، نور، دما و زمان، از عوامل مهم و تأثیرگذار بر میزان رشد سلولی و بهبود کمیت و کیفیت شاخص-های فیزیولوژیکی جلبک‌ها بوده‌اند و بررسی هر چه بیشتر فاکتورهای فوق می‌تواند به کشت و پرورش سریع‌تر جلبک‌ها و نیز به بهبود کمی و کیفی تولیدات آن‌ها کمک نماید.

بر اساس نتایج تعداد نهایی سلول‌ها در روزهای ۲۴ یا ۱۶ از روز ۸ که در واقع مرحله لگاریتمی رشد بوده و دارای بیشترین سرعت رشد ویژه است، بیشتر و بنابراین تفاوت رشد مشخص‌تر و واضح‌تر است. دلیل این امر آنست که افزایش تعداد سلول‌ها به‌صورت تقسیم دوتایی و تصاعدی صورت گرفته و سرعت آن می‌تواند تحت تاثیر تیمارها قرار بگیرد و اثر نوع تیمار بر تعداد سلول‌ها را مشخص‌تر نماید. استفاده از محیط کشت J در هر دو مولاریته نمکی، نسبت به دو محیط دیگر، محیط مناسب‌تری جهت تحریک و افزایش تقسیمات سلولی به‌نظر رسید و سبب افزایش بیومس سلولی و رشد سریع‌تر و بهتر جلبک مزبور شد. در صنایع کشت و پرورش جلبک‌های تک سلولی، افزایش و تحریک سرعت تقسیم سلولی، در واقع یک مسئله بسیار حائز اهمیت است که می‌تواند بر تعداد زئوپلانکتون‌ها به عنوان موجودات تغذیه‌کننده از فیتوپلانکتون‌ها یا همان جلبک‌های تک‌سلولی تاثیرگذار باشد (Aziz *et al*., 2006).

در هر دو گونه جلبک، بیشترین سرعت رشد ویژه حدوداً $0.453\ d^{-1}$ و کمترین زمان دوبرابر شدن سلول‌ها، در محدوده زمانی روز شروع آزمون یا تلقیح اولیه در محیط کشت (روز صفر) تا روز ۸ دوره قرار داشت. در مولاریته ۱ مولار، بیشترین سرعت رشد ویژه

در هر دو محیط J و S و در مولاریته ۲ مولار، صرفا در محیط کشت J مشاهده گردید. اما این نتایج با یافته‌های Sathasivam و Juntawong (۲۰۱۳)، مبنی بر تأثیر بیشتر محیط کشت R در مقایسه با محیط کشت J، در افزایش سرعت رشد جلبک *Dunaliella* مطابقت ندارد. این اختلاف می‌تواند به دلیل تفاوت در نوع گونه جلبکی و نیز اختلاف محیط کشت جانسون تغییر یافته از نظر مقدار برخی عناصر، با محیط کشت J گزارش شده در تحقیقات دانشمندان فوق‌الذکر باشد.

در واقع، Converti و همکاران (۲۰۰۹)، بر همین اساس معتقد بودند که گرچه محیط‌های کشت با دقت فراوانی برای پرورش هرچه بهتر انواع مختلف میکروجلبک‌ها تهیه می‌شوند، اما نمی‌توان محیط کشتی خاص برای پرورش یک نوع میکروجلبک را دقیق ترین و بهترین نوع محیط کشت دانست. زیرا فاکتورهای مختلف محیطی نظیر میزان مولاریته، مقدار نور و دما می‌توانند با اثرات القایی محیط کشت بر جلبک تداخل نمایند و از سوی دیگر بسته به نوع ترکیبات مختلف درون سلولی، آن‌ها می‌توانند به صورت‌های متفاوتی از عوامل القایی تاثیر پذیرند.

همان‌گونه که ذکر شد، یکی از عوامل تاثیر گذار بر تعداد سلول‌ها در داخل محیط کشت جلبک‌های آب شور، میزان غلظت نمک است. بر اساس نتایج بدست آمده از این تحقیق، تعداد سلول‌ها در مولاریته ۱ مولار تقریباً ۱/۵ تا ۲ برابر تعداد سلول‌ها در مولاریته ۲ مولار بوده و در تیمار شوری با مولاریته ۲ مولار نمک، میزان افزایش تعداد سلول‌های جلبک، از روز شروع آزمون تا روز ۲۴ام، نسبت به شرایط مولاریته ۱ مولار با سرعت کمتری در هر سه محیط کشت افزایش یافت. بر اساس تحقیقات Garcia و همکاران (۲۰۱۲)، در پی افزایش درجه شوری میزان مصرف انرژی درون سلولی میکروجلبک، برای برقراری تعادل اسمزی با محیط اطراف بالا رفته و بنابراین انرژی کمتری برای تقسیمات دوتایی باقیمانده و آن‌ها کاهش خواهند یافت. همچنین مقادیر بالای یون‌های حاصل از نمک محیط نظیر سدیم و کلر، دارای تاثیرات سمی مستقیم بر سیستم غشایی بوده و همچنین سبب تداخل با جذب عناصر معدنی بخصوص پتاسیم می‌گردند. در نتیجه در شوری زیاد، جذب پتاسیم که یک یون ضروری برای تنظیم هموستازی سلول می‌باشد، توسط سلول‌ها کاهش می‌یابد (Tester and Davenport, 2003).

بر اساس نتایج، اندازه و حجم سلولی گونه *D. bardawil*، تقریباً دو برابر حجم سلولی در گونه *D. salina* بود، که در برخی محیط‌ها نظیر S، مقداری افزایش نیز نشان می‌داد. بزرگ بودن حجم سلول در گونه *D. bardawil*، ممکن است تا حدودی کم بودن تعداد سلول‌ها در سوسپانسیون جلبکی (بر اثر پایین بودن سرعت تقسیمات سلولی در این گونه جلبکی) را جبران نموده و بنابراین مقدار ترکیب بر واحد میلی لیتر آن را افزایش دهد، زیرا سلول بزرگتر می‌تواند حاوی ترکیبات درون سلولی بیشتری باشد.

از سویی این افزایش حجم، در شرایط مولاریته ۲ مولار و بویژه در داخل محیط S مشاهده شد. بررسی‌ها نشان داده که جلبک *Dunaliella* به دلیل نداشتن دیواره سلولی، در پاسخ به تغییرات خارج سلولی مانند شوری زیاد قادر است که با سنتز گلیسرول فراوان، تغییر غلظت یون‌های داخل سلول و تغییر حجم سلولی، تعادل اسمزی خود را حفظ نموده و نیز با افزایش مقدار کاروتنوئیدها به‌ویژه بتاکاروتن به برخی تنش ها پاسخ دهد (Raja *et al*., 2007; Ben-Amotz and Avron, 1992).

نتایج حاصل از آنالیز واریانس داده‌ها، معنی‌دار بودن کلیه اثرات اصلی از جمله نوع گونه و نوع محیط کشت بر سایز و حجم سلول را نشان داد، اما بررسی روابط همبستگی مقدار ترکیبات کاروتنوئید کل، بتاکاروتن، کلروفیل، قند و پروتئین به طور جداگانه در هر یک از دو محیط R و J، (اما در مجموع برای هر دو گونه)، همبستگی مثبت و معنی‌داری با میزان حجم سلول نشان نداد. در عوض مقادیر شاخص های کاروتنوئید کل، کلروفیل و قند در محیط S بر حسب واحد میلی‌لیتر سوسپانسیون جلبکی با حجم سلول رابطه مثبت و معنی دار داشتند. درمجموع، این یافته‌ها، نشان می‌دهند که تغییر ترکیبات محیط کشت می‌تواند بر مقدار ترکیبات مغذی سلول جلبک تاثیرگذار باشد.

بررسی مقایسه ای مقدار ترکیبات درون سلولی برحسب دو واحد میلی لیتر سوسپانسیون جلبکی و نیز وزن خشک، نشان داد که مقدار ماده در واحد میلی لیتر تا حد زیادی تحت تاثیر تعداد سلول و نیز حجم سلولی قرار می‌گیرد و بنابراین در این رابطه تفاوت‌های

بسیاری میان تیمارها مشاهده می‌گردد، درحالی‌که مقدار ترکیب بر وزن خشک از موارد فوق مستقل بوده و بر همین اساس مقدار تغییرات معنی‌دار بسیار کمتری میان تیمارها را نشان می‌دهد. در این ارتباط تاثیر محیط S و سپس محیط J در مقدار کاروتنوئید، بتاکاروتن و کلروفیل بر میلی لیتر سوسپانسیون جلبک و تاثیر محیط R در مقدار این ترکیبات در میلی گرم وزن خشک جلبک از دو محیط کشت دیگر بیشتر بود. محیط کشت R همچنین سبب افزایش مقدار قند کل گردید، در حالیکه محیط کشت J در افزایش مقدار پروتئین نقش مهم‌تری داشت.

بالا بودن مقدار کاروتنوئید و بتاکاروتن در میلی لیتر، در روزهای انتهایی دوره آزمون (روز ۲۴) که به افزایش تعداد سلول‌ها و بیوماس سلولی در این روزها باز می‌گردد، و بالا بودن مقدار آن‌ها در میلی‌گرم وزن خشک، در روزهای ابتدائی و میانی رشد (۸ و ۱۶) نیز در نتایج بدست آمده از این تحقیق مشاهده می‌گردد. یافته‌های حاصل از تحقیقات Nikookar و همکاران (۲۰۰۴) که تاثیر تنش شوری بر روند رشد و مقدار رنگدانه‌ها را مورد بررسی قرار دادند و بیشترین میزان بتاکاروتن و کلروفیل *a* را در روز ۲۸ آزمون مشاهده نمودند، نیز این نتیجه را تایید می‌نماید. تاثیر مولاریته نیز در تولید کاروتنوئیدها، معنی‌دار بود ($P<0.01$)، اما تاثیر متقابل دوتایی آن با نوع گونه جلبک معنی‌دار نشد. به‌طور کلی تغییرات مقدار کاروتنوئید در مولاریته‌های مختلف وابسته به نوع محیط کشت بود، به‌عنوان مثال، محیط کشت S در *D. salina* در ۱ مولار نمک، و محیط کشت J در مولاریته ۲ مولار همین گونه اثر القایی بیشتری در تولید کاروتنوئید بر وزن خشک داشتند. طبق نتایج بدست آمده افزایش شوری سبب افزایش مقدار کاروتنوئید نگردید، که این امر ممکن است به دلیل کاهش فتوسنتز و تعداد تقسیمات سلولی در پی افزایش شوری باشد (Nikookar *et al*., 2004). بر اساس نتایج این محققان، مقدار کاروتنوئید کل به‌دلیل کاهش میزان فتوسنتز و نیز تقسیمات سلولی، تحت تاثیر شوری افزایش چشمگیری نیافت. همچنین Gomez و همکاران (۲۰۰۳) تاثیر مقدار شوری بر کمیت و کیفیت کاروتنوئید تولید شده در دو گونه جلبک *Dunaliella* را مورد بررسی قرار دادند و مشاهده کردند که افزایش و یا کاهش شوری بر روند تولید کاروتنوئید تاثیر معنی داری ($P<0.05$)، نداشت.

گرچه تحقیقات انجام شده توسط Garcia و همکاران (۲۰۱۲) و Rad وهمکاران (۲۰۱۱) نشان داد که افزایش غلظت نمک می‌تواند سبب افزایش تجمع بتاکاروتن در *Dunaliella* گردد، اما نتایج به‌دست آمده از این تحقیق در رابطه با مقدار بتاکاروتن بر وزن خشک، این مورد را نشان نداد. اگرچه برخی تاثیرات آنتی اکسیدانی بتاکاروتن و کلاً کاروتنوئیدها بویژه در شرایط تنشی به اثبات رسیده (Lamers *et al*., 2008; El-Baky *et al*., 2004)، اما به نظر می‌رسد که احتمالاً سلول‌های دو گونه جلبک در این آزمون، در جهت سازگاری با شرایط شور، از فعالیت برخی دیگر از اجزای آنتی اکسیدانی آنزیمی و غیر آنزیمی سلول که در این تحقیق ارزیابی نشده‌اند، بهره گرفته باشند (Haghjou *et al*.,2009). بررسی وضعیت کلروفیل کل، همخوانی نسبی تغییرات کلروفیل کل با کاروتنوئید کل را نشان داد. بر اساس منابع، کاروتنوئیدها به خصوص بتا کاروتن می‌توانند، در شرایط تنش، از اثرات تخریبی کلروفیل تهییج شده که بصورت طبیعی قادر به خاموش شدن نمی‌باشد، بکاهند (Coesel *et al*., 2008; Park *et al*., 2006).

میزان قند کل در غالب حالات، تا روز ۲۴ یک روند افزایشی را طی نمود. افزایش کربوهیدرات در شرایط تنش، می‌تواند ناشی از تخریب بازدارنده‌های سنتز نشاسته و سایر پلی‌ساکاریدها باشد (Chang *et al*., 2001) که یکی از نتایج آن تجمع قندهای محلول در داخل سلول است (Kerepesi and Galba, 2000). با توجه به نتایج در بعضی حالات افزایش پروتئین سلول‌ها در شوری ۲مولار نسبت به شوری ۱مولار مشاهده شده که می‌توان آنرا به افزایش بیان برخی از آنزیم‌های سازگار کننده در *Dunaliella* نسبت داد (Liu *et al*., 2012; Chen *et al*., 2011).

از سوی دیگر، برخی آزمایشات صورت گرفته نشان داده است که تغییر در میزان ماکرونوترینت‌های محیط کشت، نظیر نیتروژن که از عناصر اصلی تشکیل دهنده پروتئین‌ها محسوب می‌شود نیز می‌تواند بر میزان سنتز پروتئین‌ها تأثیر مستقیم داشته باشند. به طور مثال، یک تحقیق با افزایش مقدار آهن در محیط، افزایش مقدار رادیکالهای آزاد بر اثر آسیب اکسیداتیو

و نتیجتا کاهش تقسیمات سلولی و کلروفیل سلولی مشاهده گردید (Ordog *et al*., 2012).

در یک جمع‌بندی می‌توان بیان نمود که در تحقیق حاضر، تجمع مقادیر کاروتنوئید، بتاکاروتن، کلروفیل، قند و پروتئین سلولی جلبک، بسته به نوع گونه جلبکی، نوع محیط کشت، مقدار غلظت نمک و زمان نمونه برداری، میان تیمارها تفاوت نشان دادند. بنابراین نتایج بدست آمده و نتایجی از این دست، می‌توانند در افزایش بیومس سلولی و نیز ارتقای کمی تولیدات ارزشمند جلبکی، بسته به اینکه کدام موارد از نظر پرورش دهنده و مرجع تولید کننده فیتوپلانکتون، بیشتر مد نظر باشد، مورد توجه و استفاده قرار گیرند.

References

Abu-Rezq, T.S., Al-Hooti, S., Jacob, D.A., 2010. Optimum culture conditions required for the locally isolated *Dunaliella salina*. *Jornal of Algal Biomass Utilization*, 2, 12-19.

Albalasmeh, A.A., Berhe, A.A., Ghezzehei, T.A., 2013. A new method for rapid determination of carbohydrate and total carbon concentrations using UV spectrophotometry. *Carbohydrate Polymers*, 97(2), 253-261.

Aziz, N.A., Gharib, S.M., Dorgham, M.M., 2006. The interaction between phytoplankton and zooplankton in a Lake-Sea connection, Alexandria, Egypt. *International Journal of Oceans and Oceanography*, 1(1), 151-165.

Becker, E.W., 2007. Micro-algae as a source of protein. *Biotechnology Advances*, 25(2), 207-210.

Ben-Amotz, A., Avron, M., 1992. *Dunaliella:* physiology, biochemistry, and biotechnology. CRC press.

Berube, K.A., Roessler, J., Jones, T.P., Janes, S., 1994. The determination of volume of *Dunaliella* cells by transmission electron microscopy and image analysis. *Annals of Botany*, *73*(5), 481-491.

Boda, K., 1990. Non-conventional feedstuffs in the nutrition of farm animals (No. 636.085 B6).

Borowitzka, M.A., Siva, C.J., 2007. The taxonomy of the genus *Dunaliella* (Chlorophyta, Dunaliellales) with emphasis on the marine and halophilic species. *Journal of Applied Phycology*, 19(5), 567-590.

Bowden, T.J., Thompson, K.D., Morgan, A.L., Gratacap, R.M., Nikoskelainen, S., 2007. Seasonal variation and the immune response: a fish perspective. *Fish and Shellfish Immunology*, 22(6), 695-706.

Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), 248-254.

Brown, M.R., Jeffrey, S.W., Volkman, J.K., Dunstan, G.A., 1997. Nutritional properties of microalgae for mariculture. *Aquaculture*, *151*(1-4), 315-331.

Chang, S.C., Cho, M.H., Kang, B.G., Kaufman, P.B., 2001. Changes in starch content in oat (*Avena sativa*) shoot pulvini during the gravitropic response. *Journal of Experimental Botany*, 52(358), 1029-1040.

Chen, H., Lao, Y.M., Jiang, J.G., 2011. Effects of salinities on the gene expression of a (NAD^+)-dependent glycerol-3-phosphate dehydrogenase in *Dunaliella salina*. *Science of the Total Environment*, 409(7), 1291-1297.

Coesel, S.N., Baumgartner, A.C., Teles, L.M., Ramos, A.A., Henriques, N.M., Cancela, L., Varela, J.C.S., 2008. Nutrient limitation is the main regulatory factor for carotenoid accumulation and for Psy and Pds steady state transcript levels in *Dunaliella salina* (Chlorophyta) exposed to high light and salt stress. *Marine Biotechnology*, 10(5), 602.

Converti, A., Casazza, A.A., Ortiz, E.Y., Perego, P., Del Borghi, M., 2009. Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, *48*(6), 1146-1151.

Eijckelhoff, C., Dekker, J.P., 1997. A routine method to determine the chlorophyll *a*, pheophytin *a* and β-carotene contents of isolated Photosystem II reaction center complexes. *Photosynthesis Research*, 52(1), 69-73.

El-Baky, H.A., El-Baz, F.K., El-Baroty, G.S., 2004. Production of antioxidant by the green alga *Dunaliella salina*. *International Journal of Agriculture and Biology*, *6*(1), 1560-8530.

Francavilla, M., Colaianna, M., Zotti, M., G Morgese, M., Trotta, P., Tucci, P., Schiavone, S., Cuomo, V., Trabace, L., 2012. Extraction, characterization and in vivo neuromodulatory activity of phytosterols from microalga *Dunaliella tertiolecta*. *Current Medicinal Chemistry*, 19(18), 3058-3067.

Garcia, N., Lopez-Elias, J.A., Miranda, A., Huerta, M.M.P.N., Garcia, A., 2012. Effect of salinity on growth and chemical composition of the diatom *Thalassiosira weissflogii* at three culture phases. *Latin American Journal of Aquatic Research*, *40*(2), 435.

Gharibi, Gh., Javaheri baboli, M., Ayiin jamshid, Kh., 2013. Effect of dietary *spirulina* algae powder (*Spriulina platensis*) on growth and survival of larvae of white shrimp (*Litopenaeusv annamei*). *Journal of Marine Science*, 12 (2), 32-25.

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

Haghjou, M.M., Shariati, M., Smirnoff, N., 2009. The effect of acute high light and low temperature stresses on the ascorbate–glutathione cycle and superoxide dismutase activity in two *Dunaliella salina* strains. *Physiologia Plantarum*, 135(3), 272-280.

Hui, C., JianGuo, J., GuangHong, W., 2009. Effects of salinity changes on the growth of *Dunaliella salina* and its isozyme activities of glycerol-3-phosphate dehydrogenase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(14), 6178-6182.

James, C.M., Al-Khars, A.M., 1986. Studies on the production of planktonic copepods for aquaculture. *Syllogeus*, 58, 333-340.

Janssen, M., Tramper, J., Mur, L.R., Wijffels, R.H., 2003. Enclosed outdoor photobioreactors: Light regime, photosynthetic efficiency, scale-up, and future prospects. *Biotechnology and Bioengineering*, 81(2), 193-210.

Karni, L., Avron, M., 1988. Ion content of the halotolerant alga *Dunaliella salina*. *Plant and Cell Physiology*, *29*(8), 1311-1314.

Kerepesi, I., Galiba, G., 2000. Osmotic and salt stress-induced alteration in soluble carbohydrate content in wheat seedlings. *Crop Science*, 40(2), 482-487.

Lamers, P.P., Janssen, M., De Vos, R.C., Bino, R.J., Wijffels, R.H., 2008. Exploring and exploiting carotenoid accumulation in *Dunaliella salina* for cell-factory applications. *Trends in Biotechnology*, 26(11), 631-638.

Leliaert, F., Smith, D.R., Moreau, H., Herron, M.D., Verbruggen, H., Delwiche, C.F., De Clerck, O., 2012. Phylogeny and molecular evolution of the green algae. *Critical Reviews in Plant Sciences*, *31*(1), 1-46.

Lichtenthaler, H.K., Buschmann, C., 2001. Chlorophylls and carotenoids: Measurement and characterization by UV-VIS spectroscopy. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*.

Liu, W., Ming, Y., Li, P., Huang, Z., 2012. Inhibitory effects of hypo-osmotic stress on extracellular carbonic anhydrase and photosynthetic efficiency of green alga *Dunaliella salina* possibly through reactive oxygen species formation. *Plant Physiology and Biochemistry*, *54*, 43-48.

Martinez, M.R., Chakroff, R.P., Pantastico, J.B., 1975. Note: direct phytoplankton counting techniques, using the haemacytometer. *Philippine Agriculturist*, *59*(1/2), 43-50.

Mishra, A., Mandoli, A., Jha, B., 2008. Physiological characterization and stress-induced metabolic responses of *Dunaliella salina* isolated from salt pan. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, *35*(10), 1093-1101.

Nikookar, K., Moradshahi, A., Kharati, M., 2004. Influence of salinity on the growth, pigmentation and ascorbate peroxidase activity of *Dunaliella salina* isolated from Maharlu salt lake in Shiraz. *Iranian Journal of Science and Technology (Sciences)*, 28(1), 117-25.

Omori, M., Ikeda, T., 1984. Methods in zooplankton ecology. *A Wiley Interscience Publication, New York*.

Ordog, V., Stirk, W.A., Balint, P., van Staden, J., Lovasz, C., 2012. Changes in lipid, protein and pigment concentrations in nitrogen-stressed *Chlorella minutissima* cultures. *Journal of Applied Phycology*, 24(4), pp.907-914.

Park, S., Polle, J.E., Melis, A., Lee, T.K., Jin, E., 2006. Up-regulation of photoprotection and PSII-repair gene expression by irradiance in the unicellular green alga *Dunaliella salina*. *Marine Biotechnology*, 8(2), 120-128.

Phang, S.M., 1992, December. Role of algae in livestock-fish integrated farming system. In *Proceedings of the FAO/IPT Workshop on Integrated Livestock Fish Production System (Ed. TK Mukherjee, PS Moi, JM Panandam and YS Yang)* (16-20).

Pulz, O., Gross, W., 2004. Valuable products from biotechnology of microalgae. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *65*(6), pp.635-648.

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

Raja, R., Hemaiswarya, S., Balasubramanyam, D., Rengasamy, R., 2007. Protective effect of *Dunaliella salina* (Volvocales, Chlorophyta) against experimentally induced fibrosarcoma on wistar rats. *Microbiological Research*, 162(2), 177-184.

Ramakrishna, A., Dayananda, C., Giridhar, P., Rajasekaran, T., Ravishankar, G.A., 2011. Photoperiod influences endogenous indoleamines in cultured green alga *Dunaliella bardawil*. *Indian Journal of Experimental Biology*, 234-240.

Raven, J.A., Falkowski, P.G., 1999. Oceanic sinks for atmospheric CO_2. *Plant, Cell and Environment*, *22*(6), 741-755.

Said, H.A., 2009. Changes in levels of cellular constituents of *Dunaliella parva* associated with inorganic phosphate depletion. *Middle-East Journal of Scientific Research*, 4(2), 94-99.

Sathasivam, R. and Juntawong, N., 2013. Modified medium for enhanced growth of *Dunaliella* strains. *International Journal of Current*

Science, *5*, 67-73.
Shaish, A., Ben-Amotz, A., Avron, M., 1992. Biosynthesis of β-carotene in *Dunaliella*. *Methods in Enzymology*, 213, 439-444.
Shariati, M. and Lilley, R., 1994. Loss of intracellular glycerol from *Dunaliella* by electroporation at constant osmotic pressure: subsequent restoration of glycerol content and associated volume changes. *Plant, Cell and Environment*, 17(12), 1295-1304.
Spektorov, K. and Nazarenko, L., 1989. Method of determining dry biomass by microalgae lacking arigid cell wall. *Soviet Plant Physiology*, 36(3), 496-500.
Srinivasakumar, K.P., Rajashekhar, M., 2009. The population abundance, distribution pattern and culture studies of isolated microalgal strains from selective sampling sites along the south east coast of India. *African Journal of Biotechnology*, 8(16).
Tachibana, K., Yagi, M., Hara, K., Mishima, T., Tsuchimoto, M., 1997. Effects of feeding of β-carotene-supplemented rotifers on survival and lymphocyte proliferation reaction of fish larvae (Japanese parrotfish (*Oplegnathus fasciatus*) and Spotted parrotfish (*Oplegnathus punctatus*)): preliminary trials. *In Live Food in Aquaculture*, 313-316.
Tafreshi, A.H., Shariati, M., 2006. Pilot culture of three strains of *Dunaliella salina* for β-carotene production in open ponds in the central region of Iran. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22(9), 1003-1006.
Takaichi, S., 2011. Carotenoids in algae: distributions, biosyntheses and functions. *Marine Drugs*, 9(6), 1101-1118.
Tester, M., Davenport, R., 2003. Na^+ tolerance and Na^+ transport in higher plants. *Annals of Botany*, 91(5), 503-527.
Vilchez, C., Forjan, E., Cuaresma, M., Bédmar, F., Garbayo, I., Vega, J.M., 2011. Marine carotenoids: biological functions and commercial applications. *Marine Drugs*, 9(3), pp.319-333.
Volkman, J.K., Jeffrey, S.W., Nichols, P.D., Rogers, G.I., Garland, C.D., 1989. Fatty acid and lipid composition of 10 species of microalgae used in mariculture. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 128(3), 219-240.
Wang, Y.J., Chien, Y.H., Pan, C.H., 2006. Effects of dietary supplementation of carotenoids on survival, growth, pigmentation, and antioxidant capacity of characins, *Hyphessobrycon callistus*. *Aquaculture*, 261(2), 641-648.
Wijffels, R.H., Barbosa, M.J., Eppink, M.H., 2010. Microalgae for the production of bulk chemicals and biofuels. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 4(3), 287-295.