ارزیابی سرعت تکثیر، میزان پروتئین و برخی خصوصیات فیزیولوژیک دو سویه فیتوپلانکتون آب شور میکروجلبک *Dunaliella*، تحت اثر تغییر عوامل محیطی

رؤیا محمدخانی[۱۱]، مریم مددکار حق‌جو*[۲]

۱. گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد
۲. گروه زیست شناسی (فیزیولوژی)، دانشکده علوم، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد

چکیده

نظر به اهمیت گزینش سویه‌ها و تکثیر فیتوپلانکتون به منظور تغذیه آبزیان پرورشی، ارزیابی سرعت تکثیر، میزان پروتئین و برخی خصوصیات فیزیولوژیک دو سویه فیتوپلانکتون آب شور ریز جلبک *Dunaliella* sp. (استخراج‌شده از ایران) و *Dunaliella bardawil*-UTEX2538 (غیرایرانی) در شرایط مهم محیطی متفاوت از نظر شدت‌های نوری ۵۰μE و ۱۵۰μE و غلظت‌های ۰/۱، ۰/۵، ۱، ۱/۵، ۲ و ۳ مولار NaCl در مدت ۲۴ روز انجام گرفت. سویه ایرانی از نظر طولانی بودن مرحله لگاریتمی رشد، دارا بودن بیشترین تعداد سلول (19×10^{6}cells/ml) در غلظت‌های نمکی ۰/۵ و ۰/۱ مولار (بترتیب در شدت‌های نوری ۱۵۰μE و ۵۰μE)، بالاتر بودن محتوای کلروفیلی و کاروتنوئیدی، اندازه سلولی بزرگتر ($307/16\pm87/95\mu m^3$) و بیشترین مقدار وزن خشک در غلظت ۰/۵مولار (در روز ۸ام کشت و ۱۵۰μE)، بر سویه خارجی اولویت داشت. مقدار پروتئین در هر دو سویه در روز ۸ام به بیشترین مقدار رسید ولی بیشینه آن به بارداویل در ۱۵۰μE اختصاص داشت. بیشترین نرخ رشد ویژه (SGR) و کمترین زمان دوبرابر شدن سلول‌ها (DT)، در ۵۰μE به غلظت‌های ۰/۱ و ۰/۵ (بترتیب در سویه ایرانی و بارداویل) و در ۱۵۰μE به غلظت‌های ۰/۵ (سویه‌ایرانی) و ۱ و ۱/۵ مولار (سویه بارداویل) مربوط بود. بیشترین SGR و کمترین DT سویه *D.bardawil* در۵۰μE و برای *Dunaliella* sp. در ۱۵۰μE (هر دو درمولاریته ۰/۵) مشاهده شد. افزایش شدت نور از ۵۰μE به ۱۵۰μE، سبب کاهش کلروفیل و کاروتنوئید و بالعکس افزایش پروتئین و بیشترین وزن‌تر در روز ۸ام در اکثر نمونه‌ها گردید. بطورکلی، سویه ایرانی در غلظت‌های کمتر نمکی و هر دو شدت نوری از رشد بهتر و سویه بارداویل در نور بیشتر از مقدار پروتئین بیشتری برخوردار بودند.

واژگان کلیدی: تغذیه آبزیان، میکرو جلبک دانالیه‌لا، نرخ رشد ویژه، فیتوپلانکتون، پروتئین سلول

* نویسنده مسوول، پست الکترونیک: madadkar.m@lu.ac.ir

۱. مقدمه

با توجه به سهم عمده غذاهای دریایی در سلامت انسان و نیز توسعه صنعت پرورش آبزیان در کشور، نیاز به منبع تغذیه‌ای مفید، سالم و در عین حال کم هزینه برای لاروها و نوزادان آبزیانی نظیر میگو و ماهی روز به روز افزایش می‌یابد.

بررسی منابع تغذیه‌ای مفید برای افزایش هرچه بیشتر تعداد زئوپلانکتون، ناگزیر به انجام بررسی‌ها و مطالعات آزمایشگاهی بر روی سویه‌های جلبک‌های تک‌سلولی به عنوان فیتوپلانکتون که منابع مهم، کارآمد و ارزانی در تغذیه زئوپلانکتون می‌باشند می‌انجامد. زیرا جلبک‌های تک‌سلولی به عنوان تولیدکنندگان مواد آلی در حیات اکوسیستم‌های آبی و تداوم زنجیره‌های غذایی نقش اساسی دارند (Latała, 1991).

جلبک دانالیه‌لا (*Dunaliella*)، یک جلبک سبز تک‌سلولی بدون دیواره از شاخه کلروفیسه، رده کلامیدوموندالس، راسته دانالیه‌لالس و تیره دانالیه‌لاسه می‌باشد (Leliaert *et al*., 2012)، که به عنوان یک فیتوپلانکتون بویژه در آبهای شور دریاها، باتلاق‌ها و تالاب‌ها حائز اهمیت است. پنج گونه از جنس *Dunaliella* مربوط به آب‌های شیرین و ۲۳ گونه مربوط به محیط‌های دریایی و شور می‌باشند. (Avron and Ben-Amotz, 1992). نظر به توانایی فراوان جلبک در سازگاری با نمک و شوری محیط زندگی، پراکنش نسبتا وسیع آن در زیستگاه‌های طبیعی مشاهده شده (Pick, 2004) و بنابراین سویه‌های متعدد بومی آن را می‌توان از مناطق مختلف کشور جداسازی نمود.

برخی از سویه‌های این جلبک نظیر *Dunaliella bardawil* قادرند در برخی شرایط معین تا ۱۰ درصد وزن خشک خود بتاکاروتن تولید نمایند (Ben-Amotz, *et al*., 1982). علاوه بر کاروتنوئیدها، کلروفیل‌ها نیز به عنوان رنگ‌های طبیعی پایدار بصورت افزودنی‌های مفید به محصولات غذایی افزوده می‌شوند (Hutching, 1994; Levent İnanç, 2011). بررسی‌ها نشان می‌دهد که برخی سویه‌های دانالیه‌لا دارای مقدار کلروفیل بیشتری نسبت به سایرین هستند (Haghjou, 2009). استفاده از محتوای پروتئینی میکروجلبک (Microalgae) همچنین در غنی‌سازی جیره غذایی آبزیان و دامها به عنوان افزودنی تکمیلی کاربرد دارد (Halama, 1990; Phang, 1992). بطور کلی، کیفیت تغذیه‌ای پروتئین جلبک در مقایسه با پروتئین گیاهان بسیار بالاتر بوده و مقدار آن در جلبک *Dunaliella* می‌تواند در برخی موارد تا ۵۷٪ وزن سلول را شامل شود (Becker, 2007).

بهره‌گیری از سویه‌های بومی به عنوان ذخایر ژنتیکی که می‌توانند دارای برخی پتانسیل‌های نهفته بوده و ضمنا با اقلیم مناطق نیز بخوبی سازگاری داشته باشند، بسیار حائز اهمیت بوده اما منوط به شناخت هر چه بهتر و دقیق‌تر ویژگی‌ها و رفتار فیزیولوژیک جلبک در شرایط متفاوت محیطی است. در این رابطه، ارزیابی برخی شاخص‌های مهم نظیر سرعت و میزان تقسیمات سلولی از نظر تولید بیومس بالا، وزن خشک و تر سلول، میزان پروتئین، رنگدانه‌های آنتی‌اکسیدان مفید نظیر کاروتنوئیدها و کلروفیل، می‌توانند در انتخاب سویه مورد نظر برای کشت در شرایط تعریف شده، تعیین کننده باشند. جداسازی و شناسایی برخی سویه‌ها از برخی مناطق ایران صورت گرفته و پاسخ فیزیولوژیک آنها به برخی عوامل محیطی بررسی شده است (شریعتی و هادی، ۱۳۷۹; مددکار حق‌جو، ۱۳۹۲ Fazeli *et al*., 2006; Nikookar *et al*., 2004;). برخی از بررسی‌های قبلی بیانگر وابسته بودن سرعت تقسیمات به دماهای بسیار پایین، شدت نور بسیار بالا و نیز غلظت نمک محیط کشت بوده و برخی دیگر تغییرات مقدار رنگدانه در اثر تغییر غلظت نمک محیط کشت و یا شدت‌های نوری زیاد را نشان داده‌اند (Haghjou *et al*., 2009; Nikookar *et al*., 2004; Hosseini Tafreshi, and Shariati,. 2006;

(Hadi,*et al.*, 2008. با این حال طراحی شرایطی که از نظر اقتصادی به صرفه بوده و امکان فراهم نمودن آن برای رشد جلبک در کارگاه‌های کوچک، ساده‌تر و عملی‌تر باشد، بیشتر مد نظرند.

بهمین منظور در این تحقیق با استفاده از تغییر شدت نور و نیز غلظت شوری محیط رشد جلبک در یک محدوده عملی، بعنوان دو عامل مهم و تاثیرگذار بر خصوصیات و رفتار فیزیولوژیک جلبک، مقایسه ویژگی‌های یک سویه ایرانی جلبک دانالیه‌لا با یک سویه خارجی طی یک دوره رشدی ۲۴ روزه صورت گرفت و از این طریق غلظت‌های نمکی بهینه و زمان‌های مناسب برای برداشت جلبک به منظور بهره‌گیری‌های آتی مورد بررسی و ارزیابی واقع شدند.

۲. مواد و روش‌ها

دو سویه جلبک *Dunaliella* تحت عنوان، *D. bardawil* (UTEX2538) تهیه شده از کلکسیون جلبکی دانشگاه تگزاس و یک سویه ایرانی *Dunaliella* sp. استخراج شده از مرداب گاوخونی اصفهان، بصورت کشت تک کلنی بر روی محیط کشت جامد (۱/۵ درصد آگار) تلقیح شده و پس از گذشت چند روز و پدیدار شدن کلنی‌ها، انتقال آنها به ۱ میلی لیتر محیط کشت مایع (با مولاریته ۱ مولار، بعنوان شرایط پایه) انجام شد. این مراحل جهت اطمینان از خلوص نمونه سه بار انجام گرفت. طراحی شرایط آزمون با تهیه محیط کشت‌های مایع بر اساس محیط کشت اصلاح شده جانسون و همکاران (Johnson, 1968) با pH معادل با ۷/۳ و در غلظت‌های مختلف نمکی (۰/۱، ۰/۵، ۱، ۱/۵، ۲ و ۳ مولار نمک NaCl) تهیه گردید. مقدار ۲۳۰ میلی‌لیتر از محیط‌های کشت مایع آماده شده، تحت شرایط استریل به ارلن مایرهای ۲۵۰ میلی‌لیتری اتوکلاو شده انتقال یافت و تلقیح دو سویه جلبکی در محیط‌های کشت مایع به نحوی صورت گرفت که تعداد سلول اولیه در هر ارلن تقریبا معادل ۲×۱۰^{۵} سلول در میلی‌لیتر محیط کشت باشد.

محتوای سوسپانسیون سلولی ارلن‌ها به دو بخش تقسیم شده و یک گروه به شرایط شدت نوری μE ($۵۰\pm۱۰ \mu molm^{-2}s^{-1}$) و گروه دیگر به شرایط شدت نوری $۱۵۰\pm۱۰\mu E$، هر دو در دمای ۲۵/۲۳ درجه سانتی‌گراد و با فتوپریود (۱۶/۸ ساعت، تاریکی/نور) منتقل شدند. در واقع، میزان نور بصورتی که بدون صرف هزینه‌های زیاد در شرایط آزمایشگاهی و کارگاه‌های کوچک به سادگی قابل طراحی باشد، افزایش یافت و دما و فتوپریود نیز در محدوده شرایط طبیعی طراحی گردید.

دوره آزمون به مدت ۲۴ روز که بتواند شامل تغییرات دوره ایستایی منحنی رشد نیز باشد، ادامه یافت و در این مدت برداشت نمونه‌ها به منظور شمارش سلول‌ها، اندازه‌گیری رنگدانه‌های کلروفیل، کاروتنوئید کل و بتاکاروتن هر چهار روز یک بار و سنجش وزن خشک، وزن تر و میزان پروتئین نیز بترتیب در روزهای صفر (قبل از شروع آزمون)، ۸، ۱۶ و ۲۴ انجام گرفت. آزمون دیگری در شدت نوری $۵۰\pm۱۰\mu E$ با نور ممتد (Continuous light)و بدون فتوپریود تا روز ۱۶ام ادامه یافت ولی به جهت کوتاه‌تر بودن دوره آزمون تنها از برخی اطلاعات آن در قسمت بحث و نتایج استفاده گردید. شمارش سلولی با استفاده از لام آینه‌ای هموسایتومتر انجام شد و تعداد سلول‌ها در هر میلی‌لیتر از سوسپانسیون جلبکی محاسبه گردید. اندازه‌گیری میزان بتاکاروتن به روش Eijckelhoff and Dekker در سال ۱۹۹۷، مقدار کاروتنوئید کل و کلروفیل به روش Hartmut و همکاران در سال ۲۰۰۱ و نیز اندازه‌گیری مقدار پروتئین به روش Bradford در سال ۱۹۷۶، با استفاده از محلول پروتئین استاندارد آلبومین گاوی بر اساس اندازه‌گیری جذب نمونه‌ها با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل Shimatzu, UV-160) انجام شد و بصورت میکروگرم در $۱۰^{۶}$ سلول گزارش گردید. برای اندازه‌گیری وزن تر نمونه‌ها یک میلی‌لیتر سوسپانسیون در یک میکروویال توزین شده ریخته شد و سپس به مدت ۵

دقیقه در ۳۰۰۰g سانتریفوژ گردید. محلول رویی خارج و دوباره میکروویال توزین شد، از تفاوت وزن میکروویال خالی و میکروویال حاوی رسوب، وزن تر یک میلی‌لیتر سوسپانسون محاسبه گردید (Ramakrishna, 2011). در مرحله بعد، میکروویال به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۷۰ درجه سانتیگراد نگهداری شد و با توزین مجدد میکروویال حاوی سوسپانسیون خشک شده، وزن خشک سلول محاسبه شد (علی دادالهی و همکاران ۱۳۹۱). نرخ رشد ویژه سلولی (Specific growth rate, SGR) و زمان دو برابر شدن (Doubling time, DT) سلول‌ها نیز با استفاده از اعداد شمارش سلولی برای هر تکرار محاسبه گردید. نرخ رشد ویژه با استفاده از رابطه (۱) محاسبه گردید که در آن N_2 تعداد سلول‌های جلبک در زمان t_2 و N_1 تعداد سلول‌های جلبک در زمان t_1 و Δ_t مدت زمان انجام آزمایش است. زمان دو برابر شدن جمعیت سلولی نیز با استفاده از رابطه (۲) محاسبه گردید (Omori and Ikeda, 1984) .

(1) $SGR=\mu=(ln N_2-ln N_1)/\Delta t$

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

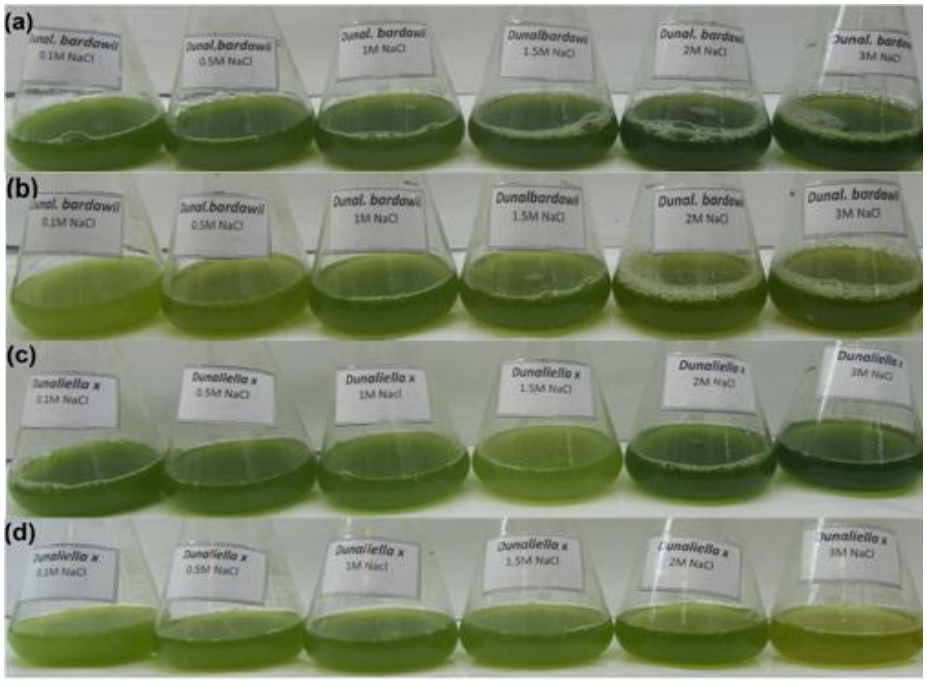
برای ارزیابی حجم سلول، با استفاده از تکنیک ویدئو میکروسکپی از سلول‌ها در شرایط پایه، فیلم برداری شد و محاسبه حجم سلولها با استفاده از روش Berubeو همکاران در سال ۱۹۹۴ صورت گرفت و نتایج برحسب میکرومتر مکعب ارائه گردید. آزمایشات بصورت فاکتوریل در قالب طرح پایه کاملا تصادفی در ۳ تکرار انجام گرفت. میانگین حجم سلول‌ها با اندازه‌گیری ابعاد ۵۰ عدد سلول محاسبه گردید.

۳. نتایج

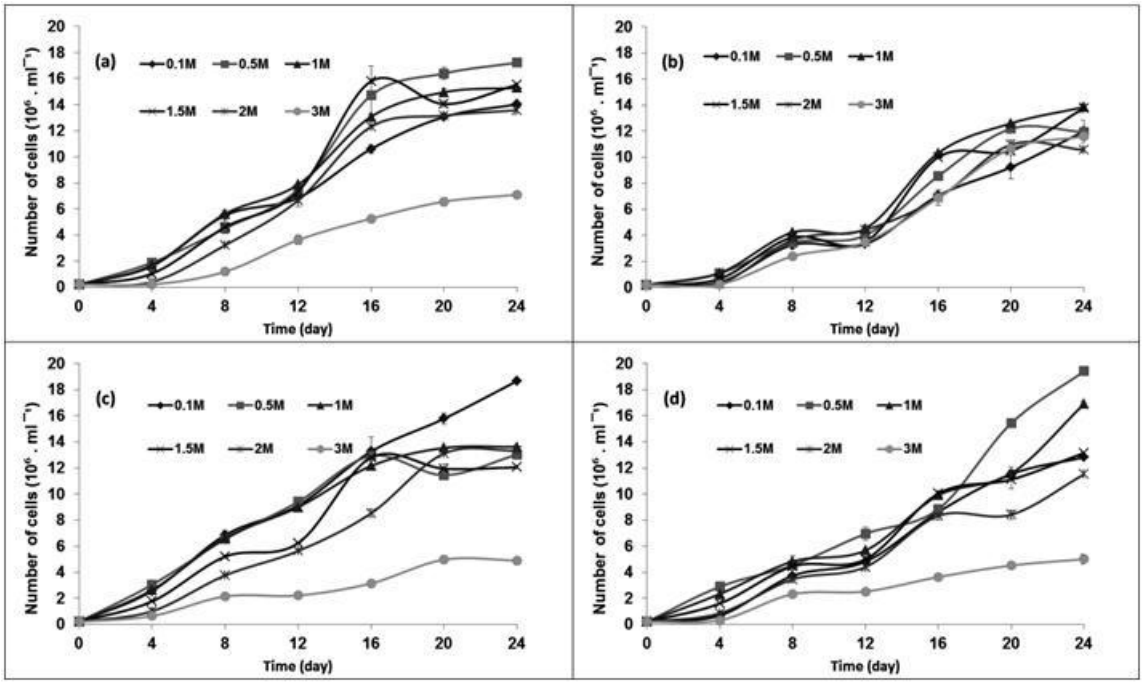
شکل ۱، سوسپانسیون‌های سلولی جلبک سبز دانالیه‌لا را در دو شدت نوری و غلظت‌های متفاوت نمک نشان می‌دهد. بر اساس شکل موردنظر، افزایش میزان نور سبب کاهش رنگ سوسپانسیون‌های سلولی شده که این مورد در سویه ایرانی بارزتر است.

براساس تجزیه آماری داده‌های شکل ۲، اثر تیمار نور بر روند تقسیمات سلولی در *D. bardawil* و *Dunaliella* sp.، به ترتیب در سطح $P<۰/۰۵$، معنی‌دار و غیرمعنی‌دار بوده است. مقایسه میانگین‌ها، نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار میان تعداد سلول‌ها در غلظت‌های مختلف نمکی در شدت نوری $۵۰\pm۱۰\mu E$ برای هر دو سویه بود. درحالیکه در شدت نوری $۱۵۰\pm۱۰\mu E$، رشد سلولی سویه *D. bardawil*اختلاف معنی‌داری در غلظت‌های مختلف نمکی نشان نداد. بیشترین میزان تقسیمات سلولی برای غلظت ۰/۵ مولار سویه ایرانی مشاهده گردید (شکل ۲). اعمال شرایط نور ممتد یا پیوسته، سبب کاهش روند رشدسلولی در همگی غلظت‌های نمکی در یک دوره ۱۶ روزه نسبت به هر دو تیمار فتوپریودیک (شدت‌های نوری $۵۰\pm۱۰\mu E$ و $۱۵۰\pm۱۰\mu E$) گردید. به نحوی که بیشترین تعداد سلولهای حاصل شده مربوط به غلظت ۰/۱ مولار نمک بوده و در سویه ایرانی و خارجی به ترتیب برابر با $۸/۷۷\times۱۰^{۶}\pm۰/۳۲$ و $۹/۲۵\times۱۰^{۶}\pm۰/۳۱$ سلول در یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون جلبکی، شمارش گردید. بر اساس اطلاعات مندرج در جداول ۱ و ۲، بیشترین نرخ رشد ویژه و کمترین زمان دو برابر شدن سلول‌ها در مولاریته‌های ۰/۱، ۰/۵ (بترتیب در سویه ایرانی و بارداویل) در شدت نوری $۵۰\mu E$ و برای مولاریته‌های ۰/۵ (در سویه ایرانی)، ۱ و ۱/۵ مولار (در سویه بارداویل) در شدت نوری $۱۵۰\mu E$ قابل مشاهده است. بنابراین بیشترین نرخ رشد ویژه و کمترین زمان دو برابر شدن در مورد سلول‌های *D. bardawil* در شدت نوری $۵۰\ \mu E$ و برای *Dunaliella* sp. در شدت نوری $۱۵۰\mu E$ و هر دو در مولاریته ۰/۵ مشاهده می‌شود. بر اساس شکل ۳، در شدت نوری $۵۰\pm۱۰\ \mu E$ تغییرات کلروفیل کل، علی‌رغم وجود نوسانات کاهشی و افزایشی در روزهای مختلف، به طور کلی تا انتهای دوره آزمون، روند تقریبا ثابتی را برای هر دو سویه نشان داده است.

بررسی‌های آماری نشان داد که تاثیر تیمار نور بر تغییرات کلروفیل سلول در $P<۰/۰۵$، معنی‌دار می‌باشد (جدول ۳). روند منحنی در شدت نوری $۱۵۰\pm۱۰\mu E$، در هر دو سویه، یک روند نزولی بود. بیشترین مقدار کلروفیل سلول در *Dunaliella* sp.، در شدت نوری $۵۰\pm۱۰\ \mu E$ و غلظت ۳ مولار نمک مشاهده گردید. مقایسات میانگین‌ها میان غلظت‌های نمکی، اختلاف معنی‌داری در تیمار نوری $۱۵۰\pm۱۰\mu E$، نشان نداد. روند تغییرات کلروفیل a و کلروفیل b در سلول با روند تغییرات کلروفیل کل مشابهت داشت (نتایج نشان داده نشده است). مطابق اشکال ۴ و ۵ روند تغییرات بتاکاروتن و کاروتنوئید سلول، الگویی تقریبا مشابه با تغییرات کلروفیل کل از خود نشان داد. شکل ۶ روند تغییرات پروتئین سلول در شرایط نوری متفاوت را نشان می‌دهد. بررسی آماری نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین محتوای پروتئینی در شدت نوری $۵۰\pm۱۰\mu E$ و شدت نوری $۱۵۰\pm۱۰\mu E$، بود (جدول ۳). افزایش شدت نور، سبب افزایش محتوای پروتئین سلول در همگی غلظت‌های نمکی گردید. هر چند اثر متقابل شدت نوری و غلظت نمک بطور مجزا بر میزان پروتئین در هر سویه معنی‌دار بود (برای هر سویه، جداول آنالیز واریانس به طور مجزا نشان داده نشده‌است)، اما در شدت نوری $۵۰\pm۱۰\mu E$، غلظت نمک بر تغییرات پروتئین سلول در سویه ایرانی موثر و معنی‌دار، و در *D. bardawil*، بی‌معنی بود. در شدت نوری $۱۵۰\pm۱۰\mu E$، غلظت نمک بر تغییرات پروتئین در هر دو سویه فاقد تاثیر معنی‌دار بود. در شدت نوری $۵۰\pm۱۰\mu E$ بیشترین مقدار پروتئین در غلظت ۳ مولار نمک و روز ۸ آزمون حاصل شد. با افزایش شدت نور تابیده شده، سلول-های کشت شده در غلظت ۰/۱ مولار نمک و در روز ۸ آزمون، بیشترین مقدار پروتئین را در خود مجتمع نمودند. تاثیر متقابل شدت نور، نمک و زمان بر میزان پروتئین در هر سویه و نیز تاثیر متقابل شدت نور، نمک، زمان و سویه بر پروتئین سلول جلبک در سطح $P<۰/۰۵$ معنی‌دار بود (جدول ۳).



شکل ۱. کشت سوسپانسیون سلولی دو سویه مختلف دانالیه‌لا در غلظت‌های مختلف نمکی (از چپ به راست ۰/۱، ۰/۵، ۱، ۱/۵، ۲ و ۳ مولار نمک NaCl): a) *D. bardawil* در شدت نور $۵۰\pm۱۰\ \mu E$؛ b) *D. bardawil* در شدت نور $۱۵۰\pm۱۰\mu E$؛ c) *Dunaliella* sp. در شدت نور $۵۰\pm۱۰\mu E$ و d) *Dunaliella* sp. در شدت نور $۱۵۰\pm۱۰\mu E$.



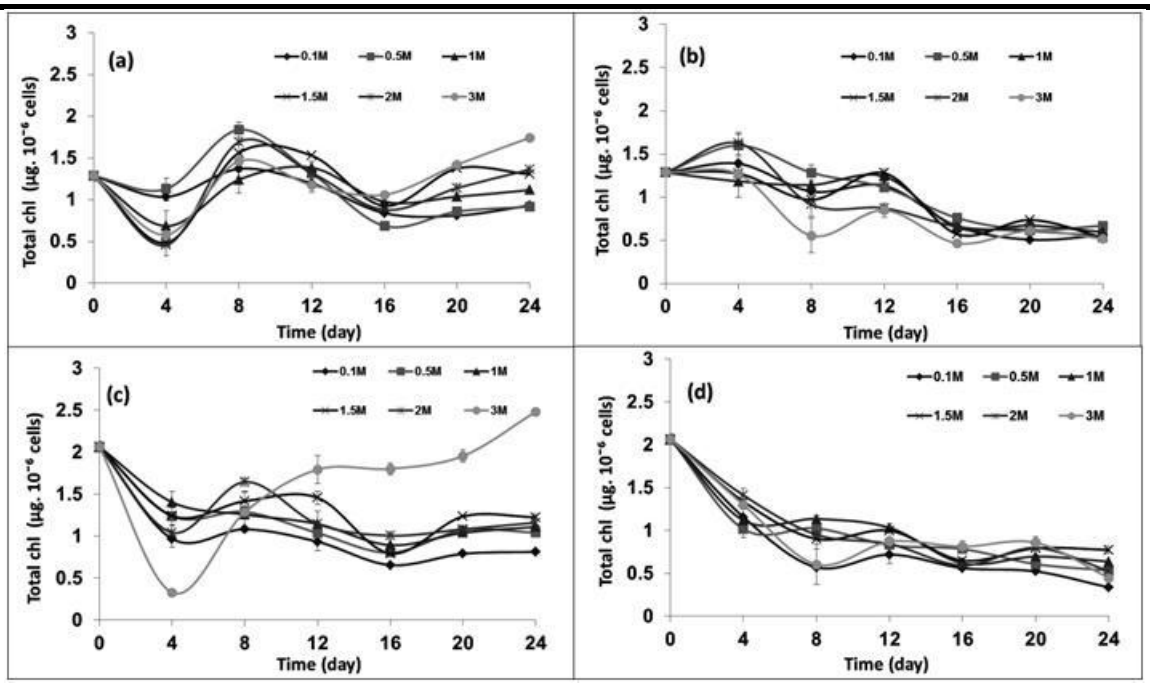
شکل ۲. روند منحنی‌های رشد بر اساس تقسیم سلولی در دو سویه جلبک *Dunaliella* در شرایط متفاوت نوری. a) منحنی رشد *D. bardawil* در شدت نور ۱۰±۵۰ μE ; b) منحنی رشد *D. bardawil* در شدت نور ۱۰±۱۵۰ μE ; c) منحنی رشد *Dunaliella* sp. در شدت نور۱۰±۵۰ μE ; d) منحنی رشد *Dunaliella* sp. در شدت نور ۱۰±۱۵۰ μE ; مقادیر میانگین سه تکرار ± SD می‌باشند.

جدول ۱- نرخ رشد ویژه (SGR, μ) در دو سویه جلبک *Dunaliella* در دو شدت نوری متفاوت (day^{-1}) طی یک دوره رشدی ۲۴ روزه. مقادیر میانگین سه تکرار ± SD بوده و حروف کوچک و بزرگ غیرمشابه بر اساس آزمون Tukey، نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار به ترتیب میان نمونه‌های هر ستون و هر سطر، در $P<۰/۰۵$ می‌باشند.

غلظت نمک (مولار)	شدت نور ۱۰±۵۰ μE		شدت نور ۱۰±۱۵۰ μE	
	D. bardawil	*Dunaliella* sp.	*D. bardawil*	*Dunaliella* sp.
۰/۱	^{B}۰/۱۷۷۱±۰/۰۰۰۳^{b}	^{C}۰/۱۸۹±۰/۰۰۰۲^{e}	^{A}۰/۱۷۰۴±۰/۰۰۳^{b}	^{AB}۰/۱۷۳۳±۰/۰۰۰۱^{c}
۰/۵	^{C}۰/۱۸۵۶±۰/۰۰۰۲^{d}	^{B}۰/۱۷۴±۰/۰۰۰۳^{c}	^{A}۰/۱۷۰۳±۰/۰۰۰۵^{b}	^{D}۰/۱۹۰۶±۰/۰۰۰۱^{e}
۱	^{B}۰/۱۸۰۷±۰/۰۰۰۴^{c}	^{A}۰/۱۷۵۸±۰/۰۰۰۴^{d}	^{A}۰/۱۷۶۵±۰/۰۰۰۷^{c}	^{C}۰/۱۸۴۸±۰/۰۰۰۴^{d}
۱/۵	^{D}۰/۱۸۱۳±۰/۰۰۰۱^{c}	^{A}۰/۱۷۰۷±۰/۰۰۰۳^{b}	^{C}۰/۱۷۶۳±۰/۰۰۰۹^{c}	^{B}۰/۱۷۴۴±۰/۰۰۰۲^{c}
۲	^{C}۰/۱۷۵۷±۰/۰۰۱^{b}	^{C}۰/۱۷۴۹±۰/۰۰۰۶^{cd}	^{A}۰/۱۶۵۲±۰/۰۰۰۷^{a}	^{B}۰/۱۶۸۸±۰/۰۰۰۷^{b}
۳	^{B}۰/۱۴۸۶±۰/۰۰۰۴^{a}	^{A}۰/۱۳۳۳±۰/۰۰۰۶^{a}	^{C}۰/۱۶۹۱±۰/۰۰۰۲^{b}	^{A}۰/۱۳۴±۰/۰۰۳^{a}

جدول ۲. زمان دو برابر شدن (DT) سلول‌ها بر حسب روز، در دو سویه جلبک *Dunaliella* در دو شدت نوری متفاوت طی یک دوره رشدی ۲۴ روزه. مقادیر میانگین سه تکرار ± SD بوده و حروف کوچک و بزرگ غیرمشابه بر اساس آزمون Tukey، نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار به ترتیب میان نمونه‌های هر ستون و هر سطر، در $P<۰/۰۵$ می‌باشند.

غلظت نمک (مولار)	شدت نور $۵۰\pm۱۰\mu E$		شدت نور $۱۵۰\pm۱۰\mu E$	
	D. bardawil	*Dunaliella* sp.	*D. bardawil*	*Dunaliella* sp.
۰/۱	^{B}۳/۹۲۷۷±۰/۰۰۷۴^{c}	^{a}۳/۶۸۰۳±۰/۰۰۳۸	^{C}۴/۰۸۱۱±۰/۰۷۳۳^{b}	^{BC}۴/۰۱۳۱±۰/۰۰۲۸^{b}
۰/۵	^{B}۳/۷۴۹۲±۰/۰۰۶۴^{a}	^{C}۴/۰۰۱۷±۰/۰۱۴۳^{c}	^{D}۴/۰۸۸۸±۰/۰۰۴۸^{b}	^{A} ۳/۶۵۰۲±۰/۰۰۱۱^{a}
۱	^{A}۳/۸۵۵۳±۰/۰۰۲۷^{b}	^{A}۳/۹۵۱۳±۰/۰۰۸۹^{b}	^{A}۳/۹۳۶۴±۰/۰۱۱۵^{a}	^{B}۵/۷۷۸۷±۰/۰۹۴^{d}
۱/۵	^{B}۳/۸۳۵۳±۰/۰۰۱۷^{b}	^{D}۴/۰۷۱۶±۰/۰۱۴۵^{d}	^{C}۳/۹۵۲۴±۰/۰۲۵۴^{a}	^{A}۳/۹۵۶۳±۰/۰۰۵۷ ^{b}
۲	^{A}۳/۹۵±۰/۰۱۱۷^{d}	^{B}۳/۹۸۷۴±۰/۰۱۵^{c}	^{D}۴/۲۱۴±۰/۰۱۴۶^{c}	^{C}۴/۱۳۲±۰/۰۱۰۳^{b}
۳	^{B}۴/۶۷۵±۰/۰۰۹۵^{e}	^{C}۵/۱۹۵۴±۰/۰۰۵۲^{e}	^{A}۴/۱۱۷±۰/۰۰۶۵^{b}	^{C}۵/۲۲۷±۰/۰۸۱۲^{c}



شکل ۳. روند تغییرات کلروفیل کل سلول در دو سویه جلبک *Dunaliella* در شدت‌های متفاوت نوری. a) *D. bardawil* در شدت نور $۵۰\pm۱۰\mu E$; b) *D. bardawil* در شدت نور $۱۵۰\pm۱۰\mu E$; c) *Dunaliella* sp. در شدت نور $۵۰\pm۱۰\mu E$; d) *Dunaliella* sp. در شدت نور $۱۵۰\pm۱۰\mu E$; مقادیر میانگین سه تکرار ± SD می‌باشند.

جداول ۴ تا ۷، وزن تر و خشک سویه‌های دانالیه‌لا را تحت تاثیر تیمارهای نور، نمک و زمان نشان می‌دهند. بررسی اثرات اصلی و متقابل تیمارهای اعمال شده بر وزن تر و خشک در سویه بارداویل حاکی از معنی‌دار

بودن کلیه اثرات در سطح $P<۰/۰۵$ بوده در حالیکه در مورد سویه ایرانی، کلیه اثرات اصلی بر وزن تر سلول بی‌معنی و در ارتباط با وزن خشک به جز تاثیر اصلی نور، همگی معنی‌دار بوده‌اند.

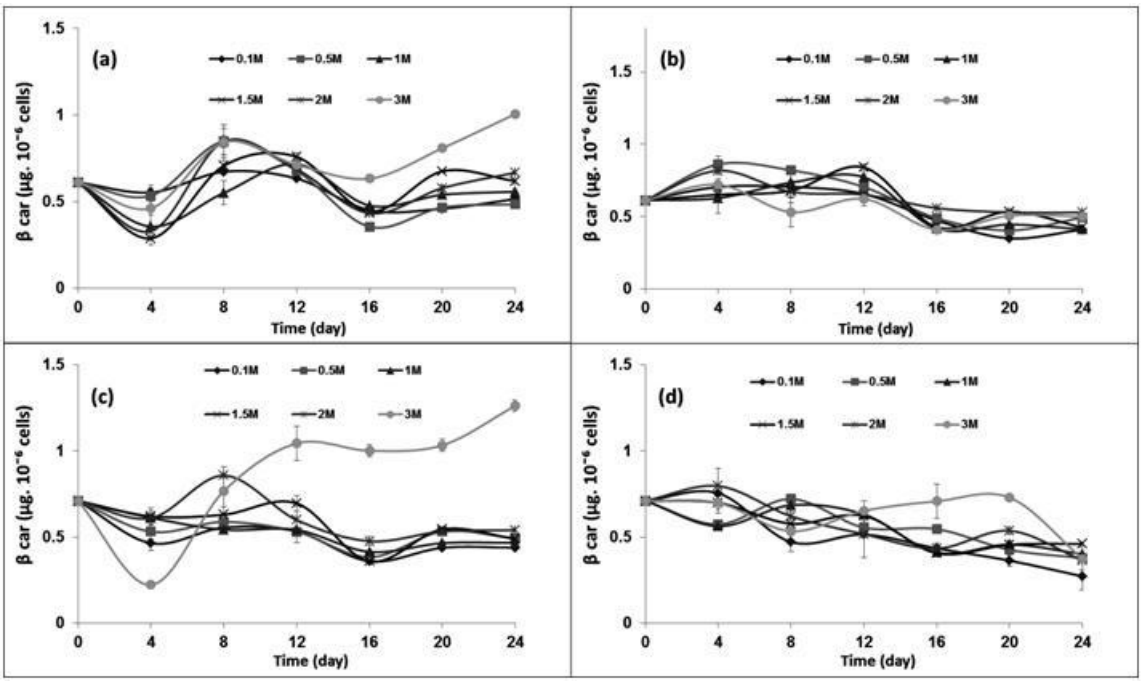
بیشترین مقدار وزن تر در شدت نوری $۵۰\mu E$ در سویه بارداویل و سویه ایرانی بترتیب در روز ۱۶ام و ۲۴ام (هر دو در غلظت ۳ مولار) و در شدت نوری $۱۵۰\mu E$ در روز ۸ام کشت (بترتیب در غلظت‌های ۰/۱ و ۲ مولار نمک) مشاهده گردید. اندازه‌گیری حجم سلول‌های دو سویه در شرایط پایه (در ۵۰ تکرار)، مقادیر ۱۲۵/۷۵± ۲۴۰/۷۱ میکرو متر مکعب را برای سویه بارداویل و ۸۷/۹۵ ±۳۰۷/۱۶ میکرومتر مکعب را برای سویه ایرانی نشان می‌دهد و بررسی‌های آماری با استفاده از آزمون T-Test معنی‌دار بودن اختلاف سایز میان دو سویه را در $P<۰/۰۵$ نشان داده است.

جدول۳. تجزیه واریانس ترکیبات و شاخص‌های اندازه‌گیری شده در جلبک دانالیه‌لا.

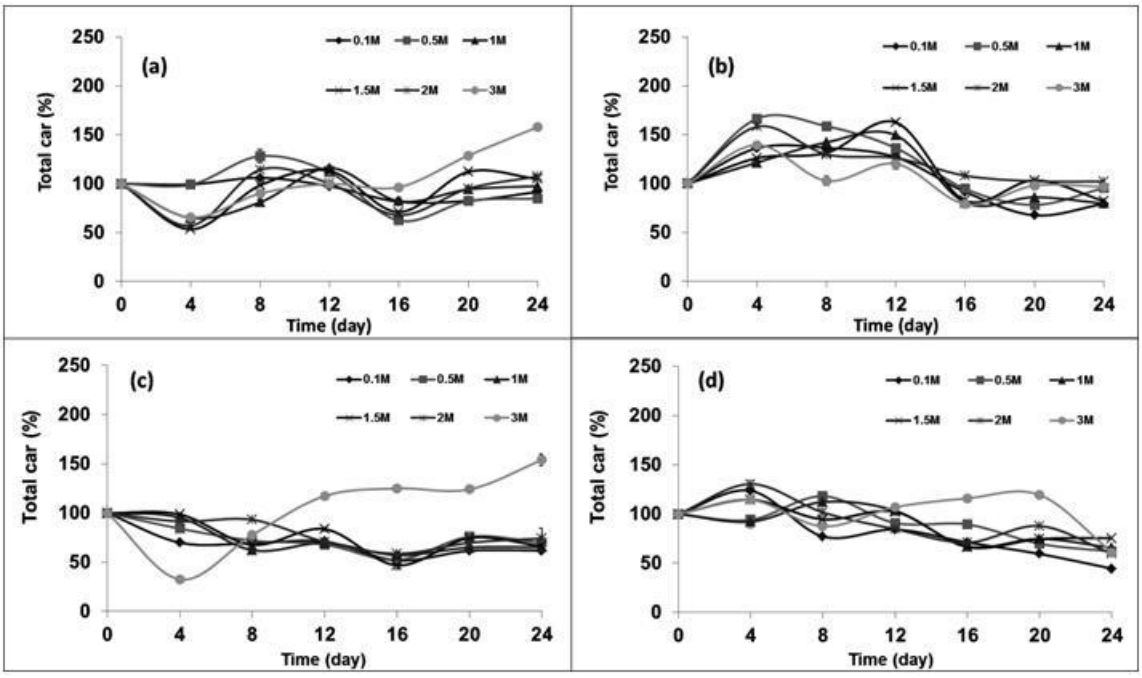
منابع تغییرات	*میانگین مربعات*							
	درجه آزادی	تعداد سلول	کلروفیل کل	بتاکاروتن	کاروتنوئید کل	پروتئین	وزن تر	وزن خشک
سویه	۱	۰/۲۹۶ ns	۲/۴*	۰/۰۰۱ ns	۰/۰۰۲ ns	۰/۱۳۳ ns	۳/۶۹*	۰/۵۳*
غلظت نمک	۵	۱۳۹/۲*	۰/۳۱*	۰/۱۹۱*	۰/۰۳۷*	۹۱/۶۲*	۳/۵۹*	۰/۷۲*
شدت نور	۱	۷۶۲*	۹/۹۷*	۰/۳۳۲*	۱/۴۵*	۱۳۶۲/۶*	۰/۱۶۸*	۰/۱۳*
زمان	۳	۰/۰۰۰۲*	۱۰/۸*	۰/۶۸۸*	۰/۲۱۶*	۴۳۷۷/۱*	۵/۵۷*	۰/۱۲*
سویه*غلظت نمک	۵	۱۲۴/۸*	۰/۲۴*	۰/۰۴۵*	۰/۰۲۵*	۱۶/۱*	۰/۸۹*	۰/۱۱*
سویه * شدت نور	۱	۷۳/۳*	۰/۰۰۲ ns	۰/۰۰۵ ns	۰/۰۰۹*	۰/۱۶۱ ns	۰/۵۱۸*	۰/۰۵۳*
سویه * زمان	۳	۶۸/۷*	۳/۰۵*	۰/۱۲۹*	۰/۰۶۷*	۲۹/۴۶۱*	۰/۴۹۲*	۰/۳۶۸*
نمک * شدت نور	۵	۱۵۶/۴*	۰/۵۳*	۰/۱۸۴*	۰/۰۳۷*	۶۳/۴۸۷*	۱/۶۷۷*	۰/۱۹۲*
غلظت نمک * زمان	۱۵	۲۲۹/۴*	۰/۲۰*	۰/۰۶۷*	۰/۰۳۱*	۳۲/۸۴*	۱/۹۶*	۰/۱۰۰*
شدت نور * زمان	۳	۲۵۷/۱*	۱/۶۸*	۰/۱۷۳*	۰/۳۲۵*	۱۱۶۶/۶*	۰/۳۹۶*	۰/۰۲۴ ns
سویه *غلظت نمک * شدت نور	۵	۹۳/۹*	۰/۰۵۷*	۰/۰۱۰*	۰/۰۰۵*	۶/۶*	۰/۱۸۷ ns	۰/۰۷۹*
سویه * نمک * زمان	۱۵	۴۴/۸۴*	۰/۰۶*	۰/۰۱۹*	۰/۰۱۰*	۱۰/۶۳۹*	۰/۸۶۷*	۰/۱۳۴*
غلظت نمک *شدت نور* زمان	۱۵	۵۹/۹۰*	۰/۱۵*	۰/۰۴۲*	۰/۰۱۱*	۳۴/۷۱۵*	۰/۳۷۰*	۰/۱۴۱*
سویه*غلظت نمک* شدت نور* زمان	۱۵	۵۹/۷*	۰/۰۵*	۰/۰۱۱*	۰/۰۰۶*	۵/۲۳*	۰/۴۸*	۰/۱۷*

*، معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد.

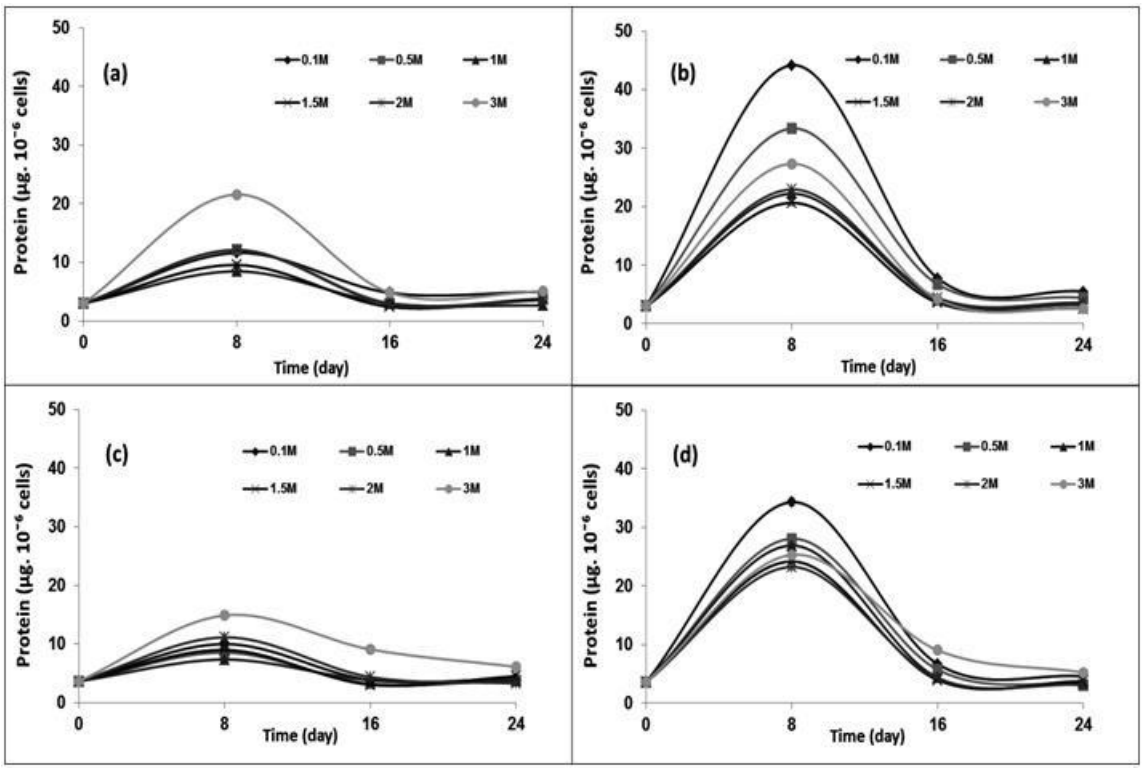
ns ،اثر مولفه معنی‌دار نیست.



شکل ۴. روند تغییرات بتاکاروتن سلول در دو سویه جلبک *Dunaliella* در شدت‌های متفاوت نوری. a) *D. bardawil* در شدت نور *µE* ۵۰±۱۰ ; b) *D. bardawil* در شدت نور *µE* ۱۵۰±۱۰ ; c) *Dunaliella* sp. در شدت نور *µE* ۵۰±۱۰ ; d) *Dunaliella* sp. در شدت نور *µE* ۱۵۰±۱۰ ; مقادیر میانگین سه تکرار ± SD می‌باشند.



شکل ۵. درصد تغییرات کاروتنوئید کل سلول در دو سویه جلبک *Dunaliella* در شدت‌های متفاوت نوری. a) *D. bardawil* در شدت نور *µE* ۵۰±۱۰ ; b) *D. bardawil* در شدت نور *µE* ۱۵۰±۱۰ ; c) *Dunaliella* sp. در شدت نور *µE* ۵۰±۱۰ ; d) *Dunaliella* sp. در شدت نور *µE* ۱۵۰±۱۰ ; مقادیر میانگین سه تکرار ± SD می‌باشند.



شکل۶. روند تغییرات پروتئین سلول در دو سویه جلبک *Dunaliella* در شدت‌های متفاوت نوری. a) *D. bardawil* در شدت نور *µE* ۱۰±۵۰ ; b) *D. bardawil* در شدت نور *µE* ۱۰±۱۵۰ ; c) *Dunaliella* sp. در شدت نور *µE* ۱۰±۵۰ ; d) *Dunaliella* sp. در شدت نور *µE* ۱۰±۱۵۰ ; مقادیر میانگین سه تکرار ± SD می‌باشند.

جدول ۴. وزن تر بر حسب میکروگرم بر 10^6 سلول، در دو سویه جلبک *Dunaliella* در شدت نوری *µE* ۱۰±۱۵۰ طی یک دوره رشدی ۲۴ روزه. مقادیر میانگین سه تکرار±SD بوده و حروف غیرمشابه بر اساس آزمون Tukey، نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار میان نمونه‌های هر ستون در $P<$ ۰/۰۵ می‌باشند.

شدت نور	*µE* ۱۰±۱۵۰							
سویه	D. bardawil				Dunaliella sp.			
زمان / نمک (مولار)	روز صفر	روز ۸ام	روز ۱۶ام	روز ۲۴ام	روز صفر	روز ۸ام	روز ۱۶ام	روز ۲۴ام
۰/۱	۶۵۰±۳۲^{a}	۹۰^{b} ۲۰۹۷±	۱۵۴۲±۲۸۶^{ab}	۹۷۳±۹۵^{ab}	۱۰۰۰±۵^{a}	۳۰۸±۱۵^{a}	۱۳۹۳±۱۲۱^{a}	۱۱۴۳±۱۵۱^{a}
۰/۵	۶۵۰±۳۲^{a}	۱۱۲۶±۹۷^{a}	۱۷۲۰±۱۰۰^{ab}	۱۰۳۱±۸۲^{ab}	۱۰۰۰±۵^{a}	۱۱۴۰±۳۳۵^{a}	۱۵۴۱±۹۳^{a}	۶۶۰±۵۶^{a}
۱	۶۵۰±۳۲^{a}	۱۹۷۴±۹۸^{b}	۱۲۶۹±۲۶۳^{a}	۱۰۵۰±۸۶^{ab}	۱۰۰۰±۵^{a}	۱۰۳۵±۱۷۵^{a}	۱۳۶۱±۹۵^{a}	۷۵۳±۴۷^{a}
۱/۵	۶۵۰±۳۲^{a}	۱۵۲۳±۶^{b}	۱۴۱۴±۲۰۰^{a}	۹۰۲±۲۰^{a}	۱۰۰۰±۵^{a}	۱۹۵۹±۵۶۳^{ab}	۱۲۱۱±۱۸۶^{a}	۶۸۳±۷۱^{a}
۲	۶۵۰±۳۲^{a}	۱۵۰۱±۷۵^{b}	۱۹۲۶±۱۵۶^{b}	۱۴۵۶±۱۲۱^{b}	۱۰۰۰±۵^{a}	۳۶۳۴±۱۸۱^{b}	۱۷۲۴±۶۲^{a}	۱۲۰۷±۱۲۰^{a}
۳	۶۵۰±۳۲^{a}	۴۱±۵۰^{a}	۱۹۵۰±۹۵^{b}	۱۳۴۲±۹۰^{ab}	۱۰۰۰±۵^{a}	۱۶۱۶±۸۱^{ab}	۱۷۹۹±۱۴۰^{a}	۱۷۱۸±۱۵۴^{a}

جدول ۵. وزن تر بر حسب میکروگرم بر $۱۰^{۶}$ سلول، در دو سویه جلبک *Dunaliella* در شدت نوری μE ۱۰±۵۰ طی یک دوره رشدی ۲۴ روزه. مقادیر میانگین سه تکرار ± SD بوده و حروف غیرمشابه بر اساس آزمون Tukey، نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار میان نمونه‌های هر ستون در $P<۰/۰۵$ می‌باشند.

شدت نور	$۵۰±۱۰\ \mu E$							
سویه	D. bardawil				Dunaliella sp.			
زمان نمک (مولار)	روز صفر	روز ۸ام	روز ۱۶ام	روز ۲۴ام	روز صفر	روز ۸ام	روز ۱۶ام	روز ۲۴ام
۰/۱	۶۵۰±۳۲^{a}	۴۱۳±۱۳۴^{a}	۱۲۱۳±۲۱۲^{a}	۶۵۵±۳۳^{ab}	۱۰۰۰±۵^{a}	۳۱۷±۵۶^{a}	۱۳۷۵±۸۹^{c}	۸۶۵±۱۳۲^{a}
۰/۵	۶۵۰±۳۲^{a}	۷۹۱±۱۳۳^{ab}	۸۲۰±^{۱۲۰a}	۳۷۷±۳۰^{a}	۱۰۰۰±۵^{a}	۶۱۲±۶۰^{a}	۱۱۱۷±۱۸۶^{b}	۱۱۷۷±۱۵۵^{a}
۱	۶۵۰±۳۲^{a}	۹۳۳±۶۶^{ab}	۹۰۹±۷۲^{a}	۵۷۳±۳۷^{ab}	۱۰۰۰±۵^{a}	۴۸۳±۱۳۸^{a}	۸۸۰±۸۱^{a}	۱۱۳۱±۵۰۸^{a}
۱/۵	۶۵۰±۳۲^{a}	۱۵۴۶±۶۶۶^{bc}	۶۷۳±۲۵^{a}	۶۶۷±۱۶۳^{ab}	۱۰۰۰±۵^{a}	۲۳۲۶±۳۹۴^{c}	۷۰۶±۳۸^{a}	۱۱۶۴±۲۰۶^{a}
۲	۶۵۰±۳۲^{a}	۱۵۰۱±۷۵^{bc}	۱۱۳۳±۲۵۵^{a}	۱۰۲۱±۱۶۳^{bc}	۱۰۰۰±۵^{a}	۲۶۸۶±۴۰^{c}	۱۵۵۴±۱۰۷^{c}	۱۱۰۲±۷۹^{a}
۳	۶۵۰±۳۲^{a}	۱۳۰۲±۶۶۷^{c}	۲۹۵۶±۲۰۱^{b}	۱۴۹۹±۳۰۰^{c}	۱۰۰۰±۵^{a}	۱۱۴۱±۵۷^{b}	۲۹۸۷±۱۴۰^{d}	۳۰۹۷±۴۲۳^{b}

جدول ۶. وزن خشک بر حسب میکروگرم بر $۱۰^{۶}$ سلول، در دو سویه جلبک *Dunaliella* در شدت نوری μE ۱۰±۱۵۰ طی یک دوره رشدی ۲۴ روزه. مقادیر میانگین سه تکرار ± SD بوده و حروف غیرمشابه بر اساس آزمون Tukey، نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار میان نمونه‌های هر ستون در $P<۰/۰۵$ می‌باشند.

شدت نور	$۱۵۰\pm۱۰\ \mu E$							
سویه	D. bardawil				Dunaliella sp.			
زمان / نمک (مولار)	روز اول	روز ۸ام	روز ۱۶ام	روز ۲۴ام	روز اول	روز ۸ام	روز ۱۶ام	روز ۲۴ام
۰/۱	۵۰±۲/۵^{a}	۱۵/۳۶±۹۰^{a}	۳۵±۱۰^{a}	۵۶/۶±۹^{a}	۳۵۰±۱۷^{a}	۱۳/۳۹±۰/۶^{a}	۵۷/۹±۱۱/۵^{a}	۶۲/۴۱±۶^{a}
۰/۵	۵۰±۲/۵^{a}	۲۹/۹±۱/۴۸^{a}	۹۳±۴۰^{ab}	۸۳/۸±۲۲^{ab}	۳۵۰±۱۷^{a}	۶۸۸±۱۱۷^{c}	۶۷/۸±۲۹^{a}	۴۹/۷۸±۳۰^{a}
۱	۵۰±۲/۵^{a}	۴۱/۵±۸/۳^{a}	۱۲۶±۵۱^{ab}	۱۳۷±۱۰^{b}	۳۵۰±۱۷^{a}	۴۰±۱۰^{a}	۱۲۸±۶۰^{a}	۱۱۰±۳۰^{a}
۱/۵	۵۰±۲/۵^{a}	۶۵±۱۸^{a}	۱۵۶±۴۵^{ab}	۱۲۵±۲۳^{b}	۳۵۰±۱۷^{a}	۱۷۴±۷۹^{a}	۱۳۶±۵۷^{a}	۸۸/۷۵±۵^{a}
۲	۵۰±۲/۵^{a}	۱۱۰±۵/۵^{a}	۲۵۸±۱۳۶^{bc}	۲۵۹±۱۴^{c}	۳۵۰±۱۷^{a}	۵۶۳±۱۲۲^{bc}	۲۷۶±۲۰^{b}	۱۹۵±۵۵^{a}
۳	۵۰±۲/۵^{a}	۴۲/۵±۲^{a}	۴۲۶±۳۰^{c}	۲۹۹±۳۵^{c}	۳۵۰±۱۷^{a}	۳۹۸±۱۳۷^{b}	۳۴۷±۸۴^{b}	۴۹۹±۱۹۲^{b}

جدول ۷. وزن خشک بر حسب میکروگرم بر $۱۰^۶$ سلول، در دو سویه جلبک *Dunaliella* در شدت نوری $۵۰\pm۱۰\ \mu E$ طی یک دوره رشدی ۲۴ روزه. مقادیر میانگین سه تکرار ± SD بوده و حروف غیرمشابه بر اساس آزمون Tukey، نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار میان نمونه‌های هر ستون در $P<۰/۰۵$ می‌باشند.

شدت نور	$۵۰\pm۱۰\ \mu E$							
سویه	D. bardawil				Dunaliella sp.			
زمان	روز صفر	روز ۸ام	روز ۱۶ام	روز ۲۴ام	روز صفر	روز ۸ام	روز ۱۶ام	روز ۲۴ام
نمک (مولار)								
۰/۱	۵۰ ± ۳^a	$۱۳/۶۱\pm۶^a$	۴۶۶ ± ۲۶^b	$۵۷/۰۲\pm۳۱^a$	۳۵۰ ± ۶۰^a	$۱۴/۵۹\pm۰/۷۲^a$	۱۷۶ ± ۱۴۲^a	۵۳ ± ۴۱^a
۰/۵	۵۰ ± ۳^a	$۴۹/۸۱\pm۷^a$	$۵۴/۳۷\pm۱۰^a$	$۴۲/۵۸\pm۲۹^a$	۳۵۰ ± ۶۰^a	$۲۲/۹۷\pm۱^a$	۴۴۱ ± ۲۲^{ab}	۱۲۰ ± ۶۹^a
۱	۵۰ ± ۳^a	۱۰۶ ± ۲۵^b	$۶۱/۱۶\pm۹^a$	۷۶ ± ۲۹^a	۳۵۰ ± ۶۰^a	$۵۲/۸۴\pm۲^a$	۱۵۶ ± ۶۴^a	۱۲۷ ± ۱۸^a
۱/۵	۵۰ ± ۳^a	۱۹۵ ± ۶۱^c	۱۰۵ ± ۵۶^a	۱۵۴ ± ۶^{ab}	۳۵۰ ± ۶۰^a	۲۵۴ ± ۲۰^a	۱۳۷ ± ۶۵^a	۱۰۷ ± ۳۳^a
۲	۵۰ ± ۳^a	۱۸۶ ± ۹^c	۱۸۶ ± ۴۵^{ab}	۲۳۸ ± ۱۶^{ab}	۳۵۰ ± ۶۰^a	۶۷۱ ± ۴۲^b	۱۰۱ ± ۲۹^a	۱۹۲ ± ۳۰^a
۳	۵۰ ± ۳^a	۱۷۶۴ ± ۸۸^d	۵۰۳ ± ۲۸^b	۴۴۱ ± ۲۶^b	۳۵۰ ± ۶۰^a	۳۰۲ ± ۵۷^a	۷۳۰ ± ۵۳^b	$\pm۱۳۲^b$ ۶۵۲

۴. بحث و نتیجه گیری

شوری و نور دو عامل محیطی بسیار مهم هستند که بر تعداد و کیفیت غذایی فیتوپلانکتون‌ها موثرند (Lavens and Sorgeloos, 1996). بنابراین این عوامل می‌توانند بطور غیرمستقیم و یا حتی در مواردی مستقیما بر تعداد و تنوع زئوپلانکتون (نظیر روتیفر و آرتمیا) نیز تاثیرگذار باشند (روفچائی و همکاران ۱۳۸۸؛ Navarro *et al*., 1999). افزودن جلبک‌ها به عنوان غذا به محیط رشد و پرورش آبزیان، سبب افزایش تعداد و کیفیت غذایی آنها شده و مشاهده شده که در این رابطه حتی تاثیر افزودن جلبک بصورت زنده و یا جلبک‌های خشک شده منجمد، می‌تواند در مواردی یکسان باشد (Navarro *et al*., 1999). بررسی Peredo-Alvarez و همکاران در سال ۲۰۰۳، نشان داده است که برخی از روتیفرهای آب شیرین، با افزایش مقدار غذای جلبکی (از نوع *Chlorella vulgaris*)، تحت تاثیر نمک محیط آزمون واقع نشده و تعداد روتیفرهای آب شیرین با افزایش مقدار غذای جلبکی موجود در محیط افزایش می‌یابد، بنابراین تغذیه جلبکی در این مورد توانسته یک اثر محافظتی در کاهش اثر نمک محیط کشت نشان‌دهد. با این حال در رابطه با آبزیانی که در محیط‌های شور پرورش می‌یابند، استفاده از فیتوپلانکتون‌هایی که شوری را تحمل نموده و به راحتی در آن تقسیم و تکثیر نمایند، ضروری می‌نماید. از سوی دیگر جلبک‌هایی نظیر دانالیه‌لا که حاوی ارزش غذایی بالائی هستند را می‌توان بصورت خشک شده نیز به محیط پرورش آبزیان افزود (Nutra - Kol. Nutrition solutions).

نتایج بدست آمده از آزمون حاضر که به منظور کشت و پرورش جلبک در شرایط ساده کارگاهی صورت گرفته نشان می دهد که، بیشترین تعداد سلول ها (با نرخ رشد ویژه تقریبا $۰/۱۹\ day^{-1}$)، مربوط به سویه ایرانی بوده که بترتیب در مولاریته‌های ۰/۵ (تحت شرایط نوری $۱۵۰\pm۱۰\mu E$) و ۰/۱ مولار نمک (تحت شرایط نوری $۵۰\pm۱۰\mu\ \mu E$)، در اثر ادامه حرکت

صعودی منحنی‌های رشد در مرحله لگاریتمی کشت بدست آمده و تا روز ۲۴ام (پایان آزمون) نیز، شروع مرحله ایستایی رشد مشاهده نمی‌شود. بر اساس نظر Lavens و Sorgeloos در سال ۱۹۹۶، نکته کلیدی در کشت جلبک‌های فیتوپلانکتونی، نگهداری و باقی ماندن کشت در مرحله لگاریتمی است که بدلیل تازه بودن تولیدات جلبکی و قابلیت هضم بهتر آنها از اهمیت بیشتری برخوردار است. اما در این مورد، سویه خارجی (*D. bardawil*) بویژه در شرایط نور بیشتر، کاهش تقسیمات سلولی و ورود منحنی رشد به مرحله ایستایی را در اکثر غلظت‌های نمکی نشان می‌دهد. نتایج برخی از گزارشات، حاکی از تاثیر تحریک کننده و یا ممانعت کننده نور بر روی تقسیم سلولی در سویه‌های متفاوت جلبک دانالیه‌لا است (مددکار حق‌جو، ۱۳۹۲). با این حال در تحقیق حاضر، تاثیر افزایش نور در سویه ایرانی، بصورت جابجا شدن ادامه روند رشد (یا بعبارتی تداوم مرحله لگاریتمی رشد) از مولاریته ۰/۱ به سمت مولاریته‌های بالاتر ۰/۵ و ۱، نمایان شده است. در همین شرایط، رشد و ادامه مرحله لگاریتمی بر اثر افزایش شدت نور در مولاریته ۳ مولار سویه *D. bardawil*، حالت مشابهی را نشان می‌دهد. García و همکاران در سال ۲۰۰۷، کاهش نرخ رشد ویژه جلبک دانالیه‌لا را با افزایش غلظت نمک محیط کشت از ۱۰ تا ۳۵ درصد نشان دادند که با بخش اول نتایج بدست آمده همخوانی دارد، با اینحال به نظر می‌رسد که درک دلیل اثر تحریک کنندگی نور بر روی رشد در غلظت‌های نمکی بالا (نظیر ۳ مولار در آزمون حاضر) نیازمند بررسی‌های فیزیولوژیک بیشتری است، زیرا یافته‌های علمی دال بر آن هستند که با افزایش غلظت نمک، میزان تولید ترکیباتی نظیر گلیسرول در دانالیه‌لا، افزایش یافته و این افزایش تولید، بالعکس نیازمند کاهش رشد و صرف انرژی سلول در مسیر تولید گلیسرول به جای تقسیمات سلولی است (Arun and Singh, 2013; Jones and Galloway, 1797).

بر اساس نتایج Shamra و همکاران در سال ۲۰۱۲، ماکزیمم تعداد سلول‌های بدست آمده از یک سویه استخراج شده از هند، طی ۸ روز از آغاز کشت، در نور $50\pm10\mu E$، تقریبا معادل $1/96\times10^{6}$ cells/ml و با نرخ رشد برابر ۰/۵ تقسیم بر روز، در مولاریته ۱/۷ مولار بوده است. در مقایسه سویه ایرانی با مرحله لگاریتمی طولانی‌تر (۱۲ روز)، نرخ رشد کمتر از نصف ولی با ماکزیمم تعداد سلول 12×10^{6}cells/ml (تقریبا هفت برابر)، در مولاریته ۱/۵ مولار و شرایط نوری مشابه، از جهات یاد شده می‌تواند دارای مزیت باشد.

بر اساس نتایج بدست آمده، بطور کلی پروتئین سلول، در شرایط نور بیشتر برای هر دو سویه افزایش نشان داده و همچنین ماکزیمم مقدار را برای مولاریته‌های پایین‌تر (۰/۱ و ۰/۵) در نور $150\pm10\mu E$ به جای مولاریته بالاتر (۳ مولار) در نور $50\pm10\mu E$ نشان می‌دهد. بنابراین به نظر می‌رسد میزان نور و غلظت نمک هر دو با هم بر میزان پروتئین سلول تاثیرگذارند. نتایج آنالیز واریانس، معنی‌دار بودن اثر متقابل نور و شوری در این آزمون را در $P<0/05$ نشان می‌دهد. به نظر می‌رسد که واکنش‌های سازگاری با شدت نوری بالاتر و نیز ادامه تقسیمات سلولی، نیازمند فعالیت بیشتر سیستم سنتز پروتئین سلول در این شرایط باشد. نتایج آزمون Kirrolia و همکاران در سال ۲۰۱۱ نشان داد که میزان پروتئین جلبک سندسموس (*Senedesmus*) در مولاریته‌های پایین کاهش یافته در حالیکه در پاسخ به افزایش مولاریته، افزایش می‌یابد. همچنین بر اساس یافته‌های Chen و Jiang در سال ۲۰۰۹، در غلظت‌های بالای شوری محیط، بیان برخی آنزیم‌های سازگار کننده در *Dunaliella* افزایش می‌یابد. نتایج بدست آمده از آزمون حاضر در شرایط نور کم با نتایج محققین فوق، همخوانی نشان می‌دهد. اما با افزایش شدت نور، مولاریته‌های زیر ۱ مولار نمک، محتوای پروتئینی خود را بیشتر از سایر مولاریته‌ها افزایش داده و بنظر می‌رسد که خود را از طریق سنتز پروتئین‌های

مختلف ضروری با شرایط جدید سازگار می‌نمایند. افزایش مقدار پروتئین در هر دو سویه و هر دو شدت نوری، در روز ۸ام آزمون ملاحظه می‌گردد که مرحله لگاریتمی رشد بوده و تمهیدات لازم برای فراهم نمودن شرایط مناسب برای رشد و سازگاری در این مرحله ضروری به نظر می‌رسد، با ادامه رشد و افزایش سن سلول‌ها، مقدار پروتئین در تمامی نمونه‌ها کاهش می‌یابد. بنابراین به نظر می‌رسد در مواردی که ارزش غذایی پروتئینی جلبک مد نظر باشد می‌توان به برداشت سلول‌ها در روز هشتم و تحت شرایط نوری بالاتر اقدام نمود. بالاتر بودن میزان پروتئین سلول‌ها در مولاریته‌های پایین، نظیر ۰/۱ مولار، می‌تواند به عنوان یک مزیت در مواردی که شوری بالا در پرورش آبزیان مد نظر نیست تلقی گردد.بالاترین مقدار وزن خشک برای سلول‌های سویه ایرانی در مولاریته ۰/۵ مولار نمک، روز ۸ام کشت در شرایط نوری ۱۵۰ و نیز در مولاریته ۳ مولار در شدت نوری پایین‌تر بدست آمده و برای سویه *D. bardawil* نیز در مولاریته ۳ مولار ، در همین شرایط قابل مشاهده است که با افزایش شدت نور به ۱۵۰ و تحریک تقسیم سلولی در این مولاریته، به حداقل مقدار کاهش می‌یابد زیرا تقسیمات سریع از تجمع ماده خشک سلول ممانعت می‌نمایند. مشابه این حالت در ارتباط با محتوای رنگدانه‌ای سلول‌ها نیز قابل مشاهده است بطوریکه غلظت نمکی که کمترین سرعت تقسیمات سلولی را موجب می‌شود، سبب تجمع بیشترین میزان رنگدانه در سلول می‌گردد که از روز هشتم به بعد به وضوح در سویه ایرانی در نور کم قابل مشاهده است. طی چند روز ابتدای رشد به منظور سازگاری سلول‌ها و سیستم فتوسنتزی با شوری محیط، میزان کلروفیل و همینطور کاروتنوئیدها کاهش می‌یابند.

کاهش وزن خشک با افزایش سن کشت از روز ۱۶ به روز ۲۴ در اکثر غلظت‌های نمکی هر دو سویه مشاهده می‌شود، که می‌توان آن را با فقر غذایی محیط کشت جلبک در اواخر آزمون مرتبط دانست. نتایج آماری معنی‌دار بودن اثر اصلی زمان و اثر متقابل زمان و سویه را بر وزن تر و نیز خشک جلبک نشان می‌دهد. افزایش وزن تر سلول نیز در هر دو سویه با افزایش شدت نور در روزهای ابتدائی تر رشد (۸ام) ملاحظه می‌گردد.

بررسی وضعیت رنگدانه‌ها حاکی از آن است که تاثیر افزایش نور بصورت کاهش مقدار کلروفیل و به تبع آن کاروتنوئیدها و بتاکاروتن در هر دو سویه نمایان می‌شود، که در سویه ایرانی به دلیل سرعت رشد و افزایش تقسیمات از کاهش بیشتری برخوردار است. کاهش میزان کلروفیل در واقع بصورت یک مکانیسم تنظیمی، سبب کاهش انرژی نوری جذب شده و تخفیف آثار زیانبار نور می‌گردد (Smith, *et al.*, 1990).بر اساس یک نظر، یک سویه ممکن است بتواند با افزایش سرعت تقسیمات، میزان نور دریافت شده توسط هر سلول را کاهش دهد (Ben-Amotz, and Avron, 1983). بررسی وضعیت سویه *D. bardawil* در شرایط نوری بالاتر، بالعکس کاهش سرعت تقسیم و متعاقبا کاهش بطئی‌تر کلروفیل و ثبات نسبی مقدار بتاکاروتن و کاروتنوئیدها را بعنوان محافظین دستگاه فتوسنتزی سلول در برابر افزایش نور، نشان می‌دهد. کاهش مقدار کلروفیل در شدت نور کمتر ($۵۰\pm۱۰\mu E$)، در ابتدای کشت به علت اندک بودن تعداد سلول‌ها در محیط کشت و بنابراین زیاد بودن سهم نور تابیده شده به هر سلول می‌باشد که با افزایش تعداد سلول‌ها در محیط کشت کاهش می‌یابد. جالب آنکه، محتوای رنگدانه‌ای سلول‌ها (کاروتنوئیدها، بتاکاروتن و کلروفیل) با افزایش نور تقریبا مستقل از غلظت نمک محیط کشت شده، روند تغییرات تقریبا مشابهی را نشان می‌دهند. بنابراین بیشترین میزان محتوای رنگدانه‌ها، در شرایط شدت نور کمتر برای هر دو سویه قابل مشاهده می‌باشند. نتیجه‌گیری کلی آنکه بررسی و مطالعه ویژگی‌های سویه‌های بومی جلبک‌های میکروسکپی فیتوپلانکتونی از نظر شاخص‌های تغذیه‌ای مطلوب و

مهم در شرایط محیطی که بسادگی نیز قابل طراحی و اجرا باشند، حائز اهمیت می‌باشد. زیرا شناسایی هر چه دقیق‌تر قابلیت‌های جلبک می‌تواند محقق را در انتخاب نوع سویه، زمان مناسب برداشت و نیز محتوای تغذیه‌ای جلبک مورد نظر یاری داده و امکان پرورش آن را در شرایط ساده کارگاهی فراهم آورد، در این رابطه هر یک از دو سویه به لحاظ دارا بودن ویژگی‌های متفاوت، با توجه به اهداف مورد نظر در طرح پروش فیتوپلانکتون و ویژگی‌هایی که از نظر محقق بیشتر مد نظرند می‌توانند مورد استفاده قرار گیرند.

منابع

روفچائی، ر. پژند، ذ. چوبیان، ف. ارشاد لنگرودی، ه. ۱۳۸۸. تأثیر تغییرات دما و نور بر رشد جمعیت روتیفر آب شیرین. مجله علوم زیستی واحد لاهیجان، شماره۳، ۵۵-۴۵.

شریعتی، م. هادی، م. ۱۳۷۹. جداسازی و خالص سازی و شناسایی جلبک *Dunaliella salina* از حوضچه‌های تبخیر نمک در مرداب گاوخونی اصفهان. مجله زیست شناسی ایران، جلد ۹، شماره ۱ تا ۴، ۵۴-۳۹.

علی دادالهی، س. گراوند کریمی، م. عمادآبادی، ا. ۱۳۹۱. بررسی تغییرات فصلی پراکنش و میزان زیتوده جلبکهای غالب سواحل جزر و مدی استان بوشهر (ساحل شمالی خلیج فارس). مجله اقیانوس شناسی. سال سوم، شماره ۹، ۲۶-۱۷.

مددکار حق‌جو، م. ۱۳۹۲. بررسی مقایسه‌ای برخی شاخص‌های فیزیولوژیک (محتوای کلروفیلی، فعالیت فتوسنتزی) در گزینش سویه‌های جلبک *Dunaliella* sp. جداسازی شده از آبهای ایران. مجله سلول و بافت (علمی- پژوهشی)، جلد ۴، شماره ۱، ۱۰۲-۸۵.

Arun, N. and D. P. Singh. 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. J Mar Biol Ass India. 55: 65-70.

Avron, M. and Ben-Amotz, A. 1992. *Dunaliella*: physiology, biochemistry and biotechnology. CRC Press, Boca Raton. 2 p.

Becker, E. W. 2007. Micro-algae as a source of protein. Biotechnol. Adv. 25: 207-210.

Ben-Amotz, A., Katz, A. and Avron, M. 1982. Accumulation of beta-carotene in halotolerant algae: purification and characterization of B-carotene-rich globules from *Dunaliella bardawil* (Chlorophyceae). J. Phycol. 18: 529-537.

Ben-Amotz, A. and Avron, M. 1983. On the factors which determine massive beta-carotene accumulation in the halotolerant alga. Plant Physiol. 72: 593-7.

Berube, K. A., Roessler, J., Jones, T. P. and Janes, S. 1994. The determination of volume of *Dunaliella* cells by transmission electron microscopy and image analysis. Ann. Bot. 73: 481-491.

Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-Dye binding. Anal. Biochem. 72: 248-254.

Chen, H. and Jiang, J. 2009. Osmotic responses of *Dunaliella* to the changes of salinity. J. Cell. Physiol. 219: 251-8.

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

Fazeli, M. R., Tofighi, H., Samadi, N. and Jamalifar, H. 2006. Effects of salinity on β-carotene production by *Dunaliella tertiolecta* DCCB26 isolated from the Urmia salt lake, north of Iran. Bioresour. Techno. 97: 2453-2456.

Garcia, F., Freile-Pelegrin, Y. and Robledo, D. 2007. Physiological characterization of *Dunaliella* sp. (Chlorophyta Volvocales) from Yucatan, Mexico. Bioresource Technology. 98: 1359-1365.

Hadi, M. R., Shariati, M. and Afsharzadeh, S. 2008. Microalgal biotechnology; carotenoid and glycerol production by the green algae *Dunaliella* isolated from the Gave-Khooni salt

De Clerck, O. 2012. Phylogeny and molecular evolution of the green algae. Crit Rev Plant Sci. 31: 1-46.

Levent İnanç, A. 2011. Chlorophyll: Structural properties, health benefits and its occurrence invirgin olive oils. Akademik Gıda. 9: 26-32.

Navarro, J. C., Henderson, R. J., McEvoy, L. A., Bell, M. B. and Amat, F. 1999. Lipid conversion during enrichment of Artemia. Aquaculture. 174: 155–166.

Nikookar, K., Moradshahi, A. and 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 J. Sci. Technol. Transact. 28: 117-125.

Omori, M. Ikeda, T. 1984. Methods in marine zooplankton ecology, John Wiley and Sons Inc, New York, 332 p.

Peredo-Alvarez, V. M.و Sarma, S. S. and Nandini, S. 2003. Combined effect of concentrations of algal food (*Chlorella vulgaris*) and salt (sodium chloride) on the population growth of *Brachionus calyciflorus* and *Brachionus patulus* (Rotifera). Rev Biol Trop. 51: 399-407.

Phang, S. M. 1992. Role of alga in livestock-fish integrated farming system. (eds) T. K. Mukherjee, P. S. Moi, Panandam and Y. S. Yang). Proceeding of the FAO/IPT Workshop on Integrated Livestock-fish Production System, 16-20 Dec., 1991, University of Malaya, Kuala Lumpur, Malaysia. Pp: 49-56.

Ramakrishna, A., Dayananda, C., Giridhar, P., Rajasekaran T. and Ravishankar, G. A. 2011. Photoperiod influences endogenous indoleamines in cultured green alga *Dunaliella bardawil*. Indian J Exp Biol . 49: 234-240.

Shamra, P., Agarwal, V., Mohan, M. K., Kachhawaha, S. and Kothari, S. L. 2012. Isolation and characterization of *Dunaliella* species from Sambhar Lake (India) and its phylogenic position in the genus *Dunaliella* using 18S rDNA. Natl. Acad. Sci. Lett. 35: 207-213.

Pick, U., 2004. Adaptation of the halotolerant alga *Dunaliella* to high salinity, salinity: Environ. Plants Molecules. Pp: 97-112.

Smith, B. M., Morrissey, P. J., Guenther, J. E., Nemson, J. A., Harison, M. A. Allen, J. F.and Melis A. 1990. Response of the photosynthetic apparatus in *Dunaliella salina* (green alga) to irradiance stress. Plant Physiol. 93: 1433-1440.

marsh, Iran. Biotechnol. Bioprocess Enjineering. 13: 540-544.

Haghjou, M. M., Shariati, M. and 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. Physiol Plant. 135: 272-280.

Halama, D. 1990. Single cell protein. In : Boda, K. (ed). Nonconventional feed stuffs in the nutrition of farm animals. Elsevier Science Publishing Company, Inc. 655 Avenue of Americas, New York, N.Y. 10010. Pp: 34-49.

Hartmut, K., Lichtenthaler, H. and Claus, B. 2001. Chlorophylls and carotenoids: measurement and characterization by UV-VIS spectroscopy. Curent Protocols in Food Anal. Chem. Copyright © by John Wiley & Sons, Inc. F4.3.1-F4.3.8

Hosseini Tafreshi, A. and Shariati, M. 2006. Pilot culture of three strains of *Dunaliella salina* for β-caroten production in open ponds in the central region of Iran. World J. Microb. Biotechnol. 22: 1003-1009.

Hutching, J. B. 1994. Food color and appearance. Blackie Academic and Professional, London.

Johnson, M. K., Johnson, E. J., Macelory, R. D., Speer, H. L. and Bruff, B. S. 1968. Effect of salts on halophilic alga *Dunaliella viridis*. J. Bacteriol. 95: 1461-1468.

Jones, T. W., Galloway, R. A. 1797. Effect of light quality and intensity on glycerol content in *Dunaliella tertiolecta* (Chlorophyceae) and the relationship to cell growth/osmoregulation. J. Phycol. 15: 101-106.

Kirrolia, A., Bishnoi, N. R. and Singh, N. 2011. Salinity as a factor affecting the physiological and biochemical traits of *Scenedesmus quadricauda*. J. Algal Biomass Utln. 2: 28-3.

Latała, A. 1991. The effects of salinity, temperature and light on the growth and morphology of green planktonic algae. Oceanologia. 31: 119–138.

Lavens, P. and Sorgeloos, P. 1996. Manual on the production and use of live food for aquaculture. FAO Fishers Technical Paper, 361. Available on: ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/003/w3732e/w3732e00.pdf

Leliaert, F., Smith, D. R., Moreau, H., Herron, M. D., Verbruggen, H., Delwiche, C. F. and

Nutra - Kol. Nutrition solutions, Red Revolution, *Dunaliella salina*, Available on: http://www.nutrakolusa.com/index.php?page_id=105

Evaluation of growth rate, protein content and some physiological characteristics from two salt water phytoplanktonic species, microalga *Dunaliella*, under different environmental conditions

Roya Mohammadkhani, Maryam Madadkar Haghjou*

Biology Department, Faculty of Science, Lorestan University, Khoramabad, Iran

Abstract:

Regarding the importance and selection of phytoplankton culturing for feeding marine zooplankton and fishes, under simple and practical conditions, two species of an unicellular green alga, *Dunaliella* sp. (isolated from Iran) and *D.bardawil*-UTEX 2538, were cultured and their growth characteristics were studied under different environmental light intensities (50μE and 150μE) and salt concentrations (0.1,0.5,1,1.5, 2 and 3M NaCl).*Dunaliella* sp. was different from *D.bardawil* because of having the longer logarithmic growth phase, higher number of cells (19×10^6 cells.ml^{-1}) in 0.1M and 0.5M at light intensities of 150μE and 50μE respectively, higher chlorophyll and carotenoid contents, bigger size of cells ($307.16\pm87.95\mu m^3$) and higher dry weight at 0.5M on 8th day from the beginning of experiment under 150μE, than those in *D.bardawil*. Protein content from the cells increased in both strains on 8th day but the maximum amount was belonged to *D.bardawil* under 150μE. The highest specific growth rate (SGR) and the lowest doubling time (DT) were seen under 50μE at 0.1 M and 0.5 M (Iranin species and *D.bardawil*, respectively) and under 150μE in 0.5M (Iranian species) and 1M and 1.5M (*D.bardawil*). The highest SGR and the lowest DT of *D.bardawil* was at 50μE and for *Dunaliella* sp. was at 150μE (both at 0.5M). Increasing in light intensity from 50 μE to150μE, caused decrease in chlorophyll and carotenoid contents and conversely increase in protein content (also the highest amount of fresh weight on 8thday) in most of the samples. Overall, Iranian species at lower salt concentrations showed better growth and higher efficiency.

Keywords: Marine organism feeding, Micro alga *Dunaliella*, Phytoplankton, Protein content, Specific growth rate