فیزیولوژی و بیوتکنولوژی آبزیان
سال دوازدهم، شماره سوم، پاییز ۱۴۰۳

مقاله پژوهشی

# اثر روش تثبیت و تنش شوری (کلرید سدیم) بر شاخص‌های رشد، تجمع کاروتنوئید و کربوهیدرات در ریزجلبک *Dunaliella salina*

مسعود حیدری‌زاده[۱]*، نگار الفتی[۲]، سید فصیح صادقی[۲]

DOI: 10.22124/japb.2024.25973.1520
تاریخ دریافت: آبان ۱۴۰۲ تاریخ پذیرش: بهمن ۱۴۰۲

**چکیده**

ریزجلبک‌ها برای تولید ترکیبات با ارزش طبیعی مورد استفاده قرار می‌گیرند. بازده کم و هزینه بالا، پتانسیل تجاری ریزجلبک‌ها را محدود می‌کند. اخیرا تکنیک‌های بی‌حرکت‌سازی و افزایش بهره‌وری تولید مورد توجه قرار گرفته‌اند. در این پژوهش، تاثیر غلظت‌های مختلف نمک (کلرید سدیم)، روش تثبیت و مدت دوره رشد بر زی‌توده، کربوهیدرات، کاروتنوئید، کلروفیل‌های a و b در ریزجلبک *Dunaliella salina* ارزیابی شد. نتایج نشان داد در شرایط آزاد رشد ریزجلبک به طور معنی‌داری بیشتر از شرایط تثبیت بود. در شوری ۱۵۰ و ۳۰۰ گرم در لیتر رشد ریزجلبک به طور معنی‌داری کاهش یافت. بیشترین زی‌توده در شوری ۷۵ گرم در لیتر و شرایط کشت آزاد اندازه‌گیری شد. مقدار کاروتنوئید در شوری ۷۵ گرم در لیتر و شرایط بدون تثبیت از تیمارهای دیگر بیشتر بود. کربوهیدرات در شوری ۳۰ گرم در لیتر به طور معنی‌داری از تیمارهای دیگر بیشتر بود. در غلظت ۱۵۰ گرم در لیتر، کربوهیدرات در شرایط تثبیت به طور معنی‌داری بیشتر بود. به نظر می‌رسد ترکیب بستر و همچنین روش اعمال تثبیت یک عامل اثرگذار باشد. تنش شوری یک روش ساده و ارزان برای القای تولید کاروتنوئید است. پژوهش در زمینه بهینه‌سازی ماده مورد استفاده و همچنین روش اعمال تثبیت برای افزایش بازده تولید ترکیبات باارزش ضروری به نظر می‌رسد.

**واژگان کلیدی:** *روش تثبیت*، Dunaliella salina، *شوری*، *کاروتنوئید*.

۱- استادیار گروه علوم زیستی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران.
۲- کارشناس ارشد بیوشیمی، گروه علوم زیستی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران.
* نویسنده مسئول: m.haidarizadeh@uok.ac.ir

**مقدمه**

ریزجلبک‌ها به عنوان منابعی برای تولید رنگدانه، پروتئین، اسیدهای چرب، ترکیبات با خاصیت اسمزی بالا و همچنین به عنوان ماده فعال سطحی (Biosurfactants) و امولسیون کننده‌های طبیعی (Bioemolsifires) مورد استفاده قرار می‌گیرند. ریزجلبک *Dunaliella salina* از جلبک‌های سبز، تک سلولی و فتوسنتز کننده‌ایی است که در گستره وسیعی از غلظت‌های نمک رشد می‌کند. *D. salina* به عنوان میکروارگانیسمی منتخب و مناسب در زیست‌فناوری و زیست‌شناسی مولکولی مورد توجه است. این جلبک همچنین منبع مهمی برای تولید گلیسرول، بتاکاروتن و دیگر ترکیبات باارزشی است که به عنوان مکمل غذایی استفاده می‌شوند (Mathimani et al., 2017).

ریزجلبک *D. salina* یک منبع زیستی اصلی برای تولید بتاکاروتن است، به طوری که ۱۰ تا ۱۵ درصد وزن آن را بتاکاروتن تشکیل می‌دهد (Ye et al., 2008). کشت *D. salina* مهم‌ترین روش طبیعی تولید بتاکاروتن است. از سال ۱۹۸۰ به صورت تجاری و صنعتی برای تولید پودر این جلبک و بتاکاروتن از این روش استفاده می‌شود. با افزایش جمعیت و نیاز به انرژی، ریزجلبک‌ها برای تولید سوخت‌های زیستی نیز مورد توجه قرار گرفته‌اند. بتاکاروتن در زمینه پزشکی و دارویی برای سلامت قلب، خواص آنتی‌اکسیدانی و ضدسرطانی و بهبود دهنده سیستم ایمنی مورد استفاده قرار می‌گیرد. این ریزجلبک بیش از ۹۵ درصد انواع کاروتنوئیدها را تولید می‌کند (Zarandi-Miandoab et al., 2019). تولید تجاری بتاکاروتن به عنوان سومین صنعت مرتبط با ریزجلبک‌ها طبقه‌بندی می‌شود. به علت نداشتن دیواره سخت سلولی، قابلیت هضم آسان ممانعتی در مصرف آنها نیز وجود ندارد (Lamers et al., 2008).

در شرایط محیطی سخت و تنشی مانند دمای بالا، شوری زیاد، تشعشع و نور شدید و منابع نیتروژنی کم، تولید کاروتنوئید در کلروپلاست این جلبک القا شده و جلبک به رنگ نارنجی دیده می‌شود. *D. salina* می‌تواند به تغییرات ناگهانی در محیط همانند غلظت نمک سازش یابد (Jimenez and Pick, 1994). رنگ *D. salina* در شرایط تنشی افزایش شدت نور، شوری زیاد، عرضه ناکافی مواد مغذی و افزایش دما از سبز تا قرمز تغییر می‌کند (Nguyen et al., 2016). تجمع بتاکاروتن در پلاستوگلوبین‌ها باعث کاهش نسبت کلروفیل به

کاروتنوئید می‌شود. این توانایی باعث می‌شود که ریزجلبک *D. salina* به عنوان یک منبع زیستی عالی برای زمینه‌های تجاری عمل کند (Tran et al., 2014). سیستم‌های کشت بسته در مقایسه با مخازن باز باعث تولید غلظت‌های بیشتری از کاروتنوئید می‌شوند (Pasqualetti et al., 2011). برای کاهش نرخ رشد در سیستم‌های صنعتی باید شدت نور و مقدار نمک زیاد و محدودیت مواد غذایی در نظر گرفته شود. تنش ایجاد شده توسط غلظت زیاد نمک، تقسیم سلولی را کند می‌کند، اندازه جلبک را کاهش و تحرک را افزایش می‌دهد. همچنین میزان رشد به سرعت توسط تنش نمکی متاثر می‌شود (Ben-Amotz et al., 2009). مطالعات نشان داده‌اند زمانی که غلظت نمک از ۴ به ۹ درصد افزایش می‌یابد، تولید بتاکاروتن در ریزجلبک *D. salina* حدود ۳۰ برابر افزایش می‌یابد (Hosseini Tafreshi and Shariati, 2009). کاهش نرخ رشد توسط تنش‌های غیرزیستی نقش مهمی در بیشینه کردن تولید بتاکاروتن دارد. بنابراین با ایجاد تنش می‌توان به محصولات با ارزشی دست یافت که قابلیت استفاده در زمینه‌های مختلف را دارند. با توجه به تاثیر تنش شوری روی تولید بتاکاروتن در ریزجلبک *D. salina* و اهمیت بتاکاروتن در زمینه‌های مختلف بویژه زمینه پزشکی، با توجه به شرایط اکولوژیکی خاص ایران و وجود منابع زیست طبیعی این جلبک مانند دریاچه‌های فوق اشباع ارومیه، قم، حوض سلطان و غیره امکان استخراج و جداسازی آن وجود دارد. هدف از این مطالعه ارزیابی شرایط مناسب رشد و تولید بهینه کاروتنوئید در جلبک *D. salina* است. در بسیاری از ریزجلبک‌ها استفاده از برخی از تکنیک‌های بی‌حرکت‌سازی مصنوعی یک راهبرد موثر برای افزایش سرعت رشد و تولید زی‌توده و متابولیت‌ها است (Moreno-Garrido, 2013). افزایش معنادار تولید زی‌توده و اگزوپلی‌ساکاریدهای نهایی در کشت تثبیت شده نسبت به کشت آزاد و سوسپانسیونی گزارش گردیده است در حالی که پروفایل ترکیبات قندی و اسید چرب هیچ تغییری نداشته است (Calderon et al., 2018).

با هدف تولید ترکیبات با ارزش و برای دستیابی به بالاترین بازده، علاوه بر بررسی تاثیر شاخص‌های محیطی موثر در افزایش رشد ریزجلبک و زی‌توده، تکنیک‌های مختلف کشت (تثبیت، آزاد) *D. salina* آزموده می‌شود. در بسیاری از میکروارگانیسم‌ها بی‌حرکت‌سازی یک روش موثر برای افزایش رشد و تولید زی‌توده و متابولیت‌ها است. بستر مورد استفاده برای

تکنیک تثبیت و بی‌حرکت‌سازی، مواد ارزان قیمتی هستند که بوفور در دسترس هستند و هیچ آسیبی به محیط و خود میکرواورگانیسم نمی‌رسانند. اثر تکنیک تثبیت بر سرعت رشد و میزان تولید زی‌توده ریزجلبک برای پتانسیل تولید ترکیبات با ارزش، تعیین مقدار و همچنین تعیین نوع پلی‌ساکاریدهای استخراجی و بررسی میزان و شرایط رشد ریزجلبک در شوری‌های مختلف در پژوهش‌های متعددی ارزیابی شده است.

این پژوهش با هدف بررسی و ارزیابی اثر سطوح مختلف شوری (کلرید سدیم) و همچنین اثر روش تثبیت بر رشد و تولید کاروتنوئید و کربوهیدرات استخراج شده از ریزجلبک *D. salina* انجام شد. به نظر می‌رسد که درجات مختلف شوری و همچنین تکنیک تثبیت بر رشد و تولید کاروتنوئید و کربوهیدرات استخراجی تاثیر داشته باشد.

## مواد و روش‌ها

در این پژوهش کشت فعال نمونه ریزجلبک *Dunaliella salina* (ADT004) از شرکت توسعه ذخایر زیستی جلبک فارس (شیراز) تهیه شد و در شرایط کاملا ایزوله و با استفاده از محیط کشت اصلاح شده f/2 در دوره رشد ۳۶ روزه مورد مطالعه قرار گرفت. روش کشت در دو سطح کشت تثبیت (Immobilization) و کشت آزاد (No Immobilization) و غلظت‌های مختلف نمک در سطوح ۰ (شاهد)، ۳۰، ۷۵، ۱۵۰ و ۳۰۰ گرم در لیتر به صورت طرح آزمایشی آماری فاکتوریل با سه تکرار طراحی شد. شرایط کشت تثبیت با اضافه کردن قطعات یکسان (با ابعاد ۲ سانتی‌متر) پلی‌اتیلنی که به عنوان فیلتر در آکواریوم‌ها به کار می‌رود و به عنوان فوم شناخته می‌شود، به محیط‌های کشت طراحی شد. کشت آزاد بدون حضور این قطعات در ظروف کشت اعمال شد.

### روش کشت

۱۰ میلی‌لیتر از سوسپانسیون کشت سلولی خالص جلبک *D. salina* (ذخایر زیستی فارس، ایران) به ۲۴۰ میلی‌لیتر محلول غذایی اصلاح شده f/2 (ذخایر زیستی فارس، ایران) در یک ارلن ۵۰۰ میلی‌لیتری استرلیزه شده اضافه شد و در شرایط کاملا ایزوله از نظر دما، نور و هوادهی (هوادهی توسط پمپ ۲۴ ساعته) کشت شد. دمای اتاق کشت به وسیله کولر آبی در بازه ۲۸-۲۲ درجه سانتی‌گراد تنظیم شد. اتاق اختصاصی کشت با شرایط نوری ۱۲ ساعت روشنایی ۱۲ ساعت تاریکی با میزان نور تابشی

حدود ۱۵۰۰ لوکس تنظیم شد (Mahdian, 2022).

سطوح مختلف شوری با اضافه کردن نمک به محیط کشت در غلظت‌های ۳۰۰، ۱۵۰، ۷۵، ۳۰ و ۰ (شاهد) گرم در لیتر و در دو شرایط تثبیت و آزاد طراحی شد. در روزهای مختلف در طول دوره رشد ۳۶ روزه بر اساس جدول شماره ۱ نمونه‌برداری از محیط‌های کشت انجام و شاخص‌های مورد نظر اندازه‌گیری شد.

**جدول ۱: جدول زمانی برداشت نمونه از محیط کشت برای اندازه‌گیری شاخص‌ها**

| نمونه | تاریخ برداشت | طول دوره رشد (روز) |
|---|---|---|
| ۱ | ۱۴۰۰/۰۳/۱۳ | ۰ |
| ۲ | ۱۴۰۰/۰۳/۱۶ | ۳ |
| ۳ | ۱۴۰۰/۰۳/۱۹ | ۶ |
| ۴ | ۱۴۰۰/۰۳/۲۲ | ۹ |
| ۵ | ۱۴۰۰/۰۴/۰۳ | ۲۱ |
| ۶ | ۱۴۰۰/۰۴/۰۶ | ۲۴ |
| ۷ | ۱۴۰۰/۰۴/۱۳ | ۲۷ |
| ۸ | ۱۴۰۰/۰۴/۱۶ | ۳۰ |
| ۹ | ۱۴۰۰/۰۴/۱۹ | ۳۳ |
| ۱۰ | ۱۴۰۰/۰۴/۲۲ | ۳۶ |

۵ میلی‌لیتر از تیمارهای مختلف محیط کشت برداشت شد و جذب نوری را در طول موج ۶۸۰ نانومتر به وسیله دستگاه اسپکتروفوتومتر (Unico، 2100، ایران) اندازه‌گیری و نتایج ثبت شد. پس از اتمام آزمایش و خارج کردن قطعات تثبیت از محیط‌های کشت و شست و شوی آنها، وزن زی‌توده نهایی تولید شده اندازه‌گیری شد. برای شمارش سلولی از لام هموسیتومتر نئوبار (Neubauer) استفاده شد. پس از اتمام دوره رشد زی‌توده نهایی تولید شده با دستگاه سانتریفیوژ (Labofuge 400، Heraeus، امریکا) به مدت ۵ دقیقه و دور ۴۸۵۹g جمع‌آوری و توزین شد (Olfati, 2022).

### سنجش رنگیزه‌ها

برای اندازه‌گیری مقدار کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل کل و کاروتنوئید جذب عصاره به ترتیب در طول موج‌های ۶۴۵ و ۶۶۳ و ۴۷۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفوتومتر اندازه‌گیری و از رابطه‌های ۱ تا ۴ برای محاسبه مقدار رنگیزه‌ها استفاده شد (Arnon, 1967).

**رابطه ۱:**

$$\text{Chl a (mg/g)} = [0.0127\,(A_{663}) - 0.00269\,(A_{645})] \times 100 / W$$

**رابطه ۲:**

$$\text{Chl b (mg/g)} = [0.0229\,(A_{645}) - 0.00468\,(A_{663})] \times 100 / W$$

**رابطه ۳:**

$$\text{Total} = \text{Chl a} + \text{Chl b}$$

**رابطه ۴:**

$$\text{Carotenoids} = [1000\ (A_{470}) - 2.270\ \text{Chl a} - 81.4\ \text{Chl b}] / 227$$

W: وزن‌تر بافت نمونه (میلی‌گرم)؛ $A_{663}$، $A_{645}$ و $A_{479}$: میزان جذب نمونه‌ها به ترتیب در طول موج‌های ۶۶۳، ۶۴۵ و ۴۷۹ نانومتر است.

**سنجش کربوهیدرات**

به منظور اندازه‌گیری مقدار کربوهیدرات، ۱۰ میلی‌لیتر از محیط کشت به مدت ۱۰ دقیقه در ۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس سوپرناتانت حذف شد و ۱۰ میلی‌لیتر اتانول ۸۰ درصد به رسوب باقی مانده اضافه و با کاغذ صافی صاف شد. ۲ میلی‌لیتر از محلول صاف شده برداشته و ۱ میلی‌لیتر فنل ۵ درصد به آن اضافه شد. سپس به این محلول ۵ میلی‌لیتر اسید سولفوریک غلیظ اضافه شد و پس از گذشت ۳۰ دقیقه جذب محلول به وسیله دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج ۴۸۵ نانومتر اندازه‌گیری شد. در نهایت، با استفاده از معادله خط منحنی استاندارد گلوکز غلظت کربوهیدرات نمونه‌ها محاسبه شد (Sadeghi, 2021).

**تهیه عکس میکروسکوپ الکترونی**

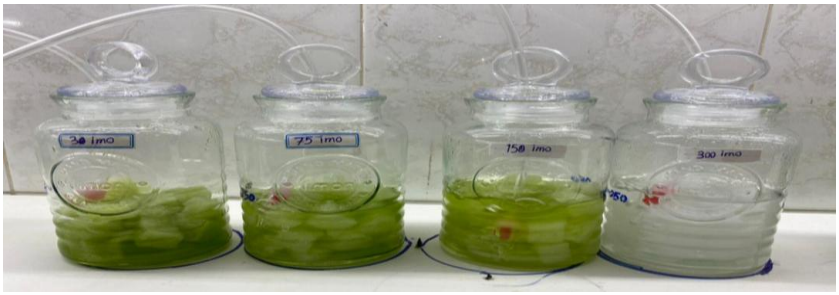
به منظور آماده‌سازی نمونه برای مطالعه با میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM) ۱/۵ میلی‌لیتر از محیط کشت *D. salina* برداشت شد. مراحل آماده‌سازی با استفاده از فیکساتور و تتراکسید اسمیوم انجام شد (Maleki et al., 2015) و عکس‌برداری با میکروسکوپ الکترونی نگاره (MIRA3، TESCAN، چک) در آزمایشگاه مرکزی دانشگاه کردستان صورت گرفت.

**تجزیه و تحلیل آماری**

در این پروژه، تجزیه و تحلیل داده‌ها و رسم نمودارها با نرم‌افزار SPSS 24 انجام شد. برای هر کدام از داده‌ها آزمون تحلیل واریانس دوطرفه برای مقایسه میانگین‌ها در سطح اطمینان ۹۵ درصد انجام و تاثیر سه شاخص غلظت‌های مختلف نمک، شرایط تثبیت و مدت زمان دوره رشد بر متغیرهای میزان رشد، شمارش سلول، زی‌توده، تولید کاروتنوئید، کربوهیدرات، کلروفیل a و کلروفیل b در ریزجلبک *D. salina* ارزیابی شد. به منظور ارزیابی معنی‌دار بودن تفاوت میانگین‌ها نیز پس‌آزمون دانکن اعمال شد.

**نتایج**

شکل‌های ۱ و ۲ به ترتیب کشت تثبیت و کشت آزاد *D. salina* را در روز ۲۱ نشان می‌دهند.

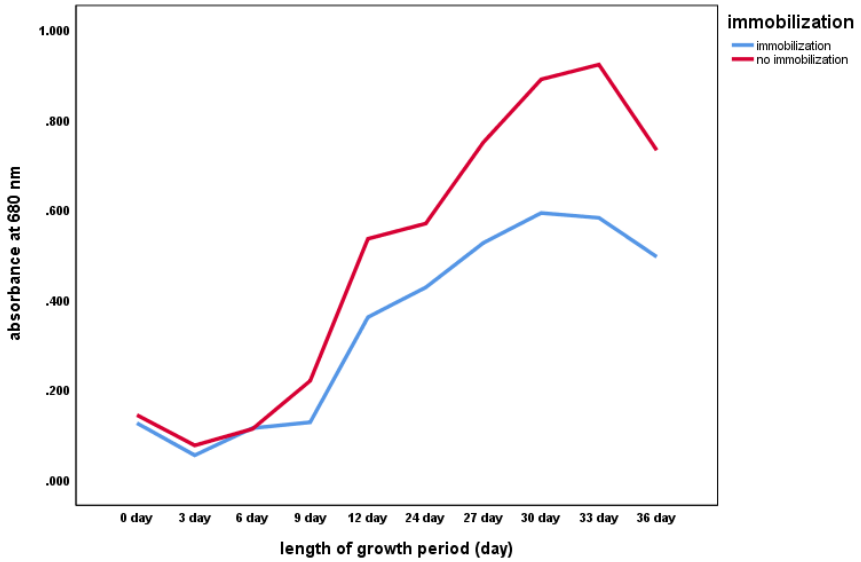



**شکل ۱: کشت ریزجلبک *Dunaliella salina* در غلظت‌های مختلف از نمک طعام در حالت تثبیت در روز بیست و یکم**

**شکل ۲: کشت ریزجلبک *Dunaliella salina* در غلظت‌های مختلف از نمک طعام در حالت آزاد در روز بیست و یکم**

دوره رشد به مدت ۳۶ روز ادامه یافت. در طول دوره رشد در ۱۰ بازه زمانی از همه تیمارها نمونه‌برداری شد و میزان رشد بر حسب شدت جذب و تعداد سلول اندازه‌گیری شد.

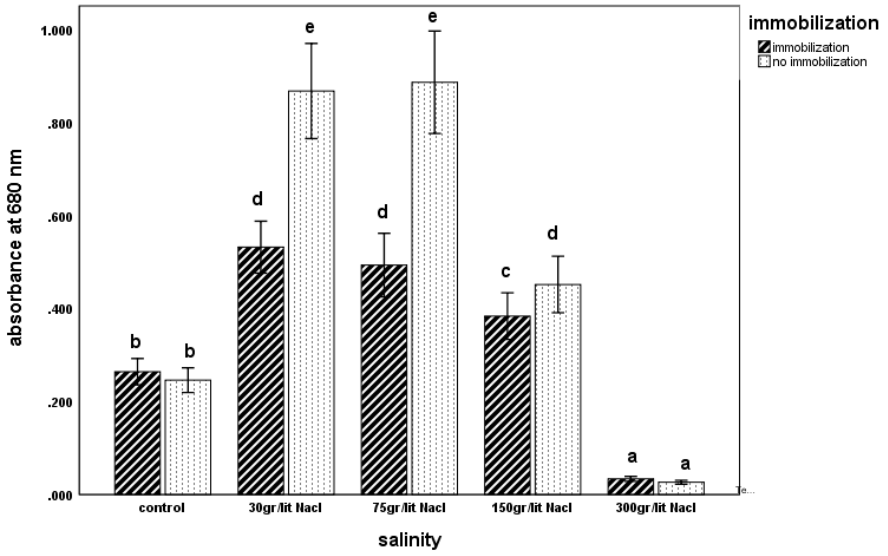
در شکل ۳ منحنی رشد نمونه شاهد در شرایط آزاد در مقایسه با شرایط تثبیت نشان داده شده است. نمونه شاهد در شرایط آزاد در مقایسه با شرایط تثبیت رشد بیشتری را نشان داد. الگوی تغییرات منحنی رشد در هر دو شرایط تثبیت و آزاد تقریبا مشابه بود. در هر دو شرایط در روز ۳۶ به طور معناداری رشد نمونه‌ها کاهش نشان داد. منحنی رشد شکل ۳ نشان می‌دهد مرحله اول یا فاز لگ در روزهای ۰ تا ۳ و مرحله دوم یا فاز لوگ در روزهای ۳ تا ۹ و مرحله سوم یا ایستا در روزهای ۱۲ تا ۳۰ و مرحله چهارم یا مرگ در روزهای ۳۳ تا ۳۶ رخ داد.




**شکل ۳: منحنی مقایسه رشد ریزجلبک *Dunaliella salina* در دوره رشد (۳۶ روز) در شرایط کشت تثبیت (Immobilization) و کشت آزاد (No Immobilization) بر اساس میزان جذب (Absorbance)**

بر اساس نتایج این پژوهش منحنی شکل ۳ نشان می‌دهد در شرایط آزاد میزان رشد ریزجلبک بیشتر از شرایط تثبیت بود. شرایط تثبیت در این آزمایش بر رشد اثر منفی داشت و رشد ریزجلبک را کاهش داد. در شکل بیشترین میزان رشد ریزجلبک در روز سی و سوم مشاهده شد و پس از آن میزان رشد کاهش یافت. در تمام نمونه‌گیری‌ها رشد و جذب در شرایط آزاد بیشتر از شرایط تثبیت بود.

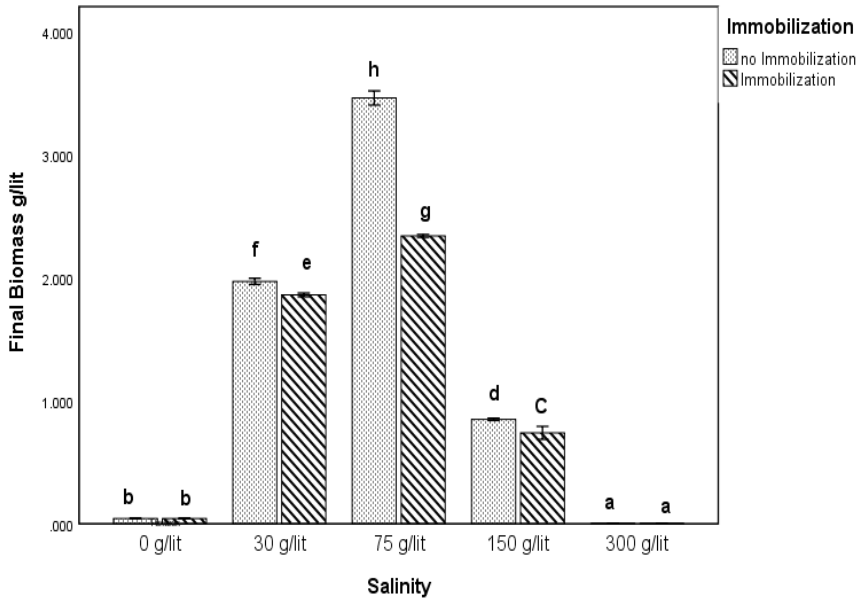
داده‌های نمودار شکل ۴ که از اندازه‌گیری جذب محیط کشت تیمارها در روز آخر رشد یعنی روز ۳۶ به دست آمده است، نشان می‌دهد با افزایش غلظت نمک تا غلظت ۷۵ گرم در لیتر، رشد *D. salina* افزایش یافت و در شوری ۷۵ گرم در لیتر بخوبی به رشد خود ادامه داد. اما در غلظت‌های ۱۵۰ و ۳۰۰ گرم در لیتر رشد *D. salina* به طور معنی‌دار کاهش یافت. با این وجود حتی در غلظت ۳۰۰ گرم در لیتر اگرچه رشد کاهش نشان داد، اما متوقف نشد. در مقایسه دو شرایط تثبیت و غیرتثبیت، *D. salina* در غلظت‌های ۳۰، ۷۵ و ۱۵۰ گرم در لیتر در شرایط غیرتثبیت رشد بیشتری را نسبت به شرایط تثبیت نشان داد.




**شکل ۴: اثر شوری (Salinity) و روش‌های کشت تثبیت (Immobilization) و آزاد (No Immobilization) بر رشد ریزجلبک *Dunaliella salina* در انتهای دوره پرورش (میانگین ± انحراف معیار). حروف متفاوت بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارها است (P<۰/۰۵).**

رشد ریزجلبک در شرایط تثبیت نسبت به شرایط غیرتثبیت کاهش پیدا کرد و شرایط غیرتثبیت برای رشد این ریز جلبک مناسب‌تر بود. در محیط کشت شاهد و محیط کشت با غلظت نمکی ۳۰۰ گرم در لیتر، تفاوتی بین اثر شرایط تثبیت و آزاد مشاهده نشد.

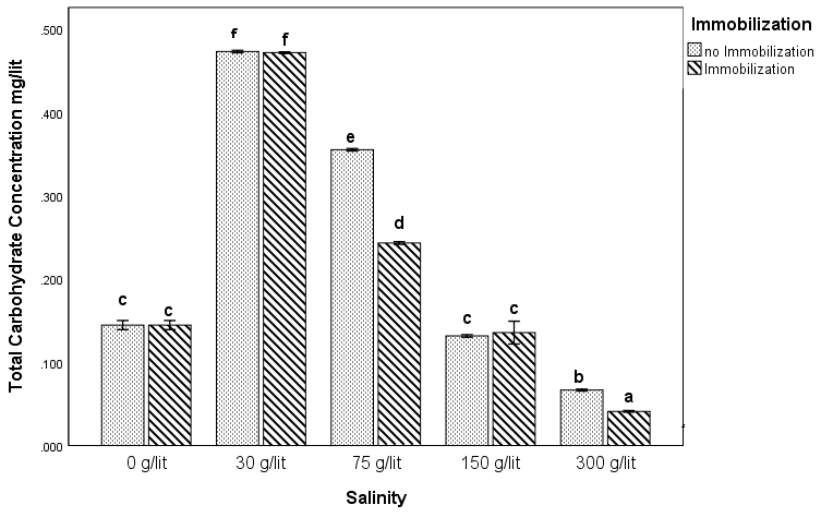
زی‌توده تولید شده و جمع‌آوری شده در پایان دوره رشد ۳۶ روزه در شرایط تثبیت در محیط‌های با غلظت نمک ۳۰ و ۷۵ گرم در لیتر افزایش یافت (شکل ۵). در غلظت ۳۰ و ۷۵ گرم در لیتر، در شرایط آزاد به طور معنی‌داری زی‌توده *D. salina* بیشتر از شرایط تثبیت بود. غلظت صفر (شاهد) در هر دو شرایط تثبیت و غیرتثبیت (آزاد) تاثیر خیلی کمی بر روی زی‌توده داشت. غلظت ۳۰ گرم در لیتر در هر دو شرایط تثبیت و غیر تثبیت تاثیر یکسانی بر میزان زی‌توده داشت و در غلظت ۱۵۰ گرم در لیتر در شرایط تثبیت زی‌توده بیشتری تولید شد. بیشترین زی‌توده در این آزمایش در شوری ۷۵ گرم در لیتر و شرایط رشد آزاد و بدون تثبیت اندازه‌گیری شد.



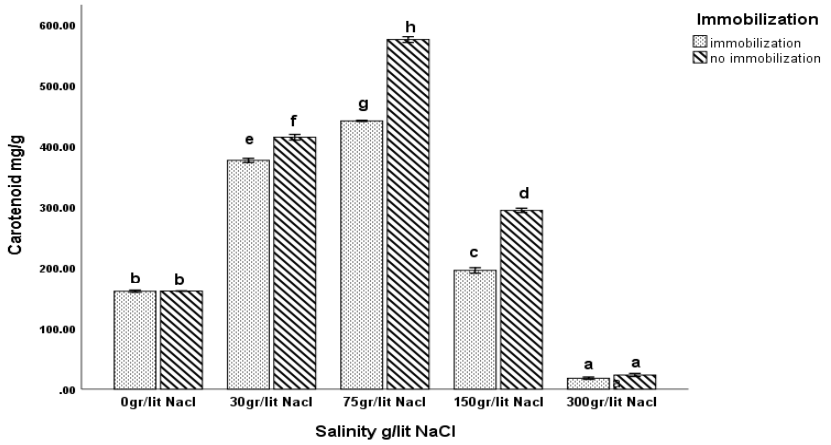

**شکل ۵: اثر شوری (Salinity) و روش‌های کشت تثبیت (Immobilization) و آزاد (No Immobilization) بر میزان زی‌توده نهایی *Dunaliella salina* (میانگین ± انحراف معیار). حروف متفاوت بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارها است (P<۰/۰۵).**

مقدار تولید کربوهیدرات در شوری ۳۰ گرم در لیتر به طور معنی‌داری از تیمارهای دیگر بیشتر بود. در غلظت شاهد و ۳۰ گرم در لیتر روش تثبیت اثری بر محتوای کربوهیدرات نشان نداد. در غلظت ۷۵ گرم در لیتر محتوای کربوهیدرات در شرایط آزاد به طور معنی‌داری از شرایط تثبیت بیشتر بود. داده‌های نمودار شکل ۶ از اندازه‌گیری محتوای کربوهیدرات کل محیط کشت تیمارها در روز آخر رشد یعنی روز ۳۶ به دست آمده است.

مقدار تولید کاروتنوئید در شوری ۷۵ گرم در لیتر و شرایط بدون تثبیت و آزاد از تیمارهای دیگر بیشتر بود (شکل ۷). در غلظت ۷۵ گرم در لیتر محتوای کاروتنوئید در شرایط آزاد از شرایط تثبیت بیشتر بود. در غلظت صفر (شاهد) در هر دو شرایط تثبیت و غیرتثبیت (آزاد) کاروتنوئید تولید شده یکسان بود. کاروتنوئید تولید شده در غلظت ۳۰ گرم در لیتر در هر دو شرایط افزایش یافت.



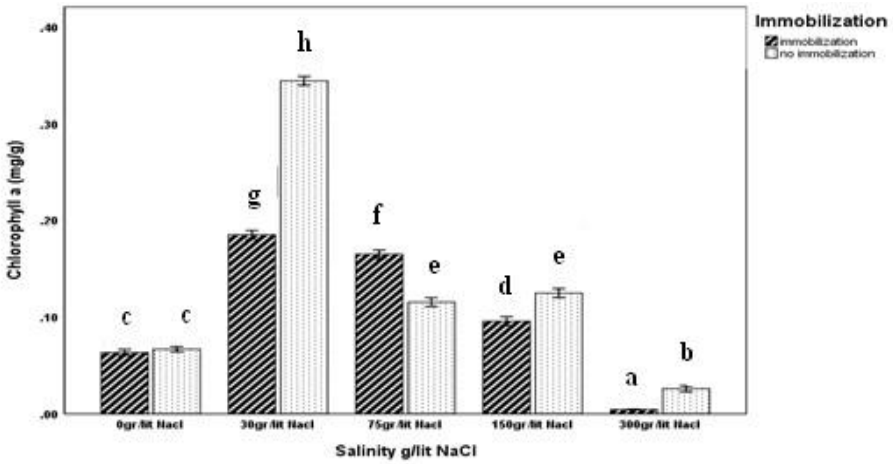

**شکل ۶: اثر شوری (Salinity) و روش‌های کشت تثبیت (Immobilization) و آزاد (No Immobilization) بر میزان کربوهیدرات زی‌توده نهایی *Dunaliella salina* (میانگین ± انحراف معیار). حروف متفاوت بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارها است (P<۰/۰۵).**




**شکل ۷: اثر شوری (Salinity) و روش‌های کشت تثبیت (Immobilization) و آزاد (No Immobilization) بر مقدار کاروتنوئید زی‌توده نهایی *Dunaliella salina* (میانگین ± انحراف معیار). حروف متفاوت بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارها است (P<۰/۰۵).**

در غلظت ۱۵۰ گرم در لیتر نسبت به غلظت ۷۵ گرم در لیتر تولید کاروتنوئید به طور معنی‌دار کاهش یافت. در غلظت ۳۰۰ گرم در لیتر تولید کاروتنوئید بشدت کاهش یافت. در تمام تیمارها تولید کاروتنوئید در شرایط آزاد بیشتر از شرایط تثبیت بود. داده‌های نمودار شکل ۷ از اندازه‌گیری محتوای کاروتنوئید کل محیط کشت تیمارها در روز آخر رشد یعنی روز ۳۶ به دست آمده است.

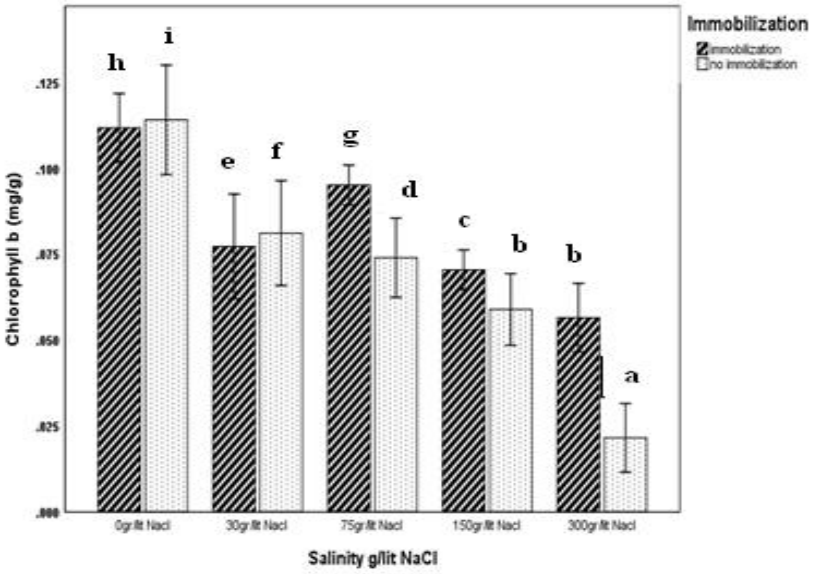
مقدار کلروفیل a در روز آخر رشد یعنی روز ۳۶ به دست آمده است (شکل ۸). میزان تولید کلروفیل a در شوری ۱۵۰ گرم در لیتر و شرایط بدون تثبیت و آزاد از تیمارهای دیگر بیشتر بود. در غلظت ۷۵ گرم در لیتر محتوای کلروفیل a در شرایط آزاد از شرایط تثبیت بیشتر بود. در غلظت صفر (شاهد) در هر دو شرایط تثبیت و غیرتثبیت (آزاد) کلروفیل a تولید شده یکسان بود. کلروفیل a تولید شده در غلظت ۳۰ گرم در لیتر در هر دو شرایط افزایش یافت. در غلظت ۱۵۰ گرم در لیتر نسبت به غلظت ۷۵ گرم در لیتر تولید کلروفیل a به طور معنی‌داری افزایش یافت. در غلظت ۳۰۰ گرم در لیتر تولید کلروفیل a بشدت کاهش یافت.




**شکل ۸: اثر شوری (Salinity) و روش‌های کشت تثبیت (Immobilization) و آزاد (No Immobilization) بر مقدار کلروفیل a زی‌توده نهایی *Dunaliella salina* (میانگین ± انحراف معیار). حروف متفاوت بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارها است (P<۰/۰۵).**

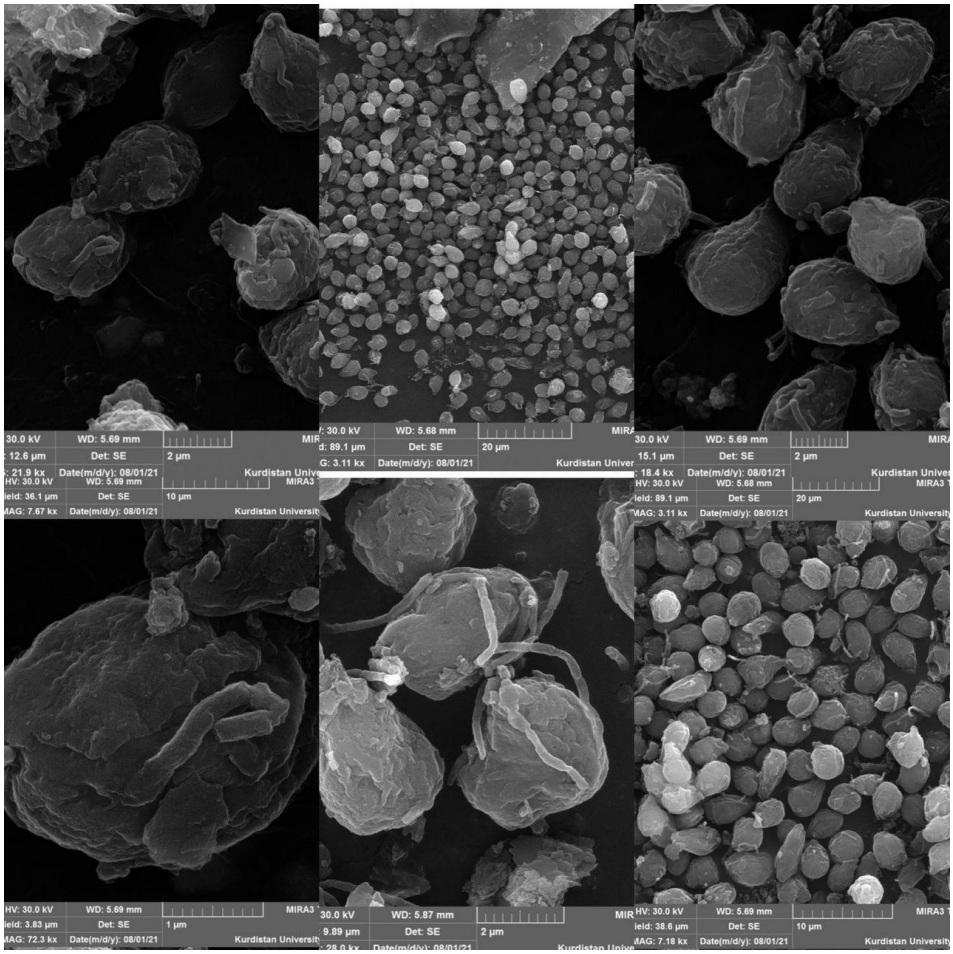
در تمام تیمارها بجز غلظت ۷۵ گرم در لیتر تولید کلروفیل a در شرایط آزاد بیشتر از شرایط تثبیت بود. شکل ۸ نشان می‌دهد میزان تولید کلروفیل a در غلظت ۱۵۰ گرم در لیتر، محتوای کلروفیل a در شرایط آزاد به طور معنی‌دار از شرایط تثبیت بیشتر است. در غلظت ۳۰۰ گرم در لیتر، کلروفیل a در دو شرایط آزاد و تثبیت کمترین مقدار را نشان داد. میزان کلروفیل a تولید شده در شرایط غیرتثبیت (آزاد) و در تمام غلظت‌ها از شرایط تثبیت بیشتر بود. شرایط تثبیت تاثیر منفی بر میزان کلروفیل a داشت.

مقدار کلروفیل b محیط کشت تیمارها در روز آخر رشد یعنی روز ۳۶ به دست آمده است (شکل ۹). در غلظت شاهد تولید کلروفیل b در دو شرایط تثبیت و آزاد تقریبا برابر و بیشترین مقدار بود. در غلظت صفر (شاهد) در هر دو شرایط تثبیت و غیرتثبیت کلروفیل b بیشترین مقدار را داشت. در شرایط تثبیت و غلظت ۳۰ گرم در لیتر میزان کلروفیل b تولید شده از شرایط غیرتثبیت بیشتر بود. اما در غلظت ۱۵۰ گرم در لیتر در شرایط غیرتثبیت میزان کلروفیل b تولید شده از شرایط تثبیت بیشتر بود.




**شکل ۹: اثر شوری (Salinity) و روش‌های کشت تثبیت (Immobilization) و آزاد (No Immobilization) بر مقدار کلروفیل b زی‌توده نهایی *Dunaliella salina* (میانگین ± انحراف معیار). حروف متفاوت بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارها است (P<۰/۰۵).**

تصاویر میکروسکوپی در شکل‌های ۱۰ و ۱۱ نشان می‌دهد *D. salina* جلبک سبز تک سلولی است که دو تاژک دارد. با مشاهده تصویر میکروسکوپ الکترونی (شکل ۱۰) ابعاد، شکل ظاهری و تاژک‌ها با دقت و با جزئیات تایید می‌شود. مشاهده تجمع کاروتنوئید در شرایط تنشی به دلیل سیاه و سفید بودن این تصاویر امکان پذیر نبود.



**شکل ۱۰: تصاویر میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM) از *Dunaliella salina***

**شکل ۱۱: تصویر *Dunaliella salina* با میکروسکوپ نوری. بزرگنمایی ×۴۰۰.**

**بحث**

محصولات زیستی به دست آمده از ریزجلبک‌ها به دلیل آینده امیدوار کننده، خواص ویژه، تقاضای فعلی و افزایش هزینه‌های انرژی، توجه بیشتری را به خود جلب کرده است. این محصولات زیستی منابع غذایی پایدار، مقرون به صرفه و کارآمد در نظر گرفته می‌شوند. با این حال، بازده کم و هزینه‌های تولید بالا، پتانسیل تجاری ریزجلبک‌ها را محدود می‌کند (Ahmad et al., 2023).

پژوهش‌های زیادی برای تولید محصولاتی با ارزش اقتصادی بالا (مانند رنگدانه، کود آلی، لوازم آرایشی، مواد شیمیایی، مواد غذایی و غیره) از زی‌توده ریزجلبک‌ها صورت گرفته است. اندازه کوچک سلول‌های منفرد به معنای مشکل در استفاده از فرایندهای بیوتکنولوژی است. از طرف دیگر ریزجلبک‌ها همچنین به عنوان تصفیه کننده فاضلاب از نیترات، فسفات، فلزات سنگین و ترکیبات دیگر عمل می‌کنند. برداشت بهینه و کم‌هزینه ریزجلبک‌ها یکی از چالش‌های اصلی است که کاربردهای زی‌توده را محدود می‌کند. در این زمینه، تثبیت سلول‌های جلبکی برای کاهش مشکل برداشت و همچنین حفظ زی‌توده جلبکی با ارزش بالا برای فرآوری بیشتر پیشنهاد شده است. در سال‌های اخیر، رویکردهای نوآورانه‌ای در زمینه بی‌حرکت‌سازی و میکروکپسوله‌سازی به کار گرفته شده است که برتری سلول‌های بی‌حرکت را نسبت به سلول‌های آزاد به اثبات رسانده است (Mallick, 2020). به منظور حل این مشکلات،

تکنیک‌های بی‌حرکت‌سازی سلولی مورد توجه قرار گرفته‌اند. سلول بی‌حرکت به عنوان سلول زنده‌ای شناخته می‌شود که با روش طبیعی یا مصنوعی از حرکت آزاد آن به دیگر قسمت‌های فاز آبی یک سیستم جلوگیری می‌شود. بسیاری از تکنیک‌های بی‌حرکت‌سازی میکروارگانیسم‌ها را می‌توان اصلاح و اعمال کرد.

بی‌حرکت‌سازی می‌تواند به صورت جفت کووالانسی، کششی، جذب، حبس در امولسیون مایع در مایع، جذب در غشای نیمه تراوا و به دام افتادن در پلیمرها اعمال شود. بی‌حرکت‌سازی را می‌توان به صورت غیرفعال (با استفاده از تمایل طبیعی میکروارگانیسم‌ها برای اتصال به سطوح طبیعی یا مصنوعی) و فعال (عوامل لخته‌ساز، ضمیمه شیمیایی و کپسول‌سازی ژل) نیز گروه بندی کرد (Kaparapu and Geddada, 2020). در پژوهش حاضر از تثبیت با روش به دام افتادن در پلیمرها بهره گرفته شد.

در مطالعه Zarandi-Miandoab و همکاران (۲۰۱۹) با بررسی چهار عامل تاثیرگذار روی تولید بتاکاروتن در ریز جلبک *D. salina* نشان داده شد که به کارگیری تنش‌ها ممکن است اثرات سودمندی روی افزایش تولید بتاکاروتن در این گونه جلبک داشته باشد.

Mohammadi و Arashrad (۲۰۱۶) با بررسی اثرات سطوح مختلف شوری بر تولید بتاکاروتن در ریزجلبک *D. salina* نشان دادند که شوری محیط ممکن است اثرات قابل توجهی بر کیفیت و ساختار کاروتنوئید در این ریزجلبک داشته باشد. این پژوهشگران نشان دادند که تغییر شوری محیط کشت تا ۳ مولار سدیم کلرید باعث افزایش تجمیع بتاکاروتن و کل کاروتنوئیدها در ریزجلبک *D. salina* شد (Mohammadi and Arashrad, 2016).

در مطالعه‌ای دیگر، Ye و همکاران (۲۰۰۸) با بررسی بیوسنتز و تنظیم کاروتنوئیدها در ریزجلبک *D. salina* نشان دادند که تولید گونه‌های واکنش‌گر اکسیژن در شرایط تنشی باعث افزایش تجمع بتاکاروتن در این ریزجلبک می‌شود. Gallego-Cartagena و همکاران (۲۰۱۹) در پژوهشی با بررسی اثر تنش‌های مختلف بر فعالیت کاروتوژنیک سویه کلمبیایی ریزجلبک *D. salina* نشان دادند که شرایط تنشی مختلف باعث افزایش تولید بتاکاروتن در این ریزجلبک می‌شود. Wu و همکاران (۲۰۲۰) نیز در پژوهشی به بررسی تاثیر تنش‌های غیرزیستی روی تولید بتاکاروتن و سوخت و ساز اسید چرب در ریزجلبک *D. salina* پرداختند و نشان دادند که تنش نمکی زیاد و شرایط

کمبود نیتروژن رشد سلولی جلبک را مهار می‌کند. این شرایط باعث افزایش تولید بتاکاروتن می‌شود. همچنین تولید لوتئین توسط نور زیاد افزایش یافت (Wu et al., 2020). Gomez و همکاران (۲۰۰۳) رشد جلبک *D. salina* را در یک دوره ۴۰ تا ۴۵ روزه مطالعه کردند. Hashemi و همکاران (۲۰۲۱) گزارش کردند که روش اعمال تنش شوری (شوری لحظه‌ایی و یا افزایش تدریجی شوری) بر مقدار تولید بتاکاروتن تاثیر دارد. تولید بتاکاروتن در روش تنش شوری لحظه‌ای ۱۴ برابر کمتر از روش تنش نمک آهسته رهش بود (Hashemi et al., 2021). بر حسب شرایط محیط کشت و سویه مورد نظر دوره‌های رشد جلبک می‌تواند متفاوت باشد. در برخی مطالعات به علت محدودیت زمانی، دوره‌های رشد در مدت دو یا سه هفته مورد بررسی قرار می‌گیرد.

نتایج پژوهش حاضر نشان داد میزان تولید کاروتنوئید در شوری ۷۵ گرم در لیتر و شرایط بدون تثبیت (آزاد) از تیمارهای دیگر بیشتر بود. در غلظت ۷۵ گرم در لیتر محتوای کاروتنوئید در شرایط آزاد از شرایط تثبیت بیشتر بود. در غلظت صفر (شاهد) در هر دو شرایط تثبیت و غیرتثبیت (آزاد) کاروتنوئید تولید شده یکسان بود. کاروتنوئید تولید شده در غلظت ۳۰ گرم در لیتر در هر دو شرایط افزایش یافت. در غلظت ۱۵۰ گرم در لیتر نسبت به غلظت ۷۵ گرم در لیتر تولید کاروتنوئید به طور معنی‌داری کاهش یافت. در غلظت ۳۰۰ گرم در لیتر تولید کاروتنوئید بشدت کاهش یافت. در تمام تیمارها تولید کاروتنوئید در شرایط آزاد بیشتر از شرایط تثبیت بود.

مطالعه Mishra و همکاران (۲۰۰۸) بر روی یک سویه *Dunaliella* به دست آمده از بلورهای نمک مزرعه نمک آزمایشی با عرض ۲۱ درجه و ۴۶ دقیقه و طول جغرافیایی ۷۲ درجه و ۱۱ دقیقه انجام شد. مطالعه هومولوژی و مقایسه مولکولی نشان داد که سویه جدا شده از گونه *D. salina* بود. آنها الگوی رشد و پاسخ‌های متابولیکی مانند پرولین، گلیسین، بتائین، گلیسرول، پروتئین کل و قند کل را در میزان شوری‌های مختلف از ۰/۵ تا ۵/۵ مولار مورد مطالعه قرار دادند. رشد مطلوب در نمک طعام ۱ مولار مشاهده شد. پس از آن رشد شروع به کاهش کرد. بیشترین رشد در روز هفدهم تلقیح در تمام غلظت‌های نمک بجز ۰/۵ مولار نمک طعام به دست آمد، بیشترین رشد در این غلظت در روز سیزدهم مشاهده شد. تفاوت معنی‌داری در محتوای کلروفیل‌های a و b در غلظت ۲ مولار نمک وجود نداشت، در صورتی

که در غلظت ۳ مولار افزایش معنی‌داری مشاهده شد. با این وجود، دوباره در غلظت ۵/۵ مولار رشد کاهش یافت. متابولیت‌های شرایط استرس مانند پرولین، گلیسین، بتائین، گلیسرول و مقدار کل قند همزمان با افزایش غلظت نمک به بیشترین میزان افزایش یافت. در مورد پرولین، گلیسین، بتائین، گلیسرول و قند کل در ازای صد هزار سلول در ۵/۵ مولار نمک، بیشترین افزایش مشاهده شد. کاهش پروتئین کل نیز مشاهده شد. تجزیه و تحلیل پلاسمای سلولی (Inductive Coupled Plasma: ICP) نشان داد که یون سدیم درون سلولی تا غلظت ۲ مولار نمک بدون تغییر باقی ماند و پس از آن افزایش قابل توجهی مشاهده شد. هیچ افزایش قابل توجهی در سطح داخل سلولی یون‌های پتاسیم و منیزیوم با افزایش غلظت نمک مشاهده نشد. برای بررسی ویژگی‌های فیزیولوژیکی و متابولیکی *D. salina* می‌توان از پتانسیل بیوتکنولوژیکی و صنعتی آن استفاده کرد (Mishra et al., 2008).

بر اساس نتایج پژوهش حاضر با افزایش شوری محیط رشد *D. salina* افزایش یافت. در شوری ۷۵ گرم در لیتر، *D. salina* بخوبی به رشد خود ادامه داد. در غلظت ۳۰۰ گرم در لیتر اگرچه رشد جلبک کاهش نشان داد، اما متوقف نشد و این دقیقا هالوفیت (نمک‌دوست) بودن این جلبک را تایید می‌کند. پژوهش‌های دیگر نیز این نتایج را تایید می‌کنند. *D. salina* در غلظت‌های ۳۰، ۷۵ و ۱۵۰ گرم در لیتر، شرایط غیرتثبیت و آزاد رشد بیشتری را نسبت به شرایط تثبیت نشان داد. رشد ریزجلبک در شرایط تثبیت نسبت به شرایط غیرتثبیت کاهش پیدا کرد و شرایط غیرتثبیت برای رشد این ریزجلبک مناسب‌تر بود. در محیط کشت شاهد و محیط کشت با غلظت‌های نمکی ۳۰۰ گرم در لیتر، تفاوتی بین اثر شرایط تثبیت و آزاد مشاهده نشد.

آزمون تحلیل واریانس مقایسه میانگین‌ها نشان داد اثر عامل شرایط کشت (تثبیت و آزاد) بر رشد *D. salina* کاملا معنی‌دار است. در مورد عامل شوری آزمون تحلیل واریانس نشان داد که عامل مورد مطالعه اثر معنی‌داری بر تفاوت میانگین‌ها داشت و شوری اثر معنی‌داری بر رشد ریزجلبک *D. salina* داشت. آزمون تحلیل واریانس مقایسه میانگین‌ها بررسی اثر طول دوره رشد و شرایط (تثبیت و آزاد) بر میزان رشد در مورد عامل دوره زمانی، جدول آزمون تحلیل واریانس فرضیه برابری میانگین‌ها را رد کرد و معنی‌دار بودن تفاوت میانگین‌ها را نشان داد. آزمون تحلیل واریانس بررسی اثر غلظت نمک و

شرایط تثبیت بر میزان زی‌توده تولیدی و اثرات متقابل این دو عامل را فرضیه برابری میانگین‌ها را رد کرد و معنی‌دار بودن تفاوت میانگین‌ها را نشان داد. آزمون تحلیل واریانس بررسی اثر غلظت نمک و شرایط تثبیت بر مقدار کاروتنوئید تولیدی شوری و شرایط تثبیت اثر معنی‌داری بر مقدار کاروتنوئید و کلروفیل‌های a و b تولیدی ریزجلبک *D. salina* داشت.

در مجموع، بر اساس نتایج این پژوهش در شرایط آزاد میزان رشد ریزجلبک بیشتر از شرایط تثبیت بود و شرایط تثبیت در این آزمایش بر رشد اثر منفی داشت و رشد ریزجلبک را کاهش داد. این نتیجه در مقابل بیشتر گزارش‌های پژوهشگران دیگر است. به طور کلی تکنیک تثبیت باعث افزایش بازده تولید می‌شود هرچند به نظر می‌رسد جنس و ترکیب بستر مورد استفاده و همچنین روش اعمال تکنیک تثبیت یک عامل اثرگذار و موثر در فرایند تثبیت میکروارگانیسم‌ها بویژه *D. salina* باشد. نتایج نشان می‌دهد با افزایش غلظت نمک تا غلظت ۷۵ گرم در لیتر، رشد *D. salina* افزایش یافت. در غلظت شوری ۷۵ گرم در لیتر، *D. salina* بخوبی به رشد خود ادامه داد. در غلظت ۱۵۰ و ۳۰۰ گرم در لیتر، رشد *D. salina* به طور معنی‌دار کاهش یافت. بیشترین زی‌توده تولیدی در این آزمایش در شوری ۷۵ گرم در لیتر و شرایط رشد آزاد و بدون تثبیت اندازه‌گیری شد. میزان تولید کاروتنوئید در شوری ۷۵ گرم در لیتر و میزان تولید کلروفیل a در شوری ۱۵۰ گرم در لیتر شرایط بدون تثبیت و آزاد از تیمارهای دیگر بیشتر بود. در غلظت شاهد تولید کلروفیل b در دو شرایط تثبیت و آزاد تقریبا برابر و بیشترین مقدار بود. جنس *Dunaliella* ۲۹ گونه دارد که شکل‌های مختلفی دارند و از هم قابل تشخیص هستند. *D. salina* از نظر شکل ظاهری شباهت زیادی به کلامیدوموناس دارد با این تفاوت که *D. salina* فاقد دیواره سلولی است. این ریزجلبک دارای شکل‌های متفاوتی است از جمله تخم‌مرغی شکل، کروی، استوانه‌ای، بیضی شکل، دوکی شکل شعاعی، گلابی شکل و متقارن الطرفین و یا غیر متقارن است. سلول‌ها در هر گونه با تغییر شرایط تغییر شکل می‌دهند. *D. salina* نوعی از ریزجلبک‌های نمک‌دوست، تک سلولی، با رنگ سبز و متعلق به گروه کلروفیت‌ها است. این ریزجلبک به مقدار فراوان در محیط‌های آبی شور بویژه در دریاها و دریاچه‌های نمکی یافت می‌شود. این ریزجلبک دارای دو تاژک یکسان با هسته‌ای ساده، نقطه حساس به نور چشم مانندی برای تشخیص نور،

پیرنوئیدی (پروتئینی برای تولید نشاسته) پوشیده شده از دانه‌های نشاسته در انتهای سلول و کلروپلاستی فنجان شکل در نیمه پایینی سلول تخم‌مرغی شکل است. همچنین این ریزجلبک فاقد دیواره سلولی است. ریزجلبک *D. salina* به عنوان یک منبع زیستی عالی برای تجاری‌سازی، تولید و بهره‌برداری بیوتکنولوژیکی و صنعتی بوده و ادامه کار پژوهشی روی این ریزجلبک ضروری و مفید است. ریزجلبک *D. salina* با توجه به محصولات متعددی که می‌توان از آن استخراج کرد پتانسیل لازم و امیدبخشی برای پژوهش و تولید تجاری و صنعتی فراورده‌های زیستی بوده، برای بهینه‌سازی تولید این محصولات از *D. salina* می‌توان پروژه‌های متعددی طراحی کرد. در زی‌توده تولیدی آزمون‌های تشخیصی دقیق تجزیه کیفی و کمی برای شناسایی انواع پلی‌ساکارید، مونوساکارید، اگزوپلی‌ساکارید، انواع رنگیزه‌ها بویژه بتاکاروتن و همچنین اسیدهای چرب به منظور تولید سوخت‌های زیستی قابل انجام است.

## منابع


**Ahmad A., Banat F., Alsafar H. and Hasan S.W. 2023.** Recent breakthroughs in integrated bio-molecular and biotechnological approaches for enhanced lipid and carotenoid production from microalgae. Phytochemistry Reviews, 22(4): 993–1013. doi: 10.1007/s11101-022-09804-5

**Arnon A.N. 1967.** Method of extraction of chlorophyll in the plants. Agronomy Journal, 23: 112–121.

**Ben-Amotz A., Polle J.E.W. and Subba Rao D.V. 2009.** The Alga *Dunaliella*: Biodiversity, Physiology, Genomics and Biotechnology. CRC Press, USA. 575P.

**Calderon N.D.G., Bayona K.C.D. and Garces L.A. 2018.** Immobilization of the green microalga *Botryococcus braunii* in polyester wadding: Effect on biomass, fatty acids, and exopolysaccharide production. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 14: 80–87. doi: 10.1016/j.bcab.2018.02.006

**Gallego-Cartagena E., Castillo-Ramirez M. and Martinez-Burgos W. 2019.** Effect of stressful conditions on the carotenogenic activity of a Colombian strain of *Dunaliella salina*. Saudi Journal of Biological Sciences, 26(7): 1325–1330. doi: 10.1016/j.sjbs.2019.07.010

**Gomez P.I., Barriga A., Cifuentes A.S. and 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. doi: 10.4067/S0716-97602003000200008

**Hashemi A., Pajoum Shariati F., Delavari Amrei H. and Heydari Nasab A. 2021.** The effect of instantaneous and slow-release salt stress methods on beta-carotene production within *Dunaliella salina* cells. Iranian Journal of Chemistry and Chemical Engineering, 40(5): 1642–1652. doi: 10.30492/IJCCE.2020.107691.3581

**Hosseini Tafreshi A. and Shariati M. 2009.** *Dunaliella* biotechnology: Methods and applications. Journal of Applied Microbiology, 107(1): 14–35. doi: 10.1111/j.1365-2672.2009.04153.x

**Jimenez C.A.R.L.O.S. and Pick U. 1994.** Differential stereoisomer compositions of β, β-carotene in thylakoids and in pigment globules in *Dunaliella*. Journal of Plant Physiology, 143(3): 257–263. doi: 10.1016/S0176-1617(11)81628-7

**Kaparapu J. and Geddada M.N.R. 2020.** Commercial applications of

algae in the field of biotechnology. P: 229–246. In: Arumugam M., Kathiresan S. and Nagaraj S. (Eds.). Applied Algal Biotechnology. Nova Science Publishers, India.

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

**Mahdian Y. 2022.** The effect of $CO_2$ pump on the improvement of carotenoid production in *Dunaliella salina* microalgae (In Persian). M.Sc. Thesis, University of Kurdistan, Iran. 101P.

**Mathimani T., Kumar T.S., Chandrasekar M., Uma L. and Prabaharan D. 2017.** Assessment of fuel properties, engine performance and emission characteristics of outdoor grown marine *Chlorella vulgaris* BDUG 91771 biodiesel. Renewable Energy, 105: 637–646. doi: 10.1016/j.renene.2016.12.090

**Mallick N. 2020.** Immobilization of microalgae. P: 373–391. In: Guisan J.M. (Ed.). Immobilization of Enzymes and Cells: Methods in Biotechnology. Humana Press, USA.

**Maleki L., Malek M. and Palm H.W. 2015.** Four new species of *Acanthobothrium* Van Beneden, 1850 (Cestoda: Onchoproteocephalidea) from the guitarfish, *Rhynchobatus cf. djiddensis* (Elasmobranchii: Rhynchobatidae), from the Persian Gulf and Gulf of Oman. Folia Parasitologica, 62(12): 11–15. doi: 10.14411/fp.2015.012

**Moreno-Garrido I. 2013.** Microalgal immobilization methods. P: 327–347. In: Guisan J.M. (Ed.). Immobilization of Enzymes and Cells: Methods in Biotechnology. Humana Press, USA. doi: 10.1007/978-1-62703-550-7

**Mishra A., Mandoli A. and 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. doi: 10.1007/s10295-008-0387-9

**Mohammadi K.E. and Arashrad F. 2016.** Effect of different salinity levels on β-carotene production by *Dunaliella* sp. isolates from the Maharlu Lake, Iran. Medical Laboratory Journal, 10(5): 58–68. doi: 10.18869/acadpub.mlj.10.5.58

**Nguyen A., Tran D., Ho M., Louime C., Tran H. and Tran D. 2016.** High light stress regimen on *Dunaliella salina* strains for carotenoids induction. Integrative Food, Nutrition and Metabolism, 3: 347–350. doi: 10.15761/IFNM.1000158

**Olfati N. 2022.** The effect of immobilization technique and

salinity stress on carotenoid production in *Dunaliella salina* microalgae (In Persian). M.Sc. Thesis, University of Kurdistan, Iran. 110P.

**Pasqualetti M., Bernini R., Carletti L., Crisante F. and Tempesta S. 2011.** Salinity and nitrate concentration on the growth and carotenoids accumulation in a strain of *Dunaliella salina* (Chlorophyta) cultivated under laboratory conditions. Transitional Waters Bulletin, 4(2): 94–104. doi: 10.1285/i1825229Xv4n2p42

**Sadeghi S.F. 2021.** Effect of immobilization techniques and salinity stress on growth indicator and carbohydrate production in micro algae *Dunaliella salina* (In Persian). M.Sc. Thesis, University of Kurdistan, Iran. 98P.

**Tran D., Doan N., Louime C., Giordano M. and Portilla S. 2014.** Growth, antioxidant capacity and total carotene of *Dunaliella salina* DCCBC15 in a low cost enriched natural seawater medium. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 30: 317–322. doi: 10.1007/s11274-013-1413-2

**Wu M., Zhu R., Lu J., Lei A., Zhu H., Hu Z. and Wang J. 2020.** Effects of different abiotic stresses on carotenoid and fatty acid metabolism in the green microalga *Dunaliella salina* Y6. Annals of Microbiology, 70(1): 1–9. doi: 10.1186/s13213-020-01588-3

**Ye Z.W., Jiang J.G. and Wu G.H. 2008.** Biosynthesis and regulation of carotenoids in *Dunaliella*: Progresses and prospects. Biotechnology Advances, 26(4): 352–360. doi: 10.1016/j.biotechadv. 2008.03.004

**Zarandi-Miandoab L., Hejazi M.A., Bagherieh-Najjar M.B. and Chaparzadeh N. 2019.** Optimization of the four most effective factors on β-carotene production by *Dunaliella salina* using response surface methodology. Iranian Journal of Pharmaceutical Research, 18(3): 1566–1579. doi: 10.22037/ijpr.2019.1100752

**Aquatic Physiology and Biotechnology**
**Vol. 12, No. 3, Autumn 2024**

**Research Paper**

# The effect of immobilization technique and salinity (sodium chloride) stress on growth indices, carotenoid and carbohydrate acculumation in microalga *Dunaliella salina*

**Masoud Haidarizadeh[1]*, Negar Olfaty[2], Sayed Fasih Sadeghi[2]**

DOI: 10.22124/japb.2024.25973.1520

Received: November 2023 Accepted: February 2024

## Abstract

Microalgae are used to produce valeable natural compounds. Low yield and high cost limit the commercial potential of microalgae. Recently, the techniques of immobilization and increasing production efficiency have been noticed. In the present study, the effect of salt concentration, stabilization and growth period on growth, biomass, carbohydrate, carotenoid, chlorophyll a and b in *Dunaliella salina* was evaluated. The results showed that the growth of microalgae in free conditions was more than in stabilization condition. At salinity of 150 and 300g/L algae growth was significantly reduced. The maximum biomass was measured at 75g/L salinity and free condition. Carotenoid in salinity of 75g/L and unstabilized condition was more than other treatments. Carbohydrate in salinity of 30g/L was significantly higher than other treatments. In the concentration of 150g/L, carbohydrate was significantly higher in stabilization condition. It seems that the composition of the substrate as well as the method of application of stabilization is an effective factor. Salt stress is a simple method to induce carotenoid synthesis. Research in the field of optimization of the material used as well as the method of applying stabilization to increase the production efficiency of valuable compounds seems necessary.

**Key words:** *Immobilization,* Dunaliella salina, *Salinity, Carotenoid*.

1- Assistant Professor in Department of Biological Science, Faculty of Science, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran.
2- M.Sc. in Biochemistry, Department of Biological Science, Faculty of Science, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran.

*Corresponding Author: m.haidarizadeh@uok.ac.ir