تاثیرنوسانات شوری بر میزان رشد، زیتوده و رنگدانه کلروفیل a و کارتنوئید ریزجلبک *Nannochloropsis oculata*

مریم رحیمی سورویی[1*]، کیومرث روحانی قادیکلایی[2]، فلورا محمدی زاده[1]

* m.rahimisuruee@gmail.com

۱-دانشگاه آزاد اسلامی واحدبندرعباس، بندرعباس، ایران. صندوق پستی: ۱۳۱۱-۷۹۱۵۹
۲- پژوهشکده اکولوژی خلیج فارس و دریای عمان، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات،آموزش و ترویج کشاورزی، بندرعباس. ایران ، صندوق پستی:۱۵۹۷

تاریخ دریافت: بهمن ۱۳۹٤ تاریخ پذیرش: شهریور ۱۳۹۵

لغات کلیدی : شوری، کلروفیل a، کارتنوئید، رشد، *Nannochloropsis oculata*

ریزجلبک‌ها در ابتدای زنجیره غذایی آبزیان دریایی قرار دارند و از ضروریات غذایی سالن‌های تکثیر آبزیان مختلف دریایی از جمله دو کفه‌ای‌ها، نرم‌تنان، مراحل لاروی سخت پوستان و مراحل اولیه رشد برخی ماهی‌ها هستند. ریزجلبک‌ها همچنین برای تولید زئوپلانکتون‌ها (کوپه - پودا، روتیفر، آرتمیا) ضروری هستند(Gent, 2001). یکی ازمشهورترین گونه‌های جلبک مورد استفاده در آبزی‌پروری عبارت است از *Nannochloropsis oculata* که رایج‌ترین ریزجلبک مورد استفاده برای تولید زئوپلانکتون ها (روتیفر) می باشد (Heasman *et al.*, 2000). یکی از مهمترین عوامل برای کشت ریزجلبک شوری است که برای به دست آوردن بیشترین مقدار تولید، بهتر است ریزجلبک در دامنه شوری به نسبت کم پرورش داده شوند. یکی ازکاربردهای اصلی ریزجلبک‌ها در زمینه آبزی‌پروری، مربوط است به تهیه مواد مغذی یا مکمل ها و مصرف تازه به تازه آن‌ها (به عنوان صرفا" مکمل یا ماده افزودنی به تغذیه اصلی) و یا برای رنگدار کردن گوشت ماهی آزاد و تحریک دیگر فعالیت های موجودات است (آذری تاکامی و چرمهینی۱۳۹۰). یکی از جذاب‌ترین ویژگی‌های موجودات آبزی رنگ آنها می‌باشد که منبع رنگی آنها از مواد غذایی موجود در محیط زیست آنها می‌باشد (Kop & Durmaz, 2008). ریزجلبک‌ها حاوی رنگدانه‌های زیادی مثل کلروفیل (از۰/۵ تا ۱ درصد وزن خشک آنها) و کارتنوئیدها (به طور متوسط ۰/۱ وزن خشک آنها) می باشند (Rebolloso Fuentes *et al.*, 2000) .

کارتنوئیدها رنگدانه های محلول در چربی هستند که بطور عمده در گیاهان، جلبک‌ها و باکتری‌های فتوسنتزکننده یافت می‌شوند(Guedes *et al.*, 2011). همانطوریکه انتظار می‌رود جانوران قادر به سنتز کارتنوئیدها نیستند، و آنرا از طریق رژیم غذایی خود دریافت می‌کنند(Gourveia,2003). کارتنوئیدها مسئول رنگهای زرد، نارنجی و قرمز دربرگها، میوه‌ها، گلها و رنگ پرهای بسیاری از پرندگان، حشرات، ماهی قزل‌آلا و سخت پوستانی نظیر خرچنگ و میگو می باشند. کارتنوئیدها به عنوان پیش ساز ویتامین A عمل کرده و ازکمبود آن جلوگیری می‌نماید(Pisal & Lele, 2005).

کارتنوئید یکی از رنگدانه‌های طبیعی با خاصیت آنتی-

اکسیدانی قوی است(Edge *et al*.,1997) و بدلیل خاصیت آنتی اکسیدانی و ضد سرطانی که این رنگدانه دارد از آن در تهیه مکمل‌های غذایی و مواد دارویی استفاده می‌شود (Tim *et al*., 2007). کلروفیل‌ها رنگدانه‌ای سبز رنگ بوده و در بقا و حیات گیاهان از طریق شرکت در فرایند فتوسنتز نقش بسیار مهمی را ایفا می کنند (Sharma, 2001). ریزجلبک *Nannochloropsis oculata* متعلق به رده Eustigmatophyceae بوده که شامل ۶ جنس است. این ریزجلبک ها دارای سلول های کوچک با مورفولوژی ساده می باشند که در آب شور زندگی می کنند این ریزجلبک ها غیرمتحرک، به رنگ سبز و بدون تاژک هستند. همه گونه ها تک سلولی و کوچک بوده و اندازه قطر آنها ۶-۴ میکرون می باشد (Sukenik, 1989). با توجه به اینکه ریزجلبک *Nannochloropsis oculata* به خاطر نرخ رشد و تولید زیتوده بالا و همچنین دارا بودن میزان بالای چربی به ویژه اسیدهای چرب غیر اشباع به منظور تغذیه لارو ماهی و روتیفر در آبزی پروری مورد توجه پرورش دهندگان قرار گرفته است و نیز این ریزجلبک قادر به ساخت طیف وسیع و با غلظت بالایی از رنگیزه های ارزشمند آستاگزانتین (astaxanthin)، کانتاگزانتین (canthaxanthin) و زاگزانتین (zeaxanthin) می باشد که می تواند به عنوان مکمل غذای انسانی مورد تغذیه قرار گیرد. . طبق نتایج بدست آمده توسط دیگر محققین، در ارتباط با تاثیر شوری بر روی میزان زیتوده و کلروفیلa، مناسب ترین شوری بین ۲۵ تا ۳۵ گزارش شده است اما در ارتباط با تاثیر شوری بر میزان و رنگدانه کارتنوئید در این ریزجلبک اطلاعات زیادی وجود ندارد از این رو در این تحقیق، تعیین مناسب ترین شوری برای تولید بیشینه رشد و زیتوده ریزجلبک *Nannochloropsis oculata* و تعیین مناسب ترین شوری برای تولید بیشینه رنگیزه کارتنوئید و کلروفیل a مورد تحقیق و بررسی قرار گرفت. ریزجلبک *N.oculata* از فایکولب بخش آبزی‌پروری پژوهشکده اکولوژی خلیج‌فارس و دریای عمان تهیه گردید. تمامی آزمایشات در آزمایشگاه بخش آبزی‌پروری پژوهشکده اکولوژی خلیج‌فارس و دریای عمان بندرعباس در تابستان ۱۳۹۲ انجام گرفت. به منظور مطالعه اثر شوری‌های مختلف، ریزجلبک *N.oculata* در ارلن‌های ۳ لیتری محتوی ۲/۵ لیتر آب دریای استریل شده محتوی محیط کشت f/2 و تحت شرایط یکسان با درجه حرارت ۲۵°C-۲۲، و تحت شوری‌های مختلف (ppt ۲۰، ۲۵، ۳۰، ۳۲، ۳۵،۵۰)، قلیائیت ۸ و دوره نوری ۱۲ ساعت روشنایی (شدت نور ۵۰۰۰ لوکس)، ۱۲ ساعت تاریکی (و به مدت ۱۴ روز در شرایط آزمایشگاهی کشت داده شد (Guillard & Ryther, 1962). شوری‌های بالای ۳۵ppt با افزودن نمک دریا و شوری‌های پائین ۳۵ppt با افزودن آب شیرین استریل به آن تهیه گردید (Kim, 2004). آزمایشات مربوط به هر تیمار شوری در سه تکرار و دو بار طی این مطالعه انجام شد.به منظور بررسی روند و نرخ رشد ریزجلبک *N.oculata*، هر روز سه نمونه ۱ میلی لیتری از ریزجلبک، در شرایط کاملاً استریل و پس از همگن کردن محتویات ارلن‌های مورد آزمایش، با استفاده از پیپت کاملا استریل برداشت نموده و با محلول لوگل تثبیت و با استفاده از لام شمارش هموسیتومتر و با کمک یک دستگاه میکروسکوپ اینورت TS100و یک دستگاه شمارشگر دیجیتال(LABTRON مدل LC-10) اقدام به شمارش و ثبت تعداد سلولهای جلبکی نموده و در پایان با استفاده از فرمول ارائه شده توسط Guillard وهمکاران (۱۹۷۳) نرخ رشد تعیین گردید: $\mu = (Ln_{N2} - Ln_{N1})/(t_2 - t_1)$ که N_1 و N_2 تعداد سلول های فیتوپلانکتونی در زمان های t_1 (روز اول) و t_2 (روز پایانی) می باشد. برای تعیین زیتوده، حجم معینی از ریزجلبک را در پایان دوره آزمایش برداشت نموده و از خلال کاغذ صافی خشک که وزن اولیه آن یادداشت شده عبور داده شد. کاغذ صافی را در انکاباتور فن‌دار و در درجه‌حرارت ۱۰۵°C به مدت ۲ ساعت قرار داده شد تا وزن ثابت بدست آید. کاغذ صافی را در دیسیکاتور به مدت ۱ ساعت سرد نموده و دوباره با ترازوی دقیق ۰/۰۰۱ گرم وزن نموده شد. وزن خشک را از تفاضل وزن خشک کاغذ فیلتر حاوی جلبک و کاغذ فیلتراولیه (کاغذ فیلتر را به مدت ۱ ساعت در درجه‌حرارت ۱۰۵ °C قرار داده و وزن آن را اندازه می‌گیریم) بدست آورده شد. به منظور تعیین میزان کلروفیل a و کارتنوئید در پایان دوره آزمایش از هر تیمار به مقدار ۱۰سی‌سی

نمونه برداشت نموده وبرای کاهش شوری به نمونه‌ها ۵ میلی‌لیتر آب مقطر نیز اضافه گردید. نمونه‌ها بوسیله دستگاه پمپ خلاء وبا استفاده از دستگاه کلروفیل از کاغذ صافی۰/۴۵ میکرون عبورداده و کاغذهای صافی حاوی نمونه‌ها را درون لوله سانتریفیوژ قرار داده وبه آن ۱۰ میلی‌لیتر استن ۹۰٪ ااضافه شد. سر لوله‌ها را با پارافیلم گرفته و در شرایط کاملا تاریک در یخچال بمدت ۲۴ ساعت نگهداری کرده، سپس نمونه‌ها را با استفاده از دستگاه سانتریفیوژ با سرعت ۳۰۰۰ دوردرثانیه به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ نمودیم و با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر میزان جذب کلروفیل aرا در۴ طیف نوری با طول موج های ۶۴۵، ۷۵۰، ۶۶۳، ۶۳۰ ومیزان جذب کارتنوئید را در ۲ طیف نوری با طول موج‌های ۴۸۰، ۵۱۰ اندازه‌گیری شد. میزان کلروفیل a و کارتنوئید به ترتیب به کمک معادلات ارائه شده توسط Parsons و همکاران (1984) و Wellburn (1994) بدست آمد. اطلاعات و داده‌های بدست آمده در نرم‌افزار Excel وارد شده و نتایج توصیفی بصورت جدول و نمودار تهیه گردید. تحلیل آماری نتایج در برنامه SPSS و با بکارگیری آزمون‌های پارامتری ANOVA آنالیز واریانس یک‌طرفه و دوطرفه جهت مقایسه میانگین داده‌ها مورد بررسی بکار رفته و سطح معنی دار برای داده‌ها $p<0/05$در نظر گرفته شد.

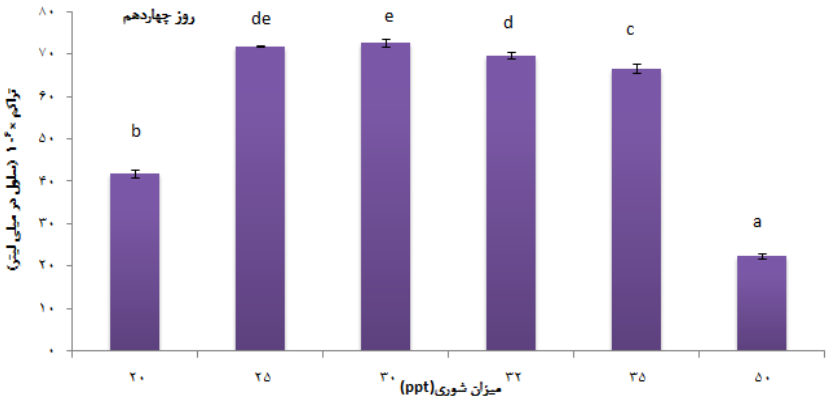
جدول ۱ تراکم ریزجلبک را طی ۱۴ روز کشت در شرایط آزمایشگاهی و در شوری‌های مختلف نشان می‌دهد.

جدول۱: میانگین تراکم سلولی (cell × 10^6 ml^{-1})ریزجلبک *N.oculata*کشت داده شده در شوری‌های مختلف طی ۱۴ روز [a] داده ها میانگین سه تکرار .S.D± می باشند.

	شوری(ppt)					
روز	۲۰	۲۵	۳۰	۳۲	۳۵	۵۰
نخست	۱/۰۲ ± ۰/۰	۱/۰۲ ± ۰/۰	۱/۰۲ ± ۰/۰	۱/۰۲ ± ۰/۰	۱/۰۲ ± ۰/۰	۱/۰۲ ± ۰/۰
دوم	۲/۳٤ ± ۰/ ۳۷	۲/۷۸ ± ۰/۱٦	۲/۷٤ ± ۰/۱۳	۲/٦۰ ± ۰/۲۷	۲/٤٦ ± ۰/۳۲	۲/۷۵ ± ۰/۱۵
سوم	٤/۵٦ ± ۰/۳۷^{a}	۵/۵۰ ±۰/۲۲^{bc}	۵/٦۰ ± ۰/۵۰^{bc}	۵/۷۷ ± ۰/۱٦^{c}	٤/۸۳ ± ۰/۱۷^{ab}	٤/۲٤ ± ۰/۳٦^{a}
چهارم	۷/۵٤ ±۰/۳۲^{a}	۱۲/۲۹ ±۰/۲۷^{b}	۱۵/٦٤ ± ۰/٦۹^{c}	۱٦/۳۵ ± ۰/۲۷^{c}	۲/٤٦ ± ۰/۳۲^{b}	۲/۷۵ ± ۰/۱۵^{a}
پنجم	۱۵/۷٤ ±۰/۵۲^{b}	۲۰/٦۰ ±۰/٤۹^{c}	۲۷/۵۸ ± ۱/۷۱^{d}	۲۸/۸۷ ± ۰/۸٤^{d}	۲۱/۲۸ ± ۰/۷۹^{c}	۱۲/٦۱ ± ۱/۵۹^{a}
ششم	۲۱/۵۸ ±۰/٤۹^{b}	۳۰/۷۵ ± ۰/۲٤^{c}	۳٦/۸۲ ±۱/۰۳^{d}	۳۵/۹۰ ±۰/۷۸^{d}	۳۰/۳۷ ± ۰/۰۳^{c}	۱۷/٤۰ ± ۲/۱۵^{a}
هفتم	۲۹/۱۳ ±۱/۷٦^{b}	٤۱/۰۸ ±۰/۳۹^{cd}	٤۳/٦۰ ± ۰/۹۰^{d}	٤۱/۷۲ ± ۱/۰۳^{d}	۳۷/۷۳ ± ۱/۹۳^{c}	۲۱/۲٦ ± ۲/۳۹^{a}
هشتم	۳۳/۰۵ ± ۳/۰٦^{b}	۵۱/۷٤ ± ۰/۷۹^{c}	۵۲/۱۹ ± ۱/۳۱^{c}	۵۰/۸۱ ± ۰/٦۹^{c}	٤۷/۵۵ ± ۱/۰۱^{c}	۲۲/۹۷ ± ۲/۰٦^{a}
نهم	۳۵/۳۰ ± ۲/۸٤^{b}	٦۲/٤۰ ± ٦/۱٦^{d}	۵۸/۹۰ ± ۰/٦۹^{cd}	۵٦/۸۳ ± ۰/۲۱^{cd}	۵۳/۱۳ ± ۰/۹۰^{c}	۲٤/۱۰ ± ۱/٦۵^{a}
دهم	۳۹/۰۲ ± ۲/۱۳^{b}	٦۵/٦۷ ± ۱/۸۱^{d}	٦۳/۸٤ ± ۰/۷۵^{d}	٦۱/۵۸ ± ۰/٦۵^{d}	۵٦/٤۲ ± ۱/۸۲^{c}	٤۲/۷۹ ± ۱/۹۵^{a}
یازدهم	٤۱/۰۱ ± ۱/۳۵^{b}	٦۹/۹۲ ± ۰/۸۱^{d}	٦۹/۳۵ ± ۰/۳۷^{d}	٦٦/۱۷ ± ۰/۹۷^{d}	۵۸/۱۲ ± ۱/٤٤^{c}	۲۵/۳۷ ± ۲/۵٤^{a}
دوازدهم	٤۱/۲۷ ± ۱/۳۷^{b}	۷۰/۸۰ ± ۰/۱٤^{d}	۷۰/۸۹ ± ۱/۱۱^{d}	٦۷/۸۸ ± ۱/٤٦^{d}	٦۳/۲۸ ± ۰/٦۲^{c}	۲۵/۲۲ ± ۲/۷۹^{a}
سیزدهم	٤۱/۵۸ ± ۱/۱۱^{b}	۷۱/۳۵ ± ۰/۳۹^{d}	۷۱/٤۱ ± ۱/۲٤^{d}	٦۹/۱۷ ± ۱/۰۹^{d}	٦٤/٤۸ ± ۰/۸٦^{c}	۲۳/۵۵ ± ۱/٦٦^{a}
چهاردهم	٤۱/۸۱ ± ۰/۹۷^{b}	۷۱/۸۵ ± ۰/۲۵^{de}	۷۲/٦۳ ± ۱/۰۰^{e}	٦۹/٦۲ ± ۰/۷۲^{d}	٦٦/۵۰ ± ۱/۰۸^{c}	۲۲/۳۹ ± ۰/۵٦^{a}

حروف زبرنگاره مختلف در هر ردیف نمایانگر اختلاف معنی دار بودن میانگین ها می باشد($p<0.05$)

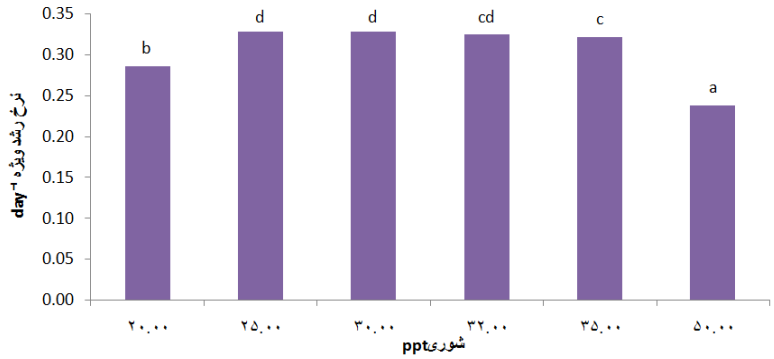
شمارش سلولهای فیتوپلانکتونی در روز چهاردهم کشت نشان داد که بیشینه تراکم مربوط به تیمار باشوری۳۰ppt (۷۲/۶۳×۱۰^{۶} سلول در میلی‌لیتر) است که دارای اختلاف معنی‌داری با شوری ppt ۲۵ (۱۰^{۶}× ۷۱/۸۵سلول در میلی‌لیتر) نمی‌باشد اما نسبت به سایر شوری‌ها دارای اختلاف معنی‌دار بود (p<۰/۰۵) و کمترین تراکم و رشد سلولی به ترتیب مربوط به شوری۵۰ppt (۲۲/۳۹×۱۰^{۶} سلول در میلی‌لیتر) می‌باشد (نمودار ۱).



شکل ۱: تراکم ریزجلبک *N.oculata* در شوری‌های مختلف در روز چهاردهم

حروف زبرنگاره مختلف در هرستون نمایانگر اختلاف معنی دار بودن میانگین ها می باشد(p<0.05).

طبق شکل ۲ بالاترین نرخ رشد ویژه ریزجلبک مربوط به تیمار با شوری ۲۵ و ppt ۳۰ بوده (۰/۳۳d^{-1}) که دارای اختلاف معنی‌داری با تیمار با شوریppt ۳۲ (۰/۳۲d^{-1}) نمی‌باشد اما نسبت به سایر شوری‌ها دارای اختلاف معنی-دار می‌باشد (p<۰/۰۵) و نیز پایین ترین نرخ رشد ویژه مربوط به تیمار با شوری۵۰ppt (۰/۲۴ d^{-1})(نمودار ۲).

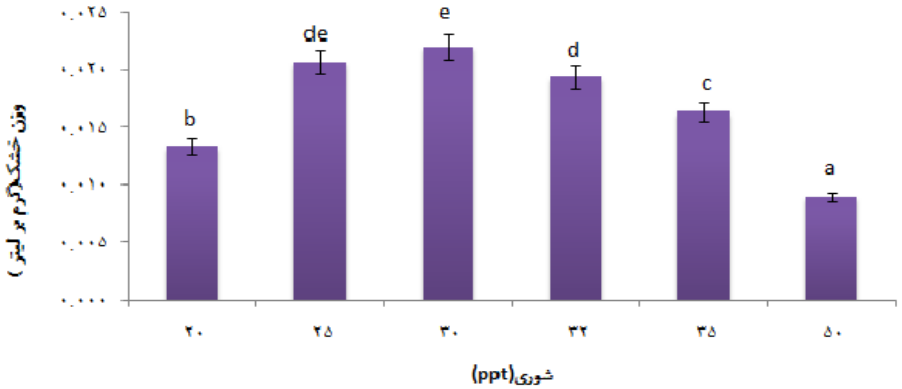


نمودار ۲: نرخ رشد ویژه(SGR) ریزجلبک *N.oculata* در شوری‌های مختلف

(حروف زبرنگاره مختلف در هر ستون نمایانگر اختلاف معنی دار بودن میانگین ها می باشد(p<0.05)).

با توجه به شکل ۳ بالاترین وزن خشک ابتدا متعلق به تیمار با شوریppt۳۰ است (۰/۰۲۲ گرم بر لیتر) و پس از آن مربوط به تیمار با شوری ppt ۲۵ بوده است (۰/۰۲۱ گرم بر لیتر) که اختلاف معنی‌داری بین تیمار با شوری

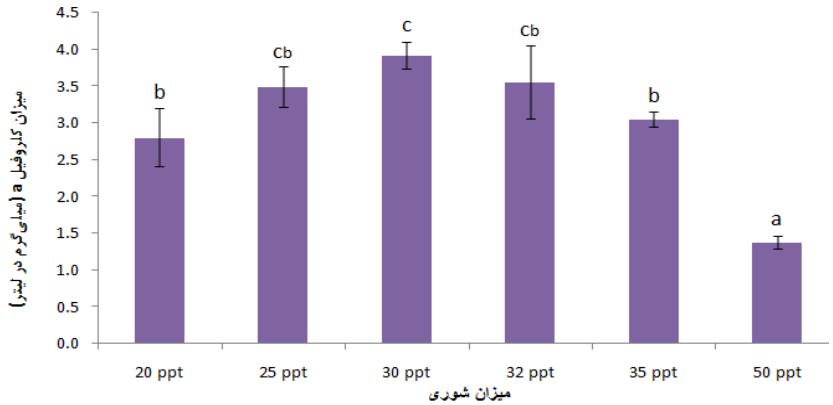
۲۵ppt و ۳۰ppt وجود ندارد اما نسبت به سایر شوری‌ها دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشد (p<۰/۰۵) و کمترین وزن خشک مربوط به تیمار با شوری ۵۰ppt (۰/۰۰۹ گرم بر لیتر) می باشد (نمودار ۳).



نمودار ۳: میزان وزن خشک ریزجلبک *N.oculata* در شوری‌های مختلف

(حروف زبرنگاره مختلف در هر ستون نمایانگر اختلاف معنی دار بودن میانگین ها می باشد($p<0.05$)).

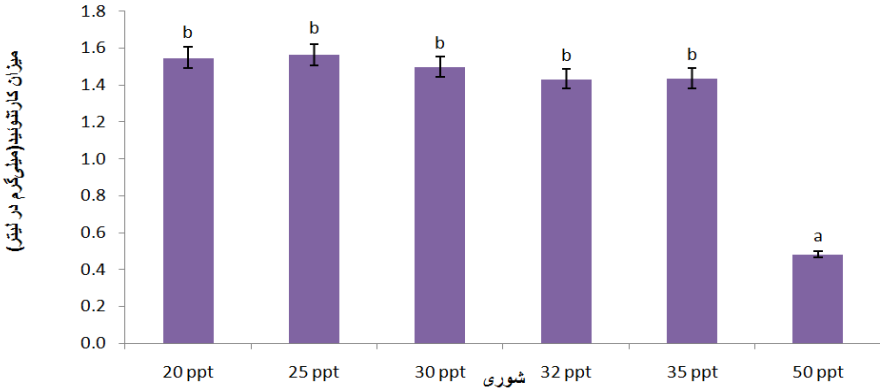
طبق شکل ۴ بیشینه میزان کلروفیلa در تیمار با شوری۳۰ppt بدست آمد(۳/۹۲ میلی گرم در لیتر) که اختلاف معنی‌داری با تیمارها با شوری‌های ۲۵ppt (۳/۴۹میلی گرم در لیتر) وppt ۳۲ (۳/۵۵ میلی گرم در لیتر) نشان نداد اما نسبت به سایر شوری‌ها دارای اختلاف معنی‌دار بود (p<۰/۰۵) وکمترین میزان کلروفیلa مربوط به تیمار با شوری۵۰ppt (۱/۳۷ میلی گرم در لیتر) می باشد (نمودار ۴).



نمودار ۴: میزان کلروفیلa ریزجلبک *N.oculata* در شوری‌های مختلف

(حروف زبرنگاره مختلف در هر ستون نمایانگر اختلاف معنی دار بودن میانگین ها می باشد($p<0.05$)).

میزان کارتنوئید تولید شده در ریزجلبک *N.oculata*، در شوری‌های ۲۰ تا ppt ۳۵ یکسان بوده (۱/۴۵میلی گرم در لیتر) و کمترین کارتنوئید تولید شده مربوط به تیمار با شوری ۵۰ppt (۰/۴۱ میلی گرم در لیتر) می‌باشد (نمودار۵). نسبت کلروفیل a به کارتنوئید در تمامی تیمارها و شوری های مختلف یکسان بدست آمده است (نمودار ۵).



(حروف زبرنگاره مختلف در هرستون نمایانگر اختلاف معنی دار بودن میانگین ها می باشد($p<0.05$)).

نتایج به دست آمده در این تحقیق حاکی از آن است که میانگین شوری‌های مناسب برای رشد ریزجلبک *N.oculata*، ۲۵ ، ۳۰ و ۳۲ ppt می‌باشند که در شوری ۳۰ppt بالاترین میزان رشد و تراکم ریزجلبکی (زیتوده) بدست آمده و همچنین با افزایش شوری از ۳۲ppt به ۵۰ppt میزان رشد سلولی و تراکم نیز کاهش یافته است. در مطالعه‌ای مشابه که برای تعیین پارامترهای بهینه رشد ریزجلبک *N.oculata* توسط Spolaore و همکاران (۲۰۱۰) طی ۱۹ روز کشت انجام گرفت، نشان دادند که بیشینه زیتوده این ریزجلبک در شوری ۴۵ppt با درجه حرارت ۲۰ °C بدست آمده است. در این تحقیق با افزایش شوری میزان رشد سلولی کاهش یافت که با نتایجی که Gu و همکاران (۲۰۱۲) با بررسی تاثیر تغییرات شوری بر روی رشد و ترکیبات شیمیایی جلبک *N.oculata* بدست آوردند مطابقت دارد، نتایج نشان داد، از آنجاییکه نوسانات شوری یک فاکتور مهم درکشت ریزجلبک‌ها به شمار می‌آید، هنگامیکه میزان شوری پایین باشد، رشد ریزجلبک افزایش یافته و با افزایش میزان شوری میزان رشد و تراکم سلولی و یا به عبارتی زیتوده کاهش می‌یابد. در مطالعه‌ای مشابه شریعتی و مددکارحقجو (۱۳۷۹) در گونه *D.salina* نیز به این نتیجه رسیدند که افزایش شوری موجب کاهش نرخ رشد سلول‌ها گردیده است. Kirst (۱۹۸۹) علت را اینگونه بیان نمود که با افزایش شوری سلول‌ها ورم نموده و باعث اتساع غشا پروتوپلاسمی سلول گردیده و درنتیجه سلول‌ها انرژی بیشتری را برای ادامه حیات صرف کرده و در نتیجه رشد کاهش می‌یابد. بحث دیگری که در این مطالعه مورد سنجش و بررسی قرار گرفت میزان وزن خشک و SGR (نرخ رشد ویژه) می‌باشد. با توجه به اینکه در این مطالعه کشت ریز جلبک طی ۱۴ روز بوده بالاترین وزن خشک مربوط به شوری ۳۰ppt بوده که دارای اختلاف معنی-داری با شوری ۲۵ppt نبوده است اما نسبت به سایر شوری‌ها اختلاف معنی‌دار نشان داد ($p<۰/۰۵$) و با افزایش شوری از ۳۲ به ۵۰ppt میزان وزن خشک و SGR نیز کاهش یافت. وزن خشک وSGR پایین به علت افزایش شوری در این مطالعه مشابه با نتایجی بود که در گونه‌های *Dunaliella salina* و *Spriulina platensis* گزارش شد. هنگامیکه این دو گونه تحت استرس با افزایش شوری قرارگرفتند، میزان وزن خشک و SGR در این دو گونه کاهش یافت (Fu & Bell, 2003 ; Rosales, *et al.*, 2005). Gu و همکاران (۲۰۱۲) در مطالعه‌ای که داشتند بیان نمودند هنگامیکه ریزجلبک‌ها تحت استرس شوری واقع شدند، با افزایش شوری میزان وزن خشک و SGR نیز کاهش یافت و در طول افزایش شوری رشد به کندی صورت گرفت که با نتایج بدست آمده در این مطالعه مطابقت داشت. Gu و همکاران (۲۰۱۲) بیان نمودند با افزایش شوری از ۳۵ تا ۵۵ ppt میزان وزن خشک کاهش یافت و نیز بیان داشتند در طی ۱۹ روز کشت، این ریزجلبک دارای بالاترین وزن خشک در شوری ۳۵ ppt و دارای بالاترین میزان کلروفیل aو کارتنوئید در شوری ۲۵ppt بوده است. در این تحقیق مشاهده شد که بالاترین میزان کلروفیلa در

شوری۳۰ppt بوده که ریزجلبک در این شوری نیز بالاترین میزان تراکم را دارا بوده است و پایین‌ترین میزان کلروفیل a درشوری ۵۰ppt بوده که پایین‌ترین میزان تراکم را دارا بوده است واحتمال می‌رود به دلیل میزان تراکم ریزجلبک در شوری مورد نظر باشد. در مطالعه‌ای که Warr و همکاران (۱۹۸۵) در تنظیم اسمتیک *Spirulina platensis* داشته، مشاهده کردند هنگامی که میزان رنگدانه‌ها مخصوصا کلروفیلa تحت شوری بالا کاهش می یابد بازده فتوسنتیک نیز کاهش می یابد در نتیجه به طور قابل توجهی تولیدات زیتوده در برخی ریز-جلبک‌ها کاهش یافت که با نتایج بدست آمده در این مطالعه هم‌خوانی داشته و مشاهده شد با افزایش شوری از ۳۲ppt به ۵۰ppt میزان زیتوده و کلروفیلa کاهش یافت. در این مطالعه با افزایش شوری از ۳۵ به ۵۰ppt رنگ ریزجلبک روشن‌تر شد و نیز میزان کلروفیلa، کارتنوئید و میزان رشد کاهش یافت و این نیز مطابقت داشته با مطالعه‌ای که Gu و همکاران (۲۰۱۲) داشته و بیان نمودند که با افزایش شوری از ۴۵ تا ۵۵ppt رنگ سبز جلبک روشن‌تر شد و نیز کاهش قابل توجهی در میزان کلروفیلa، کارتنوئید و میزان رشد مشاهده شد.نتیجه دیگری کهGu و همکاران (۲۰۱۲) در این مطالعه بیان نمودند این بود که میزان کلروفیلa و کارتنوئید در طی تغییرات شوری از ۲۵ تا ۳۵ppt افزایش یافت. در این تحقیق نیز درطی تغییرات شوری از ۲۰ تا۳۰ppt میزان رشد ریزجلبک و میزان کلروفیلa افزایش یافت و نیز مشاهده شد ریزجلبک دارای بالاترین میزان کلروفیل a در تیمار با شوری ۳۰ppt است و این نیز هم-خوانی داشته با گزارشاتی که Fazeli و همکاران (۲۰۰۶) ارائه دادند که شوری پایین می‌توانست میزان کلروفیلaو کارتنوئید را در *Dunaliella tertiolecta* افزایش دهد. Lele و Pisal (۲۰۰۵) با مطالعه بر روی میزان کارتنوئید تولید شده از میکروجلبک *D.salina* به این نتیجه رسیدند که با استفاده از پارامترهای استرسی متفاوت، مثل شوری بالا، دمای بالا و کمبود نیتروژن باعث افزایش میزان کارتنویید و کاهش میزان کلروفیل می‌گردد و نیز مشاهده کردند که میزان اپتیمم غلظت شوری برای رشد *D.salina* ۲ مولار بوده و در این شوری بیشینه زیتوده را داشته‌اند به طوری که در محیط کشت با شوری ۱/۵ مولار میزان زیتوده کاهش یافته است. در این مطالعه نیز شوری بالا باعث کاهش میزان کلروفیل گردید.شریعتی و مددکار حقجو در سال ۱۳۷۹ در بررسی اثر تنش شوری بر میزان بتاکاروتن و کلروفیل محتوای جلبک تک سلولی *D.salina* جدا شده از مرداب گاوخونی اصفهان به این نتیجه رسیدند که افزایش میزان شوری موجب کاهش نرخ رشد سلول‌ها و افزایش مقدار بتاکاروتن سلول‌ها در محیط کشت می‌گردد و تأثیر شوری درافزایش بتاکاروتن سلول-ها، نسبت به تأثیر کمبود مواد غذایی محیط مؤثرتر می باشد. که تقریباً مشابه با نتایج بدست آمده در این مطالعه بود، که افزایش میزان شوری باعث کاهش نرخ رشد سلول‌ها گردید اما افزایش شوری تاثیری بر روند تولیدکارتنوئید نداشته و فقط در شوری ppt ۵۰ تولید کارتنوئید کاهش یافت همچنین Fu و Bell (۲۰۰۳) بیان نمودند با افزایش شوری کلروفیلa در *Trichodesmium.sp* و کارتنویید در *B.braunii* افزایش یافت. Guedes و همکاران (۲۰۱۱) در مطالعه ریزجلبک ها به عنوان منبع کارتنویید بیان کردند که شرایط اپتیمم برای تولید بالاترین میزان بتاکاروتن در جلبک دنالیلا سالینا دمای بین ۲۵ تا ۳۰ درجه سانتی‌گراد و PH=۵ می‌باشد و شریعتی و مددکار حقجو در مطالعه-ای سال ۱۳۷۹ داشتند به این نتیجه رسیدند که افزایش میزان شوری موجب کاهش نرخ رشد سلولها و افزایش مقدار بتاکاروتن سلول‌ها در محیط کشت می‌گردد و تأثیر شوری درافزایش بتاکاروتن سلول‌ها، نسبت به تأثیر کمبود مواد غذایی محیط مؤثرتر می باشد. نتیجه قابل توجه در این مطالعه میزان کارتنوئید تولید شده می‌باشد که از شوری ۲۰ تا ۳۵ppt به یک میزان است. با توجه به گزارشات و مطالعات گذشته که مناسب‌ترین شوری برای رشد ریزجلبک *N.oculata* بین ۲۰ تا ۳۵ppt می‌باشد می‌توان نتیجه گرفت که ریزجلبک مورد نظر در اپتیمم شوری بالاترین میزان کارتنوئید را دارا بوده و فقط در شوری ۵۰ppt داری کمترین میزان کارتنوئید است که احتمال می‌رود به دلیل میزان کمتر رشد و تراکم سلولی

در شوری موردنظر باشد. به عنوان نتیجه گیری کلی می توان عنوان نمود شوری بهینه برای تولید بیشینه ریزجلبک *Nannochloropsis oculata* شوری ۳۰ppt می‌باشد. با توجه به اینکه رشد سلولی ریزجلبک در شوری ۵۰ppt متوقف نشد می‌توان نتیجه گرفت که ریزجلبک *N.oculata* نسبت به شوری بالا مقاوم بوده وطبق گزارشات مطالعات پیشین و مطالعه حاضر می‌توان نتیجه گرفت که ریزجلبک در دامنه وسیعی از شوری توانایی رشد را دارد و نیز تولید کارتنوئید در ریزجلبک مربوطه در شرایط اپتیمم رشد به یک میزان بود و از آنجاییکه ریز جلبک *N.oculata* چه از نظر نقطه نظر تولید بالای زیتوده جلبکی و چه از نقطه نظر تولید کارتنوئید حائز اهمیت است از این رو در این مطالعه سعی گردید با انجام آزمایشات مربوطه اپتیمم شرایط لازم برای تولید بیشینه زیتوده و کارتنوئید در ریز جلبک *N.oculata* تعیین نموده تا گام مهمی علاوه بر تامین غذای زنده مراکز تکثیر آبزیان، و با توجه به مناسب بودن درصد کارتنوئید تولید شده، در تامین بخشی از نیازهای صنایع غذایی و دارویی برداشته شود.

منابع

آذری تاکامی، ق. و امینی چرمهینی، م.، ۱۳۹۰ (ترجمه). دستور العمل تکثیر و پرورش پلانکتون ها. چاپ اول. موسسه انتشارات دانشگاه تهران.۳۳۷ صفحه.

شریعتی، م. و مددکار حقجو، م.، ۱۳۷۹. بررسی اثر تنش شوری بر میزان بتاکاروتن وکلروفیل محتوای جلبک سبز دنالیلا سالینا جدا شده از مرداب شور گاوخونی اصفهان، مجله پژوهشی علوم دانشگاه اصفهان، دوره۱۴، شماره ۲، صفحات ۶۶-۵۵.

Edge, R., McGarvey, D.J. and Truscott, T.G., 1997. The carotenoid as antioxidants. Areview. Journal of Detonulaconfervacea (Cleve) Gran. Canadian Journal of Microbiology, 8: 229–239.

Fazeli, M.R., Tofighi, H., Samadi, N., Jamalifar, H. and Fazeli, A., 2006. Carotenoids accumulation by *Dunaliellater tiolecta* (lake urmia isolate) and *Dunaliella salina* (ccap 19/18 &wt) under stress conditions. Daru, 14(3):117−129.

Fu, F. and Bell, P.R.F., 2003. Effect of salinity on growth, pigmentation, N2 fixation and alkaline phosphatase activity of cultured *Trichodesmium* sp. Marine Ecology Progress Series, 257: 69–76.

Gent University, 2001. Production and use of livefood for aquaculture. Courseware developed at the Laboratory of Aquaculture & Artemia Reference Center, Gent University.

Gourveia, L.A.D., Rema, P.B., Pereira, O.B. and Empis, J.C., 2003. Colouring ornamental fish (*Cyprinus carpio* and *Carassius auratus*) with microalgal biomass. Aquaculture Nutrition, 9(2): 123−129.

Gu, N., Lin, Q., Li,G., Qin,G., Lin, J. and Huang, L., 2012. Effect of Salinity Chang on Biomass and Biochemical Composition of *Nannochloropsisocuulata*. Journal of the WORD AQUACULTURE SOCIETY, 43, NO.1.

Guedes, A.C., Amaro, H.M. and Malcata, F.X., 2011. Microalgae as Sources of Carotenoids. Mar. Drugs, 9: 625-644.

Guillard, R.R.L. and Ryther, J.H., 1962. Studies on marine planktonic diatoms. *I. Cyclotella* nana Hustedt, and

Guillard, R.R.L., 1973. Division rates. In: Stein, J.R. (Ed.), Handbook of phycological methods: culture methods and growth measurements. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 289–311.

Heasman, M., Diemar, J., O'connor, W., Sushames, T. and Foulkes, L., 2000. Development of extended shelf-life microalgae concentrate diets harvested by centrifugation for bivalve molluscs, Aquaculture Research, 31: 637−659.

Kim, D.I., Matsuyama, Y., Nagasoe, S., Yamaguchi, M., Yoon, Y.H.,Oshima, Y., Imada, N. and Honjo, T., 2004. Effects of temperature, salinity and irradiance on the growth of the harmful red tide dinoflagellate *Cochlodinium polykrikoides* Margalef (Dinophyceae). J.plankton.Res, 26: 61−66.

Kirst, G.O., 1989. Salinity tolerance of eukaryotic marine algae. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 40:21–53.

Kop, A. and Durmaz, Y., 2008. The effect of synthetic and natural pigments on th colours of the cichlids (*Cichlasomaseverum* sp., Hekcel 1840). Aquaculture, 16:117−122.

Parsons, T.R., Maita, Y. and LALM, C.M., 1984. Determination of chlorophylls and total carotenoids: spectrophotometric method. In: A Manual of Chemical and Biological Methods for Seawater Analysis (Ed. by T. R. Parsons, Y. Maita & C. M. Lalli), pp. 101-104. Pergamon Press, Oxford, New York.

Pisal, D.S. and Lele, S.S., 2005. Carotenoid production from microalga, *Dunaliella salina.* Indian J. Biotech, 4:476−483.

Rebolloso Fuentes, M.M., AciénFernández, G.G., Sánchez Pérez, J.A. and Guil Guerrero, J.L., 2000. Biomass nutrient profiles of the microalga *Porphyridium cruentum*. Food Chem, 70, 345–353.

Rosales, N., Ortega, J., Mora, R. and Morales, E., 2005. Influence of salinity on the growth and biochemical composition of the *Cyanobacterium synechococcus*. Ciencias Marinas, 31:349–355.

Sharma, O.P., 2001. Text book of algae. Tata McGraw Hill Publishing, India.

Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E. and Isamber, A., 2010. Optimization of *Nannochloropsis groeth* using the response surface method.Journal of chemical technology and biotechnology. 81:1049.

Sukenik, A., Garmeli, Y. and Berner, T., 1989. Regulation of fatty acid composition by irradiance level in the eustigmatophyte *Nannochloropsis* sp**.** J. Phycol. 25: 686−692.

Tim, J., Bowden, T.J., Thompson, K.D., Morgan, A.L. and Nikoskelainen, A., 2007. Seasonal variation and immune response: A fish perspective. Department of Zoology, University of Aberdeen, Scotland, UK. pp. 695−70

Warr, S.R.C., Reed, R.H., Chudek, J.A., Foster, R. and Steward, W.D.P., 1985. Osmotic adjustment in *Spirulinaplatensis*. Planta 163: 424–429.

Wellburn, A.R., 1994. The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *Journal of Plant Physiology*, 144: 307−313.

Study on the effect of salinity changes on growth, biomass, and chlorophyll a and carotenoid pigments of microalgae *Nannochloropsis oculata*

Rahimisuruee M.[1]*; Rohani Ghadikolaei K.[2]; Mohammadizade F.[1]

* m.rahimisuruee@gmail.com

1- Islamic Azad university, Bandarabbas, Iran.
2-Persian Gulf and Oman See Ecological Research Institute, Iranian Fisheries Science Research Institute, Agriculture Research, Education and Extension, Bandarabbas, Iran

Abstract

In this study the effect of different salinities on growth, biomass and pigments of Chlorophyll a and Carotenoid were tested to determine an appropriate salinity to produce maximum growth, biomass and carotenoids of microalgae *(N.oculat)*.Therefore, the 2-liter flask contains microalga under different levels of salinities (20, 25, 32, 35, 50 ppt), and under laboratory conditions(temperature 25-22 ° C, PH. 8, and light period of 12 h light and 12 h darkness) were cultured for 14 days. The results of present study indicate that The maximum growth of microalgae (72.63×10^{6}cell ml^{-1}) and the maximum specific growth rate of microalgae (0.33 d^{-1}) included in treatments with salinity of 25 and 30 ppt, that had a significant difference with the other treatments ($p<0.05$) .The maximum dry weight (0.022 g/lit) and amount of chlorophyll a (3.92 mg lit) was recorded in treatments with salinity of 30 ppt and shows significant difference with the other treatment ($p<0.05$). The Minimum amount of carotenoids (0.41 mg lit) was related to treatment with salinity of 50 ppt. shows a significant difference with other treatments ($p<0.05$).According to the results we can say that microalgae resistant to high salinity and a wide range of salinity has the ability to grow and produce carotenoids.

Keywords: Salinity, Chlorophyll a, Carotenoid, Growth, *Nannochloropsis oculata*

*Corresponding author