

تأثیر تنش‌های متقابل فیزیوشیمیایی (شدت نور-شوری) بر تغییرات رشد، برخی شاخص‌های

بیوشیمیایی و ترکیب اسیدهای چرب در ریزجلبک *Nannochloropsis oculata*آذین فهیم^۱، محمدرضا کلباسی مسجدها^{۱*}، عبدالمحمد عابدیان کناری^۱، محمدصادق ثابت^۲

۱- گروه تکثیر و پرورش آبزیان، دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، نور، ایران

۲- گروه ژنتیک و به‌نژادی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، کرج، ایران

چکیده

در راستای بهره‌وری تجاری از ریزجلبک‌هایی که پتانسیل بالایی برای تولید لیپید دارند، تلاش بر این است که محتوای لیپید سلولی افزایش یابد. این امر با توجه به کاربری‌های گوناگونی که برای این افزایش لیپید در نظر گرفته می‌شود، می‌باید هوشمندانه باشد و به عبارت دیگر رویکردهای افزایش اسیدهای چرب هدف در عین حفظ بیوماس نهایی از اهمیت بیشتری برخوردار است. هدف از مطالعه حاضر بررسی تغییرات ترکیب اسیدهای چرب در ریزجلبک *Nannochloropsis oculata* تحت تنش‌های فیزیوشیمیایی (شدت نور و شوری) می‌باشد. در همین راستا میزان رشد، میزان کلروفیل و کاروتنوئید، آنالیز تقریبی و ترکیب تغییرات اسیدهای چرب ریزجلبک دریایی *N. oculata* تحت دو تنش متقابل شوری (۲۵، ۴۰ g/l) و شدت نور (۱۵۰۰ Lux و ۱۰۰۰۰ Lux) که در انتهای فاز لگاریتمی اعمال شدند مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که با توجه به اعمال تنش‌ها پس از تکمیل رشد، میزان رشد در تیمارهای مختلف اختلاف معنی داری نداشت ($P > 0.05$). همچنین با وجود اینکه بیشترین میزان لیپید کل تحت تیمار شوری ۴۰ g/l و شدت نور ۱۵۰۰ Lux بدست آمده است، بیشترین میزان اسیدهای چرب اشباع (SFA) تحت تیمار شوری ۱۵ g/l و شدت نور ۱۰۰۰۰ Lux، بیشترین میزان اسیدهای چرب تک غیراشباع (MUFA) تحت تیمار ۲۵ g/l و شدت نور ۱۰۰۰۰ Lux و بیشترین میزان اسیدهای چرب چندغیراشباع (PUFA) تحت تیمار ۱۵ g/l و شدت نور ۱۰۰۰۰ Lux هر سه بعد از گذشت ۴ روز از اعمال تنش حاصل شده. با توجه به تأثیرپذیری ترکیبات اسیدهای چرب از انواع تنش‌های فیزیکی و شیمیایی در ریزجلبک *N. oculata* می‌توان با تحت کنترل قرار دادن شرایط کشت، به بیشترین میزان از انواع اسیدهای چرب دلخواه مطابق با اهداف مورد نظر دست یافت.

کلیدواژه‌ها: تنش شوری، تنش شدت نور، سازگاری، *Nannochloropsis oculata*، اسیدهای

چرب غیراشباع، اسیدهای چرب اشباع

مقدمه

ریزجلبک‌ها به عنوان منبعی نوظهور و تجدید پذیر از مواد خام زیستی سرشار از کربوهیدرات‌ها، لیپیدها، پروتئین‌ها و رنگدانه‌ها هستند که می‌توانند در تولید انرژی، خوراک، مواد شیمیایی، مواد زیستی، داروها، محصولات آرایشی و بهداشتی و از همه مهمتر به عنوان غذا مورد استفاده قرار گیرند (۱). از آنجایی که ریزجلبک‌ها برای رشد از انرژی رایگان و ابدی خورشید استفاده می‌کنند، بکارگیری آن‌ها در حوزه غذاهای کاربردی و غذا - دارو مورد توجه ویژه قرار دارد. از جمله مواردی که به عنوان افزودنی‌های خوراک انسان، دام و آبزیان بسیار مورد توجه است، اسیدهای چرب غیراشباع چندتایی زنجیره بلند^۱ (PUFA) است که از جمله آن می‌توان به آراشیدونیک اسید (ARA, C20:4n-6)، ایکوزاپنتانویک اسید (EPA, C20:5n-3) و دوکوزاهگزانویک اسید (DHA, C22:6n-3) اشاره کرد که حضور این اسیدهای چرب در رژیم غذایی روزانه انسان، دام و آبزیان بسیار حائز اهمیت است (۲). در همین راستا، کشت و پرورش گونه‌های ریزجلبکی که دارای مقادیر قابل توجهی از این

^۱ Long-chain polyunsaturated fatty acids (LC-PUFA)

اسیدهای چرب می‌باشند با اقبال گسترده‌ای از طرف شرکت‌های تجاری مواجه شده است (۳). در صورت کشت پایدار ریزجلبک‌هایی که محتوای بالایی از اسیدهای چرب غیراشباع دارند، فرصت منحصربه‌فردی فراهم خواهدآمد تا بهره‌برداری از روغن ماهی که فرآوری آن آن اثرات منفی جبران‌ناپذیری بر محیط زیست و زنجیره غذایی دریایی می‌گذارد، متوقف شود. مهم‌ترین امر در این راستا افزایش محتوای اسیدهای چرب غیراشباع بدون کاهش بیوماس نهایی می‌باشد. اعمال انواع تنش‌های فیزیکی و شیمیایی از راهکارهای افزایش محتوای لیپید در بسیاری از ریزجلبک‌ها محسوب می‌شود (۴). طی سال‌های اخیر، محققان روی روش‌های مختلف برای افزایش تولید لیپیدها در سلول‌های ریزجلبک در سطوح مختلف که شامل اعمال انواع تنش‌های فیزیکی و شیمیایی شامل افزایش یا کاهش شدت نور و یا فقر نیتروژن یا فسفر یا افزایش شوری بوده، متمرکز شده‌اند (۵، ۶).

لیپیدهای تولید شده توسط ریزجلبک‌ها را می‌توان به دو گروه اصلی تقسیم کرد: لیپیدهای قطبی، مانند گلیسروفسفولیپیدها، که نقش مهمی در ساختار سلولی دارند، و لیپیدهای غیر قطبی، مانند تراسیل گلیسرول‌ها، که عمدتاً مسئول ذخیره انرژی هستند. لیپیدهای ساختاری (لیپیدهای قطبی) معمولاً دارای اسیدهای چرب بلند زنجیره هستند که می‌توانند به اسیدهای چرب اشباع نشده (PUFAs) تغییر شکل دهند، این نوع اسیدهای چرب شامل ایکوزاپنتانوئیک اسید (EPA)، دوکوزاپنتانوئیک اسید (DPA) و دوکوزاهگزانوئیک اسید (DHA) می‌باشد. PUFAها نقش مهمی در شکل‌گیری سوپرکمپلکس‌های میتوکندری دارند (۷)، پتانسیل تولید سوخت زیستی دارند و مشخص شده است که در درمان برخی بیماری‌ها مانند تصلب شرایین، پارکینسون و آلزایمر کاربرد دارند (۸). لیپیدهای قطبی و برخی از استرول‌ها یک مانع نفوذپذیر انتخابی ایجاد می‌کنند که از سلول در برابر محیط بیرونی محافظت کرده و به جداسازی اندامک‌های مختلف درون سلولی کمک می‌کند (۹). این لیپیدها نقش ویژه‌ای در حفظ بهینه سیالیت غشا در برابر انواع فرآیندهای متابولیکی و بیوسنتزی دارند و مستقیماً در رویدادهای مختلف همجوشی غشای درون سلولی شرکت می‌کنند. علاوه بر این، این لیپیدهای ساختاری عملکرد مهمی در مسیرهای سیگنال‌دهی سلولی دارند و در پاسخ به تغییرات محیط سلولی نقش کلیدی ایفا می‌کنند (۱۰). در طی فرآیند فتوسنتز، لیپیدهای غیر قطبی مانند تراسیل گلیسرول^۲ (TAG)، در سلول‌های ریزجلبکی ذخیره می‌شوند (۱۱). در حقیقت تولید این لیپیدها به عنوان ذخیره انرژی برای سلول‌های ریزجلبک عمل می‌کند و از آنجایی که دارای ترکیبات ارزشمندی هستند، ارزش تجاری نیز دارند (۱۲-۱۴).

مطالعه ترکیب اسیدهای چرب ریزجلبک قرار گرفته تحت مقادیر مختلف غلظت نمک بسیار ارزشمند است. چرا که ممکن است در عین افزایش لیپید در سلول‌های ریزجلبک، ترکیب اسیدهای چرب به نحوی تغییر کند تا با اهداف مورد نظر سازگاری نداشته باشد. به عبارت دیگر، بسته به اینکه کدام یک از اسیدهای چرب چند غیر اشباع، اسیدهای چرب تک غیر اشباع و اسیدهای چرب اشباع مورد نیاز است، می‌توان از سطوح NaCl مناسب استفاده کرد. در خصوص میزان شدت نور اعمال شده بر انواع ریزجلبک‌ها، نشان داده شده است که علاوه بر مقادیر لیپید تجمع یافته در ریزجلبک‌ها که از جنبه‌های گوناگون حائز اهمیت می‌باشد، ترکیب اسیدهای چرب نیز می‌تواند متغیر باشد و این امر به صورت پراکنده در مطالعات مختلف مورد بررسی قرار گرفته است (۱۲، ۱۵). متابولیسم لیپیدها در پاسخ به تنش‌های محیطی در جلبک‌های جنس *Nannochloropsis* (Eustigmatophyceae) که حاوی لیپید هستند، توجه‌های بسیاری را به خود جلب کرده‌اند چرا که علاوه بر پتانسیل بالا برای بکارگیری به عنوان سوخت زیستی، منبعی کارا برای اسیدهای چرب ارزشمند چند غیر اشباع زنجیر بلند (LC-PUFA) امگا ۳ و ایکوزاپنتانوئیک اسید (EPA) می‌باشند (۱۶). از آنجایی که تحت شرایط فقر مواد غذایی، در لیپیدهای غشایی کلروپلاست مقادیر بالایی از EPA تجمع می‌یابد، بیوماس *Nannochloropsis* به طور وسیعی در آبی پروری به عنوان افزودنی غذایی مورد استفاده قرار می‌گیرد (۱۷) و امید است در آینده به عنوان مکمل غذایی انسانی نیز جایگاه شایسته خود را پیدا کند. انعطاف‌پذیری بالا در متابولیسم لیپید در ریزجلبک *Nannochloropsis* که در واکنش به تغییرات ناگهانی در شرایط کشت این ریزجلبک اتفاق می‌افتد، این امکان را فراهم می‌کند تا به اسیدهای چرب مورد نظر خود دست یابیم. برای روشن شدن بیشتر مکانیسم‌های فیزیولوژیکی سازگاری *Nannochloropsis* با تنش‌های

² Triacylglycerol

ترکیبی، در این مطالعه دو تنش شوری و شدت نور بر این ریزجلبک هم به صورت مجزا و هم در ترکیب با هم اعمال شد. در همین راستا دو شدت نور کم (۱۵۰۰ Lux) و شدت نور زیاد (۱۰۰۰۰ Lux) و سه شوری شامل ۱۵، ۲۵ و ۴۰ g/l به صورت مجزا و ترکیبی بر ریزجلبک اعمال شد و برای هر گروه علاوه بر آنالیز بیوشیمیایی، ترکیب اسید چرب نیز مشخص گردید.

مواد و روش‌ها

کشت ریزجلبک و طراحی آزمایش

ریزجلبک *N. oculata* از بانک جلبک خلیج فارس تهیه شد، به علت وجود ناخالصی و وجود ریزجلبک‌های دیگر، ابتدا خالص سازی به روش انجام رقت سریالی انجام گرفت جهت صحت حضور گونه مورد نظر شناسایی مولکولی انجام گرفت و سپس در اتاق کشت تمیز جلبک در دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس کشت داده شد. به منظور سازگاری سازی محیطی، ابتدا جلبک‌ها در شرایط استاندارد (دمای ۲۵°C، نور ۵۰۰۰ لوکس و شوری کل ۲۵ ppm) در دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی در محیط کشت والن و با حجم ۱۰ لیتر در کیسه‌های مخصوص^۳ به مدت دو هفته کشت داده شد. سپس جهت مشخص کردن فازهای رشد، نمودار رشد این ریزجلبک با سه روش شمارش سلولی با لام نتوبار، تعیین جذب در طول موج ۷۵۰ نانومتر و مشخص کردن وزن خشک ریزجلبک ترسیم گردید. جهت آماده سازی شرایط تیمارهای در نظر گرفته شده، سه طبقه مجزا برای سه شدت نور شامل ۱۵۰۰ Lux، ۲۵۰۰ Lux (استاندارد) و ۱۰۰۰۰ Lux لوکس به ترتیب جهت شدت نور کم، بهینه و شدید در نظر گرفته شد (۱۸). همچنین برای اعمال تنش شوری به میزان ۱۵، ۲۵ و ۴۰ g/l از نمک NaCl (۱۹) نمک به کیسه‌های تعیین شده در انتهای فاز لگاریتمی افزوده شد. همچنین سه کیسه مجزا به عنوان تکرارهای زیستی برای هر حالت در نظر گرفته شد.

غلظت تراکم اولیه تلقیح ریز جلبک برای تمام تیمارها و تکرارها به صورت کاملاً یکسان و معادل $10.50 \pm 0.2 \times 10^6$ سلول در میلی‌متر مکعب (0.1 μL) بود. میزان رشد ریزجلبک‌ها به صورت روزانه با هر سه روش فوق‌الذکر پایش گردید. از آنجایی که رشد با توجه به تثبیت شرایط و سازگاری جلبک با محیط تحت کشت مطابق با منحنی رشد از پیش تعیین شده انجام گرفته بود، در انتهای فاز لگاریتمی تنش‌های مورد نظر اعمال گردید. برای اعمال تنش شوری، بر اساس حجم تحت کشت میزان نمک مورد نیاز توزین شد و به کیسه‌ها اضافه گردید. همچنین برای اعمال تنش شدت نور زیاد تعداد لامپ‌های بیشتری به طبقه در نظر گرفته شده برای شدت نور ۱۰۰۰۰ Lux اضافه شد و برای اعمال شدت نور کم از تعداد لامپ‌های طبقه مورد نظر برای شدت نور ۱۵۰۰ Lux کاسته شد. نمونه برداری جهت آنالیز بیوشیمیایی سلول‌های ریزجلبک چهار روز پس از اعمال تنش و نمونه برداری جهت بررسی تغییر ترکیبات اسیدهای چرب، دو و چهار روز پس از اعمال تنش‌ها انجام گرفت تا بتوان تاثیر فاکتور مدت زمان قرارگیری تحت تنش را نیز بر ترکیبات اسیدهای چرب بررسی نمود.

پایش رشد و ترسیم نمودار رشد

شمارش سلولی

با توجه به تک سلولی بودن ریزجلبک یوکاریوتی *N. Oculata*، شمارش سلولی با استفاده از لام هموسیتمومتر انجام پذیرفت. در همین راستا با بزرگنمایی شیئی ۴۰x تعداد سلول‌ها در مربع‌های مشخص شمارش و با استفاده از فرمول زیر میانگین تعداد سلول‌ها (در سه تکرار) در هر بار شمارش مشخص شد (۲۰).

$$\text{ضریب رقت} \times 10^4 \times \text{میانگین تعداد سلولهای نمایش داده شده} = X$$

میزان جذب در طول موج ۷۵۰ نانومتر

³ Bag Culture

علاوه بر شمارش سلولی، با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (Varian Cary50 UV-visible)، دانسیته نوری در طول موج ۷۵۰ نانومتر نیز برای هر تیمار اندازه گیری شد. در این روش نیز برای هر نمونه سه بار خوانش انجام گرفت و در نهایت اعداد به صورت میانگین ارائه شد (۲۰).

تعیین وزن خشک

میزان CC ۲ از زیست توده تر ریز جلبک جهت تعیین وزن خشک مورد استفاده قرار گرفت. این میزان ابتدا به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت rpm ۱۲۰۰۰ سانتریفیوژ شد و سپس جهت جداسازی نمک محیط کشت مجدد با آب مقطر شستشو داده شد و با همان شرایط قبلی سانتریفیوژ شد. سپس خمیر بدست آمده بعد از توزین با ترازوی حساس روی کاغذ صافی از پیش وزن شده به مدت ۴ ساعت در دمای ۱۰۰ درجه سانتیگراد در آون خشک شد و مجدداً وزن کاغذ و نمونه یادداشت گردید (۲۰). با استفاده از فرمول زیر مقادیر وزن خشک محاسبه شد:

$$\text{وزن خشک} \left(\frac{mg}{L} \right) = \frac{[B] - [A]}{\text{حجم نمونه}} \times 1000$$

که در آن [A] وزن کاغذ صافی و [B] وزن کاغذ صافی و جلبک بعد از قرار گیری در آون می‌باشد. در نهایت با توجه به داده‌های بدست آمده منحنی رشد ترسیم شد و میزان نرخ رشد ویژه (μ) و زمان دو برابر شدن (dt) به ترتیب از فرمول‌های زیر محاسبه شد:

$$\mu \text{ (day)} = \frac{\ln(x_2) - \ln(x_1)}{t_2 - t_1}$$

$$dt \text{ (day)} = \frac{\ln 2}{\mu}$$

نرخ رشد ویژه μ ، غلظت در زمان $x_1 = 1$ و غلظت در زمان $x_2 = 2$ و زمان $t_1 = 1$ و زمان $t_2 = 2$

ارزیابی زیستی جلبک

زنده‌مانی

جهت مشاهده درصد زنده‌مانی روزانه جلبک‌ها، روش رنگ‌آمیزی Evans Blue مورد استفاده قرار گرفت (۲۱). در همین راستا به نمونه‌های آماده شده جهت شمارش سلولی به نسبت ۲۰:۱ رنگ Evans Blue اضافه گردید و پس از گذشت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق زیر میکروسکوپ مشاهده شدند. از آنجا که سلول‌های مرده رنگ آبی را جذب می‌کنند و سلول‌های زنده بدون تغییر رنگ باقی می‌مانند می‌توان از رابطه زیر درصد زنده‌مانی را مشخص کرد.

$$\text{درصد زنده‌مانی} = \frac{\text{تعداد سلول‌های زنده}}{\text{تعداد سلول‌های کل}} \times 100$$

بررسی میزان کلروفیل a و کاروتنوئیدها

برای بررسی میزان کلروفیل a از روش استخراج متانول (۲۲) استفاده شد. در این روش CC ۱۰ از نمونه‌های جلبکی به مدت ۱۰ دقیقه با دور rpm ۶۰۰۰ سانتریفیوژ شد. سپس CC ۱۰ متانول خالص به رسوب حاصل از سانتریفیوژ اضافه شد و ورتکس انجام گردید. فاکتور ها با فویل آلومینیوم پوشانده شد تا کلروفیل حفظ شود. سپس نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در حمام آب گرم با دمای ۷۰ °C قرار داده شدند. بعد از سپری شدن زمان مذکور مجدداً سانتریفیوژ با سرعت rpm ۶۰۰۰ و به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. میزان جذب مایع رویی با دستگاه اسپکتروفتومتر (Varian Cary50 UV-visible)، در سه طول موج ۴۸۰، ۶۵۲ و ۶۶۵ نانومتر خوانش شد. با استفاده از دو فرمول زیر میزان کلروفیل a (۲۲) و کاروتنوئید کل (۲۳) اندازه گیری شد.

$$a \text{ کلروفیل } (\mu g/mL) = 16.5169 \times A_{665} - 8.0962 \times A_{652}$$

$$\mu\text{g/mL}) = 4 \times A_{480} \text{ کاروتنوئید کل}$$

آنالیز بیوشیمیایی

تعیین محتوای لیپید، کربوهیدرات، پروتئین، رطوبت و خاکستر

میزان چربی کل با روش کلروفرم متانول محاسبه گردید (۲۴). در همین راستا، میزان ۰/۰۵ گرم از پودر خشک شده جلبک برداشته و داخل دکانتور ریخته شد، سپس به نسبت ۲ به ۱ از کلروفرم و اتانول به نمونه اضافه شد. بعد از ۲۴ ساعت سه فاز مجزا در دکانتور تشکیل شد که فاز زیرین حاوی چربی کل و حلال بود. این فاز با کاغذ صافی جدا شد و درون لوله آزمایش از پیش وزن شده ریخته شد. حلال پرانی با نیتروژن گازی انجام گرفت و نهایتاً وزن چربی موجود از فرمول زیر محاسبه گردید.

$$\text{وزن لوله آزمایش} - \text{وزن لوله آزمایش و چربی} \\ \text{وزن نمونه} \times 100 = \text{درصد چربی}$$

برای تعیین میزان پروتئین ۰/۵ گرم از پودر خشک شده جلبک در لوله‌های هضم نمونه ریخته و به هر لوله ۱۰ سی سی اسیدسولفوریک ۰/۱ نرمال، ۰/۱۵ گرم سولفات مس و ۱/۵ گرم سولفات پتاسیم اضافه شد. سپس به مدت ۳ ساعت عمل هضم در دمای ۴۰۰ درجه سانتی گراد انجام گرفت. نهایتاً با دستگاه اتوماتیک کج‌دال (Kjeltec Auto Analyser) ساخت کشور سوئد میزان پروتئین مشخص گردید.

برای تعیین درصد رطوبت، پتری دیش‌ها از قبل شماره گذاری شده و در آون به مدت ۲ ساعت در دمای ۱۰۵ °C خشک شدند. سپس در دسیکاتور سرد شده و توزین شدند. نهایتاً میزان ۰/۵ گرم از نمونه‌ها داخل پتری دیش گذاشته و مجدد در آون ۱۰۵ °C تا زمان رسیدن به وزن ثابت (۳ الی ۴ ساعت) قرار داده شدند. سپس مجدد بعد از سرد شدن در دسیکاتور توزین انجام شد. درصد رطوبت از فرمول زیر محاسبه شد.

$$\text{وزن پتری دیش} - \text{وزن پتری دیش و نمونه} \\ \text{وزن نمونه} \times 100 = \text{درصد رطوبت}$$

میزان خاکستر نیز با استفاده از کوره الکتریکی انجام شد. به این نحو که بوته چینی‌های خالی در دمای ۱۹۰ °C به مدت یک ساعت خشک شد و بعد از سرد شدن در دسیکاتور توزین شدند. نمونه‌های خشک شده با وزن مشخص در بوته چینی‌ها ریخته شده و به مدت ۵ ساعت در دمای ۵۵۰ درجه سانتی گراد سوزانده شدند. بعد از سرد شدن در دسیکاتور با ترازوی حساس دیجیتالی توزین شدند و از فرمول زیر درصد خاکستر محاسبه شد.

$$\text{وزن بوته چینی} - \text{وزن بوته چینی و نمونه} \\ \text{وزن نمونه} \times 100 = \text{درصد خاکستر}$$

با توجه به مقادیر فوق الذکر، میزان کربوهیدرات برای هر نمونه از فرمول زیر محاسبه شد (۲۵).

$$(\text{رطوبت} + \text{خاکستر} + \text{پروتئین} + \text{چربی}) - 100 = \text{کربوهیدرات}$$

آنالیز ترکیب اسیدهای چرب با دستگاه کروماتوگرافی گازی (GC^۴)

جهت استریفیکاسیون چربی از روش Metcalfe استفاده شد (۲۶). در این روش ۵ سی سی سود متانولی به چربی استخراج شده اضافه شد و به شدت تکان داده شد. لوله آزمایش حاوی نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در حمام آب جوش قرار داده شد و بعد از خنک شدن به آنها از محلول BF₃ 20% به میزان ۲/۱۷۵ °C اضافه کرده و مجدد در حمام آب جوش به مدت سه دقیقه قرار گرفت. پس از خنک شدن به ترکیب فوق ابتدا n-hexan و سپس محلول نمک اشیاع از هر کدام یک سی سی افزوده شد. فاز بالایی حاوی اسیدهای چرب متیل استر شده است که در دستگاه

⁴ Gas Chromatography

کروماتوگرافی گازی (Varian, model: CP3800 Walnut Creek Netherlands) خوانش شد. نتایج حاصل از دستگاه با نرم افزار Chromatography Varian Star (version 6.41) Software آنالیز شد که نتایج به صورت درصد و با محاسبه سطح پیک حاصل از مجموع اسیدهای چرب مشخص گردید.

آنالیز آماری

تجزیه آماری داده‌های حاصل از تیمارها به روش تجزیه واریانس یک طرفه (one-way ANOVA) و در قالب طرح کاملاً تصادفی به صورت بررسی اثر متقابل دو تنش (فاکتوریل) صورت گرفت. فرضیات تجزیه واریانس و نرمال بوده توزیع باقیمانده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS Version 20 انجام شد. مواردی که دارای اختلاف بودند به عنوان معنی‌دار در نظر گرفته شد. مقایسه میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح اختلاف معنی‌دار انجام شد ($P > 0.05$). از نرم افزار Graph Pad Prism جهت رسم نمودارها استفاده شد.

نتایج

میزان رشد و بیوماس ریز جلبک *N. Oculata*

نتایج حاصل از روش‌های مختلف برای سنجش میزان رشد از جمله شمارش سلولی، جذب در طول موج ۷۵۰ نانومتر و وزن خشک با هم تطابق داشته و موید زمان مناسب برای اعمال تنش‌های مورد نظر می‌باشد (جدول ۱-۳). نتایج حاکی از ادامه رشد ریز جلبک‌ها تحت تیمارهای شوری و شدت نور بود و شاخص‌های رشد در مقایسه با شرایط شاهد نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین نرخ رشد در جلبک‌های تحت تنش و جلبک‌های کشت شده در شرایط شاهد دیده نمی‌شود (جدول ۱). همچنین مشخص شد که این ریز جلبک قدرت تحمل دامنه گسترده‌ای از شوری و شدت نور را دارد. جدول ۲ نشان دهنده نرخ ویژه رشد، زمان دو برابر شدن، حداکثر غلظت سلولی و بیوماس نهایی است. همانگونه که در جدول مشاهده می‌شود، نرخ ویژه رشد برای تمام تیمارها عدد 0.4 ± 0.0 روز بدست آمده و زمان دو برابر شدن نیز عدد $1/6 \pm 0.0$ روز قابل ذکر است که با شرایط شاهد اختلاف معنی‌داری نشان نداده است.

ارزیابی زیستی جلبک

همانگونه که در جدول ۳ مشاهده می‌شود درصد زنده‌مانی تحت تیمارهای تعیین شده شوری و شدت نور اختلاف معنی‌داری با شرایط کشت شاهد نداشته و این امر نیز موید قابلیت تحمل میزان بالایی از تغییرات شوری و شدت نور در این ریز جلبک می‌باشد. جداول ۴ و ۵ میانگین مقادیر $Chl-a$ و کاروتنوئیدها را در گروه‌های تعریف شده طی ۱۰ روز آزمایش نشان می‌دهد. همانطور که مشخص است جدول مربوط به کلروفیل محاسبه شده بر حسب وزن خشک (mg/l) با جداول پایش رشد مطابقت داشت که تأییدی بر صحت ارقام بدست آمده در خصوص رشد بود. همچنین میزان کاروتنوئیدها در تمامی روزهای آزمایش روند رو به رشدی را در پیش گرفته بود و نهایتاً در دو روز انتهایی به بالاترین میزان خود رسید.

جدول (۱) مقایسه میانگین تراکم سلولی، وزن خشک و جذب نوری ۷۵۰ نانومتر در ریز جلبک *Nannochloropsis oculata* در روز دهم کشت ریزجلبک؛ مقادیر گزارش شده در جدول میانگین‌ها ($\pm SE$) بر اساس سه تکرار می‌باشند. عدم درج حروف به معنی عدم وجود اختلاف معنی دار بین تیمارها می‌باشد ($P > 0.05$)

شوری	نور	تراکم سلولی (10^6 cell/ml)	وزن خشک (mg/L)	جذب (OD)
شاهد	10000 Lux	420.725378 $\pm$ 1.6280054	7.6173 $\pm$.00233	1.9231 $\pm$.00161
	1500 Lux	420.007327 $\pm$.8004751	7.6156 $\pm$.00313	1.9225 $\pm$.00222
	شاهد	423.244742 $\pm$.6886841	7.6129 $\pm$.00279	1.9222 $\pm$.00344
15 g/L	10000 Lux	421.844614 $\pm$.6643088	7.6143 $\pm$.00205	1.9260 $\pm$.00168
	1500 Lux	423.223401 $\pm$.3821925	7.6152 $\pm$.00055	1.9206 $\pm$.00115
	شاهد	421.284969 $\pm$.3060484	7.6143 $\pm$.00144	1.9241 $\pm$.00115
25 g/L	10000 Lux	419.554863 $\pm$ 1.0152139	7.6162 $\pm$.00285	1.9247 $\pm$.00256
	1500 Lux	421.246094 $\pm$ 1.4654739	7.6157 $\pm$.00188	1.9228 $\pm$.00000
	شاهد	420.476008 $\pm$.2419110	7.6141 $\pm$.00247	1.9248 $\pm$.00188
40 g/L	10000 Lux	421.341131 $\pm$ 1.4943613	7.6152 $\pm$.00255	1.9228 $\pm$.00151
	1500 Lux	420.775382 $\pm$ 1.3159099	7.6150 $\pm$.00420	1.9234 $\pm$.00365
	شاهد	421.144757 $\pm$.6820405	7.6156 $\pm$.00262	1.9260 $\pm$.00278

جدول (۲) نرخ رشد ویژه و زمان دو برابر شدن بر حسب شمارش سلولی (cell/ml) برای تیمارهای تعریف شده در ریزجلبک *Nannochloropsis oculata* بعد از ده روز کشت؛ مقادیر گزارش شده در جدول میانگین‌ها ($\pm SE$) بر اساس سه تکرار می‌باشند. عدم درج حروف به معنی عدم وجود اختلاف معنی دار بین تیمارها می‌باشد ($P > 0.05$)

شوری	نور	نرخ رشد ویژه ($\mu/\text{روز}$)	زمان دو برابر شدن (روز)
شاهد	10000 Lux	0.412658 $\pm$.0002	1.679714 $\pm$.00161
	1500 Lux	0.412351 $\pm$.001	1.680966 $\pm$.00001
	شاهد	0.411188 $\pm$.000	1.68572 $\pm$.00111
15 g/L	10000 Lux	0.410525 $\pm$.0001	1.688441 $\pm$.00201
	1500 Lux	0.413234 $\pm$.0001	1.677372 $\pm$.00031
	شاهد	0.410512 $\pm$.0005	1.688492 $\pm$.00121
25 g/L	10000 Lux	0.409085 $\pm$.0004	1.694386 $\pm$.00211
	1500 Lux	0.410842 $\pm$.0001	1.687138 $\pm$.00171
	شاهد	0.410393 $\pm$.0001	1.688985 $\pm$.00121
40 g/L	10000 Lux	0.413492 $\pm$.0002	1.676327 $\pm$.00014
	1500 Lux	0.40752 $\pm$.0005	1.70089 $\pm$.00123
	شاهد	0.408228 $\pm$.0003	1.697941 $\pm$.00001

جدول ۳) زنده‌مانی سلول‌های ریزجلبک *Nannochloropsis oculata* در تیمارهای تعریف شده از روز اول تا دهم کشت؛ مقادیر گزارش شده در جدول میانگین‌ها ($\pm SE$) بر اساس سه تکرار می‌باشند. عدم درج حروف به معنی عدم وجود اختلاف معنی دار بین گروه‌های آزمایشی می‌باشد ($P > 0.05$)

روزهای آزمایش										نور	شوری
دهم	نهم	هشتم	هفتم	ششم	پنجم	چهارم	سوم	دوم	اول	Lux	g/l
99.98±.001	99.61±.01	100±.00	100±.00	100±.00	100±.00	100±.00	100±.00	100±.00	100±.00	10000	شاهد
99.98±.001	99.74±.01	100±.00	100±.00	100±.00	100±.00	100±.00	100±.00	100±.00	100±.00	1500	
99.99±.001	99.73±.01	100±.00	100±.00	100±.00	100±.00	100±.00	100±.00	100±.00	100±.00	شاهد	
99.98±.001	99.80±.01	100±.00	100±.00	100±.00	100±.00	100±.00	100±.00	100±.00	100±.00	10000	15
99.99±.001	99.82±.01	100±.00	100±.00	100±.00	100±.00	100±.00	100±.00	100±.00	100±.00	1500	
99.98±.001	99.88±.01	100±.00	100±.00	100±.00	100±.00	100±.00	100±.00	100±.00	100±.00	شاهد	
99.98±.001	99.78±.01	100±.00	100±.00	100±.00	100±.00	100±.00	100±.00	100±.00	100±.00	10000	25
99.99±.001	99.69±.01	100±.00	100±.00	100±.00	100±.00	100±.00	100±.00	100±.00	100±.00	1500	
99.98±.001	99.68±.01	100±.00	100±.00	100±.00	100±.00	100±.00	100±.00	100±.00	100±.00	شاهد	
99.98±.001	99.78±.01	100±.00	100±.00	100±.00	100±.00	100±.00	100±.00	100±.00	100±.00	10000	40
99.99±.001	99.74±.01	100±.00	100±.00	100±.00	100±.00	100±.00	100±.00	100±.00	100±.00	1500	
99.99±.001	99.85±.01	100±.00	100±.00	100±.00	100±.00	100±.00	100±.00	100±.00	100±.00	شاهد	

جدول ۴) میزان کلروفیل در سلول‌های ریزجلبک *Nannochloropsis oculata* در تیمارهای تعریف شده از روز اول تا دهم کشت؛ مقادیر گزارش شده در جدول میانگین‌ها ($\pm SE$) بر اساس سه تکرار می‌باشند. عدم درج حروف به معنی عدم وجود اختلاف معنی دار بین گروه‌های آزمایشی می‌باشد ($P > 0.05$)

شوری	شدت نور	Day									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
شاهد	10000	0.861±.002	50.03±.01	234±.001	449±.000	756±.012	879±.01	962.21±.01	990.6±.00	1005.41±.00	1020.45±.01
	1500	0.863±.001	51.01±.01	239±.032	448±.021	759±.00	879.02±.02	962.02±.02	990.07±.04	1005.08±.03	1020.02±.01
	شاهد	0.861±.002	52.14±.01	236±.012	449±.032	759±.021	879.46±.02	962.52±.03	990.41±.01	1005.42±.01	1020.48±.05
15	10000	0.852±.001	52.11±.01	237±.002	447±.031	751±.01	879.51±.02	962.54±.02	990.56±.01	1005.56±.00	1020.51±.03
	1500	0.911±.001	52.05±.01	232±.012	441±.012	750±.05	879.36±.01	962.37±.03	990.36±.02	1005.36±.02	1020.39±.04
	شاهد	0.867±.000	52.45±.01	235±.001	439±.018	752±.011	879.27±.01	962.56±.02	990.56±.01	1005.56±.03	1020.56±.01
25	10000	0.901±.00	50.01±.01	234±.003	446±.013	759±.020	879.86±.03	962.85±.01	990.89±.00	1005.69±.00	1020.85±.03
	1500	0.871±.001	53.01±.01	234±.012	447±.020	754±.011	879.61±.021	962.65±.04	990.61±.01	1005.61±.02	1020.61±.02
	شاهد	0.887±.001	51.00±.01	238±.021	429±.021	751±.03	879.67±.01	962.26±.01	990.22±.01	1005.28±.04	1020.22±.01
40	10000	0.808±.010	52.02±.01	235±.012	440±.030	756±.010	879.83±.03	962.98±.04	990.48±.02	1005.04±.01	1020.90±.03
	1500	0.872±.001	51.01±.01	237±.011	448±.011	753±.021	879.25±.021	962.79±.05	990.07±.02	1005.36±.01	1020.61±.00
	شاهد	0.863±.003	52.09±.01	233±.032	441±.022	757±.04	879.75±.02	962.75±.01	990.79±.01	1005.79±.04	1020.79±.01

جدول ۵) میزان کاروتنوئید در سلول‌های ریزجلبک *Nannochloropsis oculata* در تیمارهای تعریف شده از روز اول تا دهم کشت؛ مقادیر گزارش شده در جدول میانگین‌ها ($\pm$ SE) بر اساس سه تکرار می‌باشند. عدم درج حروف به معنی عدم وجود اختلاف معنی دار بین گروه‌های آزمایشی می‌باشد ($P > 0.05$)

شوری (g/l)	شدت نور (Lux)	Day									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
شاهد	10000	0.287 $\pm$.002	16.67 $\pm$.002	78.12 $\pm$.002	149.67 $\pm$.002	252.02 $\pm$.002	293.38 $\pm$.002	320.67 $\pm$.002	330.35 $\pm$.002	335.84 $\pm$.002	340.76 $\pm$.002
	1500	0.283 $\pm$.001	17.01 $\pm$.01	79 $\pm$.032	148 $\pm$.021	259 $\pm$.00	279.02 $\pm$.02	362.02 $\pm$.02	330.07 $\pm$.04	335.08 $\pm$.03	340.024 $\pm$.01
	شاهد	0.261 $\pm$.002	17.14 $\pm$.01	76 $\pm$.012	149 $\pm$.032	259 $\pm$.021	279.46 $\pm$.02	362.52 $\pm$.03	330.41 $\pm$.01	335.42 $\pm$.01	340.48 $\pm$.05
15	10000	0.282 $\pm$.001	17.11 $\pm$.01	77 $\pm$.002	147 $\pm$.031	251 $\pm$.01	279.51 $\pm$.02	362.54 $\pm$.02	330.56 $\pm$.01	335.56 $\pm$.00	340.51 $\pm$.03
	1500	0.281 $\pm$.001	17.05 $\pm$.01	82 $\pm$.012	141 $\pm$.012	250 $\pm$.05	279.36 $\pm$.01	362.37 $\pm$.03	330.36 $\pm$.02	335.36 $\pm$.02	340.39 $\pm$.04
	شاهد	0.217 $\pm$.000	17.45 $\pm$.01	85 $\pm$.001	139 $\pm$.018	252 $\pm$.011	279.27 $\pm$.01	362.56 $\pm$.02	330.56 $\pm$.01	335.56 $\pm$.03	340.56 $\pm$.01
25	10000	0.291 $\pm$.00	17.01 $\pm$.01	84 $\pm$.003	146 $\pm$.013	259 $\pm$.020	279.86 $\pm$.03	362.85 $\pm$.01	330.89 $\pm$.00	335.69 $\pm$.00	340.85 $\pm$.03
	1500	0.281 $\pm$.001	17.01 $\pm$.01	84 $\pm$.012	147 $\pm$.020	254 $\pm$.011	279.61 $\pm$.021	362.65 $\pm$.04	330.61 $\pm$.01	335.61 $\pm$.02	340.61 $\pm$.02
	شاهد	0.237 $\pm$.001	16.00 $\pm$.01	78 $\pm$.021	149 $\pm$.021	251 $\pm$.03	279.67 $\pm$.01	362.26 $\pm$.01	330.22 $\pm$.01	335.28 $\pm$.04	340.22 $\pm$.01
40	10000	0.288 $\pm$.010	17.02 $\pm$.01	75 $\pm$.012	140 $\pm$.030	256 $\pm$.010	279.83 $\pm$.03	362.98 $\pm$.04	330.48 $\pm$.02	335.04 $\pm$.01	340.90 $\pm$.03
	1500	0.292 $\pm$.001	17.01 $\pm$.01	77 $\pm$.011	148 $\pm$.011	253 $\pm$.021	279.25 $\pm$.021	362.79 $\pm$.05	330.07 $\pm$.02	335.36 $\pm$.01	340.61 $\pm$.00
	شاهد	0.263 $\pm$.03	17.09 $\pm$.01	83 $\pm$.032	141 $\pm$.022	257 $\pm$.04	279.75 $\pm$.02	362.75 $\pm$.01	330.79 $\pm$.01	335.79 $\pm$.04	340.79 $\pm$.01

آنالیز بیوشیمیایی ریزجلبک

درصد ترکیبات بیوشیمیایی وزن خشک ریزجلبک *N. oculata* در تیمارهای تعیین شده در این مطالعه، محاسبه و در جدول ۶ مشاهده می‌شود. از آنجایی که محتوای لیپید در این ریزجلبک بسیار مهم است، تا به امروز تمامی تلاش‌ها بر آن بوده تا این میزان افزایش یابد. همانطور که در جدول نشان داده شده است، بیشترین میزان درصد چربی این ریزجلبک تحت تیمار شدت نور ۱۵۰۰ Lux و میزان شوری ۴۰ g/l بدست آمده است. نکته حائز اهمیت اینکه رتبه دوم و سوم بیشترین درصد چربی هر دو تحت شدت نور ۱۵۰۰ Lux حاصل شده است. به عبارت دیگر هر دو تیمار شوری ۱۵ g/l و ۲۵ g/l تحت شدت نور ۱۵۰۰ Lux بدون اختلاف معنی‌دار رتبه دوم و شوری استاندارد تحت شدت نور ۱۵۰۰ Lux رتبه سوم را به خود اختصاص دادند.

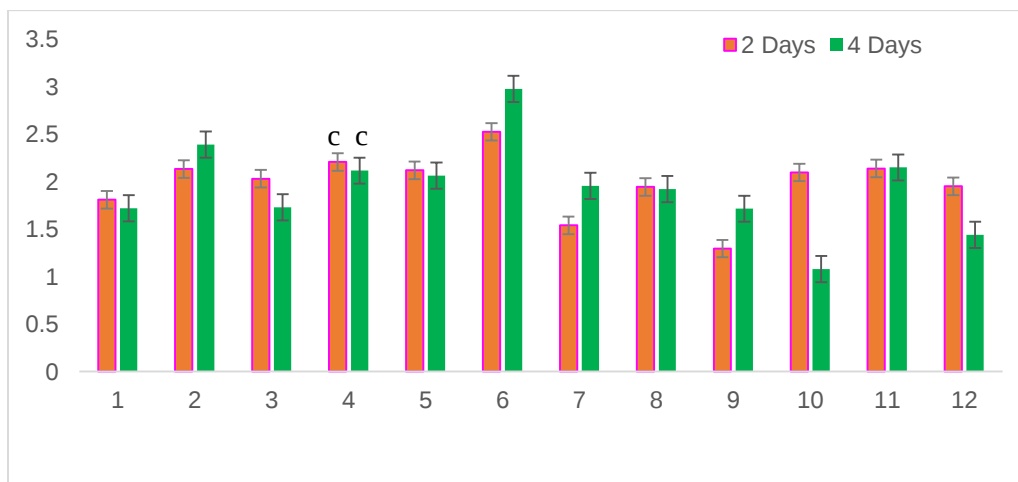
ترکیب اسیدهای چرب

درصد اسیدهای چرب موجود در لیپید استخراج شده از ریزجلبک *N. oculata* تحت تنش‌های تعریف شده در فاصله زمانی دو روز و چهار روز پس از اعمال تنش در جدول ۷-۳ گزارش شده است. همچنین، میزان اسیدهای چرب اشباع، غیراشباع و میزان TAG نیز مورد مقایسه قرار گرفته است. مهم‌ترین اسیدهای چرب اشباع و غیراشباع با یک، دو و سه پیوند دوگانه عبارتند از: پالمیتیک اسید (C16:0)، اسید اولئیک (C18:1n9)، اسید لینولئیک (C18:2n6) و اسید آلفا-لینولئیک (C18:3n3). نتایج نشان داد که در زیست‌توده *N. oculata* در تمام تیمارها اسیدهای چرب غالب عبارتند از: پالمیتیک اسید (C16)، اسید پالمیتولئیک (C16:1n) و اسید دوکوزاهگزانوئیک (C22:6n3) (جدول ۷-۳). همچنین اسیدهای چرب طولانی‌تر از ۲۲ کربن شامل لیگنوسریک (C24) و اسید نورونیک (C24:1n9) در این ریزجلبک مشاهده شد که بسیار حائز اهمیت است. بیشترین مقدار اسید نورونیک در تیمارهای با شدت نور ۱۵۰۰ Lux و شوری شاهد و شدت نور ۱۵۰۰ Lux و شوری ۱۵ g/l هر دو چهار روز پس از اعمال تنش مشاهده شد و این میزان اختلاف معنی داری با شرایط شاهد (به ترتیب ۱۸/۶۲ و ۱۹/۲۷ برابر) و سایر تیمارهای تعریف شده داشت (جدول ۷). این امر نشان دهنده تأثیر مدت زمان اعمال تنش بر تولید اسیدهای چرب با زنجیره بلند است.

جدول ۶) درصد ترکیبات بیوشیمیایی ریز جلبک *Nannochloropsis oculata* در تیمارهای تعریف شده بر اساس وزن خشک؛ مقادیر گزارش شده در جدول میانگین‌ها ($\pm$ SE) بر اساس سه تکرار می‌باشند. حروف مشابه در ستون‌های جدول نشان دهنده عدم وجود اختلاف معنی دار می باشد ($P > 0.05$).

Salinity (g/l)	Light Intensity (Lux)	Lipid	Protein	Carbohydrate	Moisture	Ash
Control	10000	38.8398 $\pm$ 0.30869 ^e	14.5117 $\pm$ 0.29176 ^e	14.4897 $\pm$ 1.96208 ^c	9.0258 $\pm$ 0.76062 ^a	26.5323 $\pm$ 1.79876 ^c
	1500	41.9500 $\pm$ 1.08717 ^c	19.1099 $\pm$ 0.30381 ^b	12.3082 $\pm$ 1.11205 ^d	7.5192 $\pm$ 0.68489 ^b	17.1599 $\pm$ 1.14652 ^e
	Control	33.4123 $\pm$ 0.93812 ^s	20.6252 $\pm$ 0.84995 ^a	17.6888 $\pm$ 1.57915 ^b	7.5462 $\pm$ 0.22295 ^b	21.5945 $\pm$ 1.42316 ^d
15	10000	37.9119 $\pm$ 0.58510 ^e	13.8711 $\pm$ 0.31378 ^e	14.2471 $\pm$ 1.33962 ^c	9.0434 $\pm$ 0.71632 ^a	28.1621 $\pm$ 1.40071 ^c
	1500	43.4745 $\pm$ 1.08717 ^b	15.4489 $\pm$ 0.22126 ^d	5.1773 $\pm$ 0.69867 ^e	7.8136 $\pm$ 0.26280 ^b	28.2608 $\pm$ 1.47287 ^c
	Control	35.3016 $\pm$ 0.44406 ^f	16.5797 $\pm$ 0.23578 ^c	21.2645 $\pm$ 5.55766 ^a	8.0518 $\pm$ 0.10141 ^a	16.5202 $\pm$ 6.00513 ^e
25	10000	39.6160 $\pm$ 0.24663 ^d	11.9793 $\pm$ 1.17855 ^s	8.4225 $\pm$ 0.83592 ^e	8.4394 $\pm$ 0.19919 ^a	36.0788 $\pm$ 1.14652 ^a
	1500	42.8779 $\pm$ 0.96584 ^b	17.6129 $\pm$ 0.56099 ^c	1.0306 $\pm$ 3.85301 ^f	9.1246 $\pm$ 0.17221 ^a	24.6258 $\pm$ 0.84409 ^d
	Control	36.4378 $\pm$ 0.32800 ^f	17.9061 $\pm$ 0.60059 ^c	21.3457 $\pm$ 1.39448 ^a	7.3345 $\pm$ 0.19061 ^b	20.4482 $\pm$ 1.15409 ^d
40	10000	37.6041 $\pm$ 0.53848 ^e	12.7036 $\pm$ 0.32193 ^f	10.0269 $\pm$ 1.09743 ^d	6.8291 $\pm$ 0.11681 ^c	40.1114 $\pm$ 1.74767 ^a
	1500	45.2722 $\pm$ 0.79619 ^a	10.5876 $\pm$ 1.32748 ^s	7.8228 $\pm$ 1.78959 ^e	6.3321 $\pm$ 0.24677 ^c	33.2704 $\pm$ 0.77996 ^b
	Control	40.3737 $\pm$ 0.26024 ^d	15.6716 $\pm$ 0.58788 ^d	0.4593 $\pm$ 1.39448 ^f	7.7240 $\pm$ 0.24987 ^b	31.1643 $\pm$ 0.63857 ^b

بیشترین میزان مجموع اسیدهای چرب اشباع (Σ SFA) تحت تیمار شوری ۱۵ g/l و شدت نور ۱۰۰۰۰ Lux، بیشترین میزان اسیدهای چرب تک غیراشباع (Σ MUFA) تحت تیمار ۲۵ g/l و شدت نور ۱۰۰۰۰ Lux و بیشترین میزان اسیدهای چرب چندغیراشباع (Σ PUFA) تحت تیمار ۱۵ g/l و شدت نور ۱۰۰۰۰ Lux هر سه بعد از گذشت ۴ روز از اعمال تنش حاصل شده. همچنین به منظور درک بهتر اثر تنش‌ها بر ترکیب اسیدهای چرب، نسبت مجموع Σ SFA و Σ MUFA به Σ PUFA دو و چهار روز پس از اعمال تنش بین گروه‌های آزمایشی مقایسه شد (نمودار ۱). همانطور که در هر دو نمودار نشان داده شده است، گروه ۶ (نور شاهد + شوری ۱۵ g/l) به طور معنی داری ($p < 0.05$) محتوای بالاتری نسبت به سایر گروه‌ها دارد.



نمودار ۱) نسبت مجموع Σ SFA و Σ MUFA به Σ PUFA دو و چهار روز پس از اعمال تنش در تیمارهای تعریف شده. حروف مشابه نشانه عدم اختلاف معنی دار است ($P > 0.05$).

Experimental Treatments: 1: light 10000 lux, salinity normal; 2: light 10000 lux, salinity 15g/l; 3: light 10000 lux, salinity 25g/l; 4: light 10000 lux, salinity 40g/l; 5: light 5000 lux, salinity normal; 6: light 5000 lux, salinity 15g/l; 7: light 5000 lux, salinity 25 g/l; 8: light 5000 lux, salinity 40 g/l; 9: light 1500 lux, salinity 15 g/l; 10: light 1500 lux, salinity 25 g/l; 11: light 1500 lux, salinity 25 g/l; 12: light 1500 lux, salinity 40 g/l;

بحث

اعضای جنس *Nannochloropsis* (Eustigmatophyceae) جلبک‌های پیکوپلانکتونیک هستند که زیستگاه‌های گسترده‌ای در دریا به ویژه در آب‌های ساحلی و مصب‌ها دارند. مقالات متعددی به این مطلب اشاره کردند که این ریزجلبک قابلیت تحمل رنج گسترده‌ای از شوری را دارند (۱۹، ۲۷). مطالعه حاضر نیز موید تحمل رنج بالای شوری توسط این ریزجلبک است چرا که تنش‌های شوری که در انتهای فاز لگاریتمی به سلول‌های ریزجلبک وارد شد، باعث ایجاد اختلاف معنی‌داری در هیچکدام از تیمارها در خصوص فاکتورهای نرخ رشد ویژه و زمان دوبرابر شدن نشد (جدول ۲-۳). همچنین نتایج بدست آمده در این مطالعه نشان داد که رشد ریزجلبک تحت شرایط شدت نور کم (1500 Lux) و شدت نور بالا (10000 Lux) اختلاف معنی‌داری با شرایط شاهد (5000 Lux) ندارد. ارزش این یافته‌ها زمانی بیش از پیش نمایان می‌شود که این ریزجلبک تحت کشت تجاری در استخرهای روباز قرار گیرد. چرا که در این صورت مسئله تبخیر و تغییرات شدت نور خورشید در فصول مختلف چالش برانگیز نخواهد بود. همچنین از منابع آبی مختلف با درجات شوری گوناگون می‌توان برای کشت استفاده کرد. از سوی دیگر از آنجایی که نمک‌ها نقش حیاتی در مسیرهای فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی رشد، تولید مثل و متابولیسم اسیدهای چرب در ریزجلبک‌ها دارند همواره، تنش شوری به عنوان یکی از کارآمدترین روش‌ها برای غنی‌سازی محتوای چربی در دستور کار محققین بسیاری قرار گرفته است (۲۸-۳۱). بسیاری از گونه‌های ریزجلبک تحت تنش شوری قرار گرفته‌اند و تغییرات ایجاد شده در آنها بررسی شده است. Yang و همکاران (۳۲) با اعمال تنش NaCl موفق به افزایش محتوای کل چربی *Monoraphidium dybowskii* به میزان $41/7\%$ درصد شدند. همچنین با اعمال تنش شوری به میزان gl^{-1} ۱۳، بیشترین میزان اسید چرب کل در *Nannochloropsis sp* به دست آمد. (۱۹)، (۳۳). در *Scenedesmus* اعمال تنش شوری به طور قابل توجهی محتوای لیپید این ریزجلبک را افزایش داده است (۳۴). همچنین نشان داده شد که وقتی ریزجلبک دریایی *Dunaliella* تحت تأثیر غلظت‌های مختلف نمک قرار می‌گیرد، تجمع لیپیدهای داخل سلولی و تری‌گلیسرول تا 70% درصد افزایش می‌یابد (۳۵). نتایج بدست آمده از این مطالعه نیز منطبق با تحقیقات انجام شده بود و تمامی تیمارهایی که تحت سه تنش شوری در نظر گرفته شده قرار داشتند اختلاف معنی‌داری را از نظر درصد چربی با گروه شاهد نشان دادند (جدول ۶-۳). از آنجایی که غلظت‌های مختلف نمک نه تنها بر میزان تجمع چربی در سلول‌های ریزجلبک، بلکه بر ترکیب اسیدهای چرب نیز تأثیر می‌گذارد (۳۶)، بررسی تغییرات این ترکیبات به منظور دستیابی به مناسب‌ترین ترکیب از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. در همین راستا نشان داده شد که مجموع اسیدهای چرب اشباع، اسیدهای چرب تک‌غیراشباع و اسیدهای چرب چندغیراشباع همگی تحت تنش‌های شوری تعیین شده اختلاف معنی‌داری با حالت استاندارد دارند (جدول ۷-۳). با وجود اینکه مطالعات زیادی در زمینه بررسی ترکیبات اسیدهای چرب تحت تنش‌های گوناگون انجام نگرفته است، این داده‌ها با توجه به اهداف گوناگون از افزایش محتوای لیپید می‌تواند بسیار ارزنده باشد.

علاوه بر این، شایان ذکر است که رشد ریزجلبک‌ها در طول فتوسنتز با حضور نور خورشید صورت می‌گیرد. نور به عنوان یکی از عوامل کلیدی بر رشد ریزجلبک‌ها و ترکیبات آن تأثیر می‌گذارد (۳۷). در مطالعات مختلف، تأثیر طول موج‌های مختلف نور بر رشد و متابولیسم ریزجلبک‌ها بررسی شده است. در این میان، مشخص شده است که شدت نور یکی از عوامل مهمی است که به شدت بر رشد ریزجلبک‌ها و محتوای چربی آنها تأثیر می‌گذارد (۳۸). در مطالعه حاضر که اثر شدت نور بر میزان لیپید تجمع یافته و ترکیبات اسیدهای چرب مورد بررسی قرار گرفته نشان داد که هر دو شدت نور کم و شدت نور بالا بر محتوای لیپید تأثیر می‌گذارد و این یافته با مطالعات پیشین همخوانی دارد (۳۹، ۴۰). به عبارت دیگر مطالعات زیادی بر اساس بررسی شدت نور مورد نیاز برای به دست آوردن حداکثر رشد و محتوای چربی انجام شده است، اما این موضوع برای گونه‌های مختلف ریزجلبک متفاوت است (۴). در این زمینه اثر شدت نور بر محتوای چربی سلول‌های ریزجلبک به خوبی مورد مطالعه قرار گرفته، اما در عین حال اطلاعات کمی در مورد تأثیر شدت نور بر ترکیب اسیدهای چرب وجود دارد. در این مطالعه میزان اسیدهای چرب اشباع تحت شدت نور بالا (10000 Lux) اختلاف معنی‌داری با شرایط شاهد (5000 Lux) نشان نداد.

جدول ۷) ترکیب اسیدهای چرب بر حسب درصد در گروه‌های تحت آزمایش در ریزجلبک *Nannochloropsis oculat*

شوری	نور	زمان	C20:5n3	C22	C22:1n9	C22:6n3	C24	C24:1n9	ΣSFA	ΣMUFA	ΣPUFA	ΣLCP UFA	TAG
شاهد	10000	2 day	1.65±0.05 ^b	6.49±0.51 ^b	1.43±0.08 ^b	18.91±0.88 ^a	1.43±0.09	1.59±0.37 ^c	38.61±1.43 ^b	22.87±1.23 ^b	37.16±1.87 ^b	22.17±1.70 ^b	66.87±0.92 ^b
	1500		1.65±0.45 ^b	14.46±0.33 ^a	1.89±0.05 ^b	26.23±1.51 ^a	0.95±0.17	5.67±1.05 ^b	34.32±5.21 ^b	23.13±4.52 ^b	43.33±2.25 ^a	32.44±3.01 ^a	62.05±1.09 ^b
	شاهد		13.79±0.25 ^a	6.20±0.92 ^b	1.47±0.54 ^b	3.70±1.58 ^c	0.38±0.20	0.25±0.88 ^c	38.62±1.67 ^b	26.19±0.39 ^a	30.85±1.76 ^b	3.25±0.52 ^d	70.42±1.26 ^a
	10000	4 day	1.65±0.45 ^b	15.13±1.25 ^a	0.89±0.05 ^b	11.23±0.60 ^b	0.95±0.17	10.12±1.10 ^a	37.82±1.81 ^b	25.07±0.61 ^a	36.50±0.64 ^b	20.54±0.58 ^b	70.14±.53 ^a
	1500		1.21±0.23 ^b	15.20±0.30 ^a	1.05±0.28 ^b	11.18±0.25 ^b	0.89±0.13	10.24±0.10 ^a	36.41±1.02 ^b	21.1072±1.94 ^b	44.76±.89 ^a	21.36±2.29 ^b	73.18±.60 ^a
	شاهد		13.37±0.26 ^a	6.12±0.60 ^b	1.85±0.38 ^b	3.38±0.30 ^c	0.42±0.15	0.55±0.22 ^c	37.42±5.43 ^b	25.9788±1.68 ^a	31.91±1.74 ^b	3.93±1.19 ^d	69.50±1.29 ^b
15 g/l	10000	2 day	1.47±0.20 ^b	8.49±0.40 ^b	1.55±0.15 ^b	11.60±1.57 ^b	0.53±0.10	2.35±0.73 ^c	43.78±1.1 ^b	23.8737±0.37 ^b	30.20±2.22 ^b	15.65±0.96 ^c	71.13±1.40 ^b
	1500		1.74±0.40 ^b	13.16±0.59 ^a	0.14±0.05 ^b	13.10±0.47 ^b	1.27±0.17	4.43±0.13 ^b	45.10±2.4 ^b	21.0815±0.80 ^b	32.09±1.13 ^b	18.80±0.62 ^c	72.31±1.08 ^a
	شاهد		2.06±0.23 ^b	12.57±2.21 ^a	1.07±0.02 ^b	11.77±2.19 ^b	2.65±0.27	0.72±1.36 ^c	46.9±1.62 ^a	24.81±.091 ^a	28.57±0.69 ^c	12.42±1.70 ^c	72.09±0.37 ^a
	10000	4 day	1.82±0.14 ^b	13.44±0.61 ^a	0.68±0.11 ^b	11.67±2.83 ^b	1.55±0.54	1.73±0.53 ^c	47.99±2.21 ^a	23.60±1.43 ^b	29.49±3.60 ^c	12.60±3.09 ^c	72.88±0.82 ^a
	1500		1.41±0.17 ^b	5.38±0.52 ^b	1.07±0.07 ^b	21.62±0.77 ^a	2.02±0.56	10.60±0.33 ^a	35.40±2.48 ^b	15.35±1.36 ^c	47.0±1.01 ^a	32.52±1.49 ^a	64.22±0.31 ^b
	شاهد		1.04±0.20 ^b	11.73±1.06 ^a	0.48±0.32 ^b	6.06±0.76 ^b	0.14±0.04	0.63±0.13 ^c	48.28±0.99 ^a	26.59±.23 ^a	25.79±0.88 ^c	6.73±2.32 ^d	75.89±1.96 ^a
25 g/l	10000	2 day	1.31±0.11 ^b	7.93±0.16 ^b	0.60±0.37 ^b	11.59±1.13 ^b	0.14±0.01	5.86±1.03 ^b	43.93±0.28 ^b	23.05±3.48 ^b	30.90±3.39 ^b	17.10±0.71 ^c	72.57±3.31 ^a
	1500		1.74±0.12 ^b	13.50±0.46 ^a	0.43±0.58 ^b	9.65±0.06 ^b	0.41±0.01	6.70±0.27 ^b	45.40±0.8 ^b	21.92±0.96 ^b	31.00±1.27 ^b	15.72±0.93 ^c	75.98±0.76 ^a
	شاهد		1.15±0.01 ^b	9.10±0.47 ^b	0.48±0.04 ^b	20.16±0.64 ^a	0.42±0.08	6.78±0.25 ^b	45.55±1.4 ^b	15.44±0.35 ^c	39.72±0.31 ^b	26.55±2.75 ^a	66.0±0.73 ^b
	10000	4 day	1.53±0.13 ^b	9.00±0.44 ^b	1.42±0.45 ^b	9.64±0.67 ^b	0.38±0.01	9.45±0.97 ^a	38.55±1.59 ^b	25.1656±2.29 ^a	36.96±1.83 ^b	19.42±0.70 ^c	74.01±0.40 ^a
	1500		2.16±0.20 ^b	14.78±0.78 ^a	1.37±0.08 ^b	4.49±0.87 ^b	0.18±0.09	6.40±1.01 ^b	40.47±3.06 ^b	27.27±1.40 ^a	31.47±0.56 ^b	10.93±2.50 ^c	74.73±2.14 ^a
	شاهد		1.17±0.20 ^b	12.13±0.11 ^b	0.16±0.07 ^b	7.99±0.93 ^b	0.26±0.04	8.74±0.92 ^a	47.48±1.2 ^a	18.26±1.55 ^c	33.01±1.42 ^b	16.12±1.37 ^c	74.69±2.00 ^a
40 g/l	10000	2 day	1.45±0.05 ^b	8.60±0.51 ^b	0.33±0.22 ^b	10.58±1.30 ^b	0.33±0.28	1.39±0.51 ^c	43.94±2.43 ^b	24.85±0.26 ^a	31.23±2.17 ^b	11.81±1.18 ^c	69.04±1.16 ^b
	1500		1.85±0.31 ^b	15.11±0.56 ^a	0.30±0.22 ^b	17.40±0.30 ^a	1.60±0.22	2.28±0.21 ^c	47.28±1.6 ^a	18.75±0.84 ^c	33.45±.83 ^b	19.69±0.51 ^c	69.11±0.55 ^b
	شاهد		1.94±0.02 ^b	10.04±0.23 ^b	3.83±0.16 ^a	11.06±1.00 ^b	0.41±0.08	5.90±0.35 ^b	41.61±1.52 ^b	24.66±1.89 ^a	33.43±1.09 ^b	17.02±1.63 ^c	72.08±1.13 ^a
	10000	4 day	1.87±0.12 ^b	11.44±0.64 ^b	1.07±0.02	9.31±0.24 ^b	0.55±0.02	2.16±0.09 ^c	42.78±2.29 ^b	26.88±1.42 ^a	31.97±.89 ^b	11.75±0.55 ^c	70.10±2.59 ^a
	1500		2.08±0.12 ^b	18.87±0.68 ^a	0.02±0.04	19.45±1.02 ^a	2.40±0.11	5.99±0.70 ^b	43.39±0.26 ^b	15.64±1.28 ^c	40.72±1.65 ^a	25.53±2.82 ^b	65.63±0.35 ^b
	شاهد		1.65±0.05 ^b	11.22±1.51 ^b	4.18±0.08 ^a	11.42±0.77 ^b	1.60±0.65	6.34±0.41 ^b	38.59±1.61 ^b	26.53±0.930 ^a	35.17±2.2 ^b	17.87±1.47 ^c	71.69±0.98 ^a

مقادیر گزارش شده در جدول میانگین‌ها (SE ±) بر اساس سه تکرار می‌باشند. عدم درج حروف با حروف مشابه در ستون‌های جدول نشان

دهنده عدم وجود اختلاف معنی دار می باشد ($P > 0.05$).

C12: Lauric acid; **C14:** Myristic acid; **C15:** Pentadecylic acid; **C16:** Palmitic acid; **C16:1n:** Palmitoleic acid; **C18:** Stearic acid; **C18:1n9:** Oleic acid; **C18:2n6:** Linoleic acid; **C18:3n6:** linolenic acid; **C20:1n9:** Eicosenoic acid; **C20:2n6:** ; **C20:4n6:** Arachidonic acid; **C20:5n3:** Eicosapentaenoic acid; **C22:** Behenic acid; **C22:1n9:** Erucic; **C22:6n3:** Docosahehexaenoic acid; **C24:** Lignoceric; **C24:1n9:** Nervonic acid; **SFA:** Saturated fatty acids; **MUFA:** Mono unsaturated fatty acids; **PUFA:** Polly unsaturated fatty acids; **LCPUFA:** Long chain Polly unsaturated fatty acids; **TAG:** Triacylglycerol

همچنین میزان اسیدهای چرب اشباع نیز تحت شدت نور کم (150۰ Lux) با اندکی کاهش نسبت به شرایط شاهد (5۰۰۰ Lux) دارای اختلاف معنی داری نبود. اسیدهای چرب تک غیرشباع در هر دو شرایط شدت نور کم (150۰ Lux) و شدت نور بالا (۱۰۰۰۰ Lux) نسبت به شرایط شاهد کاهش نشان دادند که این اختلاف معنی دار بود (جدول ۷-۳). نهایتاً اینکه اسیدهای چرب چند غیراشباع تحت هر دو تنش شدت نور کم و شدت نور بالا افزایش قابل ملاحظه این نسبت به حالت شاهد نشان دادند که این افزایش دارای اختلاف معنی دار بود. این یافته‌ها با مطالعه Van و همکاران که روی ریزجلبک *Nannochloropsis salina* انجام شده همخوانی دارد (۱۵).

اعمال تنش شدت نور و شوری به صورت همزمان اما در انتهای فاز لگاریتمی بر ریزجلبک مورد مطالعه، نشان داد که مجدد تفاوت معنی داری ($P > ۰/۰۵$) در پارامترهای رشد بین تیمارهای تحت تنش و شرایط شاهد وجود ندارد که یافته بسیار ارزشمندی بود. این در حالی است که در

تمامی مطالعات قبلی اعمال تنش‌های مختلف باعث کاهش قابل توجه زیست توده در ریز جلبک‌های مورد مطالعه شده است (۴۱-۴۶). به عبارت دیگر بدست آوردن زمان مناسب اعمال تنش بر ریز جلبک می‌تواند مانع کاهش رشد و بیوماس نهایی شود که در این مطالعه حاصل گردید. بررسی اثر متقابل دو تنش شدت نور و شوری نشان داد که بیشترین میزان تولید چربی در شوری ۴۰ g/l و شدت نور ۱۵۰۰ Lux بدست آمده که اختلاف معنی داری با شرایط شاهد داشت. بیشترین میزان اسیدهای چرب اشباع در شرایط شوری ۱۵ g/l و شدت نور ۱۰۰۰۰ Lux، اسیدهای چرب تک غیراشباع در شرایط شوری ۲۵ g/l و شدت نور ۱۵۰۰ Lux و اسیدهای چرب چندغیراشباع در شرایط شوری ۱۵ g/l و شدت نور ۱۵۰۰ Lux بدست آمد که همگی از شرایط شاهد بیشتر بوده و با آن اختلاف معنی دار داشتند. با توجه به این نتایج مطالعه ترکیب اسیدهای چرب ریز جلبکی که در معرض مقادیر مختلف غلظت نمک و همچنین شدت نور قرار دارند بسیار ارزشمند است. زیرا ممکن است ضمن افزایش لیپید در سلول‌های ریز جلبک‌ها، ترکیب اسیدهای چرب به گونه‌ای تغییر کند که با اهداف مورد نظر سازگار نباشد. به عبارت دیگر، بسته به اینکه کدام یک از اسیدهای چرب چند غیراشباع، اسیدهای چرب تک غیراشباع و اسیدهای چرب اشباع مورد نیاز است، می‌توان از سطوح مناسب NaCl یا شدت نور استفاده کرد. از آنجایی که میزان اسیدهای چرب اشباع (SFA) و اسیدهای چرب تک غیراشباع (MUFA) در تولید سوخت زیستی بسیار مهم است (۴۳)، بالاترین نسبت کل اسیدهای چرب اشباع و تک غیراشباع (TAG) به اسیدهای چرب چند غیراشباع در تیمارهای مورد استفاده مهم است. در نمودار ۱-۳ نشان داده شد که در نور شاهد همراه با شوری ۱۵ g/l بیشترین میزان این نسبت به دست آمده است. نتایج به‌دست‌آمده با مطالعاتی که اثر شوری را بر افزایش TAG در ریز جلبک‌ها بررسی کرده‌اند، کاملاً مطابقت دارد (۳۵، ۴۷). همچنین، نتایج بررسی فراوان‌ترین اسیدهای چرب در *Nannochloropsis* نشان می‌دهد که اسید پالمیتیک (C16:0)، اسید پالمیتوئیک (C16:1n) و اسید دوکوزاهگزانوئیک (C22:6n3) در همه تیمارها فراوان‌ترین اسیدهای چرب بوده و نتایج بدست آمده با سایر تحقیقات روی *Nannochloropsis* همخوانی دارد (۳، ۴۸، ۴۹).

نتیجه‌گیری

نتایج بدست آمده در این مطالعه نشان داد که در ریز جلبک *N. oculata* می‌توان با اعمال همزمان تنش شوری به میزان ۱۵ g/l و تنش شدت نور بالا به میزان ۱۰۰۰ Lux به بیشترین میزان اسیدهای چرب اشباع دست یافت. همچنین برای بدست آوردن بیشترین میزان اسیدهای چرب تک غیراشباع و چند غیراشباع در این ریز جلبک به ترتیب می‌باید شوری ۲۵ g/l و شدت نور ۱۵۰۰ Lux و شوری ۱۵ g/l و شدت نور ۱۵۰۰ Lux اعمال شود. به عبارت دیگر مشاهده شد که تحت شدت نور بالا (۱۰۰۰ Lux) اسیدهای چرب اشباع بیشتری تولید می‌شوند و این در حالی است که تحت شدت نور پایین (۱۵۰۰ Lux) اسیدهای چرب غیراشباع به میزان بیشتری در این ریز جلبک تولید می‌شوند.

منابع

1. Barsanti L, Gualtieri P. Is exploitation of microalgae economically and energetically sustainable? Algal research. 2018;31:107-15.
2. Koletzko B, Agostoni C, Carlson SE, Clandinin T, Hornstra G, Neuringer M, et al. Long chain polyunsaturated fatty acids (LC-PUFA) and perinatal development. Acta paediatrica. 2001;90(4):460-4.
3. Suzuki H, Hulatt CJ, Wijffels RH, Kiron V. Growth and LC-PUFA production of the cold-adapted microalga *Koliella antarctica* in photobioreactors. Journal of Applied Phycology. 2019;31(2):981-97.
4. Alishah Aratboni H, Rafiei N, Garcia-Granados R, Alemzadeh A, Morones-Ramírez JR. Biomass and lipid induction strategies in microalgae for biofuel production and other applications. Microbial Cell Factories. 2019;18(1):178.
5. Shokravi Z, Shokravi H, Chyuan OH, Lau WJ, Koloor SS, Petru M, et al. Improving 'Lipid Productivity' in Microalgae by Bilateral Enhancement of Biomass and Lipid Contents: A Review. Sustainability. 2020;12(21).
6. Chen B, Wan C, Mehmood MA, Chang J-S, Bai F, Zhao X. Manipulating environmental stresses and stress tolerance of microalgae for enhanced production of lipids and value-added products—a review. Bioresource technology. 2017;244:1198-206.

7. Althoff T, Mills DJ, Popot JL, Kühlbrandt W. Arrangement of electron transport chain components in bovine mitochondrial supercomplex I1III2IV1. *Embo j*. 2011;30(22):4652-64.
8. Yates CM, Calder PC, Ed Rainger G. Pharmacology and therapeutics of omega-3 polyunsaturated fatty acids in chronic inflammatory disease. *Pharmacol Ther*. 2014;141(3):272-82.
9. Gopalakrishnan V, Ramamurthy D. Dyeing Industry Effluent System as Lipid Production Medium of *Neochloris* sp. for Biodiesel Feedstock Preparation. *BioMed Research International*. 2014;2014:529560.
10. Mathieu-Rivet E, Kiefer-Meyer MC, Vanier G, Ovide C, Burel C, Lerouge P, et al. Protein N-glycosylation in eukaryotic microalgae and its impact on the production of nuclear expressed biopharmaceuticals. *Front Plant Sci*. 2014;5:359.
11. Vitova M, Bisova K, Kawano S, Zachleder V. Accumulation of energy reserves in algae: From cell cycles to biotechnological applications. *Biotechnol Adv*. 2015;33(6 Pt 2):1204-18.
12. Solovchenko AE. Physiological role of neutral lipid accumulation in eukaryotic microalgae under stresses. *Russian Journal of Plant Physiology*. 2012;59(2):167-76.
13. Fukuda H, Kondo A, Noda H. Biodiesel fuel production by transesterification of oils. *J Biosci Bioeng*. 2001;92(5):405-16.
14. Chisti Y. Biodiesel from microalgae beats bioethanol. *Trends Biotechnol*. 2008;26(3):126-31.
15. Van Wagenen J, Miller TW, Hobbs S, Hook P, Crowe B, Huesemann M. Effects of light and temperature on fatty acid production in *Nannochloropsis salina*. *Energies*. 2012;5(3):731-40.
16. Rodolfi L, Chini Zittelli G, Bassi N, Padovani G, Biondi N, Bonini G, et al. Microalgae for oil: strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. *Biotechnol Bioeng*. 2009;102(1):100-12.
17. Camacho-Rodríguez J, Cerón-García MC, González-López CV, Fernández-Sevilla JM, Contreras-Gómez A, Molina-Grima E. A low-cost culture medium for the production of *Nannochloropsis gaditana* biomass optimized for aquaculture. *Bioresource technology*. 2013;144:57-66.
18. Solovchenko A, Lukyanov A, Solovchenko O, Didi-Cohen S, Boussiba S, Khozin-Goldberg I. Interactive effects of salinity, high light, and nitrogen starvation on fatty acid and carotenoid profiles in *Nannochloropsis oceanica* CCLA 804. *European Journal of Lipid Science and Technology*. 2014;116(5):635-44.
19. Pal D, Khozin-Goldberg I, Cohen Z, Boussiba S. The effect of light, salinity, and nitrogen availability on lipid production by *Nannochloropsis* sp. *Applied microbiology and biotechnology*. 2011;90(4):1429-41.
20. Moheimani NR, Borowitzka MA, Isdepsky A, Sing S. Standard methods for measuring growth of algae and their composition. *Algae for biofuels and energy*: Springer; 2013. p. 265-84.
21. Vijayaraghavareddy P, Adhinarayanreddy V, Vemanna RS, Sreeman S, Makarla U. Quantification of Membrane Damage/Cell Death Using Evan's Blue Staining Technique. *Bio-protocol*. 2017;7(16):e2519.
22. Ritchie RJ. Consistent sets of spectrophotometric chlorophyll equations for acetone, methanol and ethanol solvents. *Photosynthesis research*. 2006;89(1):27-41.
23. Kim CW, Sung MG, Nam K, Moon M, Kwon JH, Yang JW. Effect of monochromatic illumination on lipid accumulation of *Nannochloropsis gaditana* under continuous cultivation. *Bioresour Technol*. 2014;159:30-5.
24. Folch J, Lees M, Stanley GHS. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *Journal of biological chemistry*. 1957;226(1):497-509.
25. Aksnes A, Opstvedt J. Content of digestible energy in fish feed ingredients determined by the ingredient-substitution method. *Aquaculture*. 1998;161(1-4):45-53.
26. Metcalfe LD, Schmitz AA, Pelka JR. Rapid preparation of fatty acid esters from lipids for gas chromatographic analysis. *Analytical chemistry*. 1966;38(3):514-5.
27. Boussiba S, Vonshak A, Cohen Z, Avissar Y, Richmond A. Lipid and biomass production by the halotolerant microalga *Nannochloropsis salina*. *Biomass*. 1987;12(1):37-47.
28. Kalita N, Baruah G, Goswami RCD, Talukdar J, Kalita MC. *Ankistrodesmus falcatus*: a promising candidate for lipid production, its biochemical analysis and strategies to enhance lipid productivity. *Journal of Microbiology and Biotechnology Research*. 2011;1(4):148-57.
29. Mohan SV, Devi MP. Salinity stress induced lipid synthesis to harness biodiesel during dual mode cultivation of mixotrophic microalgae. *Bioresource technology*. 2014;165:288-94.
30. Guo DS, Ji XJ, Ren LJ, Li GL, Huang H. Improving docosahexaenoic acid production by *Schizochytrium* sp. using a newly designed high-oxygen-supply bioreactor. *AIChE Journal*. 2017;63(10):4278-86.
31. Richmond A. Handbook of microalgal mass culture (1986): CRC press; 2017.

32. Yang J, Astatkie T, He QS. A comparative study on the effect of unsaturation degree of camelina and canola oils on the optimization of bio-diesel production. *Energy Reports*. 2016;2:211-7.
33. Pal D, Khozin-Goldberg I, Didi-Cohen S, Solovchenko A, Batushansky A, Kaye Y, et al. Growth, lipid production and metabolic adjustments in the euryhaline eustigmatophyte *Nannochloropsis oceanica* CCALA 804 in response to osmotic downshift. *Applied microbiology and biotechnology*. 2013;97(18):8291-306.
34. Kirrolia A, Bishnoi NR, Singh N. Salinity as a factor affecting the physiological and biochemical traits of *Scenedesmus quadricauda*. *Journal of Algal Biomass Utilization*. 2011;2(4):28-34.
35. Takagi M, Yoshida T. Effect of salt concentration on intracellular accumulation of lipids and triacylglyceride in marine microalgae *Dunaliella* cells. *Journal of bioscience and bioengineering*. 2006;101(3):223-6.
36. Sharma KK, Schuhmann H, Schenk PM. High Lipid Induction in Microalgae for Biodiesel Production. *Energies*. 2012;5(5).
37. Zhu L. Microalgal culture strategies for biofuel production: a review. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*. 2015;9(6):801-14.
38. Renaud SM, Parry DL, Thinh L-V, Kuo C, Padovan A, Sammy N. Effect of light intensity on the proximate biochemical and fatty acid composition of *Isochrysis* sp. and *Nannochloropsis oculata* for use in tropical aquaculture. *Journal of Applied Phycology*. 1991;3(1):43-53.
39. Wahidin S, Idris A, Shaleh SRM. The influence of light intensity and photoperiod on the growth and lipid content of microalgae *Nannochloropsis* sp. *Bioresource technology*. 2013;129:7-11.
40. Nzayisenga JC, Farge X, Groll SL, Sellstedt A. Effects of light intensity on growth and lipid production in microalgae grown in wastewater. *Biotechnol Biofuels*. 2020;13(1):4.
41. Ma X-N, Chen T-P, Yang B, Liu J, Chen F. Lipid production from *Nannochloropsis*. *Marine drugs*. 2016;14(4):61.
42. Guschina IA, Harwood JL. Lipids and lipid metabolism in eukaryotic algae. *Progress in lipid research*. 2006;45(2):160-86.
43. Bartley ML, Boeing WJ, Corcoran AA, Holguin FO, Schaub T. Effects of salinity on growth and lipid accumulation of biofuel microalga *Nannochloropsis salina* and invading organisms. *Biomass and Bioenergy*. 2013;54:83-8.
44. Huang G, Chen F, Wei D, Zhang X, Chen G. Biodiesel production by microalgal biotechnology. *Applied energy*. 2010;87(1):38-46.
45. Huete-Ortega M, Okurowska K, Kapoore RV, Johnson MP, Gilmour DJ, Vaidyanathan S. Effect of ammonium and high light intensity on the accumulation of lipids in *Nannochloropsis oceanica* (CCAP 849/10) and *Phaeodactylum tricornutum* (CCAP 1055/1). *Biotechnology for biofuels*. 2018;11(1):1-15.
46. Fakhry EM, El Maghraby DM. Lipid accumulation in response to nitrogen limitation and variation of temperature in *Nannochloropsis salina*. *Botanical studies*. 2015;56(1):1-8.
47. Venkata Mohan S, Devi MP. Salinity stress induced lipid synthesis to harness biodiesel during dual mode cultivation of mixotrophic microalgae. *Bioresource technology*. 2014;165:288-94.
48. Nwoba EG, Parlevliet DA, Laird DW, Alameh K, Moheimani NR. Does growing *Nannochloropsis* sp. in innovative flat plate photobioreactors result in changes to fatty acid and protein composition? *Journal of Applied Phycology*. 2020;32(6):3619-29.
49. Hu H, Gao K. Optimization of growth and fatty acid composition of a unicellular marine picoplankton, *Nannochloropsis* sp., with enriched carbon sources. *Biotechnology letters*. 2003;25(5):421-5.

The effect of mutual physicochemical stresses (light intensity-salinity) on changes in growth, biochemical factors and fatty acid composition of microalgae *Nannochloropsis oculata*

Azin Fahim¹, Mohammad Reza Kalbassi Masjedshahi^{1*}, Abdolmohammad Abedian Kenari¹, Mohammad Sadegh Sabet²

1. Department of Aquaculture, Faculty of Natural Resources and Marine Sciences ,Tarbiat Modares University

2. Department of Plant Genetics and Breeding, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University

ABSTRACT

In order to commercial productivity of microalgae that have a high potential for lipid production, the effort is to increase the cellular lipid content. This should be a smart considering based on various uses that are intended for this lipid increase. In other words, approaches to increase the targeted fatty acids while maintaining the final biomass are more important. The aim of this study is to investigate the changes in fatty acid composition in *Nannochloropsis oculata* microalgae under physicochemical stresses (light intensity and salinity). In this regard, the growth rate, the amount of chlorophyll and carotenoid, the approximate analysis and the profile of fatty acid changes of marine microalgae *N. oculata* under two mutual stresses of salinity (15, 25 and 40 g/l) and light intensity (Lux 1500 and Lux 10000) which at the end of the phase Logarithms were applied are examined. The results showed that according to the application of stresses after the completion of growth, there was no significant difference in the growth rate in different treatments ($P>0.05$). Also, despite the fact that the highest amount of total lipid was obtained under the salinity treatment of 40 g/l and the light intensity of Lux 1500, the highest amount of saturated fatty acids (SFA) was obtained under the treatment of salinity of 15 g/l and the light intensity of 10000 Lux, the highest amount of monounsaturated fatty acids (MUFA) under 25 g/l treatment and 10000 Lux light intensity and the highest amount of polyunsaturated fatty acids (PUFA) under 15 g/l treatment and 10000 Lux light intensity were obtained after 4 days of stress. Considering the effectiveness of fatty acid compounds from different kinds of physical and chemical stresses, in *N. oculata* microalgae, by controlling the cultivation conditions, the maximum amount of desired fatty acids can be achieved in accordance with the desired goals.

KEYWORDS: Salinity stress, light intensity stress, Acclimation, *Nannochloropsis oculata*, Unsaturated fatty acids, Saturated fatty acids

ARTICLE TYPE

Original Research

ARTICLE HISTORY

Received: 1 Sept 2022

Accepted: 6 Dec 2022

ePublished: 21 Dec
2022

* Corresponding Author:

Email address: Kalbassi_m@modares.ac.ir

Tel: +98 1144998000

© Published by Tarbiat Modares University