بهره‌برداری و پرورش آبزیان
جلد هشتم، شماره چهارم، زمستان ۱۳۹۸
۱۱-۲۲
http://japu.gau.ac.ir
DOI: 10.22069/japu.2020.15587.1460

اثر دما بر روی میزان رشد و چربی کل میکروجلبک دونالیلا ترتیولکتا (*Dunaliella tertiolecta*)

***فاطمه آیت‌اللهی[۱]، سید عباس حسینی[۲] و حمیده کردی[۳]**

[۱]دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد گروه تولید و بهره‌برداری آبزیان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ایران،
[۲]استاد گروه تولید و بهره‌برداری آبزیان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ایران،
[۳]دانش‌آموخته دکتری گروه تکثیر و پرورش آبزیان، مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۶/۱۲؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۸/۲۱

چکیده

علم بیوتکنولوژی به دنبال یافتن محرک‌هایی مؤثر جهت افزایش نرخ رشد و محتوای ترکیبات مختلف بیوشیمیایی مانند لیپیدها و رنگدانه‌ها در جلبک‌هاست. دما یکی از مهم‌ترین فاکتورهای فیزیکی است که تأثیر قابل‌توجهی بر رشد و فعالیت موجودات آبزی دارد. دونالیلا جلبکی تک‌سلولی است که در رده کلروفیسه‌ها طبقه‌بندی می‌شود، این جلبک بدون دیواره سلولی، متحرک و شوری‌پسند است. جلبک دو تاژکی دونالیلا به‌عنوان مقاوم‌ترین ارگانیسم یوکاریوت فتوسنتزکننده شناخته شده است. بیش‌تر جلبک‌های میکروسکوپی تحت شرایط استرس مقادیر بالایی از لیپید تولید می‌کنند. تغییر شرایط محیطی علاوه بر تأثیر بر میزان رشد و تولید چربی می‌تواند بر کیفیت چربی ریزجلبک‌ها نیز اثرگذار باشد. در این پژوهش جلبک دونالیلا پس از نمونه‌برداری از دریاچه ارومیه و خالص‌سازی، در محیط کشت والن کشت داده شد. آزمایش با ٤ تیمار (دماهای ۲۰، ۲۵، ۳۰ و ۳۵ درجه سانتی‌گراد) و ٦ تکرار به‌طور کاملاً تصادفی انجام شد. برای رشد مطلوب جلبک دونالیلا، شدت نور ۳۰۰۰ لوکس با ۱۲ ساعت دوره روشنایی و ۱۲ ساعت دوره تاریکی و محیط کشت والن فراهم گردید. شمارش تعداد سلول جلبک و اندازه‌گیری دما و پی‌اچ روزانه و میزان چربی در فازهای مختلف رشد صورت گرفت. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS انجام گرفت. با توجه به نتایج به‌دست آمده رشد جلبک با افزایش دما کاهش یافت و بیش‌ترین رشد در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد مشاهده گردید هم‌چنین به این نتیجه دست یافتیم که بیش‌ترین میزان ذخیره چربی در درمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و در فاز ثابت بود.

واژه‌های کلیدی: چربی، دما، دونالیلا، رشد، میکروجلبک

* مسئول مکاتبه: fatemehayat2000@gmail.com

مقدمه

امروزه انسان به‌منظور بهره‌برداری درست از منابع انرژی خدادادی، نیازمند شناخت هرچه بهتر و دقیق‌تر موجودات زنده و غیرزنده محیط پیرامون خویش است. در این میان، شناخت جلبک‌ها و کاربرد آن‌ها به‌عنوان یک جزء زنده و مؤثر در حیات کره زمین از اهمیت ویژه‌ای برخوردار می‌باشد.

علم بیوتکنولوژی به دنبال یافتن محرک‌هایی مؤثر جهت افزایش نرخ رشد و محتوای ترکیبات مختلف بیوشیمیایی مانند لیپیدها و رنگدانه‌ها در جلبک‌هاست. جلبک‌های میکروسکوپی به‌دلیل این‌که فتوسنتزکننده می‌باشند به منبع نور، دی‌اکسیدکربن، آب و نمک‌های معدنی جهت رشد نیازمند هستند (بالت، ۲۰۱۰). به‌منظور افزایش بازدهی تولید چربی (لیپید) در میکروجلبک‌ها، با تغییر شرایط فیزیکی مانند دما، دوره نوری و شوری در قالب طرح آزمایشگاهی، بهترین شرایط مورد نیاز کشت هر گونه جلبک به صنعت معرفی می‌شود (مسک و همکاران، ۲۰۰۵). بیش‌تر جلبک‌های میکروسکوپی، تحت شرایط استرس مقادیر بالایی از لیپید تولید می‌کنند. علی‌رغم علاقه‌مندی فراوان به میکروجلبک‌ها به‌عنوان ماده اولیه تولید سوخت زیستی، مطالعات نسبتاً کمی بر روی آن‌ها انجام شده است.

دونالیلا ریزجلبک سبز تک‌سلولی، شورپسند با پراکندگی جغرافیایی وسیع می‌باشد. ریزجلبک دونالیلا تولیدکننده اولیه[1] در محیط‌های شور است. از ویژگی‌های این جلبک تک‌سلولی، شکل بیضوی و دو تاژک آن است. علی‌رغم آن‌که فاقد دیواره ضخیم است، اما در برابر شوری و تغییر شرایط محیط مقاوم است (لیسکا و همکاران، ۲۰۰٤). بخش قابل‌توجهی از تولیدات اولیه در اکوسیستم‌های آب شور توسط این گونه انجام می‌شود (اورن، ۲۰۰۵). در این راستا جلبک سبز تک‌سلولی دونالیلا که مقاوم‌ترین میکروارگانیسم یوکاریوتیک مقاوم به نمک است و در یک محدوده وسیعی از دریاها، دریاچه‌ها و آب‌های شور زندگی می‌کند، دارای کاربردهای گوناگونی در مطالعات زیستی مربوط به لیپید می‌باشد.

جلبک دونالیلا ترتیولکتا یک جلبک سبز تک‌سلولی از رده Chlorophyceae و راسته Chlamydomonadales، بدون دیواره سلولی، متحرک و شوری‌پسند است که می‌تواند در شوری‌های مختلف (۰/۵ تا ۵/۵ مولار) به رشد خود ادامه دهد و تحت شرایط القایی قادر به تولید مقدار فراوانی لیپید است (وو و ترن، ۲۰۱٤). دونالیلا ترتیولکتا با تولید و حذف گلیسرول و تنظیم غلظت یون‌های درون‌سلولی قادر است در شوری‌های بالا به رشد خود ادامه دهد (طالبی و همکاران، ۲۰۱۳).

لیپیدها رده‌ای از ترکیبات آلی دارای هیدروکربن هستند که از مواد بنیادین برای ساختار و کارکرد سلول‌های زنده به‌شمار می‌آیند. لیپیدها ترکیبات آلی نامتجانسی (هتروژن) هستند که معمولاً در آب نامحلول‌اند ولی عمدتاً در حلال‌های غیرقطبی محلول می‌باشند و به کمک حلال‌های آلی می‌توان آن‌ها را از بافت‌های مختلف استخراج کرد.

ریزجلبک‌ها اهمیت تجاری و زیست‌محیطی زیادی به‌عنوان پایه زنجیره غذایی و تولیدکننده اکسیژن دارند و همچنین یک منبع طبیعی از ترکیبات با ارزش مانند اسیدهای چرب، آستروئیدها و کارئتنوئیدها هستند (لی و همکاران، ۲۰۱۰). ترکیب چربی ریزجلبک‌ها برای مقاصد مختلفی مورد بررسی قرار می‌گیرد، در اقیانوس‌شناسی به‌دلیل نقش آن‌ها در ایجاد کشندهای سمی و نشانگر زیستی، در آبزی‌پروری به‌دلیل تغذیه آبزیان در مراحل لاروی و در نهایت برای سوخت زیستی مورد بررسی قرار می‌گیرند (گوردیلو و همکاران، ۱۹۹۸). محتوای

1- Primary producer

هیدروکربنی جلبک‌ها مانند اسیدهای چرب و آسیل گلیسرول‌ها توانایی جایگزین شدن سوخت‌های فسیلی را دارند (طالبی و همکاران، ۲۰۱۳).

فاکتورهای محیطی به‌ویژه نور، دما و وضعیت غذایی بر فتوسنتز، بیومس و ترکیبات شیمیایی ریزجلبک‌ها تأثیرگذار می‌باشد (فرامرزی و همکاران، ۱۳۸۹).

دما یکی از مهم‌ترین فاکتورهای فیزیکی است که تأثیر قابل‌توجهی بر رشد و فعالیت موجودات آبزی دارد. دمای محیط در تسریع افزایش جمعیت جلبک‌ها نقش زیادی دارد. به‌طوری‌که در ماه‌های گرم سال شکوفایی توسط جلبک‌ها بیش‌تر از هر زمان دیگر است (ریاحی، ۱۳۷۷). بیش‌تر ریزجلبک‌ها در محدوده دمایی بین ۱۸ تا ۲۸ درجه سانتی‌گراد حداکثر رشد خود را دارند و در دماهای بالاتر از ۳۷ درجه سانتی‌گراد از بین می‌روند (فرامرزی، ۱۳۸۹).

مواد و روش‌ها

این مطالعه در پاییز سال ۱۳۹٦ به‌مدت ٦۰ روز در آزمایشگاه جلبک دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان انجام شد.

برای انجام آزمایش ابتدا ذخیره خالص جلبک دونالیلا ترتیولکتا از پژوهشکده دریاچه ارومیه تهیه گردید. تراکم اولیه ریزجلبک در آزمایشگاه کشت جلبک توسط لام هموسیتومتر[1] محاسبه گردید. والن رایج‌ترین محیط کشت جهت پرورش جلبک دونالیلا می‌باشد (لاون و سورجلوس، ۱۹۹٦) که از آن به‌میزان لازم تهیه گردید.

همچنین برای جلبک نمک دوست دونالیلا آب شور جایگزین آب مقطر شد. جهت تنظیم شوری ۳۷ ppt، مقدار ۳۷ گرم نمک طبیعی دریا تهیه و به ml۱۰۰۰ آب مقطر اضافه شد و توسط شوری‌سنج اندازه‌گیری گردید.

طراحی آزمایش: در این مطالعه برای ارزیابی عملکرد جلبک دونالیلا نسبت به تنش دمایی ٤ تیمار محتوی نسبت‌های یکسان از جلبک دونالیلا، در ٦ تکرار به‌شرح زیر در نظر گرفته شد:

۱- تیمار اول دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد

۲- تیمار دوم دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد

۳- تیمار سوم دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد

٤- تیمار چهارم دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد

در ابتدا مقدار ۲۰۰ سی‌سی از محیط کشت والن را داخل ۲٤ ارلن ۵۰۰ سی‌سی ریخته و درب آن را پنبه و فویل آلومینیومی گذاشته و با چسب اتوکلاو دور فویل را بسته و در داخل دستگاه اتوکلاو قرار داده شد و در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲۰ دقیقه استریل گردید. بعد از سرد شدن، آن‌ها را به زیر هود برده و در شرایط آسپتیک[2] و در کنار چراغ الکلی درب ظروف محیط کشت را باز کرده و ۵۰ سی‌سی از استوک اولیه را به آن اضافه نموده و به همین ترتیب ۲٤ ارلن انجام گردید. بعد از اطمینان از ثابت شدن دماهای ٤ تیمار و شرایط اتاق کشت، ارلن‌ها به اتاق کشت منتقل گردید.

شرایط اتاق کشت: شرایط فایکولب با روشنایی LUX ۳۰۰۰ توسط لامپ‌های فلورسنت تامین گردید. دوره تاریکی، روشنایی ۱۲:۱۲ تنظیم شد (رفیعی و همکاران، ۱۳۹٤). اندازه‌گیری شدت نور توسط دستگاه لوکس‌متر، دما توسط دماسنج و پی‌اچ توسط پی‌اچ‌متر و هم‌چنین هم‌زدن ارلن‌ها به‌صورت روزانه صورت گرفت. نمونه‌ها توسط ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۰۱ گرم وزن شدند.

شمارش جلبک: برای شمارش تعداد جلبک‌ها در طول دوره آزمایش، نمونه‌برداری هر ٤۸ ساعت از تیمارها و تکرارها صورت گرفت. بدین‌ترتیب که از هر تیمار سه تکرار به تصادف انتخاب گردید و از

1- Hemositometer

2- Aseptic

ریزجلبک فعال از ظروف کشت نمونه‌برداری شد. به‌منظور جلوگیری از حرکت سلول‌ها ۲ درصد محلول لوگول به نمونه اضافه شد. مشاهده و شمارش نمونه‌ها در زیر میکروسکوپ اینورت و توسط لام هموسیتومتر با محفظه شمارش به عمق ۰/۱ میلی‌متر صورت گرفت (مارتینز و همکاران، ۲۰۰۰).

پس از انجام شمارش، تعداد سلول‌ها به‌وسیله رابطه زیر محاسبه گردید:

$۱۰^{٤}$ × میانگین تعداد سلول‌های شمارش‌شده = تعداد سلول در یک میلی‌لیتر از نمونه

اندازه‌گیری زیست‌توده تولیدشده: به‌منظور اندازه‌گیری زیست‌توده تولیدشده در هر مرحله از رشد ۷۵۰ سی‌سی محیط کشت حاوی جلبک به‌وسیله دستگاه سانتریفیوژ مدل Eppendorf 15 (۸۰۰۰ rmp، ۲۰ min) سانتتریفیوژ و زیست‌توده جلبکی از محیط کشت جدا گردید. جهت جمع‌آوری کل نمونه‌ها طی مراحل رشد در دماهای مختلف، جلبک‌های سانتریفیوژ شده به فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد انتقال یافتند. نمونه‌ها در داخل پلیت به‌مدت ٢٤ ساعت درون دستگاه فریز درایر[1] مدل EyElA.FD-۸۱ قرار داده شدند تا به‌طور کامل آب خود را از دست بدهند. بعد از خشک شدن کامل ریزجلبک‌ها توسط ترازوی با دقت یک‌صدم وزن شدند. همه آزمایش‌ها سه بار تکرار شدند.

استخراج چربی: به‌منظور استخراج چربی از روش (بلایت و دایر، ۱۹۵۹) استفاده گردید. ۱۰۰ میلی‌گرم از هر نمونه خشک شده جلبک را برداشته و جهت حذف بقایای میکروجلبک در چربی استخراج‌شده، داخل کاغذ فیلتر (ضخامت ۰/٤٥ میکرومتر) قرار داده و سپس به بالن‌های دستگاه سوکسله (شکل ۱) مدل Soxtec۲۰۵ حاوی مقدار مناسبی از حلال پترولیوم اتر انتقال یافت. وزن اولیه بالن‌های سوکسله توسط ترازوی دیجیتال اندازه‌گیری گردید (W_1). پس از پایان سوکسله، بالن‌ها درون آون با دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت نیم ساعت قرار داده شدند تا حلال باقی‌مانده تبخیر گردد و سپس داخل دسیکاتور قرار داده شد بدین‌جهت که بالن‌ها به دمای محیط (۲۵ درجه سانتی‌گراد) برسند. وزن ثانویه بالن‌ها توسط ترازو اندازه‌گیری گردید (W_2). هر کدام از مراحل استخراج چربی با سه بار تکرار انجام شد.

بررسی میزان تولید چربی: درصد چربی زیست‌توده به روش زیر محاسبه گردید (نیگام و همکاران، ۲۰۱۱):

درصد چربی = $(W_2-W_1) \times ۱۰۰$ / وزن نمونه خشک

که در آن، W_1 وزن بالن خالی و W_2 وزن بالن بعد از سوکسله می‌باشد.

منحنی رشد جلبک: برای رسم منحنی رشد جلبک‌ها روش‌های مختلفی مانند شمارش تعداد سلول‌ها، اندازه‌گیری وزن خشک و غیره وجود دارد که هر یک با توجه به اهداف آزمایش انتخاب می‌شود. در این آزمایش برای رسم منحنی رشد جلبک از روش شمارش تعداد سلول جلبک استفاده گردید.

تجزیه و تحلیل آماری: تجزیه و تحلیل آماری داده‌های حاصل از اندازه‌گیری میزان رشد و چربی کل با نرم‌افزار Spss انجام پذیرفت. جهت بررسی نرمال بودن داده‌ها از آزمون کولموگروف اسمیرنف استفاده شد. جهت بررسی تأثیر تغییرات دما بر میزان رشد و چربی کل از آنالیز واریانس یک‌طرفه (One-way ANOVA) و آزمون دانکن و جهت ترسیم نمودارها از نرم‌افزار Excel استفاده گردید.

نتایج

نتایج شمارش جلبک: میانگین تعداد جلبک شمارش شده در تیمارهای مختلف این آزمایش طی ١٤ روز نمونه‌برداری در جدول ۱ نشان داده شده است.

1- Freeze dryer

جدول ۱- میانگین تعداد سلول جلبک دونالیلا در تیمارهای مختلف در طول دوره آزمایش (میانگین تعداد سلول×10^4 ± انحراف معیار).

روز	تیمار			
	دمای ۲۰	دمای ۲۵	دمای ۳۰	دمای ۳۵
۱	۹/۸۰×10^4 ±۰/۰۵ $^{a-I}$	۸/۶۱×10^4±۰/۱۷ $^{b-K}$	۸/۶۰×10^4±۰/۰۸ $^{b-F}$	۹/۶۶×10^4±۰/۵۸ $^{a-A}$
۲	۱۰/۳۳×10^4±۰/۳۰ $^{a-HI}$	۹/۰۸×10^4±۰/۰۸ $^{b-J}$	۸/۹۱×10^4±۰/۱۰ $^{bc-E}$	۸/۵۲×10^4±۰/۳٤ $^{c-B}$
۳	۱۰/۵۰×10^4±۰/۱٤ $^{a-HI}$	۹/٤۷×10^4±۰/۲٤ $^{b-I}$	۹/۰۹×10^4±۰/۰۹ $^{c-E}$	۷/٤۱×10^4±۰/۱٤ $^{d-C}$
٤	۱۰/۸۹×10^4±۰/۰۵ $^{a-HI}$	۹/٦۳×10^4±۰/۲۹ $^{b-HI}$	۹/۸۲×10^4±۰/۰۷ $^{b-D}$	۷/۳٦×10^4±۰/۲۷ $^{c-C}$
۵	۱۱/۵۸×10^4±۰/۵۸ $^{a-H}$	۱۰/۲۵×10^4±۰/۱٤ $^{b-F}$	۱۰/۱۹×10^4±۰/۰۸ $^{b-C}$	۵/۲۵×10^4±۰/۰۸ $^{c-D}$
٦	۱٤/٤۷×10^4±۰/۳۲ $^{a-G}$	۱۱/۲۸×10^4±۰/۱۹ $^{b-E}$	۱۰/۷۷×10^4±۰/۱۲ $^{c-B}$	٤/٤۷×10^4±۰/۳٤ $^{d-E}$
۷	۱۹/۸۹×10^4±۱/۰٦ $^{a-F}$	۱۲/۲۷×10^4±۰/۲۷ $^{c-C}$	۱٤/۵۸×10^4±۰/٤٤ $^{b-A}$	۳/۷۵×10^4±۰/۱٤ $^{d-F}$
۸	۲۰/٦٤×10^4±۰/۳۸ $^{a-EF}$	۱۵/۷۲×10^4±۰/۱۳ $^{b-A}$	۹/۷۵×10^4±۰/۱٤ $^{c-D}$	۱/۵۳×10^4±۰/۱۰ $^{d-G}$
۹	۲۱/٤۷×10^4±۰/۳۸ $^{a-DE}$	۱۲/۷۲×10^4±۰/۱۳ $^{b-B}$	۸/۱۱×10^4±۰/۰۵ $^{c-G}$	۰/۰۰×10^4±۰/۰۰ $^{d-H}$
۱۰	۲٤/۲۷×10^4±۰/۲۵ $^{a-C}$	۱۱/٦٦×10^4±۰/۰۸ $^{b-D}$	۷/۱۷×10^4±۰/۰۵ $^{c-H}$	۰/۰۰×10^4±۰/۰۰ $^{d-H}$
۱۱	۳۱/۷۵×10^4±۱/٦۳ $^{a-A}$	۱۱/۲۵×10^4±۰/۰۸ $^{b-E}$	۷/۰۵×10^4±۰/۰۵ $^{c-H}$	۰/۰۰×10^4±۰/۰۰ $^{d-H}$
۱۲	۲٦/۹٤×10^4±۱/٦۲ $^{a-B}$	۱۰/۰۳×10^4±۰/۰۵ $^{b-FG}$	۰/۰۰×10^4±۰/۰۰ $^{c-I}$	۰/۰۰×10^4±۰/۰۰ $^{c-H}$
۱۳	۲۲/۵۰×10^4±۰/۳۰ $^{a-D}$	۹/۷۸×10^4±۰/۱۰ $^{b-D}$	۰/۰۰×10^4±۰/۰۰ $^{c-I}$	۰/۰۰×10^4±۰/۰۰ $^{c-H}$
۱٤	۲۱/۳۳×10^4±۰/۱٤ $^{a-DE}$	۰/۰۰×10^4±۰/۰۰ $^{b-I}$	۰/۰۰×10^4±۰/۰۰ $^{b-I}$	۰/۰۰×10^4±۰/۰۰ $^{b-H}$

تذکر: حروف کوچک متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در هر ستون و حروف بزرگ متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در هر ردیف می‌باشد.

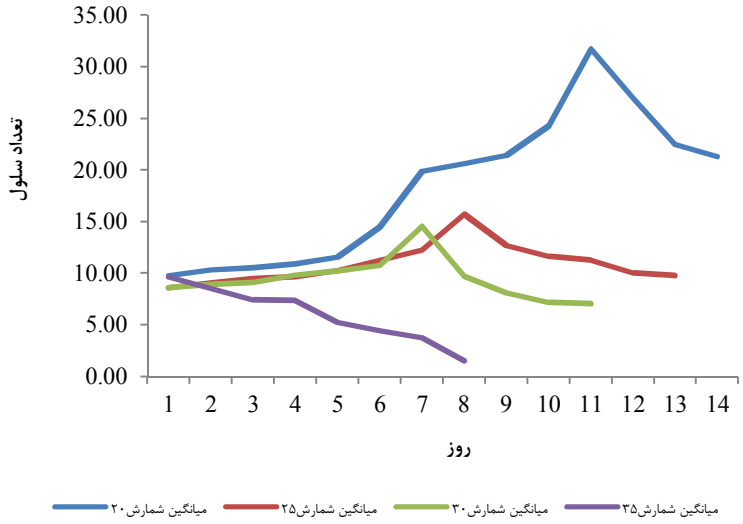
با توجه به نتایجی که در جدول ۱ مشاهده می‌شود، در روز اول نمونه‌برداری، تیمار دمای ۲۰ و ۳۵ درجه سانتی‌گراد فاقد اختلاف معنی‌دار هستند و تیمارهای دماهای ۲۵ و ۳۰ درجه سانتی‌گراد نیز فاقد اختلاف معنی‌دار هستند ($P>0/05$). هم‌چنین بررسی میانگین تعداد جلبک‌ها در هر تیمار به‌طور جداگانه در طول آزمایش نشان می‌دهد که میانگین تعداد جلبک‌ها نسبت به روز قبل دارای اختلاف معنی‌داری است ($P<0/05$).

بیش‌ترین میانگین تعداد جلبک ثبت‌شده در این آزمایش در تیمار دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد و در یازدهمین روز نمونه‌برداری با میانگین ۳۱/۷۵×10^4 سلول در میلی‌لیتر ثبت گردید. کم‌ترین میانگین تعداد جلبک ثبت‌شده در این آزمایش در تیمار دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد و در هشتمین روز نمونه‌برداری با میانگین ۱/۵۳×10^4 سلول در میلی‌لیتر ثبت گردید بیش‌ترین میانگین تعداد جلبک در تیمارهای دمای ۲۰، ۲۵، ۳۰ و ۳۵ درجه سانتی‌گراد به‌ترتیب برابر ۳۱/۷۵×10^4، ۱۵/۷۲×10^4، ۱٤/۵۸×10^4 و ۹/٦۷×10^4 می‌باشد که به‌ترتیب در روز یازدهم، هشتم، هفتم و اول ثبت گردید.

در این مطالعه میزان رشد جلبک دونالیلا ترتیولکتا در چهار دمای ۲۰، ۲۵، ۳۰ و ۳۵ درجه سانتی‌گراد مورد بررسی قرار گرفت، نتایج به‌دست آمده نشان داد که کم‌ترین تعداد سلول‌ها در دمای ۳۵ در روز هشتم نمونه‌برداری و بیش‌ترین تعداد سلول در دمای ۲۰ در

روز یازدهم نمونه‌برداری ثبت گردید. ابتدا دمای ۳۰ و سپس دمای ۲۵ و در آخر دمای ۲۰ وارد فاز لگاریتمی شدند. کم‌ترین تعداد سلول در فاز لگاریتمی مربوط به تیمار دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد برابر ۱٤/۵۸ سلول در میلی‌لیتر بود و بیش‌ترین آن مربوط به تیمار دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد برابر ۳۱/۷۵ سلول در میلی‌لیتر بود. هم‌چنین در فاز ثابت ابتدا دماهای ۳۰ و ۲۵ درجه و سپس دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد وارد این فاز شدند. در فاز ثابت کم‌ترین تعداد سلول در دمای ۳۰ درجه برابر با ۷/۰۵ سلول در میلی‌لیتر و بیش‌ترین تعداد سلول مربوط به دمای ۲۰ درجه برابر با ۲۱/۳۳ سلول در میلی‌لیتر بود.

منحنی رشد جلبک: منحنی رشد جلبک دونالیلا در تیمارهای مختلف در شکل ۱ نشان داده شده است.



شکل ۱- منحنی رشد جلبک دونالیلا ترتیولکتا در دماها و مراحل رشد مختلف.

نتایج حاصل از بررسی منحنی رشد روزانه *D. tertiolect* نشان می‌دهد که جلبک در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد نسبت به تیمارهای دیگر رشد چشمگیرتری از خود نشان می‌دهد. جلبک‌ها ابتدا در تیمار ۳۰ درجه سانتی‌گراد، سپس در تیمار ۲۵ درجه سانتی‌گراد و بعد از آن در تیمار ۲۰ درجه سانتی‌گراد به فاز لگاریتمی و سپس به فاز ثابت رسیدند و در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد وارد فاز لگاریتمی نشد. در چهار روز نخست در فاز القا رشد چندانی در همه تیمارها مشاهده نگردید.

بررسی میزان تولید چربی: درصد چربی طبق روشی که پیش‌تر به‌طور کامل توضیح داده شد برای هر تیمار در هر مرحله از رشد (فاز القا، فاز لگاریتمی، فاز ثابت) محاسبه و در جدول ۲ بیان شده است.

جدول ۲- میزان درصد چربی ریزجلبک دونالیلا ترتیولکتا (درصد چربی ± میانگین انحراف معیار) در سطح معنی‌داری ۰/۰۵.

دما	درصد چربی جلبک		
	فاز القا	فاز لگاریتمی	فاز ثابت
۲۰	۷/۱٤±۰/۰٤$^{a-C}$	۱۱/۰۹ ±۰/۰۷$^{c-B}$	۱۳/۸۲ ±۰/۲۳$^{c-A}$
۲۵	۷/۰۷±۰/۱۰$^{a-C}$	۱۷/٦٤±۰/۱۸$^{a-B}$	۲۵/۰۳ ±۰/۰۸$^{a-A}$
۳۰	۷/۱۱±۰/۰۹$^{a-C}$	۱۵/۳۱±۰/۲۹$^{b-B}$	۲۰/۵۳ ±۰/۱۱$^{b-A}$
۳۵	۷/۰۳±۰/۲۲$^{a-A}$	۰/۰۰ ±۰/۰۰$^{d-B}$	۰/۰۰±۰/۰۰$^{d-B}$

تذکر: حروف کوچک متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در هر ستون و حروف بزرگ متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در هر ردیف می‌باشد.

با توجه به نتایج میزان چربی در فاز ثابت تیمار دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد بیش‌ترین و در فاز القای دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد کم‌ترین میزان درصد چربی ثبت گردید. کم‌ترین و بیش‌ترین میزان چربی در فاز لگاریتمی به‌ترتیب مربوط به تیمارهای دمای ۲۰ و ۲۵ درجه سانتی‌گراد می‌باشد. هم‌چنین کم‌ترین و بیش‌ترین میزان چربی در فاز ثابت به‌ترتیب مربوط به تیمارهای دمای ۲۰ و ۲۵ درجه سانتی‌گراد می‌باشد.

میزان چربی در تمامی تیمارها به‌طور معنی‌داری در فاز ثابت به‌ترتیب بیش‌تر از فاز لگاریتمی و فاز القا می‌باشد ($P<۰/۰۵$) و در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد به‌طور معنی‌داری در فاز ثابت به‌ترتیب بیش‌تر از فاز لگاریتمی و فاز القا می‌باشد ($P<۰/۰۵$). در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد رشد جلبک مشاهده نشد.

میزان چربی در فاز القا در دماهای مختلف اختلاف معنی‌داری با هم نداشتند ($P>۰/۰۵$) اما، در فاز لگاریتمی و ثابت در دماهای مختلف با هم اختلاف معنی‌داری داشتند ($P<۰/۰۵$) و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد بیش‌ترین و در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد کم‌ترین میزان چربی ثبت گردید.

بحث و نتیجه‌گیری

ریزجلبک‌ها گونه‌های بسیار مناسب برای تولید موادی گران‌قیمت و مفید فایده هستند و پارامترهای گوناگونی بر نرخ رشد و هم‌چنین میزان چربی تولیدی آن‌ها اثر می‌گذارد که با بهینه‌کردن این پارامترها می‌توان به بهره‌وری مناسبی دست یافت. با توجه به نقش ریزجلبک‌ها در آبزی‌پروری، فراهم آوردن شرایط بهینه به‌منظور رشد آن‌ها، از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است (دوبینسکی و همکاران، ۱۹۹۵). تاکنون مطالعات عدیده‌ای در این زمینه صورت گرفته است، ولی فاکتورهایی مانند شدت نور، دما، طول دوره نوردهی و ترکیبات محیط کشت از عوامل تأثیرگذار بر روی رشد و تغییر در ترکیبات بیوشیمیایی ریزجلبک‌ها محسوب می‌شود (مرسادو و همکاران، ۲۰۰٤).

با توجه به نتایج به‌دست آمده در این مطالعه، تغییرات دمایی به‌عنوان عوامل محیطی، می‌تواند سبب تغییر میزان ترکیبات روغنی در جلبک تک‌سلولی *D.tertiolecta* شود. بنابراین تنظیم شرایط محیط کشت جلبک می‌تواند در تعیین شرایط کشت بهینه با هدف افزایش تولید ترکیبات بیوشیمیایی مختلف از جمله لیپیدها مؤثر باشند. تغییر عوامل محیطی به‌عنوان یک شوک یا استرس می‌تواند سبب افزایش محتوای ترکیبات روغنی شود که لازم است برای هر گونه از جلبک خاص از طریق مطالعه تعیین گردد.

مطالعات مختلف نشان می‌دهد شرایط کشت بهینه در طرح‌های صنعتی و آزمایشگاهی در مقایسه با محیط زیست طبیعی آن‌ها متفاوت است. یک گونه ممکن است در محیط زیست طبیعی خود در محدوده دمایی یا نوری خاصی قادر به ادامه حیات و تکثیر باشد اما در شرایط کشت انبوه به‌علت تغییر برخی از عوامل فیزیکی، شیمیایی یا زیست‌محیطی محدوده نیازهای آن تغییر کند (ارن، ۲۰۰۵). این مسأله نشان می‌دهد که پس از جداسازی یک جلبک از محیط زیست طبیعی لازم است شرایط مناسب و بهینه جهت کشت انبوه آن بررسی شود. رشد و تعداد سلول میکروجلبک دونالیلا ترتیولکتا به‌شدت متأثر از شرایط محیطی حاکم بر این ریزجلبک می‌باشد.

زرندی میاندوآب و همکارن (۱۳۹۳) بیان داشته‌اند که عدم تغییر جدی در تعداد سلول‌ها در شرایط مختلف تیمارهای اعمال شده نشان‌دهنده ثبات نسبی ساختار سلولی و زنده ماندن سلول‌ها می‌باشد هم‌چنین توفیق ابورزق و همکاران (۲۰۱۰) دمای بهینه برای کشت جلبک دونالیلا را ۲۰ درجه سانتی‌گراد گزارش کردند. در این پژوهش نیز تغییرات تعداد سلول در ٤ روز نخست زیاد قابل‌ملاحظه نبوده است و طولانی‌ترین دوره رشد در بین تیمارها مربوط به دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد بود.

هارت و همکاران (۱۹۹۱) به این نتیجه دست یافتند که کاهش میزان رشد در دماهای بالا به‌دلیل کاهش میزان فتوسنتز است، همچنین کاهش بیومس به‌دست آمده ممکن است به‌دلیل عدم سازش ریزجلبک در دماهای بالا باشد. همچنین مطالعات چانگ و لی (۱۹۹۹) بر روی جلبک *G.tenuastipatata* نشان داد، دماهای بالاتر از ۳۰ درجه سانتی‌گراد ایجاد استرس کرده و پرولین که یک اسیدآمینه در دیواره سلولی است آزاد و مقدار آن افزایش می‌یابد. این اسید آمینه نقش اسمزی داشته و افزایش آن با کاهش رشد ارتباط مستقیم دارد. در این مطالعه نیز در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد حداکثر تعداد سلول در روز نخست نمونه‌برداری بوده و کوتاه‌ترین دوره رشد در بین تیمارها محسوب می‌گردد و در واقع جلبک در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد در این شرایط آزمایشگاهی قادر به رشد نبوده و مرگ جلبک مشاهده گردید.

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که دماهای مختلف اثرات معنی‌داری بر روی رشد و تراکم سلول‌های ریزجلبک دونالیلا ترتیولکتا می‌تواند ایجاد نماید. به‌گونه‌ای که تراکم سلول‌های این ریزجلبک در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد در طول دوره پرورش به‌طور معنی‌داری بیش‌تر از سایر تیمارها بود ($P<۰/۰۵$). هم‌چنین با توجه به این‌که تراکم سلول‌های تلقیح‌شده در تیمارهای مختلف تقریباً با هم برابر بودند، بنابراین در مرحله إلقا (تاخیری) به‌دلیل افزایش سطوح آنزیم‌ها و متابولیسم‌های درگیر در تقسیم سلولی و هم‌چنین تاخیر در سازش فیزیولوژیکی سلول‌های ریزجلبک نسبت به محیط اطراف تراکم سلول‌های تیمارهای مختلف تا روز چهارم نمونه‌برداری از افزایش کم‌تری برخوردار بوند از سوی دیگر مشاهده شد که از روز پنجم پرورش به‌دنبال شروع مرحله دوم نمودار رشد (فاز انفجاری) تراکم سلول‌های ریزجلبک به‌صورت لگاریتمی افزایش پیدا نمود، به‌گونه‌ای که حداکثر تراکم سلول‌های ریزجلبک در تیمار دمای ۲۰ در روز یازدهم پرورش حاصل شد. این در حالی بود که شیب نمودار رسیدن به حداکثر تراکم در تیمار دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد نسبت به تیمارهای ۲۵ و ۳۰ درجه سانتی‌گراد بیش‌تر بود، از سوی دیگر شدت این شیب در تیمار دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نیز بیش‌تر از تیمار ۳۰ درجه سانتی‌گراد بود. قزلباش و همکاران (۲۰۰۸)، به این نتیجه دست یافتند که میزان رشد ریزجلبک‌ها به عوامل متعددی، از جمله گونه ریزجلبک، شدت تابش نور و درجه حرارت محیط

بستگی دارد. هم‌چنین سردار و همکاران (۲۰۰۷)، بیان می‌کنند که رشد ریزجلبک‌ها در محیط نشان‌دهنده سازش یک گونه یا سویه با محیط اطراف خود می‌باشد. در ادامه، در فاز اشباعیت نمودار رشد، زمانیکه نوترینت‌ها، نور، pH، دی‌اکسیدکربن و سایر فاکتورهای فیزیکی و شیمیایی شروع به محدود شدن نمودند، علاوه بر متعادل شدن رشد سلول‌ها تراکم آن‌ها نیز ثابت شد. بنابراین با شروع فاز نزول و کاهش تقسیم سلولی، فاز مرگ که در مرحله انتهایی نمودار رشد قرار داشت آغاز شد. در این مرحله به‌دنبال کاهش کیفیت آب و مواد مغذی، تراکم سلول‌ها به سرعت کاهش یافت به‌گونه‌ای که در روزهای انتهای پرورش سلول‌ها به‌تدریج متلاشی شدند. ابتدا تیمار دمای ۳۰ درجه، سپس دمای ۲۵ و در آخر دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد وارد فاز ثابت شدند. مسک و همکاران (۲۰۰۵)، علت این تغییرات را به‌میزان دما نسبت می‌دهند. به‌طوری‌که میزان دمای بالا، سبب آسیب رساندن به تشکیلات سیستم فتوسنتز می‌گردد. در نتیجه سلول‌ها زودتر وارد فاز مرگ می‌گردند.

نتایج پژوهش‌های مختلف نشان می‌دهد که کمیت و کیفیت لیپید جلبک‌های تک‌سلولی در واکنش به تغییرات محیطی مانند دما، نور و شوری تغییر می‌کند. هم‌چنین گونه‌های مختلف جلبک در شرایط مختلف واکنش‌های سازگاری مختلفی را نسبت به تغییرات دمایی از خود نشان می‌دهند (رینود و همکاران، ۲۰۰۲).

روکمیناساری (۲۰۱۳) به این نتیجه دست یافت که میکروجلبک دونالیلا ترتیولکتا دارای میزان چربی بالا در وزن خشک توده زیستی است. افزایش یا کاهش دما از درجه حرارت بهینه باعث افزایش تولید چربی در این ریزجلبک می‌گردد. هم‌چنین سریانگان و همکاران (۲۰۱۵) بیان نمودند که میکروجلبک دونالیلا ترتیولکتا بیش‌ترین میزان چربی را در دمای ۲۵ درجه ذخیره نمود که در مقایسه با دمای ۳۵ درجه اندکی بیش‌تر بود. در این پژوهش نیز به نتایج مشابهی دست یافتیم که بیش‌ترین درصد چربی، در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد برابر با ۲۵/۰۳ درصد در فاز ثابت بود. و بعد از آن در دمای ۳۰ درجه در فاز ثابت بیش‌تر از سایر تیمارها بود. رامش کومار (۲۰۱٤) بیان نمود که جلبک توسط افزایش محتوی لیپید خود به استرس دمایی پاسخ می‌دهد، این پروسه برای تولید بیودیزل می‌تواند بهینه باشد. تنها مانع، رشد ضعیف در این شرایط می‌باشد که نمی‌توان نادیده گرفت.

در این پژوهش نیز درصد چربی در فاز ثابت دمای ۲۵ بیش‌ترین و در دمای ۳۰ بیش‌تر از دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد بود. هم‌چنین این میزان در فاز لگاریتمی در دمای ۲۵ بیش‌ترین و در دمای ۳۰ بیش‌تر از دمای ۲۰ بود. در فاز القا همه تیمارها درصد چربی تقریباً مشابهی داشتند.

با توجه به نتایج به‌دست آمده در این مطالعه، تغییرات دمایی به‌عنوان عوامل محیطی، می‌تواند سبب تغییر میزان ترکیبات روغنی در جلبک تک‌سلولی دونالیلا شود. بنابراین تنظیم شرایط محیط کشت جلبک می‌تواند در تعیین شرایط بهینه کشت با هدف تولید ترکیبات بیوشیمیایی مختلف از جمله لیپیدها مؤثر باشد.

مناسب‌ترین روند رشد و بیش‌ترین تعداد سلول میکروجلبک دونالیلا ترتیولکتا در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد مشاهده گردید. بعد از آن در دمای ۲۵ درجه نسبت به دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد رشد بهتری مشاهده گردید و در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد در این شرایط آزمایشگاهی قادر به رشد نبود و رشد جلبک با افزایش دما کاهش یافت. هم‌چنین بیش‌ترین درصد چربی ذخیره‌شده در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد می‌باشد. از این‌رو می‌توان عنوان نمود که مناسب‌ترین

دما به‌منظور دستیابی به بیش‌ترین میزان لیپید در ریزجلبک دونالیلا ترتیولکتا دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد می‌باشد. هم‌چنین به این نتیجه دست یافتیم که در تمامی تیمارها در فاز ثابت بیش‌ترین میزان چربی ذخیره می‌گردد. در فاز لگاریتمی و ثابت ابتدا دمای ۲۵ و سپس به‌ترتیب دماهای ۳۰ و ۲۰ درجه سانتی‌گراد دارای بیش‌ترین میزان چربی بودند.

منابع

1. Abu-Rezq, T., Al-Hooti, S., and Jacob, A.D. 2010. Optimum culture conditions required for the locally isolated *Dunaliella salina*. J. Algal Biom. Util. 1: 2. 12-19.
2. Akbari, H., Foroughi Fard, H., and Ashrafzadeh, Sh. 2004. Effect of some environmental factors on the growth of *Gracilaria Corticata* red algae in fiberglass basins, research and construction in natural resources. 64: 15-8.
3. Attaran Fariman, G., Roozitalab, M., Shahabadi, H., and Sharifian, Q. 1393. Effect of Salinity on Total Fat Growth and Fatty Acid Profile of *Dunaliella Bardawil* As a Candidate for Biodiesel Production. Aqua. Ecol. J. Hormozgan University, Pp: 61-50.
4. Balat, H. 2010. Prospects of biofuels for a sustainable energy future: a critical assessment. Energy Educ. Sci. Technol. Part A. 24: 85. 111.
5. Ben-Amotz, A. and Avron, M. 1990. The biotechnology of cultivating the halotolerant alga *Dunaliella*. Trends in Biotechnology, 8: 121-126.
6. Bligh, E.G. and Dyer, W.J. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. Can. J. Biochem. Physiol. 37: 8. 911-917.
7. Dubinsky, Z., Matsukawa, R., and Karube, I. 1995. Photobiological aspects of algal mass culture. J. Mar. Biotechnol. 2: 61-65.
8. Faramarzi, M.A.S., Froutanfar, H., and Shakibaie, M. 2010 Microalgae biotechnology. Tehran University of Medical Sciences. 398p.
9. Ghezelbash, F., Farboodnia, T., Heidari, R., and Agh, N. 2008. Biochemical effects of different salinities and luminance on green microalgae *Tetraselmis chuii*. Res. J. Biol. Sci. 3: 217-221.
10. Goldman, J.C. 1977. Temperature effects on phytoplankton growth in continuous culture. Limnol. Oceanogr. 22: 932-936.
11. Gordillo, F.J., Goutx, M., Figueroa, F.L., and Niell, F.X. 1998. Effects of light intensity, CO_2 and nitrogen supply on lipid class composition of *Dunaliella viridis*. J. Appl. Phycol. 10: 2. 135-144.
12. Halim, R., Danquah, M.K., and Webley, P.A. 2012. Extraction of oil from microalgae for biodiesel production: a review. Biotechnology advances, 30: 3. 709-732.
13. Hart, B.T., Bailey, P., Edwards, R., Hortle, K., James, K., McMahon, A., Meredith, C., and Swadling, K. 1991. A review of the salt sensitivity of the Australian freshwater biota. *Hydrobiologia*, 210: 1-2. 105-144.
14. Hejazi, M.A., Mohammadzareh Jalali, H., Bagheban Zadeh Kajabad, A., and Jansooz, Sh. 1393. Determination of 61 dipolar algae isolates for use in biodiesel production. Fourth International Conference on New Approaches to Energy Conservation. 462p.
15. Hejazi, M.A., Hassanzadeh Gorjah, N., Mohammadzareh Jalali, H., and Jafari Pour, D. 1393. Effect of Ultraviolet Waves on the Production of Beta-Carotene in Green Microalgae *Dunaliela Salina*. The First International Congress and the 13th Iranian Congress of Genetics. Tehran. 447p.
16. Helmiseresht, M., Saadatmand, Q., and Khavarinejad, R. 1394. Investigating the effect of light and pH intensity on growth rate, protein and fat content in *Spirulina platnissis*. J. Al-Zahra Univ. 28: 1. 49-37.

17.Kumar, V.R., and Melchias, G. 2014. Effect of temperature on the lipid content in *Nannochloropsis oculata*, *Dunaliella salina* and *Isochyrsis galbana* for biodiesel production. Inter. J. Pharma Bio Sci. 5: 4. 499-506.
18.Lavens, P., and Sorgeloos, P., 1996. Manual on the production and use of live food for aquaculture (No. 361). Food and Agriculture Organization (FAO).
19.Lee, J., Yoo, C., Jun, S., Ahn, C., and Oh, H. 2010. Comparison of several methods for effective lipid extraction from microalgae. Bioresource Technology. 101: 75-77.
20.Lee, T.M., and Chang, Y.C. 1999. An increase of ornithins Aminitrasferase-meditated proline senthesis in relation to high-temperature injury in *Gracilaria tenusistritata*. J. Phycol. 35: 1. 84-88.
21.Liska, A.J., Shevchenko, A., Pick, U., and Katz, A. 2004. Enhanced photosynthesis and redox energy production contribute to salinity tolerance in *Dunaliella* as revealed by homology-based proteomics. Plant physiology, 136: 1. 2806-2817.
22.Malchuthan, M., Hatami, B., Dawlatsahi, Sh., and Rajabizadeh, A. 1393. Determination of Optimum Temperature of Microbial Growth of *Nano-Cholpopsis Okulata* for the Production of Green Biodiesel Fuel. J. Engin. Ener. Manage. 4: 1. 62-69.
23.Mercado, J.M., del Pilar Sánchez-Saavedra, M., Correa-Reyes, G., Lubián, L., Montero, O., and Figueroa, F.L. 2004. Blue light effect on growth, light absorption characteristics and photosynthesis of five benthic diatom strains. Aquatic Botany, 78: 3. 265-277.
24.Meseck, S.L., Alix, J.H., Gary, H., and Wikfors, G.H. 2005. Photoperiod and light intensity effects on growth and utilization of nutrients by the aquaculture feed microalgga, *Tetraselmis chui* (PLY 429), J. Aquacul. 246: 393-404.
25.Nigam, P.S., and Singh, A. 2011. Production of liquid biofuels from renewable resources. Progress in energy and combustion science, 37: 1. 52-68.
26.Omidvar, A. 1393. Microalgae, future sources of bioenergy production. Two renewable and renewable energy sources. Pp: 20-16.
27.Oren, A. 2005. A hundred years of *Dunaliella* research: 1905-2005. Saline systems, 1: 1. 2.
28.Panahi, P. 2005. Biochemistry. Volume 1. Omid Publishing. 348p.
29.Poraphrasibi, M., Imanpour Namin, J., Ramezanpour, Z., and Sadeghirad, M. 1392. Effect of light intensity and period on growth rate and fat synthesis in green algae *Dunaliella salina*. J. Aquacul. Aquaculture, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, 2: 3. 144.
30.Rafiei, F., Ashjah Ardalan, A., Mesgar, M., and Ismail Zadeh, A.S. 1391. Effect of different concentrations of nitrate on the amount of chlorophyll a and fatty algae *chlorella vulgaris*. J. Mar. Biol. Surv. 4: 13. 8-1.
31.Rahimian, H. 1357. All biology, Shahid Beheshti University Press, Pp: 273-263.
32.Rawat, I., Kumar, R.R., Mutanda, T., and Bux, F. 2013. Biodiesel from microalgae: a critical evaluation from laboratory to large scale production. Applied energy, 103: 444-467.
33.Renaud, S.M., Parry, D.L., Thinh, L.V., Kuo, C., Padovan, A., and Sammy, N., 1991. Effect of light intensity on the proximate biochemical and fatty acid composition of *Isochrysis* sp. and *Nannochloropsis oculata* for use in tropical aquaculture. J. Appl. Phycol. 3: 1. 43-53.
34.Riahi, H. 1377. Algae. Al-Zahra University Press. 272p.
35.Roleda, M.Y., Slocombe, S.P., Leakey, R.J., Day, J.G., Bell, E.M., and Stanley, M.S. 2013. Effects of temperature and nutrient regimes on biomass and lipid production by six oleaginous microalgae in batch culture employing a two-phase cultivation strategy. Bioresource technology, 129: 439-449.
36.Rukminasari, N. 2013. Effect of temperature and nutrient limitation on the growth and lipid content of three selected microalgae (*Dunaliella tertiolecta*,

Nannochloropsis sp. and *Scenedesmus* sp.) for biodiesel production. Inter. J. Mar. Sci. 3p.

37. Salmaninejad, M. 1394. Effect of culture media and light intensity on growth and carotenoids of algae *Dunaliella* salina of Urmia lake. J. Plant Breed. (Iran. J. Biol.). 28: 4. 783-771.
38. Schenk, P.M., Thomas-Hall, S.R., Stephens, E., Marx, U.C., Mussgnug, J.H., Posten, C., Kruse, O., and Hankamer, B. 2008. Second generation biofuels: high-efficiency microalgae for biodiesel production. Bioenergy research, 1: 1. 20-43.
39. Serdar, S., Lök, A., Acarli, S., and Köse, A. 2007. The effect of two different culture media and five different salinities on growth of *Tetraselmis suecica*. Rapp. Comm. Int. Mer. Médit, 38: 394.
40. Sharma, K., Schuhmann, H., and Schenk, M. 2012. High Lipid Induction in Microalgae for Biodiesel production. Energies, 5: 1532-1553.
41. Srirangan, S., Sauer, M.L., Howard, B., Dvora, M., Dums, J., Backman, P., and Sederoff, H. 2015. Interaction of temperature and photoperiod increases growth and oil content in the marine microalgae *Dunaliella viridis*. PloS one, 10: 5. e0127562.
42. Talebi, A.F., Mohtashemi, K., Tabatabaei, M., Tohidifar, M., Bagheri, A., Zainalabedini, M., Haddin Mirzaei, H., Mirzajanzadeh, M., Malekzadeh Shafaroudi, Q., and Bakhtiari, Sh. 2013. Fatty Acid Profiles: A Selective Criterion for Screening Microalgae Sludges for Biodiesel Production. J. Algal Res. 2: 267-258.
43. Vo, T., and Tran, D. 2014. Effects of salinity and light on growth of *Dunaliella* Isolates. J. Appl. Environ. Microbiol. 2: 5. 208-211.
44. Walker, T.L., Purton, S., Becker, D.K., and Collet, C. 2005. Microalgae as bioreactors. J. Plant Cell Reports. 24: 629-641.
45. Zarandi Miandoab, L., Bagheri Najjar, M.B., Hejazi, M.U., and Chaparazadeh, N. 1392. The Effect of Environmental Factors on Photosynthesis Function *Dunaliella Salina.* First National Conference on Salinity in Plants and Agricultural Development Strategies in Passion. 1663p.
46. Zarandi Miandoab, L., Hejazi, M.A., Bagheri Najjar, M.B. and Chaparazadeh, N. 1392. Modeling growth of *Dunaliella salina* in different salinity, temperature and nitrate conditions. First National Conference on Salinity in Plants and Agricultural Development Strategies in Passion. 663p.