JSST
Journal of Space Science and Technology

P-ISSN: 2008-4560
E-ISSN: 2423-4516

Journal of Space Science and Technology

Vol. 17, No. 2, pp. 56-64, 2024
https://doi.org/10.22034/jsst.2024.1483
Journal Homepage: https://www.jsstpub.com

Original Research Paper

Effect of Low Atmospheric Pressure on the Growth and Antioxidant Defense Response of *Dunaliella Salina*

Halimeh Hassanpour*

Aerospace Research Institute, Ministry of Science Research and Technology, Tehran, Iran

ARTICLE INFO

Article History:

Received 16 April 2024
Revised 01 June 2024
Accepted 22 June 2024
Available Online 02 July 2024

Keywords:

β-Carotene
Low atmospheric pressure
Dunaliella salina
Growth
Superoxide dismutase

ABSTRACT

Space explorations on Mars are compelling scientific endeavors that provide critical information on how to establish life on the planet. Designing a bioregenerative life support system capable of supplying food and oxygen is essential for long-duration human missions to Mars. The atmospheric pressure on the Martian surface is significantly lower than that on Earth, and the ability of photosynthesizing organisms to grow under such low atmospheric pressures is crucial for developing a life support system. *Dunaliella salina*, a unicellular microalga, is a rich source of the valuable metabolite β-carotene. This alga exhibits rapid growth, tolerance to environmental stress, and potential as a candidate for space studies. This study investigated the effect of low atmospheric pressure (860, 340, 160, and 80 mbar) on growth, chlorophyll pigments, and antioxidant enzyme responses in *D. salina*. The results demonstrated that growth, cell number, density, and chlorophyll content increased under 340 and 160 mbar pressures but significantly decreased at 80 mbar. Protein content increased by 32.1% at 340 mbar, declining at 80 mbar. Reduced growth under 80 mbar atmospheric pressure resulted in the high accumulation of carotenoid content (13.4 mg g^{-1}) and β-carotene (9.4 mg g^{-1}). Superoxide dismutase increased with decreasing atmospheric pressure, while catalase activity declined at 80 mbar. These findings suggest that the ability of *D. salina* to grow under varying atmospheric pressures is linked to alterations in cellular metabolism and enhanced antioxidant capacity.

*Corresponding Author's E-mail: hassanpour@ari.ac.ir

How to Cite this Article:
H. Hassanpour, "Effect of low atmospheric pressure on the growth and antioxidant defense response of *Dunaliella Salina*," *Journal of Space Science and Technology*, Vol. 17, No. 4, pp. 56-64, 2024, (in Persian), https://doi.org/10.22034/jsst.2024.1483.

COPYRIGHTS
© 2024 by the authors. Published by Aerospace Research Institute. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of The Creative Commons Attribution 4.0 International (CC BY 4.0).

OPEN ACCESS

JSST
علوم و فناوری فضایی

شاپای چاپی: ۴۵۶۰-۲۰۰۸
شاپای الکترونیکی: ۴۵۱۶-۲۴۲۳

علوم و فناوری فضایی

سال ۱۴۰۳، دوره ۱۷، شماره ۴، صفحه ۵۶-۶۴
https://doi.org/10.22034/jsst.2024.1483
Journal Homepage: https://www.jsstpub.com

مقاله پژوهشی

تاثیر کاهش فشار اتمسفری بر رشد و پاسخ دفاع آنتی‌اکسیدانی جلبک دونالیلا سالینا

حلیمه حسن‌پور*

دانشیار، پژوهشگاه هوافضا، وزارت علوم، تحقیقات و فناوری، تهران، ایران

اطلاعات مقاله

تاریخچه مقاله:

دریافت ۲۸ فروردین ۱۴۰۳
بازنگری ۱۲ خرداد ۱۴۰۳
پذیرش ۰۲ تیر ۱۴۰۳
اولین انتشار ۱۲ تیر ۱۴۰۳

واژه‌های کلیدی:

بتا-کاروتن
کاهش فشار اتمسفری
دونالیلا سالینا
رشد
سوپراکسید دیسموتاز

چکیده

اکتشافات فضایی در مریخ از موضات علمی جذاب بوده و می تواند اطلاعات ارزشمندی را برای استقرار حیات در این سیاره فراهم نماید. برای ارسال انسان به مریخ در ماموریت‌های طولانی مدت نیاز به طراحی سیستم پشیبان حیات قابل بازیابی برای تامین غذا و اکسیژن است. فشار اتمسفری سطح مریخ بسیار کمتر از سطح زمین است و قابلیت رشد موجودات فتوسنتز کننده در فشار اتمسفری پائین برای استقرار سیستم پشتیبان حیات اهمیت بسزایی دارد. دونالیلا سالینا نوعی جلبک تک سلولی و غنی از متابولیت ارزشمند بتا-کاروتن است. این جلبک رشد سریعی داشته، مقاوم به تنش‌های محیطی بوده و می‌تواند به‌عنوان کاندیدی برای مطالعات فضایی باشد. در این مطالعه تاثیر فشار پائین اتمسفری (۸۶۰، ۳۴۰، ۱۶۰ و ۸۰ میلی‌بار) بر رشد، محتوای رنگیزهای کلروفیل و پاسخ آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی جلبک دونالیلا سالینا بررسی شد. نتایج نشان داد که رشد، تعداد ، تراکم سلولی و محتوای کلروفیل در فشار ۳۴۰ و ۱۶۰ میلی‌بار افزایش یافت، ولی در فشار اتمسفری ۸۰ میلی‌بار منجر به کاهش معنی‌دار این پارامترها شد. محتوای پروتئین در فشار اتمسفری ۳۴۰ میلی‌بار ۳۲/۱ درصد افزایش یافت، ولی در ۸۰ میلی‌بار مقدار آن کاهش یافت. کاهش رشد در فشار اتمسفری ۸۰ میلی‌بار منجر به تجمع بالای محتوای کاروتنوئید (۱۳/۴ میلی‌گرم بر گرم) و بتاکاروتن (۹/۴ میلی‌گرم بر گرم) شد. فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز با کاهش فشار اتمسفری افزایش یافت، درحالی‌که فعالیت آنزیم کاتالاز در فشار ۸۰ میلی‌بار کاهش یافت. نتایج این پژوهش نشان داد که قابلیت رشد سلول‌های جلبک تحت تغییر فشار اتمسفری مرتبط با تغییر متابولیسم سلولی و افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی است.

*پست الکترونیکی نویسنده مسئول: hassanpour@ari.ac.ir

How to Cite this Article:
H. Hassanpour, "Effect of low atmospheric pressure on the growth and antioxidant defense response of *Dunaliella Salina*," *Journal of Space Science and Technology*, Vol. 17, No. 4, pp. 56-64, 2024, (in Persian), https://doi.org/10.22034/jsst.2024.1483.

COPYRIGHTS
© 2024 by the authors. Published by Aerospace Research Institute. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of The Creative Commons Attribution 4.0 International (CC BY 4.0).
OPEN ACCESS

علائم و اختصارات

کاتالاز	Catalase (CAT)
گونه‌های اکسیژن فعال	Reactive Oxygen species (ROS)
سوپراکسید دیسموتاز	Superoxide Dismutase (SOD)
نیتروبلوتیرازولیوم	Nitro Blue tetrazolium (NBT

مقدمه

اکتشافات فضایی انسان در مریخ یکی از جذاب‌ترین موضوعات علمی و فناورانه در عصر حاضر بوده و اطلاعات ارزشمندی را برای کشف و چگونگی استقرار حیات در مریخ فراهم می‌کند. از طرفی، این مطالعات می‌تواند منجر به تسهیل توسعه تکنولوژی روی زمین و ارسال انسان به مریخ شود. تحقیقات اخیر و برنامه‌ریزی برای ارسال انسان به مریخ برای ماموریت‌های طولانی مدت فضایی نیازمند سیستم پشتیبان حیات با قابلیت بازیابی دارد. این سیستم مجموعه‌ای پیچیده از سیستم‌های مهندسی و زیستی بوده که شامل بازیابی آب، تولید غذا، اکسیژن و بازیافت زباله می‌باشد [۱]. از زمان آغاز سفرهای فضایی، جلبک‌ها به‌دلیل رشد سریع، به‌عنوان کاندید مناسبی برای سیستم پشتیبان حیات در نظر گرفته شده‌اند. شرایط رشد آسانی دارند و بیومس آن‌ها خوراکی و قابل هضم برای انسان است. در اواخر دهه ۱۹۶۰ بود که سیستم قابل بازیابی با استفاده از جلبک کلرلا برای اولین بار در آزمایشات زمینی برای جذب دی‌اکسیدکربن و آزادسازی اکسیژن مورد آزمایش قرار گرفت [۲]. سپس آزمایشات متعددی تاثیر تشعشعات، میکروگراویتی، خلاء، و تغییرات شدید دمایی را روی رشد جلبک‌ها مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد که جلبک‌ها قابلیت زیادی برای بقا در شرایط پرتاب فضایی را دارند [۳].

فشار اتمسفری سطح مریخ از ۱ تا ۱۴ میلی‌بار متغیر است که وابسته به محل و فصل است. این مقدار در مقایسه با فشار اتمسفری سطح دریا (۱۰۱۳ میلی‌بار) بسیار پائین است [۴]. قابلیت رشد ارگانیسم‌های فتوسنتز کننده در فشار پایین اتمسفری به‌عنوان یک گام مهم برای استقرار سیستم پشتیبان حیات پیشرفته در ماموریت‌های طولانی مدت فضایی است. مطالعات اولیه کشت جلبک‌ها در فشار پایین اتمسفری از ۲۵۰ تا ۵۰۰ میلی‌بار نشان داد که فشار پائین اتمسفری اثر بازدارندگی روی رشد جلبک‌ها نداشته و حتی ممکن است رشد آن‌ها را کمی تحریک نماید. حتی تعدادی از جلبک‌ها متابولیسم بی‌هوازی را در شرایط اکسیژن پائین توسعه داده‌اند [۵]. تاکنون مطالعات محدود روی سیانوباکترها انجام شده و نتایج نشان داده‌است که دارای پتانسیل رشد روی مریخ هستند. برای نمونه، رشد جلبک *Anabaena cylindrical* تحت فشار پائین و دی‌اکسیدکربن اتمسفری منجر به افزایش محتوای کربوهیدرات و کاهش محتوای پروتئین شد [۶].

جلبک‌ها موجوداتی با تنوع زیستی گوناگون و قابلیت سازگاری به‌شرایط خاص را دارند که آن‌ها را قادر به بقاء در شرایط محیطی سخت از جمله بیابان‌های گرم و سرد، زیستگاه‌های خیلی شور، محیط‌های حاوی فلزات سنگین و غیره می‌نماید [۷، ۸]. رشد موفق سیانوباکترها در فشار اتمسفری پائین‌تر از ۱۰۰ میلی‌بار گزارش شده است، اما جزئیات مربوط به دینامیک رشد هنوز آشکار نیست. از طرفی، تعداد مطالعات کمی اثر کاهش فشار اتمسفری را روی جلبک‌هایی با پتانسیل تغذیه‌ای بالا صورت گرفته‌است [۹]. دونالیلا سالینا[1] از جلبک‌های تک سلولی، سبزرنگ، متعلق به رده کلروفیسه[2]، راسته ولوکالز[3]، تیره دونالیلاسه[4] و یک منبع غنی از کاروتنوئید (بیشتر بتا–کاروتن) است. بیومس جلبک و رنگیزه عصاره‌گیری شده آن دارای کاربرد وسیع در صنایع غذایی، آرایشی، داروئی و سوخت زیستی است. رنگیزه ارزشمند بتا–کاروتن به‌عنوان پیش‌ساز ویتامین A و یک آنتی‌اکسیدان قوی است و مقدار آن در جلبک دونالیلا به ۱۴٪ وزن خشک می‌رسد [۱۰]. جلبک دونالیلا تحمل بالایی به‌شرایط تنش داشته و دارای قابلیت رشد در آب‌های شور و شیرین است. این جلبک می‌تواند در محدود وسیعی از شوری (از ۰/۰۵ تا ۵/۵ مولار) رشد نماید. جلبک دونالیلا به‌طور تجاری در چندین کشور نظیر استرالیا، چین، اسرائیل و هند کشت می‌شود و البته در کشورهای شیلی، اسپانیا، ایران و پرتقال نیز به‌صورت پایلوت کشت شده و به‌عنوان بهترین منبع بتاکاروتن و آنتی‌اکسیدان محسوب می‌شود. توانایی جلبک به سازگاری با تنش‌ها (اکسیداتیو و اسمزی) و همچنین عدم حضور دیواره سلولی سبب شده که این جلبک به‌عنوان منبع مناسبی برای تولید آنتی‌اکسیدان باشد. تاکنون چندین مطالعه در ارتباط با تاثیر شرایط تنش‌های محیطی بر ظرفیت آنتی‌اکسیدانی این جلبک صورت گرفته‌است. تاثیر نور و دمای پائین بر دو سویه از جلبک دونالیلا نشان داد که فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، محتوای اسکوربات تا ۱۵٪ و گلوتاتیون تا۱۰۰٪ افزایش یافت [۱۱]. بر هم کنش نور شدید و کاهش نیتروژن سبب القای تولید کاروتنوئید در جلبک دونالیلا شد که در ارتباط با فعالیت بالای ایزوزیم آهن‌دار آنزیم سوپراکسید دیسموتاز بود [۱۲]. تنش شوری بالا منجر به بازدارندگی رشد در جلبک دونالیلا شد، اما تجمع بتاکاروتن را به‌طور معناداری افزایش داد [۱۳]. در ارتباط با تاثیر کاهش فشار اتمسفری بر

1. *Dunaliella Salina*
2. Chlorophyceae
3. Volvocales
4 . Dunaliellaceae

جلبک مطالعه اندکی صورت گرفته‌است. Cycil و همکاران (۲۰۲۱) گزارش نمودند که کاهش فشار اتمسفری تا ۱۶۰ میلی‌بار منجر به تحریک رشد جلبک‌های کلرلا و دونالیلا شد [۱۴]. مطالعه روی چند سویه کارنوباکتریوم[1] نشان داد که کارنوباکتریوم ها قادر به رشد در شرایط کاهش فشار و بدون اکسیژن اتمسفری هستند [۱۵]. در ارتباط با تاثیر فشارهای پائین اتمسفری بر پاسخ‌های آنتی‌اکسیدانی جلبک دونالیلا و ارتباط آن با رشد جلبک دونالیلا تاکنون مطالعه‌ای صورت نگرفته‌است. در این مطالعه تاثیر کاهش فشار اتمسفری بر مکانیسم رشد از طریق بررسی آنزیم‌ها و متابولیت‌های آنتی‌اکسیدانی جلبک دونالیلا سالینا بررسی شد.

مواد و روش‌ها

تهیه جلبک، شرایط کشت و اعمال فشار پائین اتمسفری

جلبک دونالیلا سالینا (*D. salina* M50030) از مرکز میکرو ارگانیسم‌های ایران خریداری شد و در محیط جانسون اصلاح شده با pH ۷/۵ کشت شد [۱۶]. جلبک‌ها در ظروف ارلن ۱۰۰ میلی‌لیتری در حجم محیط کشت ۲۵ میلی‌لیتر و تعداد سلول $۲/۳ \times ۱۰^{۴}$ کشت شدند و در دمای ۲۵ ± ۲ درجه، نور ال‌ای‌دی سفید با شدت ۲۵ میکرومول فوتون بر متر مربع بر ثانیه روی شیکر قرار گرفت.

برای ایجاد کاهش فشار، از ابزار طراحی شده برای ایجاد کاهش فشار اتمسفری حاوی یک پمپ مکنده هوا استفاده شد. میزان فشار هوای درون ظرف با استفاده از مانومتر روی دستگاه قابل ارزیابی بود. سلول‌های جلبک در روز سوم واکشت در ابتدای فاز لگاریتمی رشد تحت شرایط کاهش فشار اتمسفری ۸۶۰، ۳۴۰، ۱۶۰ و ۸۰ میلی‌بار برای ۵ روز (از روز ۴ ام تا روز ۹ ام کشت) و هر روز برای یک ساعت قرار گرفتند. نمونه کنترل نیز در شرایط محیطی مشابه در بیرون از دستگاه قرار گرفت. فشار هوای محیط با استفاده از بارومتر (۸۶۰ میلی‌بار) تعیین شد. ارلن‌ها بعد از اعمال تیمار روی دستگاه شیکر با شرایط دمایی و نوری ذکر شده در بالا قرار گرفتند. نمونه‌ها در روز ۱۴ ام کشت (ابتدای فاز ثابت رشد) برای آنالیزهای رشد و بیوشیمیایی برداشت شدند. برای هر تیمار ۳ تکرار گذاشته شد و آزمایش ۲ بار تکرار شد.

بررسی رشد

رشد جلبک‌ها هر دو روز یک‌بار برای ۱۸ روز ارزیابی شد. سوسپانسیون سلولی پس از برداشت سانتریفیوژ (سرعت g × ۴۵۰۰ برای ۵ دقیقه) شد و پلت‌های سلولی پس از دوبار شستشو با آب مقطر، دوباره سانتریفوژ گردید. پس از محاسبه وزن تر، نمونه‌ها در آون ۶۰ درجه قرار گرفت و پس از رسیدن به وزن ثابت، وزن خشک محاسبه شد. تعداد سلول‌ها نیز با استفاده از لام نئوبار به‌دست آمد. تراکم سلولی نیز با خواندن جذب سوسپانسیون سلولی در ۷۵۰ نانومتر به‌دست آمد.

بررسی رنگیزه های فتوسنتزی و کاروتنوئیدها

مقدار ۵۰ میلی‌گرم از وزن تر سلولی با استن ۱۰۰ درصد برای ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتیگراد عصاره‌گیری شد. بعد از سانتریفیوژ، جذب عصاره در طول موج‌های ۶۶۲، ۶۴۵ و ۴۷۰ نانومتر ثبت شد و محتوای کلوفیل *a*، کلروفیل *b* و کاروتنوئید با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد [۱۷].

$$Chl a\ (\mu g\ mL^{-1}) = 11.75\ A662 - 2.35\ A645$$
$$Chl b\ (\mu g\ mL^{-1}) = 18.61\ A645 - 3.96\ A662$$
$$Car\ (\mu g\ mL^{-1}) = (1000A470 - 2.270\ Chl a - 81.4\ Chl b)/198$$

محتوای بتاکاروتن

۲۰ میلی‌گرم از وزن تر سلولی در ۳ میلی‌لیتر محلول هگزان/اتانول با نسبت ۱ به ۲ (حجمی/حجمی) به‌صورت سوسپانسیون در آمد و بعد از چندین بار ورتکس، سانتریفیوژ شد. جذب محلول رویی حاوی بتاکاروتن در ۴۵۰ نانومتر قرائت شد و محتوای بتاکاروتن با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد [۱۸].

$$C_{\beta\text{-car}}\ (\mu g\ ml^{-1}) = 25.2 \times A_{450}$$

محتوای پروتئین و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی

محتوای پروتئین با استفاده از روش برادفورد سنجش شد [۱۹]. ۰/۱ گرم از وزن تر پلت سلولی در ۲ میلی‌لیتر بافر استخراج سرد Tris-HCl ۵۰ میلی‌مولار با pH ۶/۸ سائیده شد و سپس در سرعت g × ۱۲۰۰۰ برای ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد سانتریفیوژ گردید. عصاره به‌دست آمده برای سنجش پروتئین و آنزیم‌های آنتی اکسیدانی استفاده شد. برای سنجش پروتئین، ۵ میلی‌لیتر از معرف برادفورد و ۱۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی مخلوط شد و برای ۲۰ دقیقه در دمای اتاق قرار گرفت. سپس جذب در ۵۹۵ نانومتر قرائت شد و محتوای پروتئین با استفاده از نمودار رسم شده با استفاده از سرم آلبومین گاوی به‌عنوان استاندارد محاسبه شد.

فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD) از طریق بازدارندگی احیای نیتروبلوتترازولیوم (NBT) با روش Giannopolitis و Ries به‌دست آمد [۲۰]. برای تهیه مخلوط واکنش، ۲۰۰ میکرولیتر عصاره با

1. Carnobacterium

محلول بافر فسفات (۵۰ میلی مولار با pH 7.5)، متیونین ۱۳ میلی‌مولار، ۰/۱ میلی‌مولار Na-EDTA، ۷۵ NBT میلی‌مولار و ریبوفلاوین ۵۷ میکرو مولار مخلوط شد و سپس جذب نمونه در ۵۶۰ نانومتر بعد از ۱۰ دقیقه قرائت شد. یک واحد آنزیمی معادل مقدار آنزیمی است که سبب بازدارندگی ۵۰ درصد احیای NBT می‌شود.

برای سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT)، مخلوط واکنش حاوی ۱۵ میکرو لیتر عصاره آنزیمی، ۶۲۵ میکرو لیتر بافر پتاسیم فسفات (۵۰ میلی مولار با pH 7) و ۷۵ میکرولیتر هیدروژن پراکسید (۳٪) آماده شد و فعالیت آنزیم در ۲۴۰ نانومتر قرائت گردید [۲۱].

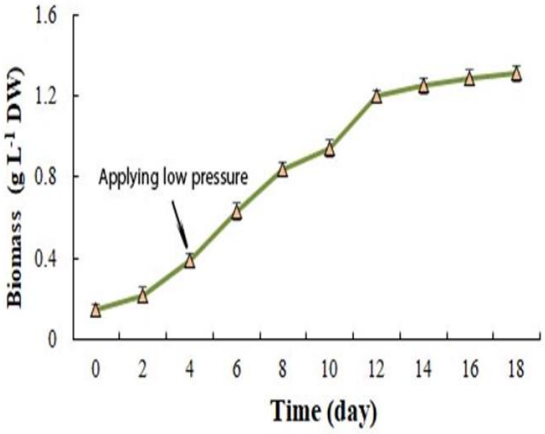
آنالیز آماری

آنالیز آماری با روش ANOVA توسط نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۱ انجام شد. آزمایشات رشد با ۵ تکرار و آزمایشات بیوشیمیایی با ۴ تکرار برای هر تیمار انجام شد. اختلاف معنی‌داری بین میانگین‌ها با روش دانکن در سطح $P \leq ۰/۰۵$ صورت گرفت.

نتایج

منحنی رشد جلبک دونالیلا سالینا

رشد جلبک پس از ۱۸ روز واکشت در محیط جدید نشان داد که در ۲ تا ۳ روز اول، جلبک‌ها در فاز تاخیری به‌سر می‌برند. سپس وارد فاز لگاریتمی رشد شده و تا روز ۱۳ ام ادامه دارد. در روزهای ۱۴ ام تا ۱۸ ام سلول‌ها وارد فاز ثابت رشد شده و تغییر رشد چندانی ندارند (شکل ۱).



شکل ۱– منحنی رشد جلبک دونالیلا سالینا بعد از ۱۸ روز از کشت.

Fig. 1. The growth curve of *D. salina* alga after 18 days of cultivation.

تاثیر فشار پائین اتمسفری بر رشد، تعداد سلول و محتوای کلروفیل

تعداد سلول‌های جلبک در فشار هوای محیط (شاهد) ۱۰۶ × ۰/۴۵ در روز ۱۴ ام کشت بود. کاهش فشار اتمسفری تا ۱۶۰ میلی‌بار منجر به افزایش تعداد سلول‌ها شد و فشار اتمسفری خیلی پائین (۸۰ میلی‌بار) منجر به کاهش ۱۷/۷ درصدی تعداد سلول‌ها در مقایسه با نمونه شاهد شد. نتایج جذب سوسپانسیون سلولی در ۷۵۰ نانومتر نشان داد که بیشترین رشد سلول‌ها در فشار اتمسفری ۳۴۰ میلی‌بار بوده و با کاهش فشار اتمسفری تراکم سلولی نیز کاهش یافت (جدول ۱)

جدول ۱– تاثیر کاهش فشار اتمسفری بر تعداد و تراکم سلولی، رشد، محتوای کلروفیل *a* و *b*.

Table 1. The effect of low atmospheric pressure on the cell number and concentration, growth, and chlorophyll *a* and *b* contents.

Pressure (mbar)	Cell number ($\times 10^6$)	Cell concentration (OD 750 nm)	Biomass (g L^{-1} DW)	Chlorophyll *a* (µg g^{-1} FW)	Chlorophyll *b* (µg g^{-1} FW)
860 ± 10	0.45 ± 0.075 c	0.12 ± 0.013 c	0.22 ± 0.15 c	24.9 ± 1.13 b	14.8 ± 0.78 b
340 ± 10	3.2 ± 0.081 a	0.31 ± 0.017 a	0.46 ± 0.23 a	34.6 ± 1.42 a	19.7 ± 1.03 a
160 ± 10	2.8 ± 0.093 b	0.26 ± 0.022 b	0.38 ± 0.29 ab	30.4 ± 1.87 ab	17.9 ± 0.65 a
80 ± 3	0.37 ± 0.71 cd	0.08 ± 0.011 d	0.15 ± 0.11 d	12.5 ± 2.36 c	10.3 ± 0.67 c

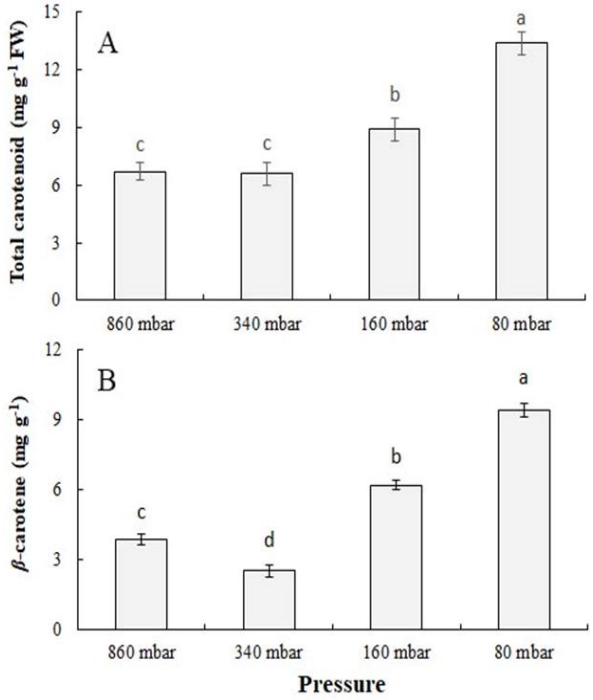
حروف نامشابه بیانگر معنی‌داری در سطح $P \leq ۰/۰۵$ است

میزان بیومس سلولی در فشارهای اتمسفری ۳۴۰ و ۱۶۰ میلی بار به ترتیب افزایش ۲/۱ و ۱/۷ برابری را نسبت به نمونه شاهد نشان داد. محتوای کلروفیل *a* و *b* با کاهش فشار اتمسفری تا ۱۶۰ میلی بار نسبت به شاهد افزایش معنی‌داری یافت ($P \leq ۰/۰۵$). بالاترین مقدار

کلروفیل a و b در فشار ۳۴۰ میلی بار مشاهده شد که به‌ترتیب افزایش ۳۸/۹ و ۳۳/۱ درصد را نسبت به شاهد نشان داد (جدول ۱).

تاثیر فشار پائین اتمسفری بر محتوای کاروتنوئید و بتاکاروتن

محتوای کاروتنوئید و بتاکاروتن تحت فشار اتمسفری پائین تغییر معنی‌داری یافت. بیشترین محتوای کاروتنوئید (۱۳/۴ میلی‌گرم بر گرم) و بتا-کاروتن (۹/۴ میلی‌گرم بر گرم) در فشار اتمسفری ۸۰ میلی بار مشاهده شد که افزایش معنی‌داری را نسبت به شاهد نشان داد ($P \leq$ ۰/۰۵). در فشار اتمسفری ۴۳۰ میلی‌بار محتوای کاروتنوئید تغییر معنی‌داری را نشان نداد، ولی محتوای بتا-کاروتن کاهش ۳۵/۱ درصدی را نسبت به شاهد نشان داد.

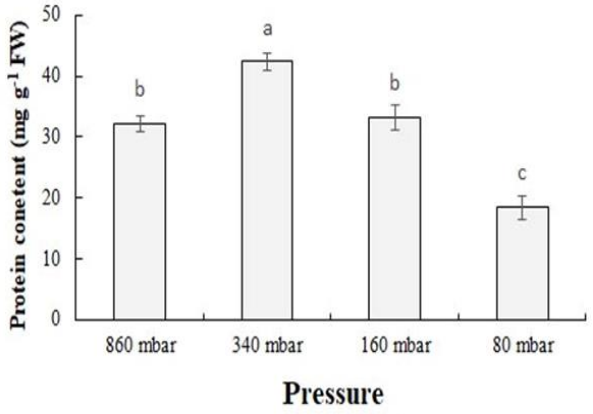


شکل ۲- تاثیر فشارهای اتمسفری پائین بر محتوای کاروتنوئید کل (A) و بتا-کاروتن (B) جلبک دونالیلا سالینا. حروف نامشابه بیانگر معنی‌داری در سطح P ≤۰/۰۵ است.

Fig. 2. The effect of low atmospheric pressure on the total carotenoid (A), β-caroten (b) of *D. salina* alga. differnt letters indicate significance at P ≥ 0.05 level.

تاثیر فشار پائین اتمسفری بر محتوای پروتئین و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی

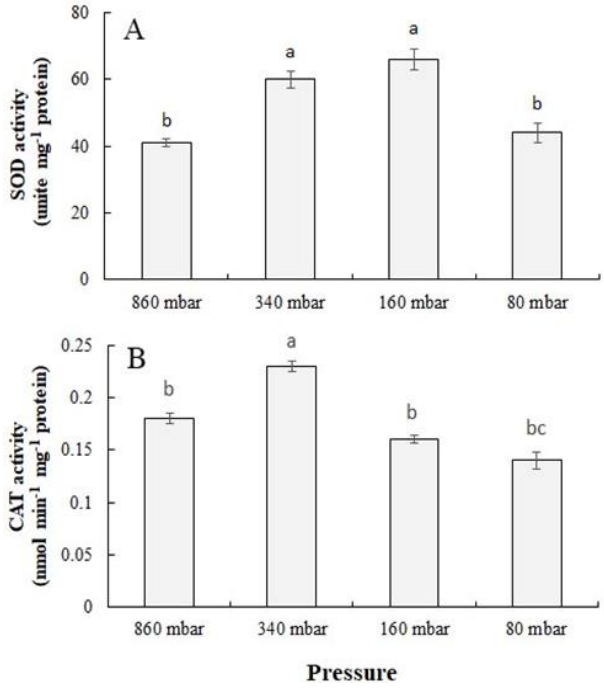
محتوای پروتئین در فشار ۳۴۰ میلی‌بار افزایش ۳۲/۱ درصد را نسبت به شاهد نشان داد. اما با کاهش بیشتر فشار، محتوای پروتئین کاهش یافت. به‌طوری‌که در فشار ۸۰ میلی‌بار، محتوای پروتئین کاهش ۴۲/۶ درصدی را نسبت به شاهد نشان داد (شکل ۳).



شکل ۳- تاثیر فشارهای اتمسفری پائین بر محتوای پروتئین جلبک دونالیلا سالینا. حروف نامشابه بیانگر معنی‌داری در سطح P ≤۰/۰۵ است.

Fig. 3. The effect of low atmospheric pressure on the protein content of *D. salina* alga. differnt letters indicate significance at P ≥ 0.05 level.

فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز تغییر معنی‌داری نسبت به نمونه شاهد یافت (شکل ۴). به‌طوری‌که با کاهش فشار اتمسفری فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز افزایش یافت.



شکل ۴- تاثیر فشارهای اتمسفری پائین بر فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی سوپراکسید دیسموتاز (A ،SOD) و کاتالاز (B ،CAT) جلبک دونالیلا سالینا. حروف نامشابه بیانگر معنی‌داری در سطح P ≤۰/۰۵ است.

Fig. 4. The effect of low atmospheric pressure on the antioxidant enzyme activity of superoxide dismutase (SOD, A) and catalase (CAT, B) of *D. salina* alga. differnt letters indicate significance at P ≥ 0.05 level.

بیشترین فعالیت آنزیمی در فشارهای اتمسفری ۳۴۰ و ۱۶۰ میلی‌بار مشاهده شد که به‌ترتیب افزایش ۴۸/۷ و ۵۶/۹ درصدی را نسبت به شاهد نشان دادند. در فشار اتمسفری ۸۰ میلی‌بار نیز فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز کمی افزایش یافت، ولی نسبت به شاهد معنی‌دار نبود (شکل 4A) فعالیت آنزیم کاتالاز در فشار ۳۴۰ میلی‌بار افزایش یافت، ولی با کاهش بیشتر فشار اتمسفری، فعالیت کاتالاز تغییر معنی‌داری را نسبت به شاهد نشان نداد (شکل 4B).

بحث

در این مطالعه، قابلیت رشد و پاسخ آنتی‌اکسیدانی سلول‌های جلبک دونالیلا سالینا تحت فشارهای پائین اتمسفری مورد بررسی قرار گرفت. جلبک‌ها به‌عنوان منبع غنی از آمینواسیدها، پروتئین، ویتامین و متابولیت‌های آنتی‌اکسیدانی هستند و به‌دلیل رشد سریعی که دارند می‌توانند به‌عنوان غذای فضانورد و تولید اکسیژن در سیستم پشتیبان حیات و سفرهای فضایی طولانی مدت مورد استفاده قرار گیرند [۱، ۲]. نتایج منحنی رشد جلبک، سه فاز مختلف رشد از جمله فازهای تاخیری، لگاریتمی و ثابت را نشان داد (شکل ۱). به‌طوری‌که در سه روز اول، سلول‌ها رشد چندانی نداشتند و در فاز تاخیری بودند. در این فاز سلول‌ها آمادگی لازم را برای ورود به فاز تکثیر (فاز لگاریتمی) پیدا می‌کنند. فاز لگاریتمی تاز روز سیزدهم ادامه یافت و سپس از روز چهاردهم سلول‌ها وارد فاز رشد ثابت شدند. تکثیر سلول‌ها در فاز ثابت کاهش یافته که می‌تواند به‌دلیل تجمع مواد سمی و کاهش مواد غذایی محیط باشد. در فاز ثابت رشد، مکانیسم‌های دفاعی سلول فعال شده و با تجمع متابولیت‌های ثانوی از سلول‌ها محافظت می‌کند [۲۲]. نتایج منحنی رشد جلبک دونالیلا پیشنهاد می‌کند که سلول‌های جلبک بایستی در روزهای ۱۲ ام تا ۱۳ ام واکشت شوند. تاثیر کاهش فشار اتمسفری بر پارامترهای رشد نشان داد که کاهش فشار اتمسفری تا ۱۶۰ میلی‌بار سبب القای بیومس، تعداد و تراکم سلولی شد. اما کاهش بیشتر فشار اتمسفری در ۸۰ میلی‌بار، پارامترهای رشد را کاهش داد (جدول ۱). بیشترین تعداد سلولی ($۳/۲\times۱۰^{۶}$) و تراکم سلولی در فشار اتمسفری ۳۴۰ میلی‌بار مشاهده شد (جدول ۱). تاکنون گزارشات متفاوتی در ارتباط با تاثیر کاهش فشار اتمسفری بر پاسخ‌های رشد صورت گرفته‌است. Orcutt و همکاران (۱۹۷۰) گزارش نمودند که جلبک‌ها قابلیت رشد در کاهش فشار اتمسفری بین ۵۰۰ تا ۲۵۰ میلی بار را دارند [۲۳]. Cycil و همکاران (۲۰۲۱) بیان نمودند که در جلبک *Chloromonas bervispina*، رشد و تعداد سلولی با کاهش فشار اتمسفری محیط حتی در ۳۳۰ میلی بار کاهش یافت و بیشترین تعداد سلولی در شرایط محیطی نرمال (۶۷۰ میلی‌بار) مشاهده شد.

اما در جلبک‌های کلرلا و دونالیلا سویه UTEX LB 200، با کاهش فشار اتمسفری تعداد سلول‌ها افزایش یافت [۱۴]. Qin و همکاران (۲۰۱۴) نشان دادند که کاهش فشار اتمسفری از ۱۰۰ به ۵۰ کیلوپاسکال منجر به کاهش رشد سیانو باکتری‌های *Anabaena flosaquae* و *Microcystis aeruginosa* شد، درحالی‌که تولید ترکیبات پلی‌مری خارج سلولی برای سازش به شرایط تنش افزایش یافت [۲۴]. Yang و همکاران (۲۰۱۶) گزارش نمودند که تعدادی از جلبک‌ها در شرایط کاهش اکسیژن می‌توانند متابولیسم بی‌هوازی را فعال نموده و رشد کنند [۲۵]. به‌نظر می‌رسد پاسخ‌های متفاوت رشد جلبک‌ها وابسته به نوع و سویه جلبک، سطح فشار اتمسفری و حتی مدت زمان اعمال کاهش فشار باشد. نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که جلبک دونالیلا سالینا در شرایط فشار پائین اتمسفری با تغییر متابولیسم سلولی قابلیت رشد داشته و حتی در فشار خیلی پائین (۸۰ میلی‌بار) قابلیت رشد کم را حفظ می‌نماید.

رنگیزه کلروفیل از اجزای اصلی دستگاه فتوسنتزی گیاهان و جلبک‌ها بوده و در جذب نور نقش دارند. کلروفیل a در واکنش شیمیایی برداشت نوری دستگاه فتوسنتزی و کلروفیل b در پایداری پروتئین‌های کمپلکس برداشت نور نقش دارند [۲۶]. در این مطالعه محتوای رنگیزه‌های کلروفیل a و b با کاهش فشار اتمسفری ۱۶۰ میلی‌بار افزایش یافت، ولی در فشار ۸۰ میلی‌بار، محتوای کلروفیل کاهش یافت. از طرفی، محتوای رنگیزه‌های کاروتئوئید و بتاکاروتن، یک روند افزایشی را با کاهش فشار نشان دادند. تحقیقات Qin و همکاران (۲۰۱۴) نشان داد که فشار اتمسفری پائین (۵۰ کیلوپاسکال) منجر به کاهش محتوای کلروفیل در جلبک *Microcystis aeruginosa* شد، در حالی‌که نسبت کاروتنوئیدها به کلروفیل افزایش یافت [۲۴]. مطالعه روی کاهو نشان داد که کاهش فشار اتمسفری ۶۷ و ۳۳ کیلوپاسکال به‌ترتیب منجر به کاهش ۲۰ و ۳۸ درصد سطح برگی و کاهش ۶ و ۲۷ درصدی وزن تر ساقه شد، ولی محتوای آنتوسیانین نسبت به گیاهچه‌های شاهد یک روند افزایشی را نشان داد [۲۷]. کاهش میزان کلروفیل می‌تواند در ارتباط با تغییر نسبت کاروتنوئید به کلروفیل برای حفاظت فتوسیستم ها در برابر تنش باشد [۶].

به‌خوبی شناخته شده است که تنش‌های غیر زیستی منجر به تجمع انواع ترکیبات اکسیژن فعال (ROS)[1] در سلول‌ها می‌شوند. این ترکیبات می‌توانند بر رشد سلول‌ها تاثیر گذارند و مسیرهای سیگنالینگ مرتبط با سیستم‌های آنتی‌اکسیدانی آنزیمی و غیر آنزیمی را فعال نمایند. فعال شدن دفاع آنتی‌اکسیدانی منجر به خنثی‌سازی رادیکال آزاد و حفاظت از پروتئین‌ها، لیپیدها و DNA

1. Reactive Oxygen Species

سلول از آسیب اکسیداتیو می‌شود [۲۸]. در این مطالعه، محتوای پروتئین در ۳۴۰ میلی‌بار افزایش یافت، ولی با کاهش بیشتر فشار اتمسفری محتوای آن کاهش یافت و کمترین مقدار در سلول‌های جلبک رشد یافته در فشار اتمسفری ۸۰ میلی‌بار مشاهده شد. پاسخ پروتئینی سلول‌ها مرتبط با رشد بود. از طرفی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، پاسخ متفاوتی را نشان دادند. به‌طوری‌که آنزیم سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز در ۳۶۰ میلی‌بار فعالیت آن‌ها افزایش یافت. ولی با کاهش بیشتر فشار اتمسفری، فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز افزایش یافت، درحالی‌که آنزیم کاتالاز کاهش فعالیت را نشان داد. افزایش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز می‌تواند بیانگر نقش مهم این آنزیم در جاروب نمودن رادیکال‌های سوپراکسید تحت کاهش فشار اتمسفری باشد. هیدروژن پراکسید توسط آنزیم‌های کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز و سایر آنزیم‌ها به ملکول آب تبدیل می‌شود [۲۹]. به‌علاوه، نتایج این پژوهش نشان داد که در فشار ۸۰ میلی‌بار، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز، پارامترهای رشد و محتوای رنگیزه کلروفیل کاهش یافت، ولی محتوای کاروتنوئید و بتا–کاروتن افزایش یافت که می‌تواند در ارتباط با نقش حفاظت کنندگی کاروتنوئیدها از سیستم فتوسنتزی برای جاروب کردن رادیکال‌های آزاد برای حفظ حداقل رشد در شرایط فشار خیلی پائین اتمسفری باشد.

نتیجه‌گیری

در این مطالعه، کاهش فشار اتمسفری تا ۱۶۰ میلی‌بار منجر به تحریک رشد و تعداد سلول جلبک دونالیلا سالینا شد و افزایش رشد در ارتباط با تحریک فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی سوپراکسید دیسموتاز بود. از طرفی کاهش خیلی زیاد فشار اتمسفری در ۸۰ میلی‌بار منجر به بازدارندگی و مرگ همه سلول‌ها نشد، بلکه رشد سلول‌ها کمتر از شاهد شد. در این شرایط سلول‌ها برای حفاظت از آسیب، سیستم‌های دفاع آنتی‌اکسیدانی غیر آنزیمی را فعال نمود و سبب بیشترین تجمع محتوای کاروتنوئید و بتا–کاروتن شد. با توجه قابلیت تحمل بالای جلبک دونالیلا سالینا به تغییر فشار اتمسفری، این جلبک می‌تواند کاندیدی برای مطالعات آتی سیستم پشتیبان حیات باشد.

تشکر و قدردانی

از حمایت مالی مسئولین محترم پژوهشگاه هوافضا برای اجرای این پژوهش قدردانی می‌گردد.

تعارض منافع

هیچگونه تعارض منافع توسط نویسنده بیان نشده است.

مراجع

[1] E. D. Revellame, R. Aguda, A. Chistoserdov, D. L. Fortela, R. A. Hernandez, and M. E. Zappi, "Microalgae cultivation for space exploration: assessing the potential for a new generation of waste to human life-support system for long duration space travel and planetary human habitation," *Algal Research*, vol. 55, 2021, Art. no. 102258, https://doi.org/10.1016/j.algal.2021.102258.

[2] C. D. O. Rangel Yagui, E. D. G. Danesi, J. C. M. De Carvalho, and S. Sato, "Chlorophyll production from *Spirulina platensis*: Cultivation with urea addition by fed-batch process," *Bioresource Technology*, vol. 92, no. 2, pp. 133–141, 2004, https://doi.org/10.1016/j.biortech.2003.09.002.

[3] G. Horneck *et al.*, "Humex, a study on the survivability and adaptation of humans to long-duration exploratory missions, part I: Lunar missions," *Advances in Space Research*, vol. 31, no. 11, pp. 2389–2401, 2003, https://doi.org/10.1016/S0273-1177(03)00568-4.

[4] F. Forget, "The present and past climates of planet Mars," in *European Physical Journal Conferences*, (EPJ Web of Conferences), 2009, vol. 1, pp. 235–248, https://doi.org/10.1140/epjconf/e2009-0924-9.

[5] L. Yang *et al.*, "Microalgae biotechnology as an attempt for bioregenerative life support systems: Problems and prospects," *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, vol. 94, no. 10, pp. 3039-3048, 2019, https://doi.org/10.1002/jctb.6159.

[6] C. Verseux, M. Baqué, K. Lehto, J. P. P. De Vera, L. J. Rothschild, and D. Billi, "Sustainable life support on Mars – the potential roles of cyanobacteria," *International Journal of Astrobiology*, vol. 15, Special Issue 1: Special Issue lucal , pp. 65–92, 2016, https://doi.org/10.1017/S147355041500021X.

[7] L. A. Lewis and P. O. Lewis, "Unearthing the molecular phylodiversity of desert soil green algae (Chlorophyta)," *Systematic Biology*, vol. 54, no. 6, pp. 936–947, 2005, https://doi.org/10.1080/10635150500354852.

[8] I. Garbayo *et al*, "Identification and physiological aspects of a novel carotenoid-enriched, metal-resistant microalga isolated from an acidic river in Huelva (Spain)," *Journal of Phycology*, vol. 48, no. 3, pp. 607–614, 2012, https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2012.01160.x.

[9] T. Niederwieser, P. Kociolek, and D. Klaus, "A review of algal research in space," *Acta Astronautica*, vol. 146, pp. 359–367, 2018, https://doi.org/10.1016/j.actaastro.2018.03.026.

[10] U. K. Roy, B. V. Nielsen, and J. J. Milledge, "Antioxidant production in *Dunaliella*," *Applied Sciences*, vol. 11, no. 9, 2021, Art. no. 3959, https://doi.org/10.3390/app11093959.

[11] M. M. Haghjou, M. Shariati, and N. Smirnoff, "The effect of acute high light and low temperature stresses on the ascorbate–glutathione cycle and superoxide dismutase activity in two *Dunaliella salina* strains," *Physiologia Plantarum*, vol. 135, no. 3, pp. 272–280, 2009, https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2008.01193.x.

[12] S. K. Saha, S. Moane, and P. Murray, "Effect of macro-and micro-nutrient limitation on superoxide dismutase activities and carotenoid levels in microalga *Dunaliella salina* CCAP 19/18," *Bioresource Technology*, vol. 147, pp. 23-28, 2013, https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.08.022.

[13] M. Wu *et al*, "Effects of different abiotic stresses on carotenoid and fatty acid metabolism in the green microalga *Dunaliella salina* Y6," *Annals of Microbiology*, vol. 70, 2020, Art. no. 48, https://doi.org/10.1186/s13213-020-01588-3.

[14] L. M. Cycil *et al*, "Investigating the growth of algae under low atmospheric pressures for potential food and oxygen production on Mars," *Frontiers in Microbiology*, vol. 12, 2021, Art. no. 12:733244, https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.733244.

[15] W. L. Nicholson, K. Krivushin, D. Gilichinsky, and A. C. Schuerger, "Growth of *Carnobacterium* spp. from permafrost under low pressure, temperature, and anoxic atmosphere has implications for Earth microbes on Mars," *Proceedings of the National Academy of Sciences(PNAS)*, vol. 110, no. 2, pp. 666-671, 2012, https://doi.org/10.1073/pnas.1209793110.

[16] H. Lv, X. Cui, F. Wahid, F. Xia, C. Zhong, and S. Jia, "Analysis of the physiological and molecular responses of *Dunaliella salina* to macronutrient deprivation," *PLOS One*, vol. 11, no. 3, 2016, Art. no. e0152226, https://doi.org/10.1371/journal.pone.0152226.

[17] H. K. Lichtenthaler and C. Buschmann, "Chlorophylls and carotenoids: measurement and characterization by UV-VIS spectroscopy," *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, vol. 1, no. 1, 2001, Art. no. F4.3.1-F4.3.8, https://doi.org/10.1002/0471142913.faf0403s01.

[18] M. H. Morowvat and Y. Ghasemi, "Culture medium optimization for enhanced β-carotene and biomass production by *Dunaliella salina* in mixotrophic culture," *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, vol. 7, pp. 217-223, 2016, https://doi.org/10.1016/j.bcab.2016.06.008.

[19] M. M. Bradford, "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding," *Analytical Biochemistry*, vol. 72, no. 1-2, pp. 248-254, 1976, https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3.

[20] C. N. Giannopolitis and S. K. Ries, "Superoxide dismutases II. purification and quantitative relationship with water-soluble protein in seedlings," *Journal Plant Physiology*, vol. 59, no. 2, pp. 315-318, 1977, https://doi.org/10.1104/pp.59.2.315.

[21] S. Jebara, M. Jebara, F. Limam, and M. E. Aouani, "Changes in ascorbate peroxidase, catalase, guaiacol peroxidase and superoxide dismutase activities in common bean (*Phaseolus vulgaris*) nodules under salt stress," *Journal of Plant Physiology*, vol. 162, no. 8, pp. 929-936, 2005, https://doi.org/10.1016/j.jplph.2004.10.005.

[22] H. Hassanpour, "Potential impact of red-blue LED light on callus growth, cell viability, and secondary metabolism of *Hyoscyamus reticulatus*," *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, vol. 58, pp. 256-265, 2022, https://doi.org/10.1007/s11627-021-10232-x.

[23] D. M. Orcutt, B. Richardson, and R. D. Holden, "Effects of hypobaric and hyperbaric helium atmospheres on the growth of *Chlorella sorokiniana*," *Applied Microbiology*, vol. 19, no. 1, pp. 182–183, 1970, https://doi.org/10.1128/am.19.1.182-183.1970.

[24] L. Qin, Q. Yu, W. Ai, Y. Tang, J. Ren, and S. Guo, "Response of cyanobacteria to low atmospheric pressure," *Life Sciences in Space Research*, vol. 3, pp. 55-62, 2014, https://doi.org/10.1016/j.lssr.2014.09.001.

[25] J. Yang, L. Ma, H. Jiang, G. Wu, and H. Dong, "Salinity shapes microbial diversity and community structure in surface sediments of the Qinghai-Tibetan Lakes," *Scientific Reports*, vol. 6, 2016, Art. no. 25078, https://doi.org/10.1038/srep25078.

[26] G. W. Stutte *et al.*, "Effect of reduced atmospheric pressure on growth and quality of two lettuce cultivars," *Life Sciences in Space Research*, vol. 34, pp. 37-44, 2022, https://doi.org/10.1016/j.lssr.2022.06.001.

[27] H. Hassanpour, A. Eydi, and M. Hekmati, "Electromagnetic field improved nanoparticle impact on antioxidant activity and secondary metabolite production in *Anthemis gilanica* seedlings," *International Journal of Agronomy*, vol. 2021, no. 1, pp. 1-9, 2021, Art. no. 8730234, https://doi.org/10.1155/2021/8730234.

[28] H. Hassanpour, "Antioxidant metabolism and oxidative damage in *Anthemis gilanica* cell line under fast clinorotation," *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, vol. 150, pp. 709-719, 2022, https://doi.org/10.1007/s11240-022-02324-2.

[29] R. Madhusudhan, T. Ishikawa, Y. Sawa, S. Shigeoka, and H. Shibata, "Post-transcritional regulation of ascorbate peroxidase during light adaptation of *Euglena gracilis*," *Plant Science*, vol. 165, no. 1, pp. 233–238, 2003, https://doi.org/10.1016/S0168-9452(03)00164-X.