اثر ترکیبی درجه حرارت و دوره‌های نوری بر رشد و زیست‌توده در جلبک سبز *Scenedesmus quadricauda*

زهرا شاهینی شمس‌آبادی[۱]، امیدوار فرهادیان[۱*] و مهدی کدیور [۲]

[۱] **اصفهان، دانشگاه صنعتی اصفهان، دانشکده منابع طبیعی، گروه شیلات**

[۲] **اصفهان، دانشگاه صنعتی اصفهان، دانشکده کشاورزی، گروه علوم و صنایع غذایی**

تاریخ دریافت: ۹۴/۷/۸ تاریخ پذیرش: ۹۵/۱۲/۱۶

چکیده

درجه حرارت و دوره نوری بر رشد و زیست‌توده در ریز جلبک‌ها تأثیر دارد. در این تحقیق تأثیر ترکیبی دماهای مختلف ۲۰، ۲۵ و ۳۰ درجه سانتی‌گراد و دوره‌های نوری مختلف ۸L:۱۶D ، ۱۲L:۱۲D و ۱۶L:۸D بر تراکم، میزان رشد ویژه، زمان دو برابر شدن و تولید زیست‌توده ریز جلبک سبز آب شیرین *Scenedesmus quadricauda* مورد بررسی قرار گرفت. آزمایش به صورت یک طرح کاملاً تصادفی در محیط کشت Bold Basal's Medium (BBM) به مدت ۱۶ روز انجام شد. نتایج نشان داد که تراکم جمعیت، میزان رشد ویژه، زمان دو برابر شدن جمعیت و مقدار زیست‌توده تفاوت معنی‌داری در بین تیمارهای آزمایشی دارد ($P < ۰/۰۵$). بالاترین تراکم ($۲/۱۱\times۱۰^{۷}$ سلول در میلی‌لیتر)، بیشترین میزان رشد ویژه (۰/۲۴ بر روز)، بیشترین میزان زیست‌توده (۰/۳۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) و کمترین زمان دو برابر شدن (۲/۸۷ روز) در دوره نوری ۱۶L:۸ D و دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد بدست آمد. کمترین تراکم ($۸/۱۸\times۱۰^{۶}$ سلول در میلی لیتر)، کمترین میزان رشد ویژه (۰/۱۷۸ بر روز)، کمترین میزان زیست‌توده (۰/۰۹۴ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) و بیشترین زمان دو برابر شدن (۳/۸۹۷ روز) در دوره نوری ۱۶L:۸ D و ۳۰ درجه سانتی‌گراد بدست آمد. بر اساس نتایج بدست آمده می‌توان بیان نمود که افزایش توأم ساعات نوری با درجه حرارت می‌تواند سبب بهبود عملکرد جلبک *S. quadricauda* در کشت‌های انبوه گردد.

واژه‌های کلیدی: دما، دوره نوری، رشد، زیست‌توده، *Scenedesmus quadricauda*

* نویسنده مسئول، تلفن: ۳۹۱۳۵۶۴-۰۳۱۳ ، پست الکترونیکی : omfarhad@cc.iut.ac.ir

مقدمه

جلبک‌های تک سلولی (Microalgae) به‌عنوان تولیدکنندگان اولیه نقش بسیار مهمی در اکوسیستم‌های آبی به لحاظ تأمین مواد و انرژی دارند (۱۴). آنها در مراحل رشد و نمو لاروی برخی از گونه های ماهیان، سخت پوستان و دو کفه‌ای‌ها به‌عنوان غذا کاربرد دارند (۶ و ۳۰). تاکنون گونه‌های زیادی از ریزجلبک‌ها شناسایی شده است. در حال حاضر تنها تعداد اندکی از آنها دارای اهمیت تجاری هستند و برای استخراج ترکیبات با ارزش مانند رنگدانه‌ها و یا پروتئین ها پرورش داده می‌شوند. ریزجلبک‌ها یک منبع طبیعی مورد توجه از ترکیباتی با فعالیت زیستی هستند که می‌توانند به‌عنوان ترکیبات اولیه در صنعت داروسازی مورد استفاده قرار گیرند (۳۱).

جلبک‌های سبز کلروفیسه یک گروه بزرگ و متنوع از موجودات آبزی هستند. جنس *Scenedesmus* متعلق به خانواده Scenedesmaceae از راسته Chlorochocals از جلبک‌های سبز کلروفیسه است که در زمینه‌های مختلف زیستی کاربرد فراوان دارد (۱۸). این جلبک معمولاً به‌عنوان میکروارگانیسم استاندارد در بسیاری از تحقیقات آبی، تکنولوژی و مدیریت آب مطرح است (۴ و۴۳).

عوامل محیطی از قبیل شدت نور، دوره نوری، دما و ترکیب مواد مغذی محیط کشت بر میزان رشد و زیست توده ریز جلبک‌ها تأثیرات مهمی دارند (۶، ۲۴و ۴۲). نور و دما از فاکتورهای اصلی مؤثر بر تولید زیست توده در محیط کشت‌های فتواتوتروفیک هستند (۱۱، ۱۹ و ۳۹). نور منبع انرژی رشد را فراهم کرده و برای سلول فتواتوتروفیک کاملاً ضروریست. موفقیت در تولید زیست توده جلبکی به استفاده کارآمد و بهینه از این انرژی نوری بستگی دارد. تغییر در کمیت و کیفیت نور یقیناً عامل محیطی تأثیرگذاری بر سیستم فتوسنتز، تولید ترکیبات بیوشیمیایی در سلول‌ها و روند رشد در جلبک‌هاست (۲۲، ۲۷، ۲۸ و ۳۳). علاوه بر این، عامل مهم دیگر دوره نوری است که بر چرخه‌های شبانه‌روزی فتوسنتزی، تنفس سلولی، میزان رشد و تقسیم سلولی تأثیر دارد. علاوه بر این، دوره نوری بر فعالیت‌های آنزیمی و سنتز ماکرومولکول‌ها تأثیر دارد (۱۰، ۱۷ و ۲۶).

یکی دیگر از عوامل مهم محیطی مؤثر بر عملکرد جلبکها درجه حرارت آب به‌عنوان یک فاکتور کلیدی است. زیرا میزان پایه و معمول تمام واکنش‌های شیمیایی در سلول های جلبکی در کنترل دما می باشد (۳۴). همچنین دما از عواملی است که بر میزان رشد جلبک، اندازه سلول، ترکیب بیوشیمیایی و نیازهای غذایی جلبک تأثیر می‌گذارد (۲۳).

جلبک سبز *Scenedesmus quadricauda* یکی از معمول‌ترین جلبک‌ها در محیط‌های آب شیرین است. سلول‌های این جلبک غیرمتحرک، فاقد تاژک و دارای کلنی است (۸). این گونه جلبکی دارای ۴۷ درصد پروتئین و ۱/۹ درصد چربی بوده که این جلبک را از نظر کاربردی با اهمیت نموده، به‌طوری‌که امروزه مصارف گوناگونی از نظر غذایی، کشاورزی، تولید ویتامین و سایر جنبه های کاربردی دارد و همچنین این گونه در پرورش زئوپلانکتون‌ها به‌عنوان غذای زنده در پرورش لارو بسیاری از آبزیان پرورشی کاربرد فراوانی دارد (۲ و ۳). ایجاد شرایط بهینه برای تولید این گونه در مقیاس بالا نیازمند آن است که شرایط مختلف در مقیاس آزمایشگاهی مورد ارزیابی قرار گیرد. بنابراین لازم است برای ایجاد شرایط مطلوب، رفتار این گونه، تحت شرایط محیطی مختلف بررسی شود. در این پژوهش تأثیر ترکیبی دوره‌های نوری و درجه حرارت‌های مختلف بر رشد و تولید جلبک *S. quadricauda* در شرایط کنترل شده آزمایشگاهی مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روشها

جمع‌آوری و خالص سازی جلبک: جلبک *S. quadricauda* از استخرهای پرورش ماهی و کانال‌های آبی جمع آوری شد. جلبک سندسموس پس از مشاهده با میکروسکوپ اینورت (مدل CETI، ساخت بلژیک) به کمک کلیدهای موجود مورد شناسایی قرار گرفت (۸). سپس *S. quadricauda* طبق روش Lavens و Sorgeloos در سال ۱۹۹۶ با کشت روی آگار خالص‌سازی گردید (۲۵). در مرحله بعد با کشت‌های متوالی ابتدا در لوله آزمایش ۲۰ میلی‌لیتر و بعد در ارلن مایرهای ۲۵۰ میلی‌لیتر حجم سلولهای جلبک خالص شده افزایش داده شد. برای اطمینان از عدم آلودگی به باکتریها از محیط کشت جامد نوترینت آگار (NA) برای بررسی تعداد کلنی های استفاده گردید. جلبک ها با استفاده از لام هموسیتومتر در زیر میکروسکوپ مورد شمارش قرار گرفت.

پرورش جلبک در ارلن مایرهای ۲ لیتری با محیط کشت تخصصی BBM انجام شد، به‌طوری‌که به ازای هر لیتر آب مقطر ۱۰ میلی لیتر از عناصر پرمصرف و ۱ میلی لیتر از سایر استوک های کم مصرف بطور جداگانه اضافه گردید (۲۹). بنابراین، برای کشت جلبک با حجم دو لیتر، ابتدا آب مقطر در ارلن مایرهای شیشه ای ریخته شد و به آن مقدار ۲۶ میلی‌لیتر محیط کشت BBM اضافه گردید. ارلن مایرهای آماده شده پس از تنظیم pH در ۶/۹ همراه با پنبه-های کتانی مورد نیاز در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد به

مدت ۱۵ دقیقه در دستگاه اتوکلاو (مدل 121A، ساخت ایران) ضدعفونی و استریل شد. پس از اتمام اتوکلاو و هم دما شدن ظروف با دمای آزمایشگاه، محلول ویتامین B از قبل استریل شده با لامپ ماورابنفش طبق دستورالعمل اختصاصی کشت به میزان ۳ میلی‌لیتر در لیتر به هر ظرف کشت اضافه گردید و بعد با رعایت شرایط استریل به هم زده شد. در مرحله بعد، ۲۰۰ میلی‌لیتر از ذخیره جلبک *S. quadricauda* به محیط کشت دارای ویتامین اضافه گردید و در دمای ۱±۲۲ درجه سانتی‌گراد و شدت نور ۶۰ میکرومول فوتون بر متر مربع بر ثانیه و در دوره نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی قرار داده شد (۳۵). هوادهی جلبک با استفاده از پمپ های هوادهی آکواریوم بطور تمام وقت انجام شد.

آماده سازی اتاقک رشد: به‌منظور آماده سازی دوره‌های نوری مناسب در تیمارها، سه اتاقک به ابعاد ۹۰×۱۶۰×۱۸۰ سانتی‌متر ساخته شد. هر اتاقک با لامپ فلوئورسنت (نور مهتابی) تجهیز گردید تا در تمام اتاقک‌ها شدت نور مناسب ۶۰ میکرومول فوتون بر متر مربع در ثانیه به طور ثابت تنظیم گردد. به‌منظور جلوگیری از ورود نور به فضای داخل اتاقک‌ها، سقف و دیوارها با پلاستیک مشکی پوشانده شد. دمای درون اتاقک رشد ۱۸ درجه سانتی‌گراد با نوسان ±۱ در آزمایشگاه تنظیم و برای اجرای پروتکل نوری در هر یک از تیمارها (مثلاً ۸ ساعت نور: ۱۶ ساعت تاریکی در تیمار ۸L:۱۶D) از سه عدد ساعت فرمان (Fur Aussen-geeignet مدل IP44، ساخت آلمان)، هریک به طور اختصاصی برای یک تیمار در تمام دوره آزمایش استفاده گردید. دما با استفاده از بخاری (Atman مدل AT180، ساخت ایران) تنظیم و تلاش گردید تا دمای ظروف آزمایشی در تیمارها حدود ۱±۲۰، ۱±۲۵ و ۱±۳۰ درجه سانتی‌گراد ثابت باشد. آزمایش در یک دوره ۱۶ روزه و شمارش جلبک‌ها هر دو روز یکبار انجام گردید.

نحوه انجام آزمایش: به‌منظور بررسی تأثیر متقابل دما و دوره نوری بر تراکم جمعیت، میزان رشد ویژه، زمان دو برابر شدن و تولید زیست توده جمعیت *S. quadricauda* ، آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۹ تیمار و ۴ تکرار (۳ تیمار دمایی ۲۰، ۲۵ و ۳۰ درجه سانتی‌گراد و ۳ تیمار نوری ۸L:۱۶D، ۱۲L:۱۲D و ۱۶L:۸D روشنایی: تاریکی) انجام شد. جلبک *S. quadricauda* در ارلن مایرهای ۵ لیتری حاوی ۶۵ میلی لیتر محیط کشت BBM با غلظت اولیه 5×10^5 سلول در میلی لیتر و زیست توده اولیه ۰/۰۱۲ میلی گرم در میلی لیتر در هر ارلن مایر، به مدت ۱۶ روز و در شدت نور ۶۰ میکرومول فوتون بر متر مربع در ثانیه کشت داده شد. شمارش جلبکها با استفاده از لام هموسیتومتری و روش مارتینز و همکاران در سال ۲۰۰۰ انجام و زیست توده با روش Lavens و Sorgeloos در سال ۱۹۹۶ محاسبه گردید (۲۵). تراکم جلبک‌ها از روز اول تا روز ۱۶، هر دو روز یکبار اندازه‌گیری شد ولی با توجه به اینکه در روز ۱۶ بیشترین میزان تراکم مشاهده شد، داده های روز ۱۶ ملاک مقایسه و بررسی قرار گرفت.

برای اندازه گیری زیست توده، از نمونه مورد نظر ۳۰۰ میلی لیتر محلول جلبکی برداشته شد و با کاغذهای صافی غشایی از قبل توزین شده، فیلتر گردید. کاغذ صافی حاوی محلول جلبکی در آون الکتریکی (مدل Shimifan Lo.141) در دمای ۸۰ درجه سانتی گراد به مدت ۴ ساعت خشک گردید و پس از خشک شدن، کاغذ صافی در دسیکاتور نگهداری شد و پس از همدما شدن با محیط آزمایشگاه بوسیله یک ترازوی دیجیتالی (مدل Shimadzu LIBROR AEU-210) مورد توزین قرار گرفت تا اختلاف وزن حاصل نشان دهنده وزن خشک جلبک باشد. با توجه به اینکه اختلاف وزن مربوط به ۳۰۰ میلی لیتر جلبک فیلتر شده می باشد، لذا برای محاسبه وزن خشک یک میلی لیتر جلبک، عدد ۳۰۰ به‌عنوان V در فرمول زیر لحاظ گردید تا وزن خشک بر حسب میلی‌گرم بر میلی لیتر محاسبه گردد.

$$DW(mg/ml)=\frac{DWA-DWC}{V}\times 1000$$

DW_A = وزن خشک کاغذ صافی و جلبک

DW_C = وزن خشک کاغذ صافی قبل از فیلتر کردن جلبک

V = حجم محلول جلبکی فیلتر شده

N = تراکم جلبک بر حسب سلول بر میلی‌لیتر

به‌منظور محاسبه سرعت رشد ویژه (SGR: Specific Growth Rate) از رابطه $SGR= (ln\ N2-ln\ N1)/\Delta t$ استفاده شد که در آن $N2$ تعداد سلول‌های جلبک در انتهای آزمایش و $N1$ تعداد سلول‌های جلبک در ابتدای آزمایش و Δt مدت زمان انجام آزمایش است (۲۱). زمان دوبرابر شدن (D_t) جمعیت جلبک‌ها با استفاده از رابطه $D_t=log2e/SGR$ محاسبه گردید (۲۱).

آنالیز آماری داده‌ها با تجزیه واریانس دو طرفه (Two-way ANOVA) انجام شد. برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون دانکن در سطح معنی دار ۵ درصد استفاده شد (۴۲). کارهای آماری لازم با استفاده از نرم افزار آماری SPSS نسخه ۲۲ (۳۸) انجام گردید.

نتایج

نتایج حاصل از آنالیز واریانس دوطرفه (Two-way ANOVA) تأثیر دوره نوری (۸L:۱۶D ، ۱۲L:۱۲D و ۱۶L:۸D) و دما (۲۰، ۲۵ و ۳۰ درجه سانتی‌گراد) روی تراکم، میزان رشد ویژه، زمان دو برابر شدن و میزان زیست توده جمعیت *S. quadricauda* در جدول ۱ ارائه شده است. نتایج آنالیز نشان داد که رژیم نوری و دما بطور مجزا و بطور متقابل بر تراکم سلولی جمعیت تأثیر معنی داری دارند، در حالیکه دما و تأثیر متقابل دما و رژیم نوری بر میزان رشد ویژه تأثیر معنی داری ندارد و به عبارت دیگر تأثیر دما معنی دار نیست. در مورد زمان دوبرابر شدن و زیست توده جلبکی تفاوت معنی داری به لحاظ رژیم نوری ، دما و تأثیر متقابل دما و نور مشاهده گردید.

نتایج حاصل از میانگین رشد در طی روزهای آغازین تا روز ۱۶ افزایش داشت و پس از روز ۱۶ جمعیت جلبکی کاهش یافت، لذا مقایسه روند رشد بین تیمارهای مختلف نوری و دمایی در طی ۱۶ روز پرورش انجام شد. تراکم، میزان رشد ویژه، زمان دو برابر شدن و میزان زیست توده جمعیت *S. quadricauda* در درجه حرارت و دوره‌های نوری مختلف در شکل ۱ ارائه شده است. بالاترین میانگین تراکم (۲۱۱۷۵۰۰۰ سلول در میلی‌لیتر)، بیشترین میزان رشد ویژه (۰/۲۴۱ بر روز)، بیشترین میزان زیست توده (۰/۳۰۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) و کمترین زمان دو برابر شدن (۲/۸۷۵ روز) جمعیت ریزجلبک *S. quadricauda* در دوره نوری ۱۶L:۸D و دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد بدست آمد. کمترین میانگین تراکم (۸۱۸۲۵۰۰ سلول در میلی‌لیتر)، کمترین میزان رشد ویژه (۰/۱۷۸بر روز)، کمترین میزان زیست توده (۰/۰۹۴ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) و بیشترین زمان دو برابر شدن (۳/۸۹۷ روز) در دوره نوری ۸L:۱۶D و دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد بدست آمد. سایر تیمارها روند حدواسط و نوسان دار را در مورد عملکرد جلبک در دماها و رژیم های مختلف از خود نشان داد.

بحث

طبق تحقیقات مختلف دما بر میزان رشد ریز جلبک‌ها بسیار تأثیرگذار است. این تحقیق نشان داد که جلبک تک سلولی *S. quadricauda* در دوره نوری ۱۶L:۸D در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد بخوبی رشد می‌کند، در حالیکه این گونه در دوره نوری ۱۲L:۱۲D و ۸L:۱۶D در دماهای مذکور رشد کمتری دارد. میزان رشد ویژه در دوره‌های نوری ۸L:۱۶D ، ۱۲L:۱۲D و ۱۶L:۸D به‌ترتیب ۰/۲۰۴، ۰/۲۲۹ و ۰/۲۴۱ بر روز در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد، ۰/۲۰۳، ۰/۲۱۴ و ۰/۲۳۳ بر روز در دمای ۲۵ درجه سانتی-گراد و ۰/۱۷۸، ۰/۲۱۰ و ۰/۲۳۵ بر روز در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد بدست آمد. بنابراین می‌توان گفت کاهش دما سبب کاهش میزان رشد می‌شود. این نتایج در توافق کلی با

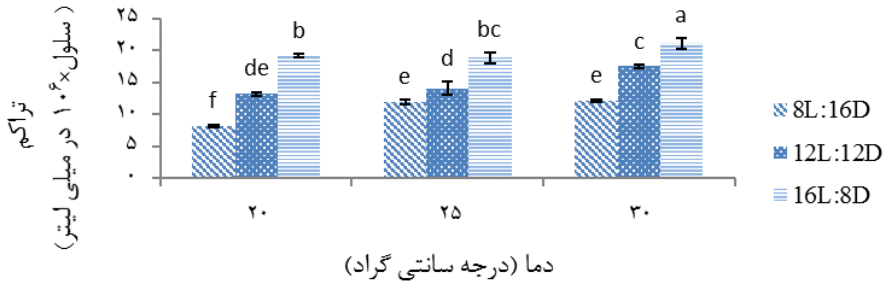
نتایج گزارش شده سایر محققان مبنی بر میزان رشد بالا در دماهای بالا بود. برای مثال، جونجا و همکاران در سال ۲۰۱۳ با بررسی پارامترهای محیطی بر رشد جلبک‌ها بیان نمودند که در دماهای کمتر از دمای بهینه، سرعت رشد کاهش می‌یابد.

جدول ۱- آنالیز واریانس دوطرفه (Two-way ANOVA) از تأثیر دوره نوری (۸L:۱۶D ، ۱۲L:۱۲D و ۱۶L:۸D) و دما (۲۰، ۲۵ و ۳۰ درجه سانتی‌گراد) روی تراکم جمعیت، میزان رشد ویژه، زمان دو برابر شدن و تولید زیست توده در *S. quadricauda*. تعداد تکرار ۴ در هر تیمار.

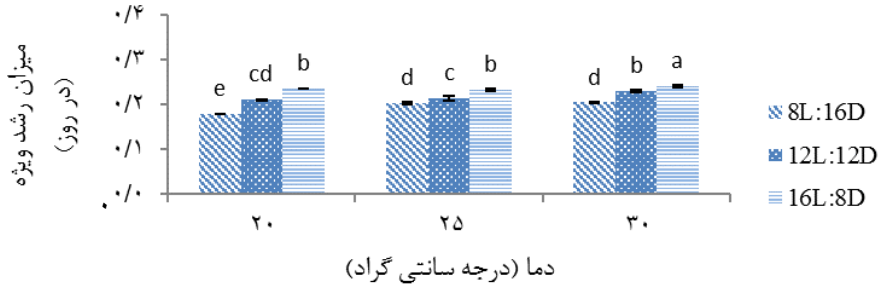
عامل	منابع تنوع	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	میزان F	سطح معنی داری
تراکم سلول	تیمار	۸	۵/۷۷۶×۱۰۱۴	۷/۲۲۰×۱۰۱۳	۶۹/۴۶۱	×
	رژیم نوری	۲	۴/۸۲۹×۱۰۱۵	۲/۴۱۴×۱۰۱۴	۲۳۲/۲۸۵	×
	دما	۲	۷/۰۸۰×۱۰۱۳	۳/۵۴۰×۱۰۱۳	۳۴/۰۵۹	×
	رژیم نوری× دما	۴	۲/۳۹۰×۱۰۱۳	۵/۹۷۶×۱۰۱۲	۵/۷۴۹	×
	خطا	۲۷	۲/۸۰۶×۱۰۱۳	۱/۰۳۹×۱۰۱۲		
	کل	۳۶	۸/۸۵۹×۱۰۱۵			
میزان رشد ویژه	تیمار	۸	۰/۰۱۳	۰/۰۰۲	۷۴/۷۶۹	×
	رژیم نوری	۲	۰/۰۱۰	۰/۰۰۵	۲۳۵/۴۴۸	×
	دما	۲	۰/۰۰۲	۰/۰۰۱	۴۱/۹۸۸	
	رژیم نوری× دما	۴	۰/۰۰۱	۰/۰۰۰	۱۰/۸۱۹	
	خطا	۲۷	۰/۰۰۱	$۲/۱۵۵×۱۰^{-۵}$		
	کل	۳۶	۱/۶۹۸			
زمان دو برابر شدن	تیمار	۸	۳/۲۷۶	۰/۴۰۹	۹۵/۷۱۸	×
	رژیم نوری	۲	۲/۴۳۹	۱/۲۲۰	۲۸۵/۰۹۹	×
	دما	۲	۰/۴۹۳	۰/۲۴۶	۵۷/۵۸۵	×
	رژیم نوری× دما	۴	۰/۳۴۴	۰/۰۸۶	۰/۰۹۴	×
	خطا	۲۷	۰/۱۱۵	۰/۰۰۴		
	کل	۳۶	۳۷۹/۵۱۸			
زیست توده	تیمار	۸	۰/۱۱۹	۰/۰۱۵	۴۱/۸۵۲	×
	رژیم نوری	۲	۰/۰۹۰	۰/۰۴۵	۱۲۷/۱۲۹	×
	دما	۲	۰/۰۲۴	۰/۰۱۲	۳۳/۶۸۳	×
	رژیم نوری× دما	۴	۰/۰۰۵	۰/۰۰۱	۳/۲۹۸	×
	خطا	۲۷	۰/۰۱۰	۰/۰۰۰		
	کل	۳۶	۱/۳۸۱			

×: به معنی اینکه در سطح ۵ درصد معنی دار می‌باشد (P<۰/۰۵).

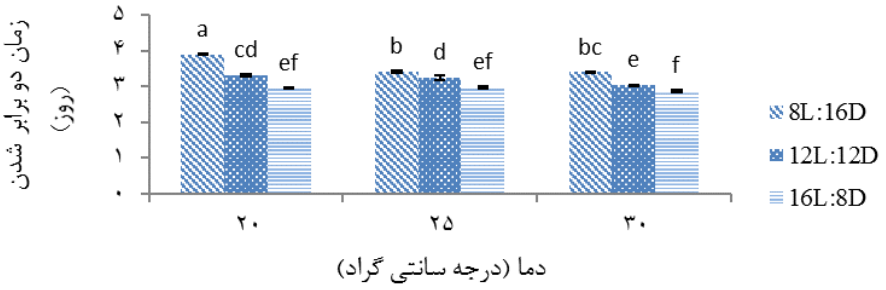
الف



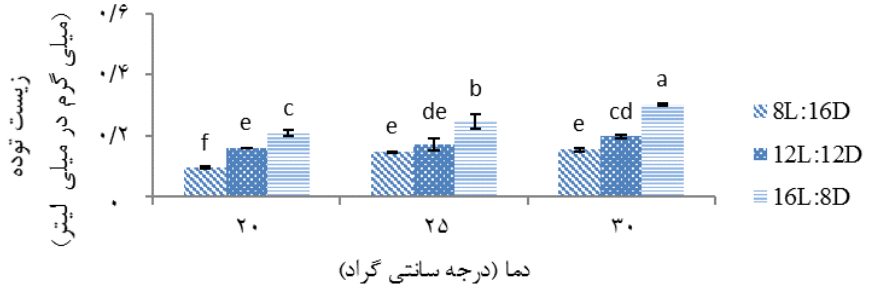
ب



ج



د



شکل ۱- میانگین (± خطای استاندارد، تعداد تکرار= ۴) رشد و تولید زیست توده جمعیت *S. quadricauda* پرورش داده شده در شرایط نوری و دمایی مختلف. (الف) تراکم جمعیت، (ب) میزان رشد ویژه، (ج) زمان دو برابر شدن، (د) تولید زیست توده. میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشابه از نظر آماری با آزمون دانکن در سطح معنی دار ۵ درصد با هم اختلاف ندارند (P>۰/۰۵).

آنان دلیل کاهش سرعت رشد در دماهای پایین را تغییر ویسکوزیته سیتوپلاسم و کاهش بهره‌وری سلول از کربن و نیتروژن گزارش کردند (۲۳). همچنین کاهش رشد در دمای پایین می‌تواند به دلیل کاهش بازده فتوسنتزی و یا افزایش حجم سلول به دلیل اختلال در تقسیم سلول در شرایط رشد غیر مطلوب باشد، به‌طوری‌که کوچیاری و همکاران در سال ۲۰۰۸ در بررسی نقش دما و شوری بر رشد جلبک *Fibrocapsa japonica* بیان کردند که با کاهش دما (۱۶ درجه سانتی‌گراد) تحت غلظت‌های مختلف شوری میزان رشد کاهش و در دماهای بالا (۲۰ و ۲۶ درجه سانتی‌گراد) میزان رشد افزایش می‌یابد (۱۳). در برخی مطالعات بیان شده است که دما با تأثیر بر فعالیت آنزیم Rubisco (آنزیم کاتالیزوری درگیر در فعالیت کربوکسیلازی در فتوسنتز) بر فتوسنتز اثر می‌گذارد، به‌طوری‌که سالوسی و کرافتس براندر در سال ۲۰۰۴ گزارش کردند که دماهای بالاتر از ۳۰ درجه سانتی‌گراد

سبب کاهش تمایل آنزیم Rubisco به دی اکسید کربن می-شود و از این‌رو به‌عنوان یک عامل محدود کننده فتوسنتز، میزان تولید زیست توده را کاهش می‌دهد (۳۶).

شرایط نوری نیز فاکتور مهم و مؤثری بر فیزیولوژی فیتوپلانکتون‌ها است و به‌عنوان منبع انرژی و عامل مهم فتوسنتز برای رشد ریزجلبک‌های فتواتوتروفیک بسیار ضروریست. نیاز گونه‌های مختلف جلبکی به نور از نظر کیفیت، شدت و همچنین دوره نوری متفاوت است. بر طبق مطالعات انجام شده تغییر در کمیت، کیفیت و شدت نور می‌تواند موجب تغییر در ترکیب رنگدانه‌ها، تغییر در زنجیره انتقال الکترون، فعالیت آنزیمی، روند فتوسنتز و تنفس و همچنین تغییر در ترکیب بیوشیمیایی و در نتیجه تغییر در روند رشد جلبک‌ها شود (۱۴، ۱۶، ۲۰ و ۳۷).

نور چه به صورت طبیعی یا مصنوعی، انرژی لازم برای انتقال الکترون از آب به $NADP^+$ و تشکیل NADPH و در نهایت تولید ATP را فراهم می‌کند. همچنین ضرورت فاز تاریکی در فرایند فتوسنتز خود دو نوع واکنش توجیه‌پذیر دارد. یکی فاز فتوشیمیایی وابسته به نور است که در غشا-های فتوسنتزی کلروپلاست رخ می‌دهد و در آن تبدیل انرژی نوری به انرژی شیمیایی (ATP و NADPH) است. مرحله دیگر تثبیت کربن است که مستقل از نور نمی‌باشد بلکه تنظیم بعضی آنزیم های درگیر در این مرحله نیز توسط نور در استرومای کلروپلاست رخ می‌دهد و در نهایت انرژی شیمیایی با تثبیت CO2 از طریق چرخه کالوین در نشاسته ذخیره می‌گردد و در واقع زیست توده جلبکی را افزایش می‌دهد. هرچند در این تحقیق میزان نشاسته اندازه گیری نشد اما استنباط ما مانند مقالات مشابه در مورد علت افزایش بیوماس به افزایش نشاسته می‌تواند مرتبط باشد.

بطور کلی می‌توان بیان نمود که رشد سلول تحت شرایط بهینه نور، منجر به تجمع کربوهیدرات به عنوان ماده ذخیره‌ای برای سوخت و ساز و رشد می‌شود و در نهایت منجر به تولید میزان بالای زیست توده می‌شود (۹، ۱۰،۱۰، ۴۱ و۴۲). نتایج به دست آمده از تحقیق ما نیز نشان داد که میزان زیست توده در دماهای ۲۰، ۲۵ و ۳۰ درجه سانتی‌گراد به‌ترتیب ۰/۲۰۹، ۰/۲۴۷ و ۰/۳۰۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر در دوره نوری ۱۶L:۸D و ۰/۱۶۰، ۰/۱۷۱ و ۰/۱۹۷ میلی‌گرم در میلی‌لیتر در دوره نوری ۱۲L:۱۲D و ۰/۰۹۴، ۰/۱۴۷ و ۰/۱۵۴ میلی‌گرم در میلی‌لیتر در دوره نوری ۸L:۱۶D بود.

تزونیس و همکاران در سال ۱۹۹۷ بیان کردند که فتواتوتروف‌ها با مقدار انرژی قابل دسترس در سیستم فتوسنتزکننده قادرند که میزان تولید زیست توده و تثبیت کربن را تعیین نمایند. بنابراین بطور نسبی می توان استباط کرد که زمان روشنایی طولانی‌تر به شرط عدم آسیب به مولکول کلروفیل می تواند باعث افزایش تقسیم سلول‌ها و زیست توده جلبکی گردد (۴۰). بطور مشابهی ریکموند در سال ۲۰۰۴ بیان کرد در صورتی که میزان نور دریافتی توسط گیاه کمتر از میزان مورد نیاز آن باشد، گیاه قادر به کسب انرژی لازم و عمل فتوسنتز نخواهد بود و این مسئله موجب کاهش در رشد می‌شود (۳۵)، همچنین آندرسون در سال ۲۰۰۵ بیان کرد، دوره‌های نوری مناسب برای بیشتر ریزجلبک‌ها از ۱۲L:۱۲D تا ۱۶L:۸D متغیر هستند (۷).

در تحقیق دیگری امینی خوئی و همکاران در سال ۲۰۱۲ دوره‌های نوری ۸L:۱۶D ، ۱۲L:۱۲D و ۱۶L:۸D و شدت‌های نوری ۳۷/۵، ۶۲/۵ و ۱۰۰ میکرومول فوتون بر متر مربع در ثانیه را برای ارزیابی رشد مورد آزمایش قرار دادند. آنان تولید زیست توده جلبک *Chlorella vulgaris* را وابسته به دوره نوری دانسته و بیان کردند که میزان زیست توده در هر سه شدت نور در دوره‌های نوری طولانی‌تر، بیشتر است (۶). سلمانی‌نژاد در سال ۱۳۹۴ نیز بالاترین میزان رشد در جلبک *Dunaliella saline* را در شدت نور ۴۰ میکرومول بیان نمود و گزارش داد که شدت نورهای بالا منجربه افزایش میزان رشد در این جلبک

نمی‌شود (۱). علاوه بر این، وهیدین و همکاران در سال ۲۰۱۳ در بررسی اثر سه شدت نور ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومول در مترمربع در ثانیه و سه دوره نوری ۱۲L:۱۲D ، ۱۸L:۶D و ۲۴L:۰۰D بر روی رشد ریزجلبک دریایی *Nannochloropsis* sp. انجام شد، بالاترین تراکم سلولی و میزان رشد ویژه را در دوره نوری ۱۸L:۶D با شدت نور ۱۰۰ میکرومول در مترمربع در ثانیه و کمترین میزان رشد را در شدت نور ۲۰۰ میکرومول در مترمربع در ثانیه و دوره نوری ۲۴L:۰۰D گزارش کردند (۴۲). آنان علت این کاهش را به پدیده ممانعت نوری (Photoinhibition) مربوط دانستند، زیرا در شدت نور بالاتر از حد اشباعیت به لحاظ واکنش‌های فتواکسیداسیون و آسیب به سیستم گیرنده فتوسنتزی نور جذب نور در سیستم فتوسنتز کننده دچار اختلال می‌شود (۵ و ۳۲). در این حالت سلول‌ها قادر به ادامه حیات طبیعی خود نیستند و با اینکه در شدت نور بالاتری قرار دارند روند رشد ابتدای فاز نمایی را ندارد و بتدریج در اواخر فاز نمایی محتویات درونی سلول‌ها آسیب دیده و به‌سرعت از بین می‌روند (۳۵). به همین دلیل در شدت نور بالا نیازی به افزایش ساعات روشنایی نیست. به عبارت دیگر، حداکثر بازدهی فتوسنتزی و حداکثر میزان رشد زمانی حاصل می‌شود که دوره نوری و شدت نور، متناسب با انرژی لازم برای انجام واکنش‌ها و فعل و انفعالات در واحد فتوسنتزی باشد (۳۲ و ۴۲).

به‌طورکلی در این مطالعه مشخص شد که *S. quadricauda* رشد و تولید بهتری را در دوره نوری ۱۶L:۸D و درجه حرارت ۳۰ درجه سانتی‌گراد دارد که این عامل با کاهش ظاهری اندازه سلول جلبکی همراه بود. در چنین شرایطی به لحاظ دوره نوری و درجه حرارت، کمترین زمان دو برابر شدن و بیشترین تراکم حاصل گردید که می‌توان این استنباط را کرد که با افزایش رشد و افزایش تقسیم سلولی، اندازه سلول های جلبکی نیز کوچکتر می‌شود و تولید جلبکی به لحاظ تعداد بیشتر خواهد شد.

نتیجه‌گیری

در این تحقیق دوره‌های نوری مختلف و درجه حرارت‌های متفاوت تأثیر معنی داری بر تراکم، میزان رشد ویژه، زمان دو برابر شدن و میزان زیست توده در ریزجلبک *S. quadricauda* داشت و افزایش ساعات روشنایی و درجه حرارت سبب افزایش در جمعیت شد. از سوی دیگر، در کشت‌های تیمار شده با دوره نوری ۸L:۱۶D در تمام درجه حرارت‌ها، جمعیت کمترین میزان رشد را نشان داد.

سپاسگزاری

بدین‌وسیله از معاون محترم پژوهشی دانشکده منابع طبیعی و معاون پژوهشی و تحصیلات تکمیلی دانشگاه صنعتی اصفهان که زمینه انجام این تحقیق را فراهم کردند، نهایت سپاسگزاری را داریم.

منابع

۱. سلمانی نژاد، م. ۱۳۹۴. تاثیر محیط کشت و شدت نور بر رشد و کاروتنوئیدهای جلبک *Dunaliella salina* دریاچه ارومیه. مجله پژوهش های گیاهی (زیست شناسی ایران) شماره ۲۸. ص ۷۸۳-۷۷۱.

۲. حیدری، ص.، فرهادیان، ا. و محبوبی صوفیانی، ن. ۱۳۸۸. تولید زیست توده و حذف آمونیاک و نیتریت از پساب کارگاه پرورش ماهی بوسیله کشت جلبک سبز سندسموس کوادریکودا. مجله محیط شناسی شماره ۵۹. ص ۱۵-۲۸.

۳. خانجانی، م.، ح.، فرهادیان، ا.، کیوانی، ی. و ابراهیمی، ع. ۱۳۸۸. تأثیر جیره‌های غذایی مختلف بر تولید و میزان رشد ویژه جمعیت آنتن منشعب آب شیرین *Ceriodaphnia quadrangular* (O. F. Müller, 1785). مجله علمی شیلات ایران. صفحه ۲۹-۴۰.

۴. فرهادیان، ا.، پیرعلی زفره ای، ا.، و مولایی، ح. ۱۳۹۵. تاثیر ترکیبی علف کش متری بوزین و سختی آب بر برخی خصوصیات جمعیت جلبک **سبز**

Scenedesmus quadricauda. مجله پژوهش های گیاهی (زیست شناسی ایران) شماره ۲۹. ص ۱۰۷-۱۱۷.

16. Etheridge, S. M., and Roesler, C.,S. 2005. Effects of temperature, irradiance, and salinity on photosynthesis, growth rates, total toxicity, and toxin composition for *Alexandrium fundyense* isolates from the Gulf of Maine and Bay of Fundy. Deep-Sea Research. 52: 2491-2500.

17. Fabregas, J., Maseda, A., Domanguez, A., Ferreira, M., and Otero, A. 2002. Changes in the cell composition of the marine microalga, *Nannochloropsis gaditana*, during a light:dark cycle. Biotechnology. Letters. 24: 2491-2500.

18. Girard, V. 2009. Evidence of Scenedesmaceae (Chlorophyta) from 100 million-year-old amber. Journal Citation Reports. 31: 145-151.

19. Goldman, J. C. 1979. Temperature effects on steady-state growth, phosphorus uptake, and the chemical composition of a marine phytoplankter. Microbial Ecology. 5: 153–166.

20. Harrison, P. J., Thompson, P. A., and Calderwood, G. S. 1990. Effects of nutrient and light limitation on the biochemical composition of phytoplankton. Journal of Applied Phycology. 2: 45-56.

21. Ikedo, T., and Omori, M. 1984. Methods in marine zooplankton ecology. John Wiley and Sons Inc, New York, 332 pp.

22. Isik, O., Hizaric, L., Sayin, S., Gokpinar, S., and Durmaz, Y. 2006. The effect of the environmental factors on the vitamin C (ascorbic acid), E (alpha-tocopherol), carotene contents and the fatty acid composition of *Spirulina platensis*. Journal of Fisheries and Aquatic Sciences. 23: 257-261.

23. Juneja, A., Ceballos, R. S., and Murthy, G. 2013. Effects of Environmental Factors and Nutrient Availability on the Biochemical Composition of Algae for Biofuels Production: A Review. Energies. 6: 4607-4638.

24. Kitaya, Y., Xiao, L., Masuda, A., Ozawa, T., Tsuda, M., and Omasa, K. 2008. Effects of temperature, photosynthetic photon flux density, photoperiod and O2 and CO2 concentrations on growth rates of the symbiotic dinoflagellate, *Amphidinium* sp. Journal of Applied. Phycology. 20: 737-742.

25. Lavens, P., and Sorgeloos, P. 1996. Manual on the production and use of live food for aquaculture. Fisheries Technical Paper. 295 pp.

26. Liu, W., Au, D. W. T., Anderson, D. M., Lam, P. K. S., and Wu, R. S. S. 2007. Effects of

5. Ak, I., Cirik S., and Guksan T. 2008. Effect of light intensity, salinity and temperature on growth in camalti strain of *Dunaliella viridis* Teodoresco from Turkey. Journal of Biological Sciences. 8: 1356-1359.

6. Amini Khoeyi, Z., Seyfabadi, J., and Ramezanpour, Z. 2012. Effect of light intensity and photoperiod on biomass and fatty acids composition of microalgae, *Chlorella vulgaris*. Aquaculture International. 20: 41-49.

7. Andersen, R. A. 2005. Algal culturing techniques. Elsevier Academic Press, New York, 578 pp.

8. Bellinger, E. D., Sigee, D. 2010. "Freshwater Algae: Identification and use as bioindicators. John Wieley and Sons, Ltd., UK, 271 pp.

9. Boussiba, S. 2000. Carotenogenesis in the green alga *Haeamatococcus pluvialis*: cellular physiology and stress response. Plant Physiology. 108: 111-117.

10. Bouterfas, R., Belkoura, M., and Dauta, A. 2006. The effects of irradiance and photoperiod on the growth rate of three freshwater green algae isolated from a eutrophic lake. Limnetica. 25: 647-656.

11. Carvalho, A. P., and Malcata, F. X. 2003. Kinetic modeling of the autotrophic growth of *Pavlova lutheri*: Study of the combined influence of light and temperature. Biotechnology Progress. 19: 1128–1135.

12. Cheng-Wu, Z., Zmora, O., Kopel, R., and Richmond, A. 2001. An industrial – size flat plate glass reactor for mass production of *Nannochloropsis* sp. (Eustigmatophyceae). Aquaculture. 195: 35 - 49.

13. Cucchiari, E., Guerrini, F., Penna, A., Totti, C., and Pistocchi, R. 2008. Effect of salinity, temperature, organic and inorganic' nutrients on growth of cultured *Fibrocapsa japonica* (Raphidophyceae) from the northern Adriatic Sea. Harmful Algae. 7: 405-414.

14. Danesi, E. D. G., Rangel-Yagui, C. O., Carvalho, J. C. M., and Sato, S. 2004. Effect of reducing the light intensity on the growth and production of chlorophyll by *Spirulina platensis*. Biomass and Bioenergy. 26: 29-335.

15. Durmaz , Y. 2007. Vitamin E (α-tocopherol) production by the marine microalgae *Nannochloropsis oculata* (Eustigmatophyceae) in nitrogen limitation. Aquaculture. 272: 717-722.

nutrients, salinity, pH and light:dark cycle on the production of reactive oxygen species in the alga *Chattonella marina*. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology. 346: 76-86.

27. Ma, X., Chen, K. W., and Lee, Y. K. 1997 . Growth of *Chlorella* outdoors in a changing light environment. Journal of Applied Phycology. 9: 425-430.

28. 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 microalga, *Tetraselmis chui* . Aquaculture. 246: 393-404. [99]

29. Nichols, H. W. 1973. Growth media – freshwater. In: Stein, J. R. [Editor], Handbook of phycological methods– culture methods and growth measurements, Cambridge University Press, pp. 7-24.

30. Olivera, M. A. C. L., Monteiro, M. P. C., Robbs, P. G., and Leite, S. G. F. 1999. Growth and chemical composition of *Spirulina maxima* and *Spirulina platensis* biomass at different temperatures. Aquaculture International. 7: 261-275.

31. Priyadarshani, I., and Rath, B. 2012. Commercial and industrial applications of micro algae- A review. Journal of Algal Biomass Utilization. 3: 89-100.

32. Pulz, O. 2001. Photobioreactors: production systems for phototrophic microorganisms. Journal of Microbiology and Biotechnology. 57: 287-293.

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. Journal of Applied Phycology. 3: 43-53.

34. Richmond, A. 1986. Cell response to environmental factors, In: Hand-book of Microalgal Mass Culture (Richmond A, ed), CRC Press, Boca Raton. pp. 69-99.

35. Richmond, A. (Ed). 2004. Handbook of Microalgal culture: Biotechnology and Applied Phycology. Blackwell Publishing Company, Cornwall, U. K., 566 pp.

36. Salvucci, M. E., and Crafts-Brandner, S. J. 2004. Relationship between the heat tolerance of photosynthesis and the thermal stability of Rubisco activase in Plants from contrasting thermal environments 1. American Society of Plant Biologists. 134: 1460-1470.

37. Sanchez-Saavedra, M. P., and Voltolina, D. 2002. Effect of photon fluence rates of white and bluegreen light on growth efficiency and pigment content of three diatom species in batch cultures. Ciencias Marinas. 28: 273-279.

38. SPPS, 2002. Statistical package for social science, version 11.5, SPSS Inc., Michigan Avenue, Chicago, Illinois, USA.

39. Thompson, P.A., and Guo, M. 1992. Effects of variation in temperature. On the biochemical composition of eight species of marine phytoplankton. Journal of Phycology. 28: 481–488.

40. Tzovenis, I., Pauw, N. D., and Sorgeloos, P. 1997. Effect of different light regimes on the docosahexaenoic acid (DHA) content of *Isochrysis aff. galbana* (clone T-ISO). Aquaculture International. 5: 489- 507.

41. Ugwu, C. U., Aoyagi, H., and Uchiyama, H. 2007. Influence of irradiance, dissolved oxygen concentration, and temperature on the growth of *Chlorella sorokiniana*. Photosynthetica. 45: 309-311.

42. Wahidin, S., Idris, A., and Muhamad Shaleh, S.R. 2013. The influence of light intensity and photoperiod on the growth and lipid content of microalgae *Nannochloropsis* sp.. Bioresource Technology. 129: 7-11.

43. Zachleder, V., Wittenburg, E., and Abarzua, S. 1986 Factors controlling the inhibitory effects of 3, 4-benzo (a) pyrene on the chlorococcal alga *Scenedesmus quadricauda*. Algological Studies/Archiv fur Hydrobiologie. 43: 281-296.

44. Zar, J. H. 1984. Bioststistical analysis, 2nd edition. Prentice Hall Inc., Englewood Cliffs, New York, USA. P. 718.

Combine effects of temperature and photoperiod on growth and biomass of green algae *Scenedesmus quadricauda*

Shahini Z.[1], Farhadian O.[1] and Kadivar M.[2]

[1] **Natural Resources Dept., Isfahan University of Technology, Isfahan, I.R. of Iran**

[2] **Agriculture Dept., Isfahan University of Technology, Isfahan, I.R. of Iran**

Abstract

Temperature and photoperiod affect on the growth and biomass of microalgae. In this study, combined effects of different temperatures (20, 25 and 30°C) and different photoperiods (8L:16D, 12L:12D and 16L:8D) on the density, specific growth rate (SGR), doubling time (Dt) and biomass of freshwater green microalgae *Scenedesmus quadricauda* were investigated. The experiment was carried out as completely randomized design in Bold Basal's Medium (BBM) for 16 days. Results showed that density, specific growth rate, doubling time and biomass are significant differences among treatments ($P< 0.05$). The maximum density (2.11×10^7 cell/ml), specific growth rate (0.24 /day), biomass (0.30 mg/ml) and the minimum doubling time (2.87 day) were obtained at 16L:8D photoperiod and 30 °C. The minimum density (8.18×10^6 cell/ml), minimum SGR (0.178 /day), minimum dry biomass (0.094 mg/ml) and maximum Dt (3.897 day) were at 8L:16D light/dark photoperiod and 20 °C, respectively. Based on obtained results, it is concluded that the increasing of light hours as photoperiod in combination with higher temperature could be make better performance for *S. quadricauda* in mass culture.

Key words: Temperature, photoperiod, growth, biomass, *Scenedesmus quadricauda*