

اثر شدت و دوره‌های نور بر رشد و زیتوده

میکرو جلبک *Chlorella vulgaris*

زهرا امینی خوئی^(۱)؛ سید جعفر سیف‌آبادی^{(۲)*} و زهره رمضانپور^(۳)

jseyfabadi@gmail.com

۱ و ۲- دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، نور صندوق پستی: ۳۵۶-۴۶۴۱۴

۳- انستیتو تحقیقات بین‌المللی ماهیان خاویاری، رشت صندوق پستی: ۴۱۶۳۵-۳۴۶۴

تاریخ پذیرش: مهر ۱۳۸۹

تاریخ دریافت: آذر ۱۳۸۸

چکیده

در این تحقیق اثر سه شدت نور ۳۷/۵، ۶۲/۵ و ۱۰۰ میکرومول فوتون بر مترمربع در ثانیه و دوره‌های روشنایی: تاریکی ۱۶:۸، ۱۲:۱۲ و ۸:۱۶ ساعت بر نرخ رشد، زمان دو برابر شدن و تولید زیتوده میکرو جلبک *Chlorella vulgaris* مورد بررسی قرار گرفت. استوک اولیه *C. vulgaris* از تالاب انزلی جداسازی و خالص گردید و در ارلن‌های ۱۰۰۰ میلی‌لیتر در دمای ثابت ۲۵±۰/۵ درجه سانتیگراد و با استفاده از محیط (Z-8+N) کشت شد. شمارش سلولی بطور روزانه از تیمارهای مختلف صورت گرفت و مقدار زیتوده در اواخر فاز نمایی رشد اندازه‌گیری شد. آنالیز واریانس تفاوت معنی‌داری را در بین تیمارهای نوری نشان داد ($P < 0.05$). بالاترین نرخ رشد ۱/۱۳ در روز در شدت ۱۰۰ میکرومول فوتون بر مترمربع در ثانیه و دوره نوری ۸:۱۶ مشاهده شد. در حالیکه کمترین زمان دو برابر شدن ۰/۶۱ در روز در همین تیمار اتفاق افتاد. بیشترین زیتوده ۲/۰۵ گرم در لیتر در شدت نور ۶۲/۵ میکرومول فوتون بر مترمربع در ثانیه و دوره نوری ۸:۱۶ تولید شد.

کلمات کلیدی: جلبک، دوره روشنایی، نرخ رشد، تولید اولیه

مقدمه

فرآیند سازگاری نوری (Photoadaptation) کنترل می‌شود. در این فرآیند، تغییراتی در دینامیک، فراساختار، بیوفیزیک و فیزیولوژی جلبک‌ها اتفاق می‌افتد که آنها را قادر به سازگاری با تغییر شرایط محیطی می‌سازد (Harrison et al., 1990; Danesi et al.,; Sanchez-Saavedra & Voltolina, 2002; Etheridge & Roesler, 2005).

زمان روشنایی، نیز عاملی است که در چرخه‌های شبانه‌روزی بر فتوسنتز، تنفس سلولی، نرخ رشد و تقسیم سلولی تأثیرگذار می‌باشد.

برای کشت و پرورش گونه‌های مختلف جلبکی، کیفیت، شدت و همچنین دوره‌های نوری متفاوتی مورد نیاز می‌باشد. تغییر در کمیت و کیفیت نور باعث ایجاد پاسخ‌های متنوع در جلبک‌های تک سلولی می‌شود. از مهمترین پاسخ‌ها می‌توان به تغییر در ترکیب رنگدانه‌ها، تغییر در زنجیره انتقال الکترون، فعالیت آنزیمی، روند فتوسنتز، روند تنفس و همچنین تغییر در ترکیب بیوشیمیایی و در نتیجه تغییر در روند رشد جلبک‌ها اشاره کرد. اثر نور بر ترکیبات بیوشیمیایی و فتوسنتز جلبک‌ها با

* نویسنده مسئول

همچنین این عامل بر فعالیت‌های آنزیمی و سنتز ماکرومولکولها تأثیر دارد (Fabregas et al., 2002; Bouterfas et al., 2006; Liu et al., 2007). برای رشد گونه‌های گیاهی مختلف دامنه نوری خاصی مورد نیاز است. هرگاه میزان نور دریافتی توسط گیاه کمتر از دامنه تحمل آن باشد، گیاه قادر به کسب انرژی لازم و عمل فتوسنتز نخواهد بود. همچنین در شدت نور بالاتر از این آستانه نیز ترکیبات سلولی بویژه رنگیزه‌های جمع‌کننده نور دچار آسیب شده و فتوسنتز متوقف می‌شود (Richmond, 2004; Ma et al., 1997).

امروزه میکرو جلبک‌ها در صنایع آبی‌پروری جهت پرورش کلیه مراحل لاروی نرم‌تنان، شکمپایان، میگو، ماهی و زئوپلانکتون استفاده می‌شود. پرورش و تولید غذای زنده با کیفیت و کمیت مناسب جهت تغذیه لاروها بخصوص در مراحل ابتدایی پرورش آنها از اهمیت بسیار زیادی برخوردار است. بنابراین شناخت و تهیه این نوع غذاها از طریق تکثیر و پرورش آنها در کارگاههای تکثیر و پرورش واجد اهمیت است (Sandens et al., 2005; Gatenby et al., 2003).

جلبک *Chlorella vulgaris* بعنوان یک غذای مناسب، بدلیل داشتن ترکیبات ایده‌آل در سالهای اخیر بسیار مورد توجه قرار گرفته است و تحقیقات متعددی برای بالا بردن کمیت و کیفیت تولید این جلبک پرورشی صورت گرفته است. ایجاد شرایط بهینه برای تولید در مقیاس بالا نیازمند آن است که شرایط محیطی مختلف در مقیاس آزمایشگاهی مورد ارزیابی قرار گیرد. بنابراین لازم است برای ایجاد شرایط مطلوب رفتار گونه‌های متفاوت، تحت شرایط محیطی مختلف ارزیابی شود.

مواد و روش کار

جلبک *C. vulgaris* از تالاب انزلی در آزمایشگاه اکولوژی انستیتو بین‌المللی ماهیان خاویاری جدا و خالص‌سازی شد. سپس اثر سه شدت نور ۳۷/۵، ۶۲/۵ و ۱۰۰ میکرومول فوتون بر مترمربع در ثانیه به همراه سه دوره روشنایی: تاریکی ۸:۱۶، ۱۲:۱۲ و ۸:۱۶ ساعت بر رشد و تولید زیتوده این جلبک مورد آزمایش قرار گرفت. ابتدا تلقیح نمونه‌ها در محیط استریل و به نسبت ۱۰ درصد استوک جلبکی (حاوی $10^5 \times 0.9$ سلول در میلی‌لیتر) در ۹۰ درصد محیط کشت زایندر (Z-8+N) انجام شد (Zehnder & Gorham, 1960). سپس نمونه‌ها در دستگاه ژرمیناتور مدل (Binder, Germany, 550L capacity) و دمای 25 ± 0.5 درجه سانتیگراد قرار گرفت. تنظیم نور توسط

دستگاه لوکس‌متر مدل (LX-1108) صورت گرفت. شمارش نمونه‌ها بطور روزانه و با سه بار تکرار برای هر نمونه، با استفاده از لام نئوبار و در زیر میکروسکوپ نوری و لنز ۴۰ انجام شد. مقادیر μ و G از معادلات پیشنهادی زیر محاسبه شد (Guillard, 1973).

$$\mu = \ln x_n - \ln x_0 (t_n - t_0)^{-1}$$

$$G = \ln 2 \mu^{-1}$$

که در آن:

X_0 : میانگین تعداد سلول‌ها در زمان t_0

X_n : میانگین تعداد سلول‌ها در زمان t_n

μ : میزان سرعت رشد ویژه (d^{-1})

G: زمان دو برابر شدن (d)

برای تعیین جذب نوری (Optical density) یک میلی‌لیتر از محیط مربوطه در زیر شعله نمونه‌برداری شد و به رقت ۱۰ رسانده شد و میزان آن در اسپکتروفوتومتر JENWAY, 630 UV/vis (Spectrophotometer, U.K) در طول موج ۵۰۰ نانومتر خوانده شد (Liu et al., 2008).

برای تعیین وزن خشک فیلتر کاغذی ۰/۴۵ میکرون در داخل یک پلیت شیشه‌ای قرار داده شد و در دستگاه آون، با دمای ۱۰۵ درجه سانتیگراد به مدت ۲ ساعت خشک گردید. سپس پلیت از دستگاه خارج گردید و داخل دسیکاتور به منظور تعدیل دما قرار گرفت. پس از سپری شدن مدت زمان حدود ۱۵-۳۰ دقیقه، کاغذ فیلتر به کمک پنس و با دقت و سرعت عمل از پلیت خارج گردید و بوسیله ترازوی دیجیتال با حساسیت ده هزار گرم توزین و مقدار آن یادداشت شد. سپس ۱۰ میلی‌لیتر از سوسپانسیون جلبکی روی فیلتر (روی پمپ خلاء) ریخته شد. آب سوسپانسیون جلبک توسط دستگاه وکیوم (پمپ خلاء) جدا گردید و با آب مقطر شسته شد. فیلتر مجدداً در داخل پلیت قرار داده شد و به آون با دمای ۱۰۵ درجه سانتیگراد برای مدت ۲۴ ساعت منتقل و پس از گذشت مدت زمان مذکور و تعدیل دمای فیلتر، وزن شد. مقدار آن، عبارت از وزن خشک سلول‌های جلبک بعلاوه وزن فیلتر بود. سپس براساس تفاوت وزن اولیه و ثانویه میزان ماده خشک جلبک برحسب گرم در لیتر محاسبه شد (Janelt et al., 1997).

پس از گردآوری تمام داده‌ها، همبستگی بین صفات، معادلات رگرسیون، مقایسه میانگین و نیز آنالیز واریانس یکطرفه توسط نرم‌افزار آماری SPSS محاسبه شد.

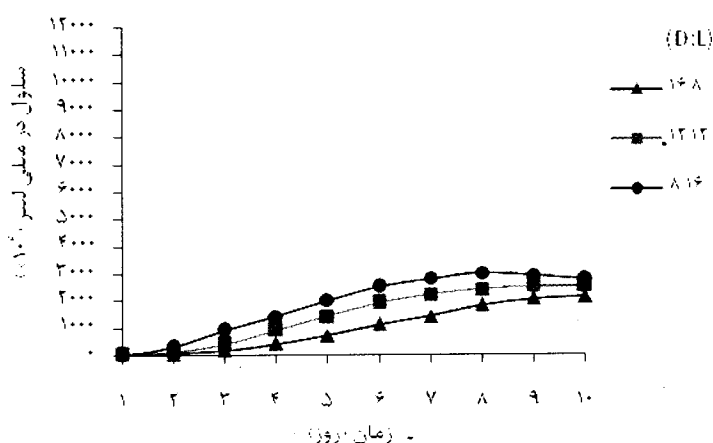
نتایج

میلی‌لیتر و $1/1 \times 10^8$ سلول در میلی‌لیتر شمارش شدند. همچنین در مقایسه با تیمارهای مختلف نرخ رشد ویژه در دوره‌های نوری اختلاف معنی‌داری نشان داد ($P < 0/05$). بیشترین نرخ رشد ویژه در دوره نوری ۸:۱۶ به مقدار ۱/۰ در روز بود و کمترین آن مربوط به ۱۶:۸ به مقدار ۰/۶۹ در روز مشاهده شد (نمودار ۱ ب).

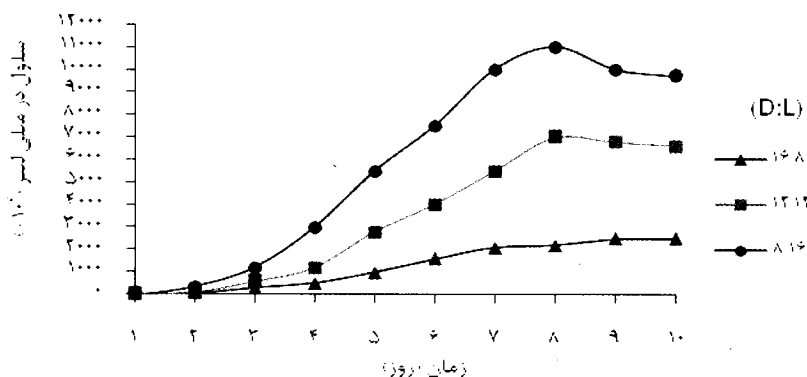
در شدت نور ۱۰۰، روند رشد نسبت به دو دوره دیگر سریعتر بود و سلول‌ها با سرعت بیشتری تکثیر شده و به حداکثر مقدار ممکن در محیط کشت رسیدند. اما پس از فاز سکون کوتاه مدت به سرعت وارد فاز مرگ و میر شدند. در این شدت نور، در دوره ۱۶:۸ رشد سلول‌ها تا روز هشتم ادامه داشت و حداکثر غلظت آنها در این روز به مقدار $0/40 \times 10^8$ سلول در میلی‌لیتر شمارش شد. در دوره ۱۲:۱۲ سرعت رشد افزایش یافت بطوریکه حداکثر مقدار رشد در روز هفتم به $0/65 \times 10^8$ سلول در میلی‌لیتر رسید. در دوره ۸:۱۶ سلول‌ها با سرعت بالایی تا روز هفتم به مقدار $0/90 \times 10^8$ سلول در میلی‌لیتر رسیدند. اما فاز سکون در این دوره بسیار کوتاه بود و بلافاصله سلول‌ها وارد فاز مرگ و میر شدند. در این شدت نور بیشترین نرخ رشد ویژه به مقدار ۱/۱۳ در روز در دوره ۸:۱۶ بدست آمد و کمترین آن در دوره ۱۶:۸ به مقدار ۰/۸۶ در روز اندازه‌گیری شد (نمودار ۱ ج).

با شمارش سلول‌های جلبک کلرلا، منحنی رشد در سه شدت نور ۳۷/۵، ۶۲/۵ و ۱۰۰ میکرومول فوتون بر مترمربع در ثانیه در دوره‌های نوری (روشنایی: تاریکی) ۸:۱۶، ۱۲:۱۲ و ۱۶:۸ ساعت ترسیم گردید (نمودار الف تا ج). در شدت نور ۳۷/۵ میکرومول فوتون بر مترمربع در ثانیه، طولانی‌ترین دوره رشد مربوط به دوره ۱۶:۸ ساعت بود که حداکثر غلظت سلول‌ها تا روز دهم به $0/21 \times 10^8$ سلول در میلی‌لیتر رسید. پس از آن در دوره ۱۲:۱۲ تعداد سلول‌ها در روز نهم حداکثر به مقدار $0/25 \times 10^8$ سلول در میلی‌لیتر رسید و کوتاه‌ترین دوره رشد مربوط به ۸:۱۶ بود که سلول‌ها تا روز هشتم حداکثر به غلظت $0/30 \times 10^8$ سلول در میلی‌لیتر رسیدند. نرخ رشد ویژه در دوره‌های نوری اختلاف معنی‌داری نشان داد ($P < 0/05$). بطوریکه بیشترین نرخ رشد ویژه در دوره ۸:۱۶ به مقدار ۰/۸۱ در روز و کمترین آهنگ رشد در دوره نوری ۱۶:۸ مقدار ۰/۶۰ در روز بود (نمودار الف).

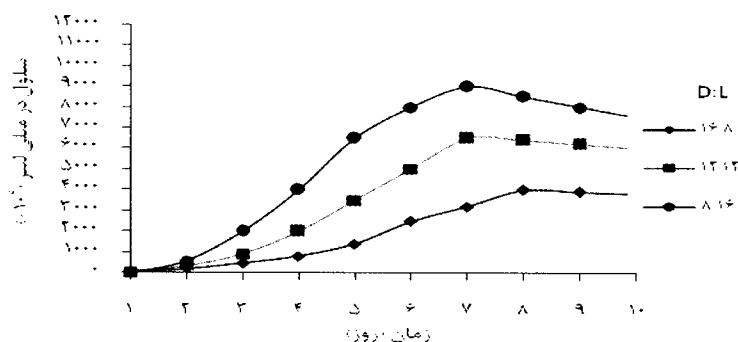
در شدت ۶۲/۵ میکرومول فوتون بر مترمربع در ثانیه، طولانی‌ترین دوره رشد مربوط به ۱۶:۸ بود که تعداد سلول‌ها در روز نهم حداکثر به مقدار $0/25 \times 10^8$ سلول در میلی‌لیتر رسید. در حالیکه برای دوره‌های ۱۲:۱۲ و ۸:۱۶ روند رشد در مقایسه با ۱۶:۸ سریعتر بود. در این دو تیمار زمان رسیدن به حداکثر رشد تا روز هشتم و تعداد سلول‌ها بترتیب $0/70 \times 10^8$ سلول در



نمودار ۱ الف: منحنی رشد در شدت نور ۳۷/۵ میکرومول فوتون بر مترمربع در ثانیه



نمودار ۱: منحنی رشد در شدت نور ۶۲/۵ میکروفوتون بر مترمربع در ثانیه



نمودار ۲: منحنی رشد در شدت نور ۱۰۰ میکروفوتون بر مترمربع در ثانیه

نوری برای شدت نور ۶۲/۵ و دوره ۸:۱۶ برابر با ۲ بود. در حالیکه کمترین آن در شدت ۳۷/۵ و دوره ۱۶:۸ به مقدار ۰/۱۶ بدست آمد (جدول ۱).

مقدار زیتوده تولید شده در تیمارهای نوری بطور معنی‌داری با یکدیگر اختلاف داشتند ($P < 0.05$). در شدت نور ۳۷/۵، کمترین مقدار زیتوده در دوره ۱۶:۸ به مقدار ۰/۱۶ گرم در لیتر و بیشترین آن در دوره ۸:۱۶ به مقدار ۰/۹۲ گرم در لیتر تولید شد. در شدت نور ۶۲/۵، تولید زیتوده هم زمان با افزایش زمان روشنایی افزایش پیدا یافت. بطوری که از مقدار ۰/۶۷ گرم در لیتر در دوره ۱۶:۸ به مقدار ۲/۰۵ گرم در لیتر در دوره ۸:۱۶ رسید. در این شدت نور فاز رشد کوتاهتر از ۳۷/۵ و بیشتر از ۱۰۰ بود. با افزایش شدت نور در ۱۰۰ میکروفوتون بر مترمربع در ثانیه، تولید زیتوده با سرعت بیشتر و در دوره کوتاهتری صورت گرفت. در نتیجه در این شدت نور نرخ رشد بیشتر اما مقدار زیتوده کمتری تولید شد. کمترین مقدار زیتوده در دوره ۱۶:۸ به مقدار ۰/۸ گرم در لیتر و بیشترین آن در دوره ۸:۱۶ به

مقادیر نرخ رشد ویژه (μ) و سرعت دو برابر شدن (G) از شاخص‌های رشد هستند که پس از شمارش سلولی از طریق معادلات مربوطه محاسبه شدند (جدول ۱). همانطور که مشاهده می‌شود، بیشترین نرخ رشد ویژه مربوط به شدت ۱۰۰ و دوره نوری ۸:۱۶ با نرخ ۱/۱۳ در روز و کمترین در ۳۷/۵ و دوره ۱۶:۸ به مقدار ۰/۱۶ در روز تعیین شد (جدول ۱).

زمان دو برابر شدن نیز با توجه به تفاوت در نرخ رشد ویژه در همه تیمارها اختلاف معنی‌داری را نشان داد ($P < 0.05$). بیشترین زمان برای دو برابر شدن در شدت ۳۷/۵ و دوره ۱۶:۸ مدت زمان ۱/۱۴ روز بود و کمترین زمان در ۱۰۰ میکرومول فوتون بر مترمربع در ثانیه و دوره ۸:۱۶ به مقدار ۰/۶۱ روز مشاهده شد (جدول ۱).

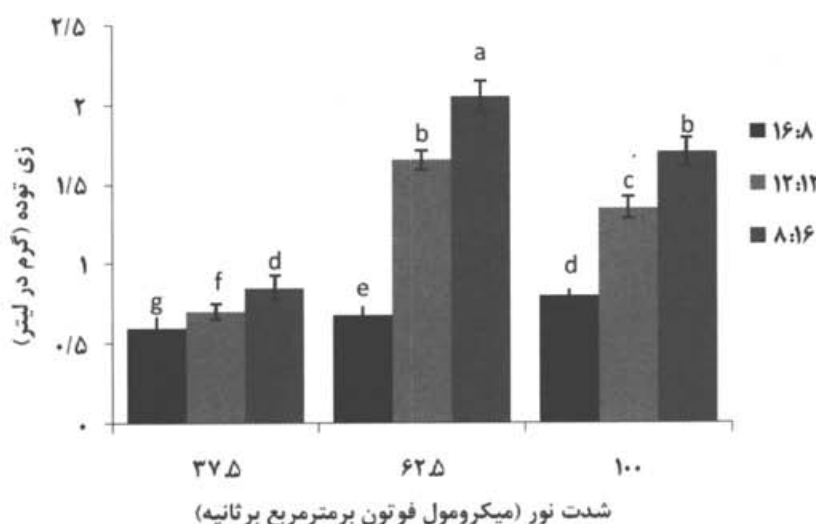
هم زمان با شمارش سلولی، مقدار جذب نوری به منظور تعیین حداکثر رشد در تیمارهای مختلف مورد بررسی قرار گرفت و معلوم شد که غلظت سلولی در تیمارهای مختلف در پایان فاز رشد اختلاف معنی‌داری دارد ($P < 0.05$). حداکثر مقدار جذب

مقدار ۱/۷ گرم در لیتر تولید شد. بطور کلی بیشترین مقدار کمترین آن در ۳۷/۵ میکرومول فوتون بر مترمربع در ثانیه و زیتوده در شدت ۶۲/۵ و دوره ۸:۱۶ به مقدار ۲/۰۵ گرم در لیتر و دوره ۱۶:۸ به مقدار ۰/۶ گرم در لیتر تولید گردید (نمودار ۲).

جدول ۱: مقایسه نرخ رشد ویژه، زمان دو برابر شدن و جذب نوری در تیمارهای مختلف

شدت نور (میکرومول فوتون بر مترمربع در ثانیه)	دوره نوری روشنایی: تاریکی (ساعت)	نرخ رشد ویژه (در روز ± خطای استاندارد)	سرعت دو برابر شدن (روز ± خطای استاندارد)	جذب نوری (غلظت سلولی ± خطای استاندارد)
۳۷/۵	۱۶:۸	۰/۶۰±۰/۰۲ ^B	۱/۱۴±۰/۰۵ ^B	۰/۶۰±۰/۰۴ ^B
	۱۲:۱۲	۰/۶۹±۰/۰۳ ^F	۱/۰۰±۰/۰۴ ^F	۰/۶۸±۰/۰۵ ^{FB}
	۸:۱۶	۰/۸۱±۰/۰۴ ^C	۰/۸۴±۰/۰۵ ^C	۰/۹۲±۰/۰۶ ^D
۶۲/۵	۱۶:۸	۰/۷۰±۰/۰۳ ^F	۱/۰۰±۰/۰۳ ^F	۰/۶۷±۰/۰۵ ^{FB}
	۱۲:۱۲	۰/۹۳±۰/۰۴ ^{CD}	۰/۷۴±۰/۰۳ ^{CD}	۱/۶۰±۰/۰۵ ^C
	۸:۱۶	۱/۰۰±۰/۰۳ ^{BC}	۰/۶۹±۰/۰۴ ^{BC}	۲/۰۰±۰/۰۵ ^A
۱۰۰	۱۶:۸	۰/۸۰±۰/۰۳ ^{DC}	۰/۸۰±۰/۰۵ ^{DC}	۰/۷۷±۰/۰۵ ^{CF}
	۱۲:۱۲	۱/۰۲±۰/۰۴ ^{AB}	۰/۶۴±۰/۰۴ ^{AB}	۰/۸۵±۰/۰۶ ^{DC}
	۸:۱۶	۱/۱۳±۰/۰۴ ^A	۰/۶۱±۰/۰۳ ^A	۱/۷۰±۰/۰۹ ^B

* حروف غیرمشابه تفاوت معنی دار در سطح ۰/۰۵ را نشان می دهد (P<0.05).



نمودار ۲: میزان زیتوده در شدت و دوره های نوری متفاوت

بحث

عوامل محیطی، مانند نور، دما و pH تاثیر مهمی بر نرخ رشد و تولید زیتوده میکرو جلبکها دارند. کمیت و کیفیت نور محیطی عامل تاثیر گذاری بر سیستم فتوسنتز و تولید کربوهیدرات در سلولها می باشد (Ma et al., 1997; Zhu et al., 1997; Renaud et al., 1991; Meseck et al., 2005). نرخ رشد مهمترین راه برای بیان موفقیت اکولوژیکی یا توانایی سازگاری یک گونه نسبت به شرایط محیط طبیعی یا آزمایشگاهی است (Isik et al., 2006; Rivkin, 1989). مقایسه نرخ رشد ویژه (μ) در زمان رسیدن به حداکثر تراکم در سه شدت نور ۳۷/۵، ۶۲/۵ و ۱۰۰ میکروفوتون بر مترمربع در ثانیه نشان داد که در شدت نور ۱۰۰ زمان رسیدن به فاز سکون از دو شدت نور ۶۲/۵ و ۳۷/۵ کوتاهتر بوده است. در شدت نور ۱۰۰ میکرومول فوتون بر مترمربع در ثانیه در روزهای ابتدایی فاز رشد، نرخ رشد بالا است. اما در روزهای بعد و با نزدیک شدن به زمان حداکثر رشد این نرخ کاهش می یابد. در دوره نوری ۸:۱۶، سلولها با نزدیک شدن به روز هفتم به سرعت زرد شده و هنگامی که منحنی رشد به فاز سکون می رسد تغییرات قابل مشاهده ای در رنگ محیط کشت پدید می آید که از سبز پررنگ به سبز کم رنگ تغییر می کند. سپس سلولها با طی یک فاز سکون کوتاه مدت بلافاصله وارد فاز مرگ و میر شدند. مشاهدات میکروسکوپی نشان داد که محتویات سلولی و کلروفیل آسیب دیده و تقریباً از بین رفته است. در شدت نوری ۶۲/۵ و ۳۷/۵ میکرومول فوتون بر مترمربع در ثانیه در ابتدای فاز رشد افزایش سلولها نسبتاً کمتر و زمان تقسیم سلولی طولانی تر بود، اما در اواخر فاز رشد سلولها تقریباً سالم و از حالت طبیعی بهتری برخوردار بودند. نتایج تحقیق Ak و همکاران (۲۰۰۸)، بر جلبک *Dunaliella viridis* در شدت نور ۵۰ و ۷۰ میکرومول فوتون بر مترمربع در ثانیه، ماکزیمم غلظت سلولی را در شدت نور ۵۰ میکرومول فوتون بر مترمربع در ثانیه نشان داد و افزایش شدت نور در ۷۰ باعث کاهش در تعداد سلولها شد. علت این کاهش را شاید بتوان به پدیده ممانعت نوری یا (Photoinhibition) مربوط دانست که واکنش های فتواکسیداسیون اتفاق افتاده و نور نمی تواند در دستگاه فتوسنتز جذب شود. در این حالت سلولها

قادر به ادامه حیات طبیعی خود نیستند و با اینکه در شدت بالاتری قرار دارند روند رشد ابتدای فاز نمایی را ندارد و بتدریج در اواخر فاز نمایی محتویات درونی سلولها آسیب دیده و به سرعت از بین می روند (Richmond, 2004).

افزایش سریع تراکم اولیه سلولها و کمبود مواد غذایی در محیط کشت نیز می تواند از عوامل محدودیت روند رشد سلولها در اواخر فاز نمایی در شدت نور بالا باشد (Brown & Tzovenis et al., 1997; Bouterfas et al., 2006; Hohmann, 2005).

نتایج تحقیق حاضر همچنین نشان داد که علاوه بر غلظت سلولها، میزان جذب نوری و مقدار زیتوده بدست آمده در پایان دوره رشد در تیمارهای مورد آزمایش متفاوت است. با افزایش زمان روشنایی میزان زیتوده در هر دو شدت نوری ۶۲/۵ و ۳۷/۵ افزایش پیدا کرد. بطوریکه بیشترین تولید در بین همه تیمارها در شدت ۶۲/۵ و دوره روشنایی: تاریکی ۸:۱۶ ساعت به مقدار ۲/۰۵ گرم در لیتر بدست آمد. شاید بتوان گفت که علت این افزایش در غلظت سلولها و مقدار زیتوده، دوره طولانی تر رشد و همچنین عدم شرایط استرس نوری (Photoinhibition) بوده است. در شدت ۱۰۰ میکرومول فوتون بر مترمربع در ثانیه، به رغم افزایش شدت نور تولید زیتوده کاهش یافته است. در این شدت نور اگر چه تکثیر سلولها با سرعت بیشتری صورت گرفت، اما بدلیل شدت نور بالا در دوره های نوری ۱۲:۱۲ و ۸:۱۶ سلولها فقط تا روز هفتم زنده مانده و زمان بیشتری برای تولید بالاتر پیدا نکرده و سلولهای آسیب دیده بلافاصله وارد فاز مرگ شدند و بالاترین مقدار زیتوده در شدت ۱۰۰ و دوره روشنایی: تاریکی ۸:۱۶ به مقدار ۱/۷ گرم در لیتر تولید شد.

در بین دوره های نوری مورد آزمایش، کوتاهترین دوره رشد در دوره روشنایی: تاریکی ۸:۱۶ ساعت بود، که سلولها بلافاصله وارد فاز رشد شدند. در دوره های ۱۲:۱۲ و ۱۶:۸ روند رشد نسبت به دوره ۸:۱۶ آهسته تر بود و زمان دو برابر شدن نیز افزایش یافت. شمس و همکاران (۱۳۸۳)، با مقایسه روند رشد جلبک *Sendesmus costatum* در سه دوره روشنایی: تاریکی ۰:۲۴، ۶:۱۸، ۱۲:۱۲، ۱۸:۶ ساعت به این نتیجه رسیدند که روند

Camalti strain of *Dunaliella viridis* Teodoresco from Turkey. Journal of Biological Sciences, 8:1356-1359.

Brown M.R. and Hohmann S., 2002. Effects of irradiance and growth phase on the ascorbic acid content of *Isochrysis* sp. T. ISO (Prymnesiophyta). Journal of Applied Physiology, 14:211-214.

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(3):647-656.

Danesi E.D.G., Ragel-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, 26:329-335.

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.

F'abregas J., Maseda A., Dom'nguez 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.

Gatenby C.M., Orcutt D.M., Kreeger D.A., Parker B.C., Jones V.A. and Neves R.J., 2003. Biochemical composition of three algal species proposed as food for captive freshwater mussels. Journal of Applied phycology, 15:1-11.

رشد در دوره ۱۸:۶ در شدت‌های نوری مختلف بطور معنی‌داری کمتر بوده است. در فتواتوتروف‌ها مقدار انرژی که در دسترس سیستم فتوسنتزکننده قرار می‌گیرد میزان تولید زیتوده و تثبیت کربن را تعیین می‌کند (Tzovenis *et al.*, 2003). بنابراین شاید بتوان گفت که زمان روشنایی طولانی‌تر تا زمانی که مولکول کلروفیل آسیب ندیده باشد، باعث افزایش تقسیم سلول-ها می‌گردد. نتایج تحقیق Boutefas و همکاران (۲۰۰۶)، روی سه جلبک سبز آب شیرین نشان داد که دوره‌های طولانی‌تر روشنایی در افزایش تولید زیتوده موثرتر از افزایش شدت نور در زمان کوتاه است. همچنین افزایش میزان زیتوده در دوره‌های نوری روشنایی: تاریکی بیشتر از در معرض روشنایی مداوم بودن نمونه‌ها است.

براساس این نتایج مشخص گردید که سلول‌های رشد یافته در شدت نور ۶۲/۵ و دوره روشنایی ۸:۱۶ توانایی بالاتری در سازگاری با شرایط محیطی داشته‌اند و تراکم سلولی و زیتوده بالاتری را تولید نموده‌اند. بنابراین با توجه به اهمیت کمیت نور و دوره‌های نوری و تاثیر مستقیم بر فتوسنتز و بدنبال آن تولید زیتوده و سنتز ماکرومولکولها لزوم توجه به شرایط نور محیطی در زمان کشت و پرورش میکروجلبک‌ها ضروری به نظر می‌رسد.

تشکر و قدردانی

با سپاس فراوان از مسئولین انستیتو بین‌المللی ماهیان خاویاری که امکانات و تجهیزات اولیه برای انجام این تحقیق را فراهم نمودند. همچنین از مسئولین دانشکده علوم دریایی دانشگاه تربیت مدرس تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع

شمس، ل.؛ سیف‌آبادی، ج.؛ متین‌فر، ع. و ابراهیم‌زاده، ح.، ۱۳۸۳. مطالعه میزان رشد دیاتومه *Skeletonema costatum* تحت تأثیر رژیم‌های مختلف نوری. مجله علمی پژوهشی شیلات، سال سیزدهم، شماره ۲، تابستان ۱۳۸۳، صفحات ۱۱۷ تا ۱۲۶.

Ak I., Cirik S. and Goksan T., 2008. Effect of light intensity, salinity and temperature on growth in

- Guillard R.R.L. 1973.** Division rates. *In*: Stein (ed) Handbook of phycological methods, Vol. 1. Cambridge University Press, Cambridge, pp.289–312.
- 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 Physiology*, 2:45-56.
- 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), β -carotene contents and the fatty acid composition of *Spirulina platensis*. *Journal of Fisheries & Aquatic Sciences*, 3-4:257-261.
- Janelt G., Bolt P., Gerbsch N. and Buchholz R., 1997.** The lamellar settler a low cost alternative for separating the micro-alga *Chlorella vulgaris* from a cultivation broth? *Applied Microbiology & Biotechnology*, 48:6-10.
- Liu W., Au D.W.T., Anderson D.M., Lam P.K.S. and Wu R.S.S., 2007.** Effects of 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.
- Liu Z.Y., Wang G.C. and Zhou B.C., 2008.** Effect of iron on growth and lipid accumulation in *Chlorella vulgaris*. *Bioresource Technology*, 99:4717-4722.
- Ma X., Chen K.W. and Lee Y.K., 1997.** Growth of *Chlorella* outdoors in a changing light environment. *Journal of Applied Physiology*, 9:425–430.
- 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* (PLY429). *Aquaculture*, 246:393-404.
- Renaud S.M., Parry D.L., Luong-Van T., 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 Physiology*, 3:43-53.
- Richmond A., 2004.** Handbook of microalgal culture, biotechnology and applied physiology. Blackwell Publishing Company. 566P.
- Rivkin R.B., 1989.** Influence of irradiance and spectral quality on the carbon metabolism of phytoplankton. I. Photosynthesis, chemical composition and growth. *Marine Ecology Progress Series*, 55:291-304.
- Sanchez-Saavedra M.P. and Voltolina D., 2002.** Effect of photon fluence rates of white and blue-green light on growth efficiency and pigment content of three diatom species in batch cultures. *Ciencias Marinas*, 28(3):273–279.
- Sandens J.M., Kallqvist T., Wenner D. and Gislerod H.R., 2005.** Combined influence of light and temperature on growth rates of *Nannochloropsis oceanica*: linking cellular responses to large-scale biomass production. *Journal of Applied Physiology*, 17:515–525.

- 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.
- Zehnder A. and Gorham P.R., 1960.** Factors influencing the growth of *Microcystis aeruginosa* Kutz, emend, Elenkin. *Canadian Journal Microbiology*, 6:645–660.
- Zhu C.J. and Lee Y.K., 1997.** Chao T.M., Lim S.H., Diurnal changes in gross chemical composition and fatty acid profiles of *Isochrysis galbana* TK1 in outdoor closed tubular photobioreactors. *Journal of Marine Biotechnology*, 5:153–157.

Effect of light intensity and photoperiod on growth rate and biomass of *Chlorella vulgaris*

Amini Khooei Z.⁽¹⁾; Seyfabadi J.⁽²⁾* and Ramezani Z.⁽³⁾

jseyfabadi@gmail.com

1,2- Faculty of Marine Science and Natural Resources, Tarbiat Modares University,
P.O.Box: 46414-356 Noor, Iran

3- International Sturgeon Research Institute, P.O.Box: 41635-3464 Rasht, Iran

Received: December 2009

Accepted: October 2010

Keywords: *Chlorella vulgaris*, Photoperiod, Growth rate, early stock

Abstract

This study provides information on the effect of three light intensities (37.5, 62.5 and 100 $\mu\text{mol photons.m}^{-2} \text{s}^{-1}$) and photoperiods (light:dark) cycle 8:16, 12:12 and 16:8h on growth rate, duplication time and biomass production in microalga *Chlorella vulgaris*. Stock of *C. vulgaris* was separated from water samples taken at Anzali Wetland, purified and cultured in 1000ml Erlenmeyer at constant temperature $25 \pm 0.5^\circ\text{C}$, using Zehnder medium. Cell count was conducted daily and biomass was measured at the exponential growth phase in different treatments. Analysis of variance indicated significant difference ($P < 0.05$) among light regimes. The maximum growth rate 1.13d^{-1} was observed at $100 \mu\text{mol photons.m}^{-2} \text{s}^{-1}$ and 16:8h light duration and also the minimum duplication time 0.61d^{-1} occurred at this treatment. The maximum biomass 2.05gl^{-1} was recorded at $62.5 \mu\text{mol photons.m}^{-2} \text{s}^{-1}$ and 8:16h light period.

* Corresponding author