



## تأثیر کیفیت نور بر رشد، مقدار پروتئین و پروفیل اسید چرب ریزجلبک *Chaetoceros muelleri*

معصومه استادی قاضیانی<sup>۱</sup>، آرش اکبرزاده<sup>\*</sup>، مرتضی یوسف زادی<sup>۲</sup>، محمد اسدی<sup>۱</sup>

<sup>۱</sup> گروه شیلات، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه هرمزگان

<sup>۲</sup> گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه قم

### چکیده

نوع مقاله:

پژوهشی

تاریخچه مقاله:

دریافت: ۹۷/۰۲/۱۷

اصلاح: ۹۷/۱۱/۰۴

پذیرش: ۹۹/۰۵/۱۵

کلمات کلیدی:

اسید چرب

پروتئین

ریزجلبک

کلروفیل *a*

کیفیت نور

در مطالعه حاضر برخی پارامترهای رشد و ترکیبات بیوشیمیایی ریزجلبک *Chaetoceros muelleri* تحت نورهای آبی، سفید و قرمز بررسی شد. تیمارهای مختلف در شرایط شوری ۲۵ قسمت در هزار، دمای  $23 \pm 1$  درجه سانتی‌گراد، شدت نور  $1500 \pm 200$  لوکس، دوره روشنایی: تاریکی ۱۲/۱۲، هوادهی ملایم و قلیائیت ۸/۵-۷/۵، به مدت ۱۲ روز در اتاقک‌های تفکیک شده قرار گرفتند. بیشترین تراکم سلولی، نرخ رشد ویژه، کلروفیل *a*، وزن خشک، پروتئین، اسیدهای چرب امگا ۳ و اسید پالمیتولئیک (۱:۱۶C)، تحت نور آبی مشاهده شد. همچنین، کوتاه‌ترین زمان دو برابر شدن جمعیت، کمترین مقدار چربی و امگا ۶ در این تیمار نوری مشاهده شد. کمترین تراکم سلولی، وزن خشک، کلروفیل *a*، پروتئین، اسیدهای چرب امگا ۳، اسید اولئیک (۱:۱۸C) و بیش از ۲۵ درصد از اسید پالمیتیک (۰:۱۶C) تحت نور قرمز دیده شد. بیشترین زمان دو برابر شدن جمعیت، بیشترین مقدار اسیدهای چرب امگا ۶ و اسید اولئیک (۱:۱۸C)، تحت نور سفید مشاهده شد. مقدار چربی کل بین سه نور تحت آزمایش اختلاف معنی‌داری نشان نداد ( $p > 0.05$ ). نور قرمز بیش از ۴۱ درصد از مقدار SFA، نور سفید بیش از ۱۶ درصد از مقدار PUFA و نور آبی ۴۶ درصد از مقدار MUFA را به خود اختصاص دادند. نور آبی به طور واضح کارایی بیشتری از خود نشان داد و دارای اختلاف معنی‌داری ( $p < 0.05$ ) نسبت به سایر نورها بود در حالی که بین نور سفید و قرمز اختلاف معنی‌داری دیده نشد.

### مقدمه

جلبک‌ها توانایی ویژه‌ای در تولید ترکیبات بیوشیمیایی دارند (Brennan and Owende, 2010; Sukenik *et al.*, 1993). این ترکیبات در صنایع مختلف غذایی، پزشکی و تولید سوخت زیستی کاربرد دارند (Mata *et al.*, 2010). در مهندسی متابولیک با تغییر شرایط فیزیکی (مانند طیف نوری و شدت نور) و شیمیایی (مانند نیتروژن و شوری) محیط کشت در قالب طرح‌های آزمایشگاهی، بهترین شرایط مورد نیاز کشت هر گونه از جلبک به صنعت معرفی می‌شود (Liska *et al.*, 2004). بنابراین لازم است برای ایجاد شرایط مطلوب، رفتار گونه‌های متفاوت، تحت شرایط محیطی مختلف ارزیابی شود. نرخ رشد مهم‌ترین راه

\* نویسنده مسئول، پست الکترونیک: [akbarzadeh@hormozgan.ac.ir](mailto:akbarzadeh@hormozgan.ac.ir)

برای بیان موفقیت اکولوژیکی یا توانایی سازگاری یک گونه نسبت به شرایط محیط طبیعی یا آزمایشگاهی است (Isik et al., 2006).

ریز جلبک *Chaetoceros muelleri* به دلیل داشتن مقادیر بالای لیپید، اسیدهای چرب ضروری، نرخ رشد و تولید زیست توده بالا به منظور تغذیه لارو سخت پوستان و نرم تنان در آبی پروری مورد توجه پرورش دهندگان قرار گرفته است (Richmond, 2004; FAO, 2007). این ریز جلبک همچنین به عنوان یکی از مهم ترین ریز جلبک ها برای تولید بیودیزل (سخت زیستی) شناخته شده است. با توجه به اهمیت این ریز جلبک، لزوم بررسی دقیق تر گونه *C.muelleri* روز به روز بیشتر احساس می شود.

در جنوب ایران و در استان هرمزگان چندین مرکز تحقیقاتی تکثیر و پرورش ماهیان دریایی، نرم تنان و سخت پوستان از جمله کارگاه تکثیر و پرورش کلاهی میناب و ایستگاه تحقیقات نرم تنان خلیج فارس وجود دارد که آزمایشگاه کشت جلبک، بخش مهمی از این مراکز را شامل می شود و جهت تغذیه مراحل لاروی میگو، روتیفر و نرم تنان مورد استفاده قرار می گیرد. در این مراکز معمولاً از نور سفید برای کشت انواع جلبک ها استفاده می شود. مطالعات نشان داده است که جلبک ها پاسخ های متفاوتی را در طول موج های مختلف نور از خود نشان می دهند، به طوری که می توان با تاباندن طول موج بهینه برای هر گونه از جلبک در کوتاه ترین زمان، بیشترین تولید را حاصل کرد (Sanchez and Voltolina, 2002). در این مطالعه روند تراکم رشد و میزان تولید کلروفیل *a*، درصد پروتئین، چربی کل و ترکیبات اسید چرب شامل: اسیدهای چرب اشباع شده (SFA)، اشباع نشده با یک بند دوگانه (MUFA)، اشباع نشده با چند پیوند دوگانه (PUFA)، در ریز جلبک *C. muelleri* تحت تأثیر طول موج های مختلف مورد بررسی قرار گرفت تا طول موج نوری بهینه برای افزایش کارایی کشت این ریز جلبک و رسیدن به زیست توده بیشتر در بازه زمانی کوتاه تر برای این گونه به دست آید.

## مواد و روش ها

### کشت ریز جلبک و اعمال تیمارها

استوک مورد نیاز جهت کشت ریز جلبک از مرکز تحقیقات شیلات بندر لنگه تهیه گردید و برای کشت جلبک از محیط کشت  $f_2$  (pH حدود ۸-۷/۸ و شوری ۲۵) استفاده شد (Guillard and Ryther, 1962). پس از انجام این مراحل با اضافه کردن استوک اولیه در حجم ۱۰۰۰ سی سی، استوک خالص *C. muelleri* کشت داده شد. هنگامی که تراکم جلبک *C. muelleri* به حد کافی افزایش یافت، به مقدار یکسان و مشخص (به نسبت ۵ در ۹۵) با تراکم اولیه  $1 \times 10^6$  میلی لیتر (Wang et al., 2014) در درون ارلن ها کشت داده شد و تحت تابش سه طیف نوری مختلف توسط لامپ های مهتابی سفید، قرمز و آبی به مدت ۱۲ روز هوادهی گردید. برای آماده سازی شرایط نوری تیمارها، از سه اتاقک مجزا با استفاده از پلاستیک های ضخیم و تیره استفاده گردید و سپس، لامپ های مهتابی در قاب های مهتابی در اتاقک ها تفکیک شده قرار داده شدند. اثر طیف های نوری مورد نظر برای بررسی پارامترهای رشد شامل: تراکم سلولی، نرخ رشد و زمان دو برابر شدن (تا پایان دوره رشد) در ۳ تکرار مورد بررسی قرار گرفت. جلبک های رشد یافته پس از گذشت هشت روز در حالی که در انتهای مرحله ی لگاریتمی قرار داشته (Pal et al., 2013) و در اوج ارزش غذایی و تراکم می باشند، جمع آوری شده و برای سنجش ترکیبات شیمیایی شامل: کلروفیل *a*، پروتئین، چربی و اسید چرب، مورد آزمایش قرار گرفتند. برای سنجش ترکیبات شیمیایی شامل: کلروفیل *a*، پروتئین، چربی و اسید چرب، جلبک های رشد یافته پس از گذشت هشت روز در حالی که در انتهای مرحله ی لگاریتمی قرار داشتند و در اوج ارزش غذایی و تراکم بودند، جمع آوری و مورد سنجش قرار گرفتند. تمامی تیمارها و تکرارها تحت شرایط یکسان در شوری ۲۵ قسمت در هزار، دمای  $23 \pm 1$  درجه سانتی گراد (Sanchez and Voltolina, 1994) و شدت نور  $1500 \pm 200$  لوکس (Pal et al., 2013) با دوره روشنایی: تاریکی ۱۲/۱۲ ساعت (Lim and Zaleha, 2013)، با هوادهی ملائم، قلیائیت ۷/۵-۸/۵ (Sanchez and Voltolina, 1994) در اتاقک های تفکیک شده قرار گرفتند. برای نمونه برداری و شمارش سلول های ریز جلبک، هر ۴۸ ساعت ۱ میلی لیتر از هر ظرف کشت برداشت شد و با استفاده از لام شمارش هموسیتومتر در زیر میکروسکوپ نوری (مدل CX21 ساخت ژاپن) با بزرگنمایی ۴۰، اقدام به شمارش سلولی گردید (Martinez et al., 1975).

نرخ رشد ویژه (SGR<sup>1</sup>) و زمان دو برابر شدن

جهت تعیین نرخ رشد ویژه، از روز اول هر ۴۸ ساعت یک بار از هر ارلن ۱ میلی‌لیتر نمونه برداشت شده و با استفاده از لام شمارش هموسیتمتر اقدام به شمارش سلولی گردید. روند شمارش سلولی به مدت ۱۲ روز ادامه داشت، سپس نرخ رشد ویژه ( $\mu$ ) و زمان دو برابر شدن سلول‌ها (gt)، به ترتیب با استفاده از معادله‌های ۱ و ۲ (Martinez-Cordova et al., 2012) محاسبه شد:

$$\mu = (\ln B_n - \ln B_0) (t_n - t_0)^{-1} \quad \text{معادله ۱:}$$

$$gt = \mu^{-1} 24 \quad \text{معادله ۲:}$$

در این معادله‌ها:  $B_0$ : میانگین تعداد سلول‌ها در زمان  $t_0$ ،  $B_n$ : میانگین تعداد سلول‌ها در زمان  $t_n$ ،  $\mu$ : نرخ رشد ویژه ( $d-1$ )،  $gt$ : زمان دو برابر شدن ( $h$ ) است.

## اندازه‌گیری میزان وزن خشک

ابتدا کاغذ صافی با دقت ۰/۰۰۱ گرم مورد وزن سنجی قرار گرفت (ترازو مدل HR-300 Series ساخت ژاپن) تا از تفریق وزن کاغذ از وزن نهایی، وزن نمونه جلبکی مشخص گردد. یک نمونه ۵ میلی‌لیتری از هر تیمار و هر تکرار، توسط پیپت برداشت شد و بر روی کاغذ صافی که روی درب ظروف مخصوص دستگاه وکیوم (مدل JB Eliminator ساخت آمریکا) قرار داده شده بود، ریخته شد. سپس نمونه‌ها تحت تأثیر خلأ ایجاد شده توسط دستگاه، روی کاغذ صافی فیلتر گردیدند. در نهایت برای خشک شدن، نمونه‌ها به مدت ۳ ساعت در دمای ۱۰۵ درجه سانتی‌گراد در آون (مدل UN 30 ساخت آلمان) قرار داده شدند (Janelt et al., 1997).

## اندازه‌گیری میزان کلروفیل

برای این منظور، یک روز در میان ۱۵ میلی‌لیتر از هر تیمار و هر تکرار، برداشت شد و بر روی کاغذ صافی با چشمه ۰,۴۵ میکرومتر (مدل Albet ساخت آلمان) که روی درب ظروف مخصوص دستگاه وکیوم (مدل JB Eliminator ساخت آمریکا) قرار داده شده بود، ریخته شد و نمونه‌ها تحت تأثیر خلأ ایجاد شده توسط دستگاه، روی کاغذ صافی فیلتر گردیدند. نمونه‌های به دست آمده در ۱۰ میلی‌لیتر استون ۱۰۰ درصد به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در تاریکی در یخچال نگهداری شدند. سپس نمونه‌ها به مدت دقیقه ۱۰ با دور ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ (مدل Hermle Z320 ساخت آلمان) شده و جذب نوری آن‌ها با اسپکتروفتومتر (مدل CE9200 ساخت سیسیل انگلستان) در طول موج‌های ۶۶۲ و ۶۴۵ نانومتر در سه تکرار خوانده و مقدار کلروفیل  $a$  برحسب میکروگرم در لیتر و به وسیله معادله ۳ محاسبه شد (Lichtenthaler and Wellburn, 1983).

$$\text{Ca} = 11.75A662 - 2.35A645 \quad \text{معادله ۳}$$

## اندازه‌گیری میزان پروتئین

به منظور تعیین میزان ترکیبات بیوشیمیایی، ریزجلبک *C. muelleri* در روز هشتم پرورش (در مرحله‌ی لگاریتمی) برداشت شد و مورد آزمایش قرار گرفت.

<sup>1</sup> Specific Growth Rate

سنجش پروتئین کل به روش Bradford (۱۹۷۶) انجام شد. به این منظور ۰/۱ گرم نمونه در بافر فسفات (۵۰ میلی مولار با اسیدیته ۷/۲ در محیط سرد) سائیده شد و به مدت ۱۵ دقیقه در سانتریفیوژ با دور ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه مدل (مدل SiGMA ساخت آلمان) قرار داده شد. سپس محلول رویی جدا شده و از این عصاره برای سنجش پروتئین استفاده شد. برای سنجش پروتئین محلول، معرف برادفورد را با عصاره پروتئین و آب مقطر مخلوط کرده و بعد از ۵ دقیقه، جذب در طول موج ۵۹۵ نانومتر توسط اسپکتروفوتومتر (مدل SPECTRONIC GENESYS5 ساخت آمریکا) قرائت شد و با استفاده از منحنی استاندارد، مقدار پروتئین تعیین گردید (Bradford, 1976).

### اندازه‌گیری میزان چربی کل

برای استخراج و جدا کردن چربی نمونه از دستگاه اتو سوکسله (مدل SOX406 ساخت چین) استفاده شد. دستگاه سوکسله از سه بخش اصلی استخراج کننده، سردکننده و بالن تشکیل گردیده است. ابتدا بالن جمع‌آوری چربی را به وزن ثابت رسانیده، توزین کرده و وزن آن‌ها یادداشت شد. مقدار مشخصی از نمونه خشک شده جلبک در کاغذ صافی وزن شد و داخل استخراج کننده قرار گرفت. ۲۰۰ میلی لیتر اتر دوپترول به عنوان حلال آلی، داخل بالن جمع‌آوری چربی ریخته شد که در اثر حرارت هیتر، اتر بخار شده و از بالن به بخش سردکننده رفته و پس از تقطیر، بر روی نمونه ریخته شده و سبب استخراج و رسوب چربی در کف بالن گردید. اختلاف توزین اولیه و ثانویه بالن جمع‌آوری، محاسبه شده و بر مقدار نمونه برداشتی تقسیم کرده و مقدار چربی نمونه تعیین گردید (Soxhlet, 1879).

### اندازه‌گیری میزان اسیدهای چرب

جهت آنالیز ترکیبات اسید چرب، ابتدا اسیدهای چرب نمونه به استرهای متیله شده اسید چرب روش (FAMES) تبدیل شد و سپس به سیستم کروماتوگرافی گازی (GC) مجهز به آشکارساز یونیزاسیون شعله (FID) مدل Varian و ستون 0.25.BPX-70،  $0.22 \text{ MM} \times 100 \text{ M} \mu\text{M}$  و گاز حامل نیتروژن با شدت جریان 1 ml/min تزریق شدند. سپس منحنی کروماتوگرام مربوط به هر اسید چرب رسم گردید. زمان بازداری به هر اسید چرب با منحنی استاندارد مقایسه گردید. در نهایت بر اساس سطح زیر منحنی، نوع و مقدار اسیدهای چرب در نمونه جلبکی مورد سنجش قرار گرفت (Breuer et al., 2013).

پس از اتمام آزمایش، داده‌های به دست آمده برای بررسی تأثیر نورهای مختلف بر ریزجلبک *C. muelleri* مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. ابتدا نرمال بودن داده‌ها توسط آزمون کلموگروف اسمیرنوف مورد بررسی قرار گرفت و در ادامه از آنالیز واریانس یک طرفه (One-Wey ANOVA) و آزمون دانکن Tukey در سطح احتمال ۵ درصد جهت بررسی وجود یا عدم وجود اختلاف معنی‌دار در فاکتورهای مورد بررسی استفاده گردید. تجزیه و تحلیل‌های آماری با نرم افزار (SPSS version 16) و رسم نمودارها با استفاده از نرم افزار (SigmaPlot Version 11) انجام شد.

## نتایج

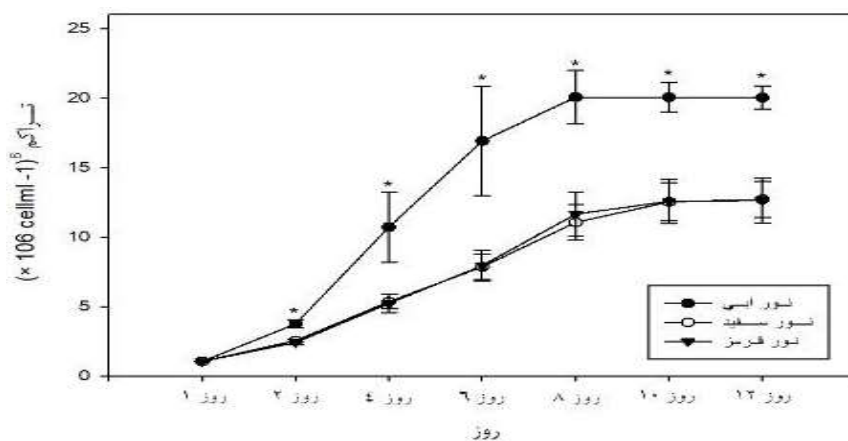
### میزان رشد

بیشترین تعداد سلول تحت نور آبی و کمترین تعداد تحت نور قرمز مشاهده شدند. شکل ۱، فراوانی سلول‌های *C. muelleri* را در سه طیف نوری متفاوت نشان می‌دهد. نتایج همچنین نشان داد که فاز تأخیری رشد ۲ روز بود و پس از روز دوم جلبک‌ها به صورت لگاریتمی رشد کردند. بالاترین میزان رشد ریزجلبک‌ها تحت نور آبی به دست آمد.

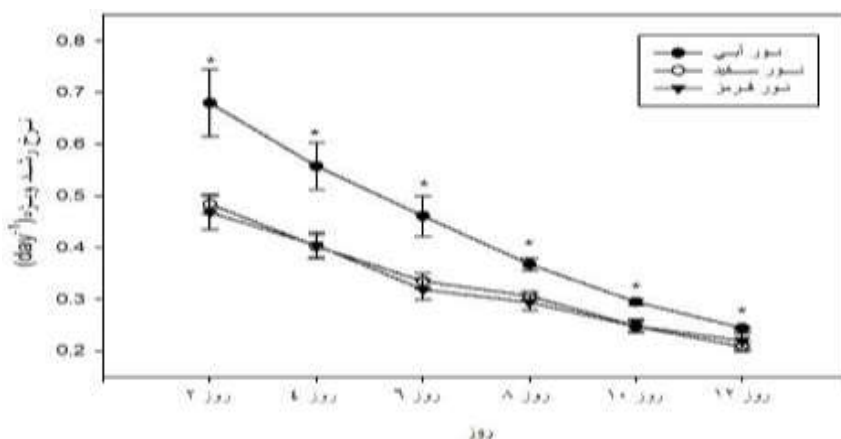
تراکم سلولی بین نورهای قرمز و سفید اختلاف معنی‌داری را نشان نداد در حالی که تیمار تحت نور آبی در طول پرورش دارای اختلاف معنی‌داری بود ( $p < 0.05$ ). شکل ۲ نرخ رشد ویژه *C. muelleri* را بین ۱۲ روز پرورش نشان می‌دهد. در روز دوم

<sup>2</sup> Fatty acid methyl ester

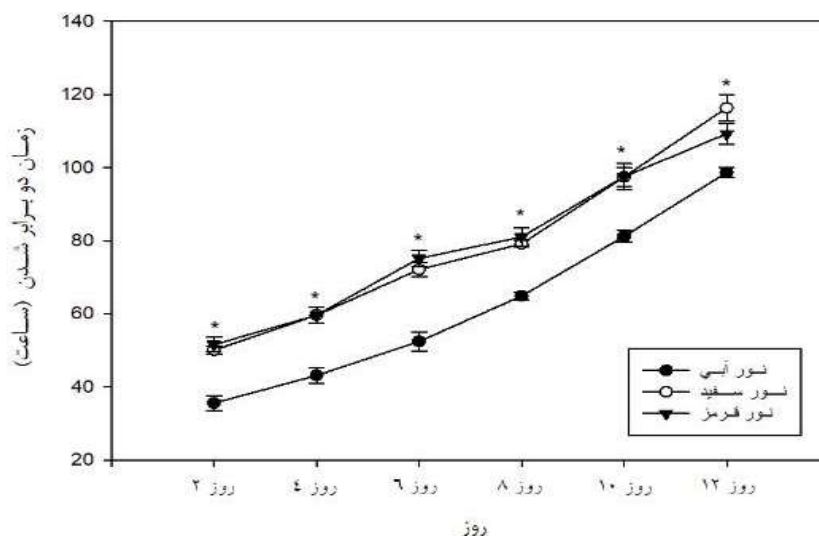
پرورش نرخ رشد ویژه برای نور آبی، سفید و قرمز به ترتیب ۰/۶۷، ۰/۴۸ و ۰/۴۶ در روز بود، این مقدار در روز دوازدهم به ترتیب به ۰/۲۴، ۰/۲۱ و ۰/۲۰ بر روز رسید. بیشینه نرخ رشد ویژه در پایان دوره مربوط به نور آبی و کمترین آن مربوط به نور سفید می‌باشد. همچنین نرخ رشد ویژه بین رنگ‌های قرمز و سفید اختلاف معنی‌داری را نشان نداد در حالی که تحت نور آبی دارای اختلاف معنی‌داری بود ( $p < 0.05$ ).



شکل ۱. تراکم *C. muelleri* طی ۱۲ روز پرورش در شرایط آزمایشگاهی (علامت ستاره نشان‌دهنده معنی‌دار بودن اختلاف می‌باشد).



شکل ۲. نرخ رشد ویژه *C. muelleri* طی ۱۲ روز پرورش در شرایط آزمایشگاهی (علامت ستاره نشان‌دهنده معنی‌دار بودن اختلاف می‌باشد).



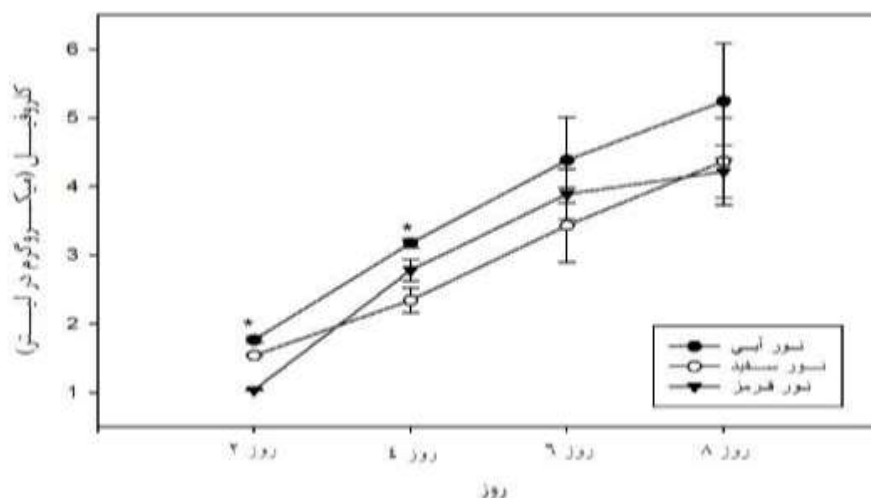
شکل ۳. زمان دو برابر شدن *C. muelleri* طی ۱۲ روز پرورش در شرایط آزمایشگاهی (علامت ستاره نشان‌دهنده معنی‌دار بودن اختلاف می‌باشد).

## زمان دو برابر شدن

زمان دو برابر شدن *C. muelleri* را بین ۱۲ روز پرورش نشان می‌دهد (شکل ۳). کوتاه‌ترین زمان دو برابر شدن در روز دوم تحت نور آبی و بیشترین زمان دو برابر شدن در روز دوازدهم پرورش در نور سفید مشاهده گردید. همچنین زمان دو برابر شدن بین رنگ‌های قرمز و سفید اختلاف معنی‌داری را نشان نداد در حالی که رنگ آبی به طور معنی‌داری کمتر بود ( $p < 0.05$ ).

## کلروفیل

میزان کلروفیل *a* در ریزجلبک *C. muelleri* را طی هشت روز پرورش نشان می‌دهد (شکل ۴). بیشینه کلروفیل در روز هشتم پرورش مربوط به نور آبی و کمترین میزان آن مربوط به نور قرمز مشاهده شد. همچنین، تیمارهای نوری سفید، آبی و قرمز تنها در روزهای اول و دوم، اختلاف معنی‌داری را با یکدیگر نشان دادند ( $p < 0.05$ ).



شکل ۴. میزان کلروفیل *C. muelleri* پس از ۸ روز پرورش در شرایط آزمایشگاهی (علامت ستاره نشان‌دهنده معنی‌دار بودن اختلاف می‌باشد).

## وزن خشک، پروتئین و چربی

میزان وزن خشک، پروتئین و چربی ریزجلبک *C. muelleri* در روز هشتم پرورش، در جدول ۱ ارائه شده است. بیشترین میزان وزن خشک و پروتئین تحت نور آبی و کمترین آن در نور قرمز مشاهده شد. همچنین، بین نورهای سفید، آبی و قرمز اختلاف معنی‌داری مشاهده شد ( $p < 0.05$ ). از نظر میزان چربی، بین نور آبی با نورهای سفید و قرمز اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد ( $p > 0.05$ ).

جدول ۱. درصد پروتئین، چربی و میزان وزن خشک *C. muelleri* پس از ۸ روز پرورش در شرایط آزمایشگاهی

پارامتر مورد سنجش	نور آبی	نور سفید	نور قرمز
پروتئین (درصد وزن تر)	۵۱/۰ ± ۱/۲ <sup>c</sup>	۴۲/۵ ± ۰/۸ <sup>b</sup>	۳۱/۳ ± ۰/۷ <sup>a</sup>
چربی (درصد وزن خشک)	۱۶/۰ ± ۰/۸	۱۸/۰ ± ۰/۶	۱۸/۰ ± ۰/۳
وزن خشک (mg/l)	۰/۶۷ ± ۰/۰۳ <sup>b</sup>	۰/۵۳ ± ۰/۰۳ <sup>ab</sup>	۰/۴۷ ± ۰/۰۳ <sup>a</sup>

مقادیر به صورت میانگین ± خطای استاندارد بیان شده‌اند. وجود حروف غیرهمسان نشانه اختلاف معنی‌دار بین تیمارها است.

## پروفایل اسیدهای چرب

در این تحقیق ۹ نوع اسید چرب متفاوت در بررسی ترکیب اسیدهای چرب ریزجلبک *C. muelleri* شناسایی شدند که نوع و میزان تغییرات آن در جدول ۲ ارائه شده است. اسید پالمیتیک (C1۶:۰) و اسید استئاریک (C1۸:۰) به ترتیب، بیشترین مقدار

جدول ۲. ترکیب اسید چرب (درصد وزنی از کل اسیدهای چرب) در طیف‌های نوری مختلف

نام اسید چرب	نوع اسید چرب	نور آبی	نور سفید	نور قرمز
اسید لوریک (C <sub>۱۲:۰</sub> )	اشباع	۱/۷۱	۱/۴۱	۱/۸۲
اسید میرستیک (C <sub>۱۴:۰</sub> )	اشباع	۶/۳۱	۶/۷۲	۵/۳۱
اسید پالمیتیک (C <sub>۱۶:۰</sub> )	اشباع	۲۰/۷۲	۲۳/۱۰	۲۵/۵۱
اسید پالمیتولئیک (C <sub>۱۶:۱</sub> )	غیراشباع (امگا۷)	۲۷/۲	۲۴/۳۲	۲۶/۱۰
اسید استئاریک (C <sub>۱۸:۰</sub> )	اشباع	۷/۹۲	۴/۷۶	۸/۲۰
اسید اولئیک (C <sub>۱۸:۱</sub> )	غیراشباع (امگا۹)	۱۸/۸	۱۹/۳۰	۱۵/۸۸
اسید لینولئیک (C <sub>2۱۸:۲</sub> )	غیراشباع (امگا۶)	۸/۶۵	۱۰/۷۱	۹/۳۴
اسیدالفا لینولئیک (C <sub>۱۸:۳</sub> )	غیراشباع (امگا۳)	۶/۰۸	۵/۵۲	۴/۳۲
اسید آرشیدیک (C <sub>۲۰:۱</sub> )	اشباع	۰/۶۳	۰/۸۱	۰/۶۸

اسیدهای چرب اشباع را به خود اختصاص دادند که تحت نور قرمز مشاهده شد. بیشترین مقدار اسیدهای چرب غیراشباع مربوط به اسید پالمیتولئیک (C<sub>۱۶:۱</sub>) است که تحت نور آبی مشاهده شد.

جدول ۳ میزان اسیدهای چرب اشباع و غیراشباع و نسبت بین آن‌ها در سه طیف نوری مختلف را نشان می‌دهد. در این پژوهش در کل تیمارها میزان اسیدهای چرب اشباع و غیراشباع در طول موج‌های مختلف نوری مورد آزمایش متفاوت بود. با توجه به جدول، بیشترین مقدار SFA تحت نور قرمز و کمترین آن تحت نور سفید مشاهده شد و بیشترین مقدار MUFA مربوط به نور آبی و کمترین آن مربوط به نور سفید می‌باشد. در مورد PUFA، بیشترین مقدار امگا۳ (C<sub>۱۸:۳</sub>) در تیمار نور آبی مشاهده شد در حالی که بیشترین مقدار امگا۶ (C<sub>۱۸:۲</sub>) در نور سفید گزارش شد. در تیمار نور قرمز، میزان SFA/USFA نسبت به سایر تیمارها بیشتر بود. در کل تیمارها، میزان اسیدهای چرب تک پیوندی نسبت به اسیدهای چرب با پیوند چندگانه، بیشتر بود (جدول ۳).

جدول ۳. درصد کلی نسبت اسیدهای چرب اشباع شده (SFA)، اشباع نشده (USFA)، اشباع نشده با یک بند دوگانه (MUFA)، اشباع نشده با چند پیوند دوگانه (PUFA) و نسبت اشباع شده به اشباع نشده (SFA/USFA) در ریزجلبک مورد آزمایش

اسید چرب	نور آبی	نور سفید	نور قرمز
SFA	۳۷/۲۹	۳۶/۸	۴۱/۵۲
USFA	۶۰/۷۳	۵۸/۲۱	۵۷/۲۸
MUFA	۴۶	۴۱/۹۸	۴۳/۶۲
PUFA	۱۴/۷۳	۱۶/۲۳	۱۳/۶۶
SFA/USFA	۰/۶۱	۰/۶۳	۰/۷۲

## بحث

عوامل محیطی مانند نور، دما و مواد مغذی، تأثیر ویژه‌ای بر نرخ رشد، تولید زیست‌توده و میزان ترکیبات لیپیدی در ریزجلبک‌ها دارند و تغییر در کیفیت نور باعث ایجاد پاسخ‌های متنوع در جلبک‌های تک سلولی می‌شود (Bouterfas *et al.*, 2006). در این مطالعه، بیشترین تراکم سلولی تحت نور آبی که دارای طول موج کوتاه‌تر و انرژی بیشتری می‌باشد، در روز هشتم آزمایش با میانگین  $20 \times 10^6$  سلول / میلی‌لیتر به دست آمد و بعد از رسیدن به اوج رشد به دلیل کاهش مواد مغذی و

بالا رفتن تراکم سلول و عدم نفوذ نور در آن‌ها رشد کند شده و در نهایت بعد از روز دهم به دلیل اتمام مواد مغذی برای نور آبی کمی شیب منفی شده است، اما برای دو نوع دیگر نمودار ثابت است و شیب منفی دیده نمی‌شود (شکل ۱). در مطالعات Sanchez و Voltolina (۲۰۰۶)، بیشترین تراکم در ریزجلبک *Chaetoceros sp.* تحت نور آبی گزارش شده است. Sanchez و Voltolina (۱۹۹۴) در مطالعاتی که روی *Chaetoceros sp.* داشتند، گزارش کردند که بیشترین تراکم سلولی در نور سفید و کمترین آن در نور آبی به دست آمد که با نتایج اخیر همخوانی ندارد. عدم همخوانی نتایج این آزمایش و نتایج کسب شده در آزمایش اخیر این‌گونه توضیح داده می‌شود که جلبک‌های متعلق به یک جنس، تحت شرایط نوری یکسان، پاسخ‌های متفاوتی را نشان می‌دهند (Sanchez and Voltolina, 2002).

آنالیز آماری داده‌ها نشان داد که نرخ رشد ویژه تحت نور آبی به طور معنی‌داری بیشتر از سایر تیمارها بود (شکل ۲). کوتاه‌ترین زمان دو برابر شدن تحت نور آبی به دست آمد (شکل ۳). همچنین بیشترین وزن خشک به دست آمده در آزمایش اخیر تحت نور آبی به دست آمد (جدول ۱). با مقایسه نتایج به دست آمده می‌توان نتیجه گرفت که نور آبی با توجه به سطح انرژی بالاتر آن در مقایسه با نور قرمز و سفید چه از لحاظ نرخ رشد ویژه و چه از لحاظ میزان زیست‌توده تولید شده، کارآمدتر بود. نتایج این مطالعه با تحقیق Sanchez و Voltolina (۲۰۰۶)، که به بررسی تأثیر منابع نوری مختلف (Cool White, GRO-Lux, ) بر روی نرخ رشد، زیست‌توده و ترکیبات شیمیایی *Chaetoceros sp.* در دو مرحله‌ی فاز لگاریتمی و ثابت پرداختند، همخوانی دارد. Yoshioka و همکاران (۲۰۱۲)، اثر طول موج‌های مختلف (آبی، سفید، قرمز) را بر روی رشد ریزجلبک *Isochrysis galbana* بررسی کردند. بیشترین میزان رشد ویژه و میزان زیست‌توده در معرض نور آبی به دست آمد و ترتیب نرخ رشد به صورت قرمز > سفید > آبی بود. همچنین Das و همکاران (۲۰۱۱)، تولید زیست‌توده را در ریزجلبک *Nannochloropsis sp.* تحت شرایط اتوتروف و میگزوتروف با سه طول موج شامل نور قرمز، آبی و سبز و یک طول موج شامل نور سفید بررسی کردند. ترتیب نرخ رشد ویژه به صورت آبی < سفید < سبز بود. نتایج کسب شده از این آزمایش‌ها با توجه به اینکه بالاترین میزان نرخ رشد ویژه و میزان زیست‌توده تحت نور آبی حاصل شده بود، با نتایج آزمایش اخیر همخوانی دارد.

به‌طوری‌که کلروفیل *a* در روزهای دوم و چهارم تحت نور قرمز بیشتر از نور سفید و در روز هشتم به مقداری کم‌تر از نور سفید رسید، در نتیجه بین میزان پروتئین و کلروفیل *a* رابطه‌ی مستقیمی وجود دارد (Smit, 1997).

در مطالعه حاضر، بیشینه محتوای کلروفیل در طول دوره‌ی پرورش تحت نور آبی مشاهده شد (شکل ۴). همچنین در نور قرمز و سفید در طول دوره‌ی پرورش نوساناتی مشاهده شد، به‌طوری‌که کلروفیل *a* در روزهای دوم و چهارم تحت نور قرمز بیشتر از نور سفید و در روز هشتم کم‌تر از نور سفید بود که با نتایج Sanchez و Voltolina (۱۹۹۴) همخوانی دارد. آن‌ها گزارش کردند که در شدت کم نور آبی مقدار کلروفیل *a* ریزجلبک *Chaetoceros sp.* به طور معنی‌داری بیشتر از نور سفید بود اما در شدت نور زیاد، تغییری در مقدار کلروفیل ایجاد نشد. بین میزان پروتئین و کلروفیل *a* رابطه‌ی مستقیمی وجود دارد (Smit, 1997). کلروفیل *a* یکی از منابع مهم ذخیره نیتروژن در جلبک‌ها بوده و رنگیزه‌ها می‌توانند تأثیر محدودیت نیتروژن را کاهش دهند. در جلبک‌ها افزایش حجم نیتروژن در محیط، سبب افزایش محتوای پروتئین و کلروفیل می‌گردد (Uslu, 2010).

در تحقیق حاضر میزان پروتئین ریزجلبک *C. muelleri* تحت نور آبی نسبت به نور سفید و قرمز بیشتر بود (جدول ۱) که با نتایج Sanchez و Voltolina (۱۹۹۴ و ۲۰۰۶) همخوانی دارد. نور آبی دارای انرژی بیشتری است و کربن فتوسنتزی بیشتری را به شکل فرعی برای چرخه‌ی کریس فراهم می‌کند و از این رو محتوی پروتئین را افزایش می‌دهد (Sanchez and Voltolina, 1994).

مقدار PUFA در آزمایش اخیر بین ۱۶/۲۳-۱۳/۶۶ درصد مشاهده شد که بیشترین مقدار آن مربوط به اسید لینولئیک (امگا۶) تحت نور سفید با میانگین ۱۰/۷۱ درصد و کمترین آن مربوط به آلفالینولئیک (امگا۳) تحت نور قرمز با میانگین ۴/۳۲ درصد می‌باشد. بنابراین، ریزجلبک *C. muelleri* دارای امگا۶ بیشتری نسبت به امگا۳ می‌باشد. مقایسه نتایج محققین دیگر از جمله

Gorjzadeh و همکاران (۲۰۱۶) و Sanchez و Voltolina (۱۹۹۴) با تحقیق حاضر، مطالب گفته شده را تایید می‌کند. بیشترین مقدار امگا۳ تحت نور آبی با میانگین ۶/۰۸ درصد به دست آمد که دارای ارزش بالایی است. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که بیشترین میزان اسیدهای چرب در *C. muelleri*، اسید پالمیتولئیک (۱:۱۶C) از گروه اسیدهای چرب غیراشباع با یک بند دوگانه (MUFA) بود، که بیشترین مقدار آن تحت نور آبی به میزان ۲۷/۲ درصد مشاهده شد و سپس اسید پالمیتیک (۰:۱۶C) از گروه اسیدهای چرب اشباع (SFA) به میزان ۲۵/۵۱ درصد در نور قرمز گزارش شد. محققین دیگر همانند Prartono و همکاران (۲۰۱۳) و Gorjzadeh و همکاران (۲۰۱۶)، نیز تقریباً نتایج مشابهی گزارش کردند و در بررسی پروفایل اسیدهای چرب جلبک *chaetoceros* عنوان نمودند که بیشترین اسید چرب غیراشباع با یک بند دوگانه مربوط به اسید پالمیتولئیک می‌باشد که در تحقیق Prartono و همکاران (۲۰۱۳) به میزان ۴۹/۴۱ درصد و در تحقیق گرجی زاده و همکاران (۲۰۱۳) ۳۰/۳۳ درصد گزارش شد که بسیار نزدیک به نتایج تحقیق حاضر بود. همچنین نتایج تحقیق Prartono و همکاران (۲۰۱۳) نشان داد که میزان SFA به مقدار ۴۴/۴۴ درصد و MUFA به میزان ۵۶/۴۲ درصد بوده است. در تحقیق حاضر مقدار SFA تحت نور قرمز با میانگین ۴۱/۵۲ درصد بیشترین مقدار و MUFA تحت نور آبی با میانگین ۴۶ درصد نیز بیشترین مقدار اسیدهای چرب را به خود اختصاص داد.

Sanchez و Voltolina (۱۹۹۴)، در تحقیق خود گزارش کردند که اولئیک اسید، در نور آبی بیشتر از ۱۵ درصد از کل اسید چرب بود که می‌تواند اثر مهمی را بر روی ارزش غذایی تولیدات زیست‌توده بگذارد که با نتایج تحقیق حاضر که میزان اولئیک اسید با میانگین ۱۵/۸۸-۱۹/۳۰ درصد مشاهده شد، همخوانی دارد. در تحقیقات دیگر نیز ثابت شده که محتوای اصلی و عمده گونه‌های مختلف متعلق به رده باسیلاریوفیسه (از جمله *Chaetoceros*) از نظر SFA (خصوصاً اسید پالمیتیک) و MUFA (خصوصاً امگا۷) غنی می‌باشند. در تحقیق Hu و همکاران (۲۰۰۸) نشان داده شده که بسیاری از مواد مغذی موجود در محیط آب بر روی متابولیسم چربی در فیتوپلانکتون‌ها مؤثر می‌باشند (Hu et al., 2008). به عنوان مثال، کمبود نیتروژن موجود در آب باعث تجمع تری‌گلیسرید در فیتوپلانکتون‌ها می‌شود و یا کمبود سیلیس موجود در آب باعث افزایش چربی‌های اشباع SFA و MUFA در دیاتومه‌ها می‌شود (Hu et al., 2008).

## تشکر و قدردانی

از همکاری صمیمانه مسئولین مرکز سنجش آلودگی و امور آزمایشگاه‌های استان هرمزگان به ویژه سرکار خانم دودی و همچنین مسئولین محترم آزمایشگاه دانشکده علوم و فنون هرمزگان کمال تشکر و سپاسگزاری را داریم.

## منابع

- Bouterfas, R., Belkoura, M., Dauta, A. 2006. The effects of irradiance and photoperiod on the growth rates of three fresh water green algae isolated a eutrophic lake. *Limnetica*. 25(3): 647-656.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72(1-2): 248-254.
- Brennan, L., Owende, P. 2010. Biofuels from microalgae a review of technologies for production, processing and extractions of biofuels and co-products. *Journal of Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 14(2): 557-577.
- Breuer, G., Evers, W.A.C., Vree, J.H., Kleinegris, D.M.M., Martens, D.E., Wijffels, R.H., Lamers, P.P. 2013. Analysis of Fatty Acid Content and Composition in Microalgae. *Journal of Visualized Experiments*. 80: 1-9.
- Das, P., Lei, W., Aziz, S.S., Obard, J.P.H. 2011. Enhanced algae growth in both phototrophic and mixotrophic culture under blue light. *Bioresource Technology*. 102(4): 3883-3887.
- FAO. 2007. Improving *P.monodon* hatchery practices. Manual based on experience in India. Aquaculture management and conservation service. 117 p.

- Gorjzdadeh, H., Sakhaei, N., Doustshenas, B., Ganemi, K., Archangi, B. 2016. Fatty acid composition of *Spirulina* sp., *Chlorella* sp. and *Chaetoceros* sp. microalgae and introduction as potential new sources to extinct omega 3 and omega 6. Iranian South Medical Journal. 19 (2): 212-224. (in Persian)
- Guillard, R.R.L., Ryther, J.H. 1962. Studies on marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt, and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran. Canadian Journal of Microbiology. 8(2): 229-239.
- Hu, Q., Sommerfeld, M., Jarvis, E., Ghirardi, M., Posewitz, M., Seibert, M. 2008. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel productions: perspectives and advances. Blackwell Publishing Ltd, National Renewable Energy Laboratory. The Plant Journal. 54(4): 621-639.
- Isik, O., Hazaric, L., Sayin, S., Gokpinar, S., Durmaz, Y. 2006. The effect of the environmental factors on the vitamin C (ascorbic acid), E(alpha- tocopherol),  $\beta$ -caroten contents and the fatty acide composition of *Spirulina platensis*. Journal of Fisheries and Aquaculture Sciences. 23(3-4): 257-261.
- Janelt, G., Bolt, P., Gerbech, N., Buchholz, R. 1997. The lamellar settle a low cost alternative for separating the microalgae *Chlorella vulgaris* from a cultivation broth. Applied Microbiology and Biotechnology. 48(1): 6-10.
- Lichtenthaler, H.K., Wellburn, A.R. 1983. Determination of total carotenoids and chlorophyll a and b of leaf extract in different solvents. Biochemical Society Transactions. 11(5): 591-592.
- Lim, K.C., Zaleha, K. 2013. Effect of photoperiod on the Cellular fatty acid composition of three tropical marine microalgae. Institute of Tropical Aquaculture, Universiti Malaysia Terengganu. Malaysian Applied Biology Journal. 42(1): 41-49.
- Liska, A.J., Shevchenko, A., Pick, U., Katz, A. 2004. Enhanced photosynthesis and redox energy production contribute to salinity tolerance in *Dunaliella* as revealed by homology-based proteomics. Journal of Plant Physiology. 136(1): 2806-2817.
- Martinez, M.R., Chakroff, R.P., Pantastico, J.B. 1975. Direct phytoplankton counting techniques using the heamacytometer. Philippines Agriculture. 55(1): 43-50.
- Martinez-Cordova, L.R., Campana-Torres, A., Martinez-Porchas, M., Lopez-Elias, J.A., Garica-Sifuentes, C.O. 2012. Effect of alternative mediums on production and proximate composition of the microalgae *Chaetoceros muelleri* as food in culture of the copepod *Acartia* sp. Latin American Journal of Aquatic Reserch. 40(1): 169-176.
- Mata, T.M., Martins, A.A., Caetano, N.S. 2010. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. Renewable and Sustainable Energy Reviews. 14(1): 217-232.
- Pal, S.W., Singh, N.K., Azam, K. 2013. Evaluation of Relationship between light intensity (Lux) and growth of *Chaetoceros muelleri*. Oceanography. 1(3): 1-4.
- Prariono, T., Kawarie, M., Katili, V. 2013. Fatty acide composition of three diatom species *Skeletonema costatum*, *Thalassira* sp. and *Chaetoceros gracilis*. Internation Journal of Environmental and Bioenergy. 6: 28-43.
- Richmond, A. 2004. Handbook of microalgal culture, biotechnology and applied physiology. Blackwell Publishing Company. 566 p.
- Sanchez-Saavedra, M.P., Voltolina, D. 1994. The chemical composition of *Chaetoceros* sp. (Bacillariophyceae) under different light conditions. Comparative Biochemistry and Physiology Part B. 107(1): 39-44.
- Sanchez-Saavedra, M.P., 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 culture. Ciencias Marinas. 28(3): 273-279.
- Sanchez-Saavedra, M.P., Voltolina, D. 2006. The growth rate, biomass production and composition of *Chaetoceros* sp. grown with different light sources. Aquacultural Engineering. 35(2): 161-165.
- Smit A.J., Robertson, B.L., Preez, D.R. 1997. Influence of ammonium-N pulse concentrations and frequency, tank condition and nitrogen starvation on growth rate and bioquematical composition of *Gracilaria gracilis*. Journal of Applied Phycology. 8(6): 473-481.
- Soxhlet, F. 1879. Die gewichtsanalytische Bestimmungdes milchfettes. Polytechnisches Journal. 232 p.
- Sukenik, A., Zmora, O., Carmeli, Y. 1993. Biochemical quality of marine unicellular algae with special emphasis on lipid composition. II. *Nannochloropsis* sp. Aquaculture. 117(3-4): 313-326.
- Uslu, L., Oya, I., Koc, K., Goksan, T. 2010. The effect of nitrogen deficiencies on the lipid and protein contents of *Spirulina platensis*. African Journal of Biotechnology. 10(3): 387-389.

- Wang, X.W., Liang, J.R., Luo, C.S., Chen, C.P., Gao, Y.H. 2014. Biomass, total lipid production, and fatty acid composition of the marine diatom *Chaetoceros muelleri* in response to different CO<sub>2</sub> levels. *Bioresource Technology*. 161: 124-130.
- Yoshioka, M., Yago, T., Yoshie-Stark, Y., Arakwa, H., Morinaga, T. 2012. Effect of high frequency of intermittent light on the growth and fatty acid profile of *Isochrysis galbana*. *International Journal of Scientific Research*. 338: 111-117.