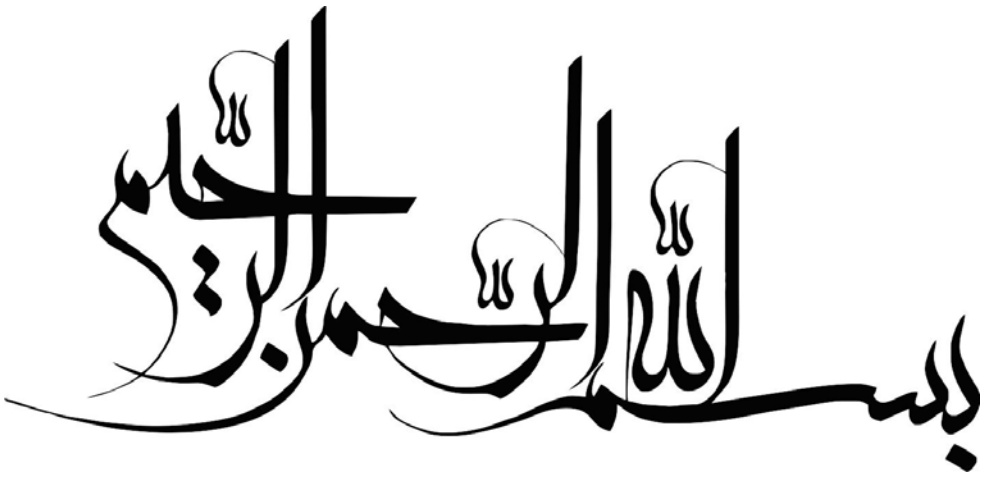

بسم الله الرحمن الرحيم

دانشکده منابع طبیعی

پایان نامه کارشناسی ارشد

تاثیر شدت و دوره نوری بر رشد و ترکیبات لیپیدی در جلبک سبز *Dunaliella salina*

از :

معصومه پورافراسیابی

استادان راهنما :

دکتر زهره رمضانپور

دکتر جاوید ایمانپور نمین

اسفند ۱۳۹۱

دانشکده منابع طبیعی

گروه شیلات (بوم شناسی آبزیان شیلاتی)

تاثیر شدت و دوره نوری بر رشد و ترکیبات لیپیدی در جلبک سبز ***Dunaliella salina***

از :

معصومه پورافراسیابی

استادان راهنما :

دکتر زهره رمضانپور

دکتر جاوید ایمانپور نمین

استاد مشاور :

مهندس مرجان صادقی راد

اسفند ۱۳۹۱

تقدیم به

مادرم ؛ قطره ای پاک از چشمه زندگی

الحمد ال... رب العالمین

تشکر و قدردانی

اینک که به لطف خدای بزرگ توفیق انجام این پایان نامه نصیبم شده است، بر خود لازم می دانم تا از تمامی عزیزانی که در انجام این مهم مرا یاری نمودند سپاسگزاری نمایم. لیکن از اساتید ارجمند و فرزانه؛ "سرکار خانم دکتر زهره رمضانپور" و "جناب آقای دکتر جاوید ایمانپور نمین" در مقام اساتید راهنما و "سرکار خانم مهندس مرجان صادقی راد" در مقام استاد مشاور این طرح که از راهنمایی های علمی و عملی ایشان بهره مند شدم، سپاسگزاری می نمایم.

از اساتید محترم دانشکده منابع طبیعی ؛ جناب آقای دکتر خوش خلق مدیریت محترم گروه شیلات، جناب آقای دکتر ستاری، جناب آقای دکتر بانی، جناب آقای دکتر فلاحتکار، جناب آقای دکتر نویریان، جناب آقای مهندس نصرال... زاده، جناب آقای دکتر خان محمدی، جناب آقای دکتر ثابت رفتار، جناب آقای دکتر صالحی، جناب آقای مهندس محمدی که در طی این دوره افتخار شاگردی ایشان را داشتم سپاسگزاری می کنم. از پرسنل محترم دانشکده منابع طبیعی، به ویژه جناب آقای مهندس موسی پور، کارشناس محترم پژوهشی این دانشکده که در امر اجرای این پایان نامه همکاری داشتند، صمیمانه سپاسگزاری می کنم.

از پرسنل محترم انستیتو تحقیقات بین المللی ماهیان خاویاری دکتر دادمان رشت، به ویژه سرکار خانم مهندس چوبیان، جناب آقای دکتر فشخامی، جناب آقای دکتر پورکاظمی، سرکار خانم مهندس عزیززاده، جناب آقای مهندس پژند، سرکار خانم مهندس روشن ضمیر، سرکار خانم مهندس رضاخواه، جناب آقای مهندس پیکران، جناب آقای مهندس حسین نژاد، جناب آقای مهندس فرزانه، جناب آقای مهندس حدادی مقدم، سرکار خانم مهندس حقیقی، سرکار خانم مهندس بنی اسماعیلی، که از حمایت های ایشان در امر اجرای این پایان نامه بهره مند بودم، سپاسگزاری می کنم.

از داوران محترم پایان نامه حاضر، "جناب آقای دکتر خارا" ریاست محترم دانشکده منابع طبیعی دانشگاه آزاد اسلامی- واحد لاهیجان و "جناب آقای دکتر خان محمدی" معاونت محترم امور مالی دانشکده منابع طبیعی- دانشگاه گیلان که قبول زحمت فرموده اند، تشکر و قدردانی می نمایم.

از دوستان گرامی سرکار خانم ها ؛ مهندس خلیلی، ذاکر، عبدالله زاده، پوتکی، نادری، کوهی، حقیقی، قیاسی، محمودی، محمدزاده و جناب آقایان ؛ مهندس زمانی، سلمرودی، حمید اغلی و اسلامی که از حمایت و همکاری ایشان در طی این دوره بهره مند بودم، سپاسگزاری می کنم.

چکیده

عنوان : تاثیر شدت و دوره نوری بر رشد و ترکیبات لیپیدی در جلبک سبز *Dunaliella salina*

نام دانشجو : معصومه پورافراسیابی

نرخ رشد ویژه، تراکم سلولی، جذب نوری، زمان دو برابر شدن سلوها و میزان تولید بیودیزل و گلیسرین در جلبک *D. salina* تحت شرایط کشت فتواتوتروف و هتروتروف بررسی شد. جلبک آب شور *D. salina* از دریاچه ارومیه جداسازی شد. در شرایط فتواتوتروف، از شدت نور (۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میکرومول فوتون بر متر مربع در ثانیه) و دوره های تاریکی : روشنایی مختلف (۰ : ۲۴ ، ۸ : ۱۶ ، ۱۲ : ۱۲ و ۱۶ : ۸ ساعت) استفاده شد. در شرایط کشت هتروتروف (دوره تاریکی : روشنایی ۲۴ : ۰ ساعت) از غلظت های مختلف گلوکز (۳۰ ، ۷۰ و ۱۵۰ گرم در لیتر) استفاده گردید. پیش از اجرای تیمارها، دو محیط کشت JM و J/L با دوز های متفاوتی از محلول ویتامین (سیانوکوبالامین، بیوتین و تیامین) مقایسه شدند. ۴ محیط کشت مورد مطالعه شامل JM، J/L، J/L + ویتامین و J/L + ویتامین با دوز دو برابر بودند. نتایج نشان داد، محیط کشت JM نسبت به سایر محیط کشت های مورد مطالعه کارایی بالاتری دارد. لذا از محیط کشت JM به منظور اجرای تیمارهای نوری استفاده شد. در شرایط کشت فتواتوتروف، بیشترین نرخ رشد ویژه (۰/۶۹ در روز)، تراکم سلولی ($۱۰^{۶} \times ۰/۳ \pm ۵/۶$ سلول در میلی لیتر)، جذب نوری (۰/۲۰) و کمترین زمان دو برابر شدن سلول ها (۱/۰۱ روز) در شدت نور ۱۵۰ میکرومول فوتون بر متر مربع در ثانیه و دوره نوری ۰ : ۲۴ ساعت مشاهده شد. کمترین نرخ رشد ویژه (۰/۱۸ در روز)، تراکم سلولی ($۱۰^{۶} \times ۰/۱ \pm ۱/۵$ سلول در میلی لیتر)، جذب نوری (۰/۰۲) و بیشترین زمان دو برابر شدن سلول ها (۳/۸۴ روز) در شدت نور ۵۰ و دوره نوری ۱۶ : ۸ ساعت بود. در شرایط فتواتوتروف، بیشترین میزان بیودیزل (۱/۳۰ درصد) در شدت نور ۱۵۰ و دوره نوری ۰ : ۲۴ ساعت و کمترین آن (۰/۳۱ درصد) در شدت نور ۱۵۰ و دوره نوری ۱۶ : ۸ ساعت بود. بیشترین میزان تولید گلیسرین (۱۴ درصد) در شدت نور ۵۰ و دوره نوری ۸ : ۱۶ ساعت و کمترین میزان آن در شدت نور ۱۵۰ (۰/۸ درصد) و دوره نوری ۰ : ۲۴ ساعت مشاهده شد. در کشت هتروتروف، بیشترین نرخ رشد ویژه (۰/۴۷ در روز)، تراکم سلولی ($۱۰^{۶} \times ۰/۰۱ \pm ۱/۱۰$ سلول در میلی لیتر)، جذب نوری (۰/۰۵) و کمترین زمان دو برابر شدن سلول ها (۱/۴۹ روز) در غلظت ۱۵۰ گرم در لیتر گلوکز مشاهده شد. کمترین نرخ رشد ویژه (۰/۲۶ در روز)، تراکم سلولی ($۱۰^{۶} \times ۰/۰۱ \pm ۰/۸۷$ سلول در میلی لیتر)، جذب نوری (۰/۰۲) و بیشترین زمان دو برابر شدن سلول ها (۲/۶۷ روز) در غلظت ۳۰ گرم در لیترگلوکز بود. افزایش غلظت گلوکز سبب افزایش میزان تولید بیودیزل شد. بیشترین میزان بیودیزل (۱/۳۰ درصد) در غلظت ۱۵۰ گرم در لیتر و کمترین مقدار آن (۰/۷۵ درصد) در ۳۰ گرم در لیتر گلوکز بود. بیشترین میزان گلیسرین (۲ درصد) در غلظت ۳۰ گرم در لیتر و کمترین مقدار آن (۱/۳ درصد) در ۱۵۰ گرم در لیتر گلوکز مشاهده شد. نتایج نشان داد، افزایش شدت نور و دوره روشنایی سبب افزایش نرخ رشد ویژه، تراکم سلولی، جذب نوری و کاهش مدت زمان دو برابر شدن سلول ها در *D. salina* می شوند. تغییرات شدت و دوره روشنایی به عنوان یک استرس سبب تغییر میزان تولید بیودیزل و گلیسرین شد. روند تغییر این دو ترکیب در شرایط کشت فتواتوتروف مشابه تراکم سلولی و نرخ رشد ویژه نبود. در کشت هتروتروف، با افزایش غلظت گلوکز میزان تولید بیودیزل، نرخ رشد ویژه، تراکم سلولی و جذب نوری افزایش و غلظت گلیسرین کاهش یافت. حداکثر میزان تولید بیودیزل در شرایط کشت هتروتروف مشابه کشت فتواتوتروف بود. هر چند تراکم سلولی در کشت هتروتروف نسبت به شرایط فتواتوتروف کمتر بود. لذا افزایش نرخ رشد و تراکم سلولی لزوما" به معنای افزایش میزان تولید بیودیزل و گلیسرین نمی باشد.

کلید واژه : شدت نور، دوره نوری، گلوکز، بیودیزل، گلیسرین، *D. salina*

فهرست مطالب

عنوان ..... صفحه
چکیده فارسی ..... خ
چکیده انگلیسی ..... د

فصل اول : مقدمه، کلیات و مروری بر منابع

۱- مقدمه ۲
۱- ۱- جلبک های سبز (Chlorophyta) ۴
۱- ۱- ۱- جلبک سبز *Dunaliella salina* ۵
۱- ۱- ۱- ۱- طبقه بندی ۵
۱- ۱- ۱- ۲- ریخت شناسی ۵
۱- ۱- ۱- ۳- خصوصیات داخل سلولی ۵
۱- ۱- ۱- ۴- فیزیولوژی ۶
۱- ۱- ۱- ۵- تولید مثل ۷
۱- ۱- ۱- ۵- ۱- تقسیم دوتایی ۷
۱- ۱- ۱- ۵- ۲- تولیدمثل جنسی ۸
۱- ۱- ۱- ۵- ۳- مرحله پالملوئیدی ۸
۱- ۱- ۱- ۶- اهمیت اقتصادی ۹
۱- ۲- سوخت زیستی ۹
۱- ۳- فتوسنتز و مسیر سنتز ترکیبات لیپیدی در جلبک *D. salina* ۱۱
۱- ۳- ۱- فتوسنتز ۱۱
۱- ۳- ۱- ۱- مرحله اول فتوسنتز ۱۲
۱- ۳- ۱- ۲- مرحله دوم فتوسنتز (زنجیره انتقال الکترون) ۱۳
۱- ۳- ۱- ۳- مرحله سوم فتوسنتز (چرخه کالوین) ۱۴
۱- ۳- ۱- ۴- مسیر سنتز اجسام لیپیدی (تری آسیل گلیسرول) در جلبک *D. salina* ۱۶
۱- ۴- بیودیزل و گلیسرول ۱۷
۱- ۴- ۱- بیودیزل ۱۷
۱- ۴- ۱- گلیسرول (گلیسرین) ۱۹
۱- ۵- شرایط مورد نیاز جهت کشت *D. salina* ۱۹
۱- ۶- عوامل موثر در افزایش نرخ رشد و تولید لیپید ۲۰
۱- ۶- ۱- نور ۲۰
۱- ۶- ۲- دوره روشنایی/ تاریکی ۲۱
۱- ۶- ۳- شدت نور ۲۱
۱- ۶- ۴- مواد مغذی و محیط کشت ۲۲
۱- ۷- انواع روش های سوخت و ساز در جلبک های میکروسکوپی ۲۲
۱- ۷- ۱- کشت فتواتوتروف ۲۳
۱- ۷- ۲- کشت هتروتروف ۲۴
۱- ۸ - کاربرد بیودیزل ۲۷
۱- ۹ - سابقه تحقیق ۲۸

فصل دوم : مواد و روش ها

۲- مواد و روش ها ۳۵
۲- ۱- نمونه برداری، جداسازی و خالص سازی *D. salin* ۳۵
۲- ۲- شرایط کشت ۳۵
۲- ۲- ۱- تنظیم نور ۳۵
۲- ۲- ۲- تنظیم دما ۳۶
۲- ۲- ۳- تهیه محیط کشت ۳۶
۲- ۲- ۴- استریل کردن ۳۸
۲- ۲- ۵- تهیه استوک و ذخیره سازی *D. salina* ۳۸
۲- ۲- ۵- ۱- روش کشت خطی جامد ۳۸
۲- ۲- ۵- ۲- ذخیره سازی سلول های *D. salina* ۳۹
۲- ۲- ۵- ۳- روش تکرار کشت مایع ۴۰
۲- ۳- اجرای تیمارهای نوری ۴۰
۲- ۳- ۱- شمارش سلولی ۴۰
۲- ۳- ۲- نرخ رشد ویژه و زمان دو برابر شدن سلول ها ۴۱
۲- ۳- ۳- غلظت سلولی ۴۲
۲- ۴- اندازه گیری لیپید ۴۲
۲- ۵- آنالیزهای آماری ۴۳

فصل سوم : نتایج

۳- نتایج ۴۵
۳- ۱- مقایسه محیط کشت های مختلف در شرایط فتو اتوتروف ۴۵
۳- ۱- ۱- منحنی تغییرات جمعیت *D. salina* در شدت نور و محیط کشت های مختلف ۴۵
۳- ۱- ۲- مقایسه نرخ رشد ویژه *D. salina* در شدت نور و محیط کشت های مختلف ۴۶
۳- ۱- ۳- مقایسه زمان دو برابر شدن سلول های *D. salina* در شدت نور و محیط کشت های مختلف ۴۸
۳- ۲ - مقایسه محیط کشت های مختلف در شرایط هتروتروف ۴۸
۳- ۲- ۱- منحنی تغییرات جمعیت *D. salina* در غلظت ۳۰ گرم گلوکز در هر لیتر از محیط کشت های مختلف ۴۹
۳- ۲- ۲- نرخ رشد ویژه *D. salina* در غلظت ۳۰ گرم گلوکز در هر لیتر از محیط کشت های مختلف ۴۹
۳- ۲- ۳- زمان دو برابر شدن سلول ها در غلظت ۳۰ گرم گلوکز در هر لیتر از محیط کشت های مختلف ۵۰
۳- ۳- استفاده از محیط کشت JM در شرایط کشت فتواتوتروف ۵۱
۳- ۳- ۱- منحنی تغییرات جمعیت *D. salina* در دوره نوری ۰ : ۲۴ ساعت ۵۱
۳- ۳- ۲- منحنی تغییرات جمعیت *D. salina* در دوره نوری ۸ : ۱۶ ساعت ۵۲
۳- ۳- ۳- منحنی تغییرات جمعیت *D. salina* در دوره نوری ۱۲ : ۱۲ ساعت ۵۲
۳- ۳- ۴- منحنی تغییرات جمعیت *D. salina* در دوره نوری ۱۶ : ۸ ساعت ۵۳
۳- ۳- ۵- مقایسه نرخ رشد ویژه *D. salina* در شرایط کشت فتواتوتروف ۵۴
۳- ۳- ۶- مقایسه زمان دو برابر شدن سلول های *D. salina* در شرایط کشت فتواتوتروف ۵۵
۳- ۳- ۷- مقایسه غلظت سلولی *D. salina* در شرایط کشت فتواتوتروف ۵۶
۳- ۴- استفاده از محیط کشت JM تحت شرایط هتروتروف ۵۷
۳- ۴- ۱- منحنی تغییرات جمعیت *D. salina* در غلظت های مختلف گلوکز تحت شرایط هتروتروف ۵۷

۳- ۴- ۲- مقایسه نرخ رشد ویژه *D. salina* در غلظت های مختلف گلوکز تحت شرایط هتروتروف ۵۸
۳- ۴- ۳- مقایسه زمان دو برابر شدن سلول های *D. salina* در غلظت های مختلف گلوکز تحت شرایط هتروتروف ۵۹
۳- ۴- ۳- مقایسه غلظت سلولی *D. salina* در غلظت های مختلف گلوکز تحت شرایط هتروتروف ۵۹
۳- ۵- استخراج بیودیزل و گلیسرین ۶۰
۳- ۶- مقایسه میزان تولید بیودیزل و گلیسرین در شرایط فتواتوتروف ۶۰
۳- ۶- ۱- مقایسه درصد تولید بیودیزل در *D. salina* ۶۰
۳- ۶- ۲- مقایسه درصد تولید گلیسرین در *D. salina* ۶۱
۳- ۷- مقایسه میزان تولید بیودیزل و گلیسرین در شرایط هتروتروف ۶۲
۳- ۷- ۱- مقایسه درصد تولید بیودیزل در *D. salina* ۶۲
۳- ۷- ۲- مقایسه درصد تولید گلیسرین در *D. salina* ۶۳
۳- ۸- همبستگی متغیرها ۶۴

فصل چهارم : بحث و نتیجه گیری

۴- بحث و نتیجه گیری ۶۶
۴- ۱- بحث ۶۶
۴- ۲- نتیجه گیری نهایی ۹۰
۴- ۳- پیشنهادها ۹۲
۴- ۳- ۱- پیشنهادهای حاصل از پایان نامه ۹۲
۴- ۳- ۲- پیشنهادهای پژوهشی ۹۲

فهرست منابع ۹۴

فهرست جدول ها

عنوان ..... صفحه

فصل اول

۱- ۱ - طبقه بندی جلبک ها ۴

فصل سوم

۳ - ۱ - مقایسه حداکثر نرخ رشد ویژه (μ_{max}) در شدت نور و محیط کشت های مختلف ۴۷
۳ - ۲ - مقایسه مدت زمان دو برابر شدت سلول ها در شدت نور و محیط کشت های مختلف ۴۸
۳ - ۳ - مقایسه حداکثر نرخ رشد ویژه (μ_{max}) در دوره تاریکی : روشنایی ۰ : ۲۴ ساعت و محیط کشت های مختلف ۵۰
۳ - ۴ - مقایسه مدت زمان دو برابر شدن سلول ها در دوره تاریکی : روشنایی ۰ : ۲۴ ساعت و محیط کشت های مختلف ۵۰
۳ - ۵ - مقایسه حداکثر نرخ رشد ویژه (μ_{max}) در شدت نور و دوره های تاریکی : روشنایی مختلف ۵۵
۳ - ۶ - مقایسه حداقل زمان دو برابر شدن سلول ها در شدت و دوره های تاریکی : روشنایی مختلف ۵۶
۳ - ۷ - مقایسه حداکثر نرخ رشد ویژه (μ_{max}) در دوره تاریکی : روشنایی ۰ : ۲۴ ساعت در غلظت های مختلف گلوکز ۵۹
۳ - ۸ - مقایسه زمان دو برابر شدن سلول ها در دوره تاریکی : روشنایی ۰ : ۲۴ ساعت در غلظت های مختلف گلوکز ۵۹
۳ - ۹ - آنالیز رگرسیون و همبستگی متغیر ها در شرایط کشت فتواتوتروف و هتروتروف ۶۴

فهرست شکل ها

عنوان ..... صفحه

فصل اول

۱- ۱- a ؛ ریخت شناسی و اجزای داخل سلولی و b ؛ تصویر میکروسکوپ الکترونی *D. salina* ۶
۱- ۲ - تصویر میکروسکوپ الکترونی، a و b ؛ اشکال مختلف *D. salina* ، c ؛ لایه گلیکوکالیکس ۶
۱- ۳ - تقسیم دوتایی در *D. salina* ۸
۱- ۴ - a ؛ تولید مثل جنسی و b ؛ مرحله پالملوئیدی ۸
۱- ۵ - مسیر فتوسنتز و تثبیت دی اکسید کربن از طریق تولید ترکیبات آلی مختلف در *D. salina* ۱۲
۱- ۶ - مرحله اول و دوم فتوسنتز در جلبک *D. salina* ۱۴
۱- ۷- چرخه کالوین و مسیر سنتز اسید های چرب در جلبک *D. salina* ۱۵
۱- ۸ - مسیر سنتز اسیدهای چرب و تولید تری آسیل گلیسرول در جلبک تک سلولی *D.salina* ۱۷
۱- ۹- واکنش تبادل استری و تولید بیودیزل ۱۸
۱- ۱۰- استخرهای طویل مجهز به چرخ پرده دار- هند ، b ؛ فتو بیوراکتورهای لوله ای- آلمان ۲۳
۱- ۱۱- مسیر جذب و سوخت و ساز گلوکز و سایر ترکیبات آلی در کشت هتروتروف در *D. slina* ۲۴
۱- ۱۲- مسیر سنتز تری آسیل گلیسرول در شرایط کشت هتروتروف و فتواتوتروف در جلبک تک سلولی ۲۵
۱- ۱۳- کاربرد بیودیزل ۲۷

فصل دوم

۲- ۱- *D. salina* جداسازی شده از دریاچه ارومیه ؛ ۴۰۰ X ۳۵
۲- ۲- a ؛ کشت خطی جامد b ؛ اسلنت ۳۹
۲- ۳- a ؛ مراحل تهیه استوک *D. salina* ، b ؛ کشت انبوه در محیط آزمایشگاه ۴۰

فصل سوم

۳- ۱- a ؛ استخراج بیودیزل و گلیسرین از جلبک *D. salina* b ؛ گلیسرین ، c ؛ بیودیزل ۶۰

فهرست نمودار ها

عنوان ..... صفحه

فصل سوم

۳ - ۱- منحنی تغییرات جمعیت *D.salina* کشت داده شده در دوره نوری ۰ : ۲۴ ساعت و شدت نور ۵۰ میکرومول فوتون بر متر مربع در ثانیه در محیط کشت های مختلف ۴۵

۳ - ۲ - منحنی تغییرات جمعیت *D.salina* کشت داده شده در دوره نوری۰ : ۲۴ ساعت و شدت نور ۱۵۰ میکرومول فوتون بر متر مربع در ثانیه در محیط کشت های مختلف ۴۶

۳ - ۳ - مقایسه میانگین نرخ رشد ویژه طی ۱۲ روز کشت در شدت نور و محیط کشت های مختلف ۴۷

۳- ۴- منحنی تغییرات جمعیت در دوره تاریکی : روشنایی ۲۴ : ۰ ساعت در محیط کشت های مختلف ۴۹

۳ - ۵ - مقایسه میانگین نرخ رشد ویژه طی ۹ روز کشت در دوره تاریکی : روشنایی ۰ : ۲۴ ساعت و محیط کشت های مختلف ۵۰

۳ - ۶ - منحنی تغییرات جمعیت در دوره تاریکی : روشنایی ۰ : ۲۴ ساعت و شدت نورهای مختلف ۵۱

۳ - ۷ - منحنی تغییرات جمعیت در دوره تاریکی : روشنایی ۸ : ۱۶ ساعت و شدت نورهای مختلف ۵۲

۳ - ۸ - منحنی تغییرات جمعیت در دوره تاریکی : روشنایی ۱۲ : ۱۲ ساعت و شدت نورهای مختلف ۵۳

۳ - ۹ - منحنی تغییرات جمعیت در دوره تاریکی : روشنایی ۱۶ : ۸ ساعت و شدت نورهای مختلف ۵۳

۳ - ۱۰ - مقایسه میانگین نرخ رشد ویژه طی ۱۲ روز کشت در شدت و دوره های نوری مختلف ۵۴

۳ - ۱۱- مقایسه میانگین غلظت سلولی طی ۱۲ روز کشت در شدت و دوره های نوری مختلف ۵۷

۳ - ۱۲- منحنی تغییرات جمعیت در دوره تاریکی : روشنایی ۲۴ : ۰ ساعت در غلظت های مختلف گلوکز ۵۸

۳ - ۱۳- مقایسه میانگین نرخ رشد ویژه طی ۹ روز کشت در دوره تاریکی : روشنایی ۰ : ۲۴ ساعت و محیط کشت های مختلف ۵۸

۳- ۱۴- مقایسه میانگین غلظت سلولی طی ۹ روز کشت در دوره تاریکی : روشنایی ۲۴ : ۰ ساعت در غلظت های مختلف گلوکز ۶۰

۳ - ۱۵- مقایسه میانگین درصد بیودیزل در جلبک *D.salina* در شدت و دوره های نوری مختلف ۶۱

۳ - ۱۶- مقایسه میانگین درصد تولید گلیسرین *D.salina* در شدت و دوره های نوری مختلف ۶۲

۳ - ۱۷- مقایسه میانگین درصد تولید بیودیزل *D.salina* در دوره تاریکی : روشنایی ۲۴ : ۰ ساعت و غلظت های مختلف گلوکز ۶۳

۳ - ۱۸- مقایسه میانگین درصد تولید گلیسرین *D.salina* در دوره تاریکی : روشنایی ۲۴ : ۰ ساعت و غلظت های مختلف گلوکز ۶۳

فصل اول

مقدمه، کلیات و مروری بر منابع

۱- مقدمه

علم جلبک شناسی یا فیکولوژی[1] از واژه یونانی فیکوز [2] به معنای علف هرز دریایی و لوگوز [3] به معنای شناخت نشات می گیرد. نام متداول جلبک یا آلجی[4] نامی است که لینه (۱۷۵۴ میلادی) دانشمند معروف سوئدی و ارائه دهنده سامانه دو نامی در طبقه بندی و نام گذاری گیاهان و جانوران، به این گروه داده است. در زبان فارسی به آن" آلگ" یا " آلگها" نیز گفته می شود که ظا هرا" برگرفته از همان واژه "جلبک" لینه است (کیا نمهر، ۱۳۸۷). جلبک ها گروهی از ارگانیزم های فتوسنتز کننده هستند که به دو دسته جلبک های ماکروسکوپی و میکروسکوپی تقسیم می شوند (Rosenberg et al., 2008). انواع ماکروسکوپی با چشم غیر مسلح قابل مشاهده هستند. اشکال میکروسکوپی تنها توسط میکروسکوپ نوری مشاهده می شوند (Rosenberg et al., 2008). جلبک های میکروسکوپی عموما" تک سلولی هستند و اهمیت بیشتری در مقایسه با انواع ماکروسکوپی دارند (Rosenberg et al., 2008). جلبک ها به دو صورت پروکاریوت (مانند جلبک های سبز - آبی) و یوکاریوت (مانند جلبک های سبز) در طبیعت وجود دارند (Mutanda et al., 2011). جلبک های پروکاریوت برخلاف انواع یوکاریوت فاقد هسته مشخص و اندامک های اصلی (دستگاه گلژی، شبکه آندوپلاسمی و میتوکندری) هستند (کیا نمهر، ۱۳۸۷). جلبک ها در زیستگاه های متفاوتی مانند اکوسیستم های آبی شور یا شیرین، خاک و حتی هوا زندگی می کنند. با این وجود، بخش قابل توجه ای از آنها در اکوسیستم های آبی ساکن هستند (Demirbas, 2010). جلبک های میکروسکوپی ساده ترین موجودات واجد کلروفیل محسوب می گردند و برخلاف گیاهان عالی فاقد ریشه، ساقه و برگ می باشند (Singh and Gu, 2010). جلبک های میکروسکوپی می توانند هتروتروف یا فتواتوتروف باشند (Brennan and Owende, 2010). جلبک های فتواتوتروف به نور خورشید، نمک های معدنی و دی اکسید کربن (منبع کربن غیر آلی) نیاز دارند (Brennan and Owende, 2010). جلبک های هتروتروف به منابع کربن آلی (مانند گلوکز و گلیسرول) نیاز دارند و می توانند در شرایط تاریکی رشد کنند. جلبک های هتروتروف می توانند غیر فتوسنتز کننده اجباری و یا اختیاری باشند (Brennan and Owende, 2010). تاریخچه تکامل و رده بندی جلبک ها بسیار پیچیده است. تا کنون طبقه بندی های مختلفی از این ارگانیزم ها ارائه شده است (Mutanda et al., 2011). مبنای طبقه بندی اولیه جلبک ها تفاوت در رنگ بود. با توجه به اینکه رنگ نسبت به نوسانات محیطی حساس بوده و تغییر می کند، با گذشت زمان و کشف میکروسکوپ الکترونی، ویژگی های دقیق تری در رده بندی جلبک ها در نظر گرفته شد (Mutanda et al., 2011). پیشرفت های مهندسی ژنتیک و متابولیک نیز سبب تغییر این رده بندی گردید. مبنای طبقه بندی جلبک ها محتوای رنگدانه، چرخه زندگی یا ساختار سلولی آنها شد. امروزه، خواص شیمیایی سلول ها، خصوصیات فیلوژنتیک و ترکیبات DNA و RNA سلول ها در طبقه بندی استفاده می شوند

[1] Phycology
[2] Phykos
[3] Logos
[4] Algae (مفرد Alga)

(Brennan and Owende, 2010). در جدیدترین رده بندی، جلبک ها در ۹ شاخه قرار می گیرند (جدول ۱- ۱ ؛ Graham and Wilcox, 2000). جلبک های میکروسکوپی توانایی ویژه ای در تولید ترکیبات بیوشیمیایی دارند (Sukenik et al., 1993). این ترکیبات در صنایع مختلف غذایی، پزشکی و صنعت تولید سوخت زیستی کاربرد دارند (Gantar, 2008). هر چند شاخه های مختلفی از جلبک ها در صنایع مختلف استفاده می شوند، اما جلبک های سبز به طور گسترده مورد توجه صنعت قرار می گیرند (Mata, 2010). علت این امر فراوانی، سهولت کشت، برداشت و فراوری زیتوده و نیز سهولت آنالیز، استخراج و خالص سازی ترکیبات بیوشیمیایی مختلف از این جلبک ها می باشد (Mata, 2010). امروزه، علم بیوتکنولوژی به دنبال یافتن محرک هایی موثر جهت افزایش نرخ رشد و محتوای ترکیبات مختلف بیوشیمیایی مانند لیپید ها در جلبک های میکروسکوپی است (Mata, 2010). به منظور افزایش بازدهی و تحریک افزایش تولید لیپید در این ارگانیزم ها، امروزه از علوم مهندسی ژنتیک و متابولیک بهره گرفته می شود (Tabatabaei et al., 2011). در مهندسی متابولیک با تغییر شرایط فیزیکی (مانند دوره نوری و شدت نور) و شیمیایی (مانند نیتروژن و شوری) محیط کشت در قالب طرح های آزمایشگاهی، بهترین شرایط مورد نیاز کشت هر گونه از جلبک به صنعت معرفی می شود (Liska et al., 2004 ; Meseck, 2005). به همین دلیل در مطالعه حاضر به بررسی روند تغییر فاکتورهای مختلف رشد و میزان تولید ترکیبات لیپیدی در جلبک سبز *Dunaliella salina* تحت تاثیر شدت و دوره های نوری مختلف پرداخته شد. امروزه از ترکیبات لیپیدی حاصل از جلبک های میکروسکوپی در صنعت تولید سوخت زیستی استفاده می شود.

فرضیات :

۱- نرخ رشد جلبک سبز *D. salina* در شدت و دوره های نوری مختلف، متفاوت است.

۲- میزان ترکیبات لیپیدی در جلبک سبز *D. salina* در شدت و دوره های نوری مختلف، متفاوت است.

۳- نرخ رشد و میزان ترکیبات لیپیدی *D. salina* (هرکدام مستقلا") با شدت و دوره های نوری همبستگی دارند.

اهداف :

۱- تعیین میزان رشد و ترکیبات لیپیدی جلبک سبز *D. salina* در شدت و دوره های نوری مختلف

۲- تعیین مناسب ترین شدت و دوره نوری مورد مطالعه در تحریک افزایش تولید ترکیبات لیپیدی و میزان رشد در جلبک سبز *D. salina* به عنوان شدت و دوره های نوری پیشنهادی جهت تولید بهینه سوخت زیستی در سیستم های کشت کنترل شده

۱- ۱- جلبک های سبز (Chlorophyta)

در جدیدترین رده بندی، جلبک ها در ۹ شاخه قرار می گیرند (جدول ۱- ۱ ؛ Graham and Wilcox, 2000). جلبک های سبز مهمترین گروه از جلبک ها می باشند (Demirbas, 2010). جزء قدیمی ترین و مقاوم ترین موجودات سطح زمین می باشند (Bold and Wynne, 1978). دانشمندان معتقدند، از حدود ۴۰۰ میلیون سال قبل، این گروه از جلبک ها از آب به خشکی انتقال یافتند و منشاء گیاهان خشکی شدند (Bold and Wynne, 1978). جلبک های سبز جزء فراوان ترین گروه از جلبک ها محسوب می شوند (Singh and Gu, 2010). پتانسیل ویژه ای در تولید ترکیبات بیوشیمیایی مختلف نظیر رنگدانه ها، اسیدهای چرب اشباع و غیراشباع، اسیدهای آمینه، اتانول، گلیسرول، گاز هیدروژن زیستی دارند (Spoehr et al., 1949 ; Franklin and Mayfield, 2004 ; Mata et al., 2010).

جدول ۱- ۱- طبقه بندی جلبک ها (Graham and Wilcox, 2000)

	گروه های جلبک	نام متداول
۱	Cyanobacteria (Chloroxybacteria)	جلبک های سبز - آبی
۲	Glaucophyta	گلاکوفیتا
۳	Euglenophyta	اوگلناها
۴	Crytophyta	کریپتوفیتا
۵	Haptophyta	هاپتوفیتا
۶	Dinophyta	داینوفلاژله یا جلبک های ۲ تاژک
۷	Ochrophyta	اوکروفیتا
	OchrophytaI → Diatoms OchrophytaII → Raphidophyceans, Chrysophyceans, Synurophyeans, Eustigmatophyceans OchrophytaIII → Pelagophyceans, Silicoflagellates, Pedinllids OchrophytaIV → Chrysomeridaleans, Phaeothminophyceans, Tribophyceans, Phaeophyceans	
۸	Rhodophyta	جلبک های قرمز
۹	Chlorophyta	جلبک های سبز *
	Chlorophyta I →Prassinophyceans Chlorophyta II →Ulrophyceans Chlorophyta III →Trebouxiophyceans Chlorophyta IV → Chlorophyceans * Chlorophyta V →Charophyceans	

* گروه (شاخه) و زیر گروه (زیر شاخه) مورد مطالعه

۱- ۱- ۱- جلبک سبز *Dunaliella salina*

۱- ۱- ۱- ۱- طبقه بندی

جلبک میکروسکوپی *Dunaliella salina* Teodoresco (۱۹۰۵) در شاخه Chlorophyta، رده Chlorophyceae، راسته Dunaliellales، خانواده Dunaliellaceae و جنس *Dunaliella* قرار دارد (Borowitzka and Siva, 2007).

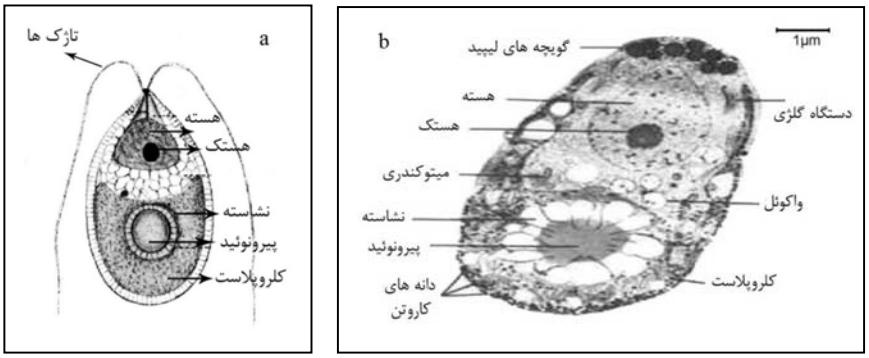
۱- ۱- ۱- ۲- ریخت شناسی

از ویژگی های ظاهری این جلبک تک سلولی، شکل بیضوی و دو تاژک آن است (Phadwal and Singh, 2003). دو تاژک، در انتهای قدامی سلول قرار دارند (شکل a ۱- ۱). طول تاژک ها در گونه های مختلف، متفاوت است (Borowitzka and Siva, 2007). این جلبک فاقد دیواره ضخیم است اما، در برابر شوری و تغییر شرایط محیط مقاوم است (Phadwal and Singh, 2003 ; Phadwal et al., 2003 ; Liska, 2004). سلول تنها توسط غشای پلاسمایی نازکی احاطه شده است (Oren, 2005). در نتیجه شکل ظاهری سلول ها تحت تاثیر تغییرات فشار اسمزی محیط کشت قرار دارد. زمانی که یک قطره از آب شور حاوی سلول های *Dunaliela* sp. روی اسلاید میکروسکوپ قرارگیرد، با تبخیر آب بدنه سلولی طویل شده و شکل خود را از دست می دهد (شکل a , b ۱- ۲). اگر قطره ای از آب شیرین به آن اضافه شود، دوباره سلول ها گرد می شوند (Teodoresco, 1905). به همین دلیل، سلول های *Dunaliela* sp. می توانند به شکل کروی، گلابی شکل یا دوکی شکل نیز مشاهده شوند (Borowitzka and Siva, 2007). اندازه سلول ها ممکن است تحت تاثیر شدت نورهای مختلف نیز تغییر کند (Borowitzka and Siva, 2007). طول سلول ها بین ۶ تا ۱۲ میکرون و عرض آنها از ۴ تا ۷ میکرون متغیر می باشد (Borowitzka and Siva, 2007). در سلول های مسن پوشش چسبناک گلیکوکالیکس، اطراف سلول را احاطه می کند (شکل c ۱- ۲). ضخامت این لایه چسبنده متغیر است و نقش آن در سلول های مسن به طور دقیق مشخص نیست (Leonardi and Caceres, 1994 ; Hatanaka et al., 1998).

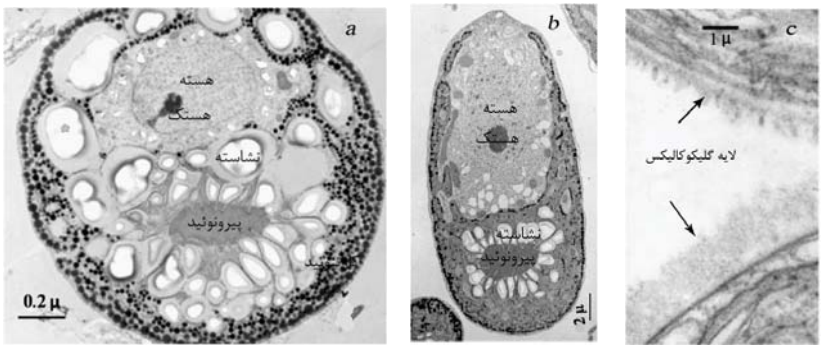
۱- ۱- ۱- ۳- خصوصیات داخل سلولی

اجزای داخل سلولی متنوعی در سلول های *D. salina*، وجود دارند (شکل a , b ۱- ۱). از جمله آنها می توان به دستگاه گلژی، میتوکندری، شبکه آندوپلاسمی، هسته، هستک، کلروپلاست واحد، گویچه های لیپید، لکه چشمی، رنگدانه های کلروفیل و بتاکاروتن، دانه های نشاسته و پیرونوئید اشاره نمود (Jaenicke, 1998 ; Oren, 2005 ; Sun et al., 2008). در کلروپلاست ساختارهایی به نام تیلاکوئید قرار دارند. رنگدانه ها، در غشای تیلاکوئیدها وجود دارند (Borowitzka, 1986 ; Oren, 2005).

تعداد لکه چشمی در نژادهای مختلف جلبک *Dunaliella* sp. از ۱ تا ۲ عدد متغیر است. برخی از نژاد ها ممکن است فاقد لکه چشمی باشند (Borowitzka and Siva, 2007).



شکل ۱- ۱- a ؛ ریخت شناسی و اجزای داخل سلولی *D. salina* و b ؛ تصویر میکروسکوپ الکترونی *D. salina* (Jaenicke, 1998 ; El-taib Heakal et al., 2010)



شکل ۱- ۲- تصویر میکروسکوپ الکترونی، a و b ؛ اشکال مختلف جلبک سبز *D. salina* ، c ؛ لایه گلیکوکالیکس (Borowitzka and Siva, 2007).

۱- ۱- ۱- ۴- فیزیولوژی

گونه های *Dunaliella* sp. می توانند در محدوده غلظت نمک ۱ تا ۴ مولار زندگی کنند. در حالی که، غلظت NaCl داخل سلولی پایینی دارند (Baas-Becking, 1931). کاهش سطح Na^+ داخل سلول، توسط فعالیت پروتئین های نا همسو بر Na^+/H^+ و نیز حامل های الکترونی زوج و خارج کننده Na^+ انجام می شود (Katz and Avron, 1985 ; Oren, 2005). این حامل ها در غشای سیتوپلاسمی سلول ها وجود دارند. با وجود ناسازگاری، بین غلظت نمک داخل و خارج سلول، تعادل اسمزی از طریق تجمع گلیسرول در فرآیند فتوسنتز انجام می گیرد (Oren et al., 1995 ; Oren, 2005 ; Chen et al., 2009).

بیشتر غشاهای زیستی نسبت به گلیسرول نفوذپذیر هستند. نفوذ پذیری غشای *Dunaliella* sp. نسبت به گلیسرول کم و غیر عادی است (Wegmann, 1971 ; Brown et al., 1982 ; Gimmler and Hartung, 1988 ; Gimmler and Weis, 1992). هرچند علت آن به طور کامل مشخص نیست اما به نظر می رسد، این پدیده سلول را قادر سازد تا گلیسرول را در داخل خود حفظ کند (Oren, 2005). تغییر غلظت NaCl محیط، می تواند سبب تغییر در غلظت گلیسرول داخل سلول گردد (Oren, 2005). امروزه در صنعت بیو تکنولوژی، از این شیوه به منظور تحریک تولید گلیسرول در این جلبک استفاده می شود (Liska et al., 2004). محلول سازگار[1] اصطلاحی است که Brown (۱۹۹۰) به محلول گلیسرول موجود در جلبک *Dunaliella* sp. داده است. محلولی که در تعادل اسمزی و کنترل واکنش های آنزیمی دخالت دارد (Oren, 2005). علاوه بر گلیسرول انواع متنوعی از ترکیبات بیوشیمیایی توسط *D. salina* سنتز می شوند. مهمترین این ترکیبات، رنگدانه بتاکاروتن و ترکیبات لیپیدی می باشند. *D. salina* منبع غنی از این ترکیبات است. تحت تاثیر استرس های محیطی (مانند تغییر در شدت نور، دوره نوری و شوری) مقادیر بالایی از این ترکیبات را تولید می کند (Borowitzka , 1995 ; Rabbani et al., 1998 ; Oren, 2005).

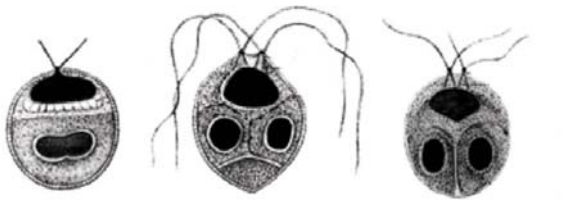
۱- ۱- ۱- ۵- تولید مثل

D. salina چرخه زندگی پیچیده ای دارد. علاوه بر تقسیم سلول های گیاهی متحرک (شکل ۱- ۳)، تولید مثل جنسی و مراحل پالملوئیدی (شکل ۱- ۴ a , b) نیز در آن مشاهده شده است (Jaenicke , 1998 ; Oren, 2005).

۱- ۱- ۱- ۵- ۱- تقسیم دوتایی

تقسیم دو تایی سلول ها با تقسیم هسته آغاز می شود. شیاری بین تاژک ها در بخش قدامی سلول ایجاد می گردد. سپس شیاری در قسمت مقابل در انتهای سلول تشکیل می شود. همزمان کلروپلاست و واحدهای پیرونوئید تقسیم می شوند. اما ۲ سلول دختر از قسمت میانی سلول توسط پل سیتوپلاسمی نازک در ارتباط هستند. در این زمان هر یک از دو سلول دختر تاژک دوم خود را نیز می سازند. یکی از تاژک ها به دور پل سیتوپلاسمی تنیده می شود تا این پل شکسته شود. به این ترتیب ۲ سلول دختر از هم جدا می شوند (شکل ۱- ۳ ؛ Borowitzka and Siva, 2007). تحت شرایط طبیعی، تقسیم دوتایی رایج ترین شیوه تولید مثل در جلبک *D. salina* می باشد (Borowitzka and Siva, 2007).

[1] Compatible solute



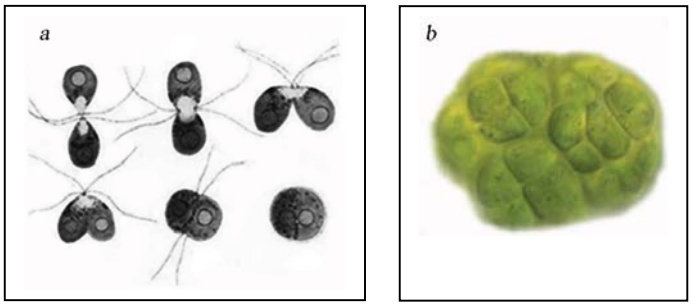
شکل ۱- ۳- تقسیم دوتایی در *D. salina* (Jaenicke, 1998)

۱- ۱- ۱- ۵-۲- تولید مثل جنسی

در تولید مثل جنسی دو گامت هم اندازه ترکیب می شوند و یک زیگوت جنسی را به وجود می آورند. تشکیل زیگوت با تغییر غلظت نمک موجود در محیط کشت مشاهده شده است. تولید مثل جنسی و تشکیل زیگوت در هنگام شوری بالا یا پایین آب مشاهده می شود (Jaenicke , 1998 ; Oren et al., 1995 ; Oren, 2005). در فرآیند تشکیل زیگوت، تاژک ها در تماس با هم قرار می گیرند و گامت ها (سلول ها) با تشکیل یک پل سیتوپلاسمی، ترکیب می شوند (شکل a ۱- ۴). زیگوت لایه خارجی ضخیمی دارد و می تواند در برابر شرایط دشوار محیط مقاومت کند. در پایان این دوره، زیگوت ها جوانه می زنند و بیش از ۳۲ سلول هاپلوئید دختر از طریق پاره شدن پاکت سلولی، آزاد می شوند (Oren, 2005).

۱- ۱- ۱- ۵- ۳- مرحله پالملوئیدی

در مرحله پالملوئیدی (سلول های گرد غیر متحرک) سلول ها تاژک و لکه چشمی خود را از دست می دهند و گردتر می شوند. سپس، لایه مخاطی لزجی را به بیرون ترشح می کنند و به سرعت در داخل آن تقسیم می شوند. به این ترتیب، توده ای از سلولهای سبز رنگ را به وجود می آورند (شکل b ۱- ۴). شرایط نا مناسب محیط کشت می تواند سبب ایجاد مراحل پالملوئیدی شود. با این وجود، زمانی که سلول ها وارد محیط کشت جدید می شوند دوباره تاژک خود را می سازند و متحرک می شوند (Borowitzka and Siva, 2007).



شکل ۱- ۴- a ؛ تولید مثل جنسی (Lerche, 1931) و b ؛ مرحله پالملوئیدی (Jaenicke , 1998)