

اثرات بازه‌ی زمانی متناوب نوردهی بر روی رشد ریزجلبک و مطالعه‌ی رفتار میکروسکوپی آن

کبریا طاهری^۱، غلامرضا رفیعی^۲، فائقه حاجی‌زاده^۱

^۱ دانشکده فیزیک، مرکز تحصیلات تکمیلی علوم پایه زنجان، زنجان

^۲ دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج

چکیده - نور عامل مهمی برای رشد سلول‌های گیاهی همچون سلول‌های ریزجلبک است، بنابراین هرگونه تغییر در شدت نور و یا نحوه‌ی تابش می‌تواند اثر مهمی بر روی نحوه‌ی رشد این نوع سلول‌ها و یا حتی ترکیبات داخلی آنها داشته باشد. هدف اصلی این کار، بررسی اثر تغییرات بازه‌ی نوردهی متناوب بر روی میزان رشد نمونه‌های ریزجلبک و تغییر ترکیبات داخلی این سلول‌ها است. در این مطالعه با تغییر بازه‌ی زمانی متناوب نوردهی بر روی نمونه‌های تحت آزمایش، بازه‌ی زمانی متناوب بهینه را بررسی کردیم. نتایج نشان می‌دهد که به ازای مدت زمان یکسان ۱۲ ساعت نوردهی در طول ۲۴ ساعت و ۶ بازه‌ی متناوب متفاوت، با کوتاه کردن بازه، رشد ریزجلبک افزایش یافته است. با توجه به اینکه ریزجلبک‌ها دارای حرکت چرخشی و انتقالی هستند، در ادامه، حرکت چرخشی این سلول‌ها را در طول مدت زمان ده روزه‌ی رشد و همینطور اثر تله‌اندازی نوری بر روی رفتار چرخشی بررسی کردیم.

کلید واژه- ریزجلبک^۳ رفتار میکروسکوپی^۴ انبرک نوری^۵ سرعت چرخشی سلول^۶ تله‌اندازی نوری

Effects Of Photoperiod On Microalgal Cells Growth And Studying Its Microscopic Behavior

Kebria Taheri¹, Gholamreza Rafiee², Faegheh Hajizadeh¹

¹Department of physics, institute for advanced studies in basic sciences (IASBS)

² Department of natural sciences, university of Tehran, Karaj

Abstract Light is an important factor for the growth of plant cells, including microalgal cells. Therefore, any changes in light intensity and the way of exposure on these cells can play an important role in changing the rate of growth or even internal compounds. The main objective of this work is to investigate how variation in the period of intermittent exposure (photoperiod) on microalgal samples affects the cell growth or its internal composition. We have tried to gain the optimum exposure photoperiod. The results show that, for the identical time period of 12 hours exposure at 24 hours and 6 different intermittent intervals, microalgal cells growth increases by shortening the time period. In the following, we examined the rotational motion of these cells during ten days period of growth and also the effects of optical trapping on cells rotational movement.

Keywords: microalgae' microscopic behavior' optical tweezers' rotational velocity of cells' optical trapping

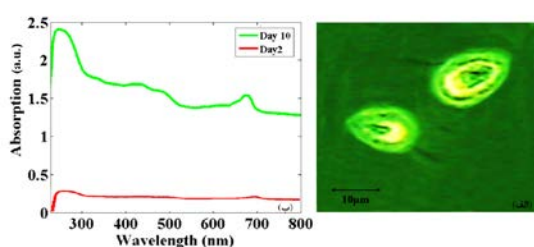
۱- مقدمه

با توجه به افزایش روزافزون مصرف سوخت‌های فسیلی و مشکلات ناشی از آن، مانند آلودگی هوا و گرم شدن زمین، دانشمندان همواره به دنبال یافتن گزینه‌ای مناسب برای جایگزینی این نوع سوخت بوده‌اند. یکی از راه‌های مناسب و مقرون به صرفه برای تولید سوخت جایگزین استفاده از تک سلولی‌های ارزشمندی مانند ریز جلبک‌ها^۱ است [۱]. از آنجا که این نوع سلول‌ها دارای ترکیبات ارزشمندی در ساختار داخلی خود هستند، گزینه‌ی مناسبی برای تولید سوخت جایگزین (سوخت زیستی)^۲ هستند. این سلول‌ها با بهره‌گیری از نور خورشید به عنوان منبع انرژی و جذب CO₂، ترکیبات شیمیایی ارزشمندی را همچون لیپید و هیدرات کربن تولید می‌کنند، که این ترکیبات می‌توانند به عنوان ماده‌ی اولیه برای تولید سوخت پاک مورد استفاده قرار گیرند [۲]. گونه‌ی ریز جلبکی *Dunaliella tertiolecta*^۳ که در این مطالعه بررسی شده است، از جمله جلبک‌های میکروسکوپی آب‌های شور و یکی از منابع غنی این مواد ارزشمند است که به گفته‌ی محققین می‌تواند تحت شرایط رشد خاص، تا حدود ۷۰٪ ترکیبات داخلی سلول را تشکیل دهند [۳]. رشد این ریز جلبک دارای سه فاز، شامل فاز رشد اولیه (۱-۲ روز)، فاز رشد نمایی (۲-۱۰ روز) و فاز مرگ یا تثبیت (۱۰ تا ۱۴ روز) است. این سلول‌ها در مقیاس‌های صنعتی از نور خورشید به عنوان منبع نور برای انجام فتوسنتز استفاده می‌کنند، در نتیجه شدت متغیر این نور و عدم دسترسی به آن در طول شب همیشه به عنوان یک مسئله مطرح بوده است. بنابراین یکی از عوامل موثر قابل بررسی بر رشد گونه‌های ریز جلبکی و شکل‌گیری ترکیبات داخلی آن‌ها، شدت نور و نحوه‌ی تابش آن است. در سال ۲۰۰۸ تعدادی از محققین نشان دادند که با تغییر چرخه‌ی شبانه‌روز و با کاهش مدت زمان شب (تاریکی) و افزایش مدت زمان روز (روشنایی) می‌توان میزان رشد و در نتیجه میزان ترکیبات ارزشمند داخلی سلول را افزایش داد [۴]. در این مطالعه

سعی کردیم برای اولین بار با تعریف بازه‌ی زمانی متناوب نوردهی و تغییر این بازه، اثر این تغییرات را بر روی رفتار این سلول‌ها و میزان رشد آن‌ها بررسی کنیم که مشخص شد با کوتاه کردن دوره‌ی متناوب زمانی می‌توان میزان رشد را افزایش داد. از طرفی سلول‌های ریز جلبکی *Dunaliella tertiolecta* ریزشناگرهایی با دو تاژک با اندازه‌های برابر هستند. وجود این تاژک‌های متحرک باعث حرکت‌های چرخشی و یا انتقالی سلول می‌شود [۵]. برای شناخت بهتر این سلول‌ها و وابستگی حرکت آن‌ها به منبع نور یکی دیگر از بررسی‌های ما در این مطالعه، بررسی سرعت چرخشی سلول‌ها تحت شرایط مختلف و به کمک تصویربرداری با سیستم میکروسکوپی بوده است. علاوه بر این اثر تله‌اندازی نوری بر روی حرکت چرخشی این شناگرها در تله‌ی نوری، برای مطالعه‌ی اثر احتمالی هر نوع تغییر رفتار میکروسکوپی سلول‌ها بر روی رشد آن‌ها مورد بررسی قرار گرفت.

۲- مواد و روش‌ها

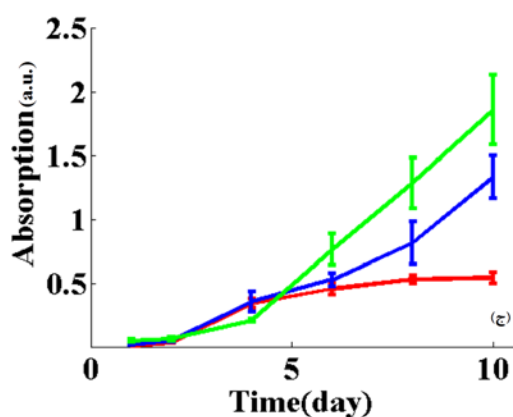
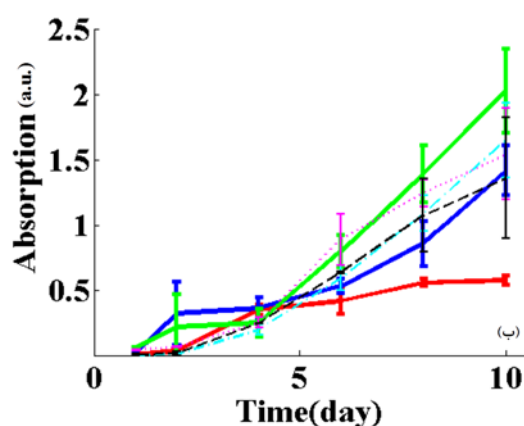
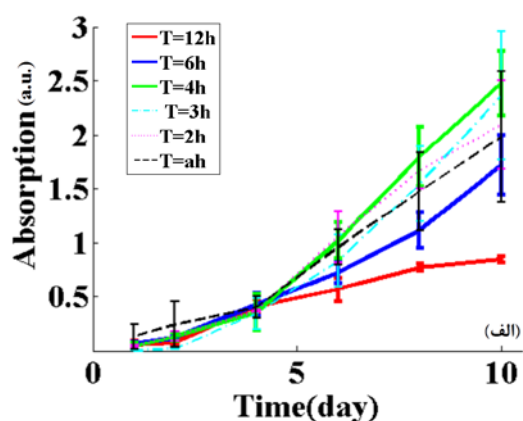
سلول‌ها در ماده‌ی رشد والن [۶]، در دمای محیط و با جذب CO₂ از طریق هوادهی از هوای اطراف با کمک پمپ و تحت تابش لامپ فلئورسنت سفید با شدت ۲۳۰۰ لومن کشت شدند. برای بررسی اثر تفاوت بازه‌ی متناوب نوردهی بر روی رشد نمونه‌ها تلاش شد با ثابت نگه داشتن تمام شرایط مورد نیاز برای رشد ریز جلبک‌ها، تنها



شکل ۱- (الف) تصویر میکروسکوپی تباین فازی تک‌سلول‌های ریز جلبکی *Dunaliella tertiolecta* که تاژک‌های آن‌ها به صورت رشته‌های تیره در اطراف سلول مشخص است. (ب) مقایسه‌ی طیف جذبی محلول حاوی سلول ریز جلبکی تحت تابش دوره زمانی متناوب نوردهی ۱ ساعته در روز اول و دهم از دوره‌ی رشد.

مدت زمان این بازه به عنوان متغیر موثر در نظر گرفته شود. تغییرات میزان رشد از روش طیف سنجی نوری به کمک دستگاه Carry5 و به صورت طیف‌گیری در

^۱ Microalgae
^۲ Biofuel
^۳ *Dunaliella Tertiolecta*



شکل ۲- نمودارهای بیشینه‌ی مقدار جذب در نمونه‌های مختلف در مدت ۱۰ روز از دوره‌ی رشد که (الف) محدوده‌ی طول موجی ۲۱۰ تا ۲۴۰ نانومتر مربوط به اسیدهای چرب، (ب) محدوده طول موجی ۴۱۰ تا ۴۴۰ نانومتر مربوط به کلروفیل a، (ج) محدوده طول موجی ۴۷۰ تا ۴۹۰ نانومتر و مربوط به β -carotene است.

دوره‌ی یک ساعته، دو ساعته و سه ساعته که در شکل ۲ (الف) و (ب)، به صورت خط‌چین نشان داده شده است، رفتار تقریباً یکسانی دارد و این مشاهدات در داده‌های ما نشان‌دهنده‌ی این امر است که تغییر در تعداد تناوب‌ها

روزهای ۱، ۲، ۴، ۶، ۸ و ۱۰ در بازه‌ی طول موجی ۲۰۰ تا ۸۰۰ نانومتر، استفاده شد. لازم به ذکر است که قبل از شروع طیف‌گیری از نمونه‌ها، طیف ظرف نمونه کوارتز حاوی محلول کشت، به عنوان طیف مرجع گرفته شد و با تنظیم نرم‌افزاری دستگاه، طیف خروجی از هر نمونه حاصل کسر طیف ظرف نمونه کوارتز حاوی محلول کشت از طیف ظرف نمونه کوارتز محلول کشت و ریزجلبک است.

شکل ۱ (الف) تصویر میکروسکوپی سلول ریزجلبکی را نشان می‌دهد. برای بررسی رفتار میکروسکوپی سلول نیز، از یک سیستم میکروسکوپی معکوس با استفاده از یک عدسی شیئی با گشودگی عددی ۱/۳ و بزرگنمایی ۱۰۰ برابر، برای تصویربرداری استفاده شده است. با استفاده از روش پردازش تصویر توسط برنامه‌ی Matlab، ۵ ثانیه از حرکت ۶۰ سلول از هر نمونه مورد بررسی قرار گرفت. برای بررسی اثر تله‌ی نوری بر روی حرکت چرخشی سلول، از یک سیستم انبرک نوری [۷]، با اتصال یک لیزر Nd:YAG با طول موج ۱۰۶۴ نانومتر به سیستم میکروسکوپی، استفاده شده و اثر توان‌های مختلف تله مورد بررسی قرار گرفته است.

۳- نتایج

شکل ۱ (ب) طیف جذبی یک نمونه‌ی ریزجلبکی را نشان می‌دهد. با توجه به اینکه برخی از مواد داخل سلولی در طول موج‌های خاصی جذب بیشتری دارند، سعی کرده‌ایم رفتار جذبی محلول‌ها را در محدوده‌ی چند طول موج مختلف مورد بررسی قرار دهیم. شکل ۲ نتایج مقدار بیشینه‌ی جذب از چند نمونه در روزهای مختلف رشد، در محدوده‌ی طول موجی (الف) ۲۱۰ تا ۲۴۰ نانومتر، (ب) ۴۱۰ تا ۴۴۰ نانومتر و (ج) ۴۷۰ تا ۴۹۰ نانومتر، نشان می‌دهد. مقدار خطای نمایش داده شده در این نمودارها انحراف میانگین از مقدار متوسط برای سه نمونه است. با توجه به اینکه در این محدوده‌های طول موجی به ترتیب جذب اسیدهای چرب، کلروفیل a، β -carotene بیشتر است [۸]، می‌توان مشاهده کرد که با کوتاه کردن زمان دوره تناوب نوردهی رشد ریزجلبک‌ها و ترکیبات ارزشمند داخل سلولی افزایش یافته است. میزان رشد برای سه

لزوما به معنای تغییر در میزان رشد نمونه‌ها نیست.

حرکت ذره در تله‌ی نوری کاملاً محدود می‌شود، این شناگرها همچنان می‌چرخند با این تفاوت که محور چرخش آنها حول راستای باریکه‌ی لیزر است (شکل ۴). نتایج مقایسه‌ی سرعت چرخش سلول‌ها در توان‌های مختلف تله‌ی نوری نشان می‌دهد که با وجود تغییر محور چرخش این سلول‌ها در تله‌ی نوری، سرعت چرخش در داخل تله نسبت به آن در خارج از تله تغییر بسیار کمی داشته است. میانگین این سرعت برای ۱۰ سلول تله‌اندازی شده برابر 0.23 ± 1.65 دور بر ثانیه به دست آمد. در ادامه مشاهده کردیم که افزایش توان لیزر تاثیر چندانی بر روی سرعت چرخش نداشته است.

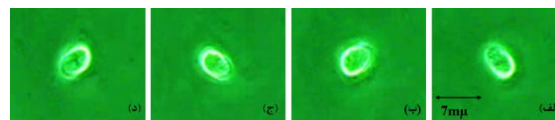
۴- نتیجه‌گیری

در این بررسی نشان دادیم که رشد سلول‌های ریزجلبکی با کوتاه کردن بازه‌ی زمانی متناوب نوردهی، از ۱۲ ساعت به ۴ ساعت، افزایش قابل توجهی می‌یابد. علاوه بر این حرکت چرخشی این ریزشناگرها مورد بررسی قرار گرفت. نتایج اولیه‌ی ما نشان می‌دهد، با وجود افزایش شدت نور و افزایش احتمالی دما در تله‌ی نوری اثر چندانی در حرکت چرخشی آن‌ها مشاهده نشده است.

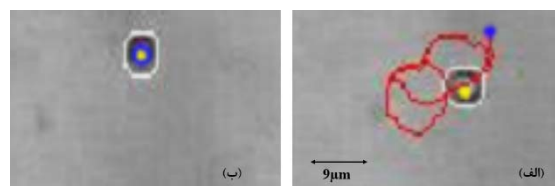
مراجع

- [1] N. Nagle, P. Lemke. "Production of methyl ester fuel from microalgae" Applied Biochemistry and Biotechnology, 24(1), 355-361. (1990).
- [2] R. H. Wijffels and M. J. Barbosa, "An outlook on microalgal biofuels," Science 329(5993), 796-799 (2010).
- [3] M. Takagi., T. Karseno Yoshida. "Effect of salt concentration on intracellular accumulation of lipids and triacylglyceride in marine microalgae *Dunaliella cells*". J. Biosci. Bioeng., 101: 223-226. (2006).
- [4] E. Jacob-Lopes, C. H. G. Scoparo, L. M. C. F. Lacerda, T. T. Franco. "Effect of light cycles (night/day) on CO₂ fixation and biomass production by microalgae in photobioreactors". chemical engineering and Processing: Process Intensification, 48(1), 306-310. (2009).
- [5] V. G. Garcés, O. Salazar-Oropeza, B. Cordero-Esquível, K. A. O'Donnell. "Induced deflagellation of *Isochrysis microalgae* in a near-infrared optical trap". Applied Optics, 54(7), 1827-1833. (2015).
- [6] A. J. Márquez. "Monitoring carotenoid and chlorophyll pigments in virgin olive oil by visible-near infrared transmittance spectroscopy. On-line application". Journal of near infrared spectroscopy, 11(3), 219-226. (2003).
- [7] A. Samadi, S. N. Seyed-Reihani. "Optimal beam diameter for optical tweezers." Optics letters 35.10 : 1494-1496.(2010).

همانطور که شکل ۲ نشان می‌دهد میزان رشد ریزجلبک‌ها در بازه‌های زمانی متناوب برای ۴، ۶ و ۱۲ ساعته به وضوح متمایز است. همچنین شکل ۲ (الف) نشان می‌دهد که میزان جذب اسیدچرب در روز دهم برای بازه‌ی زمانی متناوب ۴ ساعته نسبت به جذب آن در روز اول تقریباً ۶۳ برابر بیشتر شده است، حال آنکه میزان جذب این ماده در روز دهم برای بازه‌های ۶ ساعته و ۱۲ ساعته به ترتیب ۴۸ برابر و ۱۴ برابر مقدار آن در روز اول است و این نشان می‌دهد که اسیدچرب تولید شده در شرایط نوردهی متناوب ۴ ساعته به مراتب بیشتر از دو بازه‌ی دیگر است. برای بررسی میکروسکوپی حرکت این شناگرها، ۶۰ سلول از هر نمونه به مدت ۵ ثانیه مورد بررسی قرار گرفت. شکل (۳) حرکت چرخشی یکی از سلول‌ها را در مدت زمان ۲ ثانیه نشان می‌دهد. با اندازه‌گیری سرعت چرخشی متوسط این ۶۰ سلول با استفاده از روش پردازش تصویر در نرم‌افزار Matlab، مقدار 2 ± 0.58 دور بر ثانیه به دست آمد که این مقدار مستقل از روز طیف‌سنجی و مدت زمان بازه‌ی زمانی متناوب نوردهی بوده است.



شکل ۳- حرکت چرخشی یک سلول ریزجلبکی که سرعت آن برابر ۱/۹۸۳ دور بر ثانیه است. فاصله‌ی زمانی بین هر دو تصویر ۰/۵ ثانیه است.



شکل ۴- تفاوت محور چرخش یک سلول در (الف) خارج از تله‌ی نوری، (ب) در داخل تله‌ی نوری. نشانگر آبی مکان اولیه‌ی محور چرخش، نشانگر زرد مکان پایانی محور چرخش بعد از ۲/۳ ثانیه و منحنی قرمز رنگ رسم شده، مسیر جابه‌جایی مکان محور چرخش در این مدت زمان را نشان می‌دهد.

در ادامه، با تله‌اندازی نوری این شناگرها در تله‌ی نوری حرکت چرخشی آنها را مورد بررسی قرار داده‌ایم. نکته‌ی قابل توجه در این بررسی این است که با وجود اینکه