Archive of SID

اثر الیسیتورها و ترکیب فیتوهورمون‌ها بر رشد، محتویات رنگیزه‌های فتوسنتزی و پروتئین جلبک *Chlorella sorokiniana*

آمنه جمشیدی*[1]، محمدعلی ابراهیمی[2]، طیبه رجبیان[3]، غلامرضا بخشی خانیکی[4] و شهلا مظفری[5]

تاریخ دریافت:۹۵/۶/۱
تاریخ تصویب:۹۷/۲/۹

چکیده

جلبک کلرلا کاربرد دارویی، صنعتی و غذایی دارد. به همین دلیل بالا بردن بیوماس و متابولیت‌های آن ارزشمند است. هدف این پژوهش نیز به دست آوردن بهترین ماده یا ترکیب هورمونی برای افزایش بیوماس و متابولیت‌های ارزشمند Chlorella sorokiniana بود. در این پژوهش جلبک C. sorokiniana در محیط کشت پایهBBM)) Boldاصلاح‌شده کشت شد. به محیط‌ها نسبت‌های مختلف هورمونی نفتالن استیک اسید (NAA)، ایندول بوتیریک اسید (IBA) وکینتین (Kin)، نیترات و فسفات و تیامین پیروفسفات افزوده شد. در تیمار با 10 NAA میلی‌گرم در لیتر) Kin+(یک میلی‌گرم در لیتر) وزن خشک، محتویات رنگیزه‌های فتوسنتزی و پروتئین نسبت به شاهد افزایش معنی‌داری یافت. این صفات در تیمار با IBA+Kin وتیامین پیروفسفات اختلاف معنی‌داری را با شاهد نشان نمی‌داد بالاترین افزایش معنی دار وزن خشک، محتویات رنگیزه‌های فتوسنتزی و پروتئین نسبت به شاهد در تیمار افزایش نیترات و فسفات مشاهده شد.

واژه‌های کلیدی: بیوماس، جلبک، نیترات وفسفات، هورمون گیاهی.

مقدمه

جلبک کلرلا در صنعت غذایی، دارویی، آرایشی، غذای آبزیان، غذای دام و طیور، به عنوان بیوفیلتر و منبع بیوگاز بیواتانول و غیره مورد استفاده قرار می‌گیرد (Tate *et al.*, 2013, Zabochnicka-Swiatek, 2010). به همین دلیل بالا بردن بیوماس و متابولیت‌های آن ارزشمند است. هورمون‌های گیاهی در جلبک‌ها وجود دارند و تغییر میزان آنها ممکن است سبب تغییر رشد جلبک‌ها گردد (Bajguz & Piotrowska-Niczyporuk, 2013, Stirk *et al.*, 2013). برخی فرایندهای فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی در سلول‌های جلبکی تحت کنترل چنین هورمون‌هایی هستند (Tarakhovskaya *et al.*, 2007). اگرچه مسیر سیگنالینگ برخی از فیتوهورمون‌های جلبک‌ها هنوز ناشناخته است (Tarakhovskaya *et al.*, 2007, Lu & Xu, 2015). Skokan (۲۰۱۴) گزارش کرد که اسپیروژیر قادر به متابولیسم اکسین‌های طبیعی مثل IAAاست و دخولIAA به داخل سلول

۱. مربی گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه پیام نور تهران، ایران
* (نویسنده مسئول : **ameneh.jamshidi@gmail.com**)
۲. دانشیار گروه کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه پیام نورتهران، ایران
۳. دانشیار گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شاهد، تهران، ایران
۴. استاد گروه کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه پیام نورتهران، ایران
۵. استادیار گروه شیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه پیام نورتهران، ایران

www.SID.ir

Archive of SID

جلبک از طریق ناقلین ABC صورت می‌گیرد. محققین اثر نور و تاریکی را بر روی رشد و محتوای هورمون‌های جلبک *Chlorella minutissima* Fott &Novakova آزمایش کردند؛ بیشترین مقدار ایندول‌ها در تاریکی در محیط حاوی گلوکز ایجاد شد، درحالی‌که کشت‌های قرار گرفته در نور و تاریکی حاوی مقدار بیشتر سیتوکینین بودند (Stirk *et al.* , 2014). در مواردی اثر یک هورمون بر روی رشد یا محتوای متابولیت‌های جلبک‌ها مورد بررسی قرار گرفت؛ برای مثال اثر اکسین‌های طبیعی و سنتزی بر روی متابولیت‌ها، رشد و پاسخ آنتی‌اکسیدانی جلبک *Chlorella vulgaris* Beijerink آزمایش شد. از اکسین‌های طبیعی ایندول استیک اسید (IAA)، IBA و از اکسین‌های مصنوعی فنیل استیک اسید (PAA) و NAAمورد بررسی قرار گرفت. IAA و IBA در غلظت یک دهم میکرومولار باعث حداکثر افزایش رشد شدند. در حالی‌که NAA و PAAدر غلظت یک میکرومولار حداکثر فعالیت را نشان دادند. در این غلظت‌ها، محتوای رنگیزه‌های فتوسنتزی و پروتئین‌های محلول افزایش یافت (Piotrowska-Niczyporuk & Bajguz, 2014). در بین اکسین‌هاIAA ازIBA اثر بیشتری بر رشد داشت که بیشترین اثرخود را در ۵۰ میکرومولار نشان داد (Bajguz & Piotrowska-Niczyporuk, 2013). طبق گزارش Liuو همکاران (۲۰۱۷b)، NAA در غلظت‌های نیم، یک، یک ونیم، دو، دو ونیم میلی‌گرم در لیتر سبب افزایش رشد*C. vulgaris* گردید و حداکثر رشد در غلظت یک میلی‌گرم در لیتر مشاهده شد. در مواردی از دو یا چند هورمون برای افزایش رشد استفاده شده است. در تحقیقی اثر برهم کنش براسینواستروئیدها و سیتوکینین‌ها بر روی رشدجلبک *C. vulgaris* مورد بررسی قرار گرفت. در این بررسی از سیتوکینین‌های ترانس‌زاتین، دی فنیل اوره وکینتین استفاده شد. نتایج نشان داد که کلرلا نسبت به سیتوکینین‌ها حساسیت نشان می‌دهد. سیتوکینین‌ها با براسینواستروئیدها همکاری دارند و بالاترین اثر (تقسیم سلول‌ها، تجمع پروتئین، کلروفیل و مونوساکاریدها) در مخلوط براسینولید با ترانس زاتین به دست آمد و کمترین اثر در مخلوط ۲۸ هموکاستاسترول با ۱،۳ دی فنیل اوره حاصل شد. در اثر همکاری بین دو نوع هورمون، تعداد سلول‌ها و میزان متابولیت‌ها تقریبا به دو ونیم تا سه برابر هورمون تنها رسید (Bajguz, 2000). در پژوهشی آثار همکاری بین اکسین‌ها و براسینواستروئیدها بر روی جلبک *C. vulgaris* مورد بررسی قرار گرفت. در این بررسی اکسین‌های ایندول پیرویک اسید (IPA)،IBA و IAA به طور منفرد یا همراه با براسینواستروئیدها استعمال شد. با افزایش اکسین از یک میکرومولار تا۵۰ میکرومولار، تعداد سلول‌ها، محتوای کلروفیل، پروتئین و مونوساکاریدها افزایش یافت، ولی در غلظت۱۰۰ میکرومول همهٔ آنها کاهش یافت. حداکثر رشد و مقدار متابولیت‌ها در۵۰ میکرومولار مشاهده شد و در بین اکسین‌ها IAA حداکثر اثر را داشت. بیشترین اثر اکسین‌ها به ترتیب مربوط به IAAسپس IPAو بعد IBAبود. اکسین‌ها در همکاری با براسینواستروئیدها تکثیر سلول‌های جلبک را تحریک کرد و بالاترین تحریک در مخلوط IAA با براسینولید وکمترین تحریک در مخلوط IBA با ۲۸ هموکاستاسترول به دست آمد. مخلوط اکسین و براسینواستروئید تکثیر سلول‌ها و تجمع متابولیت‌ها (کلروفیل، پروتئین، مونوساکاریدها) را تقریباً سه تا چهار برابر بیشتر از

www.SID.ir

Archive of SID

هورمون تنها افزایش داد (Bajguz & Piotrowska-Niczyporuk, 2013). اثر تحریک‌کننده‌های بیوشیمیایی بر روی تولید بیوماس و حجم متابولیت‌ها بر روی جلبک *Chlorella sorokiniana* Shihira &.Krauss آزمایش شد. ترکیبات هورمونی NAA همراه با هورمون‌های دیگر استفاده شد. ترکیب هورمونی NAA با اکسین‌های دیگر هیچ، اثر همکاری یا تضاد نداشت و ترکیب آن با زاتین یا ژیبرلین سبب افزایش رشد گردید (Hunt *et al.*, 2010). طبق گزارش Ozioko و همکاران (۲۰۱۵)، IAA در غلظت ۱۰-۱۵ میلی‌گرم در لیتر تا روز سوم، سبب افزایش غیرمعنی‌دار وزن خشک در جلبک *C. sorokiniana* گردید. در این غلظت‌ها IAA به تنهایی و همراه با ژیبرلین، اثر معنی‌داری بر محتوای پروتئین نداشت. تغییر محیط کشت، سبب تغییر ترکیبات شیمیایی جلبک‌ها می‌شود (Sharma *et al.*, 2012). طبق گزارش، مواد غذایی، به ویژه ترکیبات نیتروژنی و فسفری، اثر زیادی بر رشد و تولید پروتئین و رنگیزه‌های جلبک‌ها دارند (Riberio *et al.*, 2013). Ramanna و همکاران (۲۰۱۴) گزارش کردندکه اوره ماده نیتروژنی مهمی برای کشت *C. sorokiniana* در فاضلاب است و افزودن آن به فاضلاب، باعث افزایش رشد این جلبک می‌شود. طبق گزارشNigam و همکاران (۲۰۱۱)، در محیط کشت *Chlorella pyrenoidosa* Chick با کاهش غلظت نیترات، بیوماس جلبک نیز کاهش می‌یافت. Ribeiroو همکاران (۲۰۱۳) اثر نیترات و فسفات را بر *Hypnea cervicornis* J. Agardh بررسی کردند. بیشترین میزان رشد جلبک در غلظت ۲۰۰ میکرومولار نیترات، در نسبت نیترات به فسفات، یک به ۱۰ به دست آمد. Ruiz و همکاران (۲۰۱۱) نیز گزارش کردندکه افزودن فسفات و ترکیبات نیتروژنی (آمونیمی و نیتراتی)، سبب رشد بیشتر *C. vulgaris*

وکاهش مواد معدنی وآلی محیط گردید. در بررسی که روی جلبک *C. minutissima* انجام پذیرفت، از مقادیر متفاوتی نیترات و فسفات استفاده شد، بیشترین میزان بیوماس، در محیط حاوی ۰/۱۲۵ گرم در لیتر نیترات سدیم و ۰/۰۷۵ گرم در لیتر دی‌پتاسیم فسفات به دست آمد. اثر هم‌افزایی نیتروژن و فسفر سبب افزایش رنگیزه‌های فتوسنتزی شد (Arora *et al.*, 2016). کاهش نیترات از ۹۰ به ۴۰،۶۰ و ۲۰ میلی‌گرم در لیتر سبب کاهش تعداد سلول‌ها و افزایش محتوای لیپید جلبک *C. vulgaris* گردید(Robles-Heredia *et al.*, 2015). Li و همکاران (۲۰۱۱) از نیترات آمونیوم، کازئین، سولفات آمونیوم و اوره به عنوان منبع نیتروژن استفاده کردند. بهترین منبع نیتروژن که سبب حداکثر رشد جلبک *C. minutissima* شد، کازئین بود. استفاده از کازئین همراه گلیسیرین سبب حداکثر رشد جلبک گردید. تیامین پیروفسفات به عنوان کوآنزیم، آنزیم‌های چرخهٔ کربس و پنتوز فسفات و متابولیسم اسیدهای امینه عمل می‌کند. به همین دلیل افزودن این ماده به محیط کشت احتمالاً باعث سریع‌تر شدن چرخه‌های رشد جلبک خواهد شد. برطبق گزارش محققین، افزودن تیامین پیروفسفات، به همراه با هورمون‌ها سبب افزایش رشد جلبک‌ها می‌گردد (Mccaffrey *et al.*, 2011). دراین تحقیق، از ترکیبی از کینتین و هورمون‌های اکسینی (طبیعی ومصنوعی)، افزایش هم‌زمان نیترات و فسفات و افزودن تیامین پیروفسفات ( ) TPPاستفاده شد تا مشخص

www.SID.ir

Archive of SID

گردد کدام یک از این ترکیبات اثر بیشتری بر رشد و مقدار متابولیت‌های جلبک *C. sorokiniana* بومی ایران دارد.

مواد و روش‌ها

مواد اولیه و شرایط رشد

جلبک *Chlorella sorokiniana* (IBRC-M 5008) از مرکز ذخایر ژنتیکی و بیولوژیکی ایران خریداری شد. مواد مورد نیاز از شرکت مرک آلمان خریداری شد. جلبک‌ها در BBMاصلاح شده (Andersen, 2005) با کمی تغییر (KH_2PO_4: ۰/۰۷۵ گرم در لیتر) کشت گردید. به محیط‌ها پنج گرم در لیتر گلوکز منوهیدرات افزوده شد. هورمون‌ها و الیسیتورها هم به محیط اضافه شدند. pH محیط با سود یک نرمال به ۶/۸ رسانده شد. ۱۰۰میلی‌لیتر محیط کشت در فلاسک‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری ریخته و سپس به مدت۲۰ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه و فشار یک اتمسفر اتوکلاو گردید. برای کشت نمونه‌ها، یک میلی‌لیتر جلبک (۰/۰۲گرم) در فاز لگاریتمی به ۱۰۰میلی‌لیتر محیط کشت تلقیح شد. فلاسک‌ها بر روی شیکر با ۱۲۵ دور در دقیقه قرار گرفت. جلبک‌ها در دمای ^{o}C ۱± ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷۲ ساعت نگهداری شدند. نور توسط لامپ‌های فلوئورسنت، حدود۵۰ مول بر متر مربع بر ثانیه تأمین شد. فتوپریود ۱۲ ساعت نور و ۱۲ ساعت تاریکی بود. وزن خشک و متابولیت‌های جلبک پس از ۷۲ ساعت کشت تعیین گردید. تیمارهایی که به محیط‌های کشت افزوده شد، طبق جدول ۱ می‌باشد. آزمایش‌ها در سال۹۴و۹۵ درآزمایشگاه پیام نور تهران شرق انجام شد.

جدول۱: نام و غلظت تیمارهای استفاده شده در محیط کشت

TPP (mg/l)	KH_2PO_4 (g/l)	K_2HPO_4 (g/l)	$NaNO_3$ (g/l)	Kin (mg/l)	IBA (mg/l)	NAA (mg/l)	treat ment medium
0	0.075	0.075	0.25	1	0	5	**A**
0	0.075	0.075	0.25	2	0	5	**B**
0	0.075	0.075	0.25	1	0	10	**C**
0	0.075	0.075	0.25	2	0	10	**D**
0	0.075	0.075	0.25	1	5	0	**E**
0	0.075	0.075	0.25	2	5	0	**F**
0	0.075	0.075	0.25	2	10	0	**G**
0	0.075	0.075	0.25	2.5	10	0	**H**
0	0.15	0.15	0.5	0	0	0	**I**
5	0.075	0.075	0.25	0	0	0	**J**
0	0.075	0.075	0.25	0	0	0	**(control) M**

www.SID.ir

Archive of SID

تخمین وزن خشک

۴۰میلی‌لیتر محیط کشت حاوی جلبک، ده دقیقه در g ۴۰۰۰سانتریفوژ شد. محلول رویی دور ریخته شد و رسوب جلبکی با آب مقطر شستشو گردید و بلافاصله در g۴۰۰۰ سانتریفوژ شد. قرص جلبکی ۷۲ ساعت در دمای ۴۰ درجه سانتیگراد قرار گرفت و سپس توزین گردید (Agrawal & Paridhavi, 2007).

اندازه‌گیری محتوای پروتئین

برای سنجش محتوای پروتئین از نمونهٔ خشک‌شده استفاده و با معرف برادفورد سنجیده شد. بدین منظور جلبک خشک‌شده با هاون پودر گردید. به پنج میلی‌گرم از مادهٔ خردشده یک میلی‌لیتر سود (نیم مولار) افزوده شد. نمونه ۱۰ دقیقه در دمای ۸۰ درجه سانتیگراد قرار گرفته وگاه‌گاهی به هم زده شد، سپس در دمای آزمایشگاه سرد گردید و در g۲۰۰۰ سانتریفوژ شد و محلول رویی به لولهٔ دیگری انتقال یافت و برای تعیین پروتئین مورد آزمایش قرار گرفت. سپس یک دهم میلی‌لیتر از محلول حاوی پروتئین به پنج میلی‌لیتر معرف برادفورد افزوده و پس از تکان دادن پس از دو دقیقه جذب در ۵۹۵ نانومتر خوانده شد. برای ترسیم منحنی استاندارد از سرم آلبومین گاوی استفاده شد *و درصد پروتئین محاسبه گردید* (*Kobayashi* et al., *2013*).

اندازه‌گیری رنگیزه‌های فتوسنتزی

یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون جلبکی در g ۴۰۰۰ سانتریفوژ شد. محلول رویی دور ریخته و قرص جلبکی فریز گردید. به جلبک‌های فریز شده چهار میلی‌لیتر متانول ۹۹/۹ درصد افزوده شد و هنگامی که جلبک‌ها کاملاً سفید شدند، در g ۲۰۰۰ سانتریفوژ و جذب محلول متانولی با اسپکتروفتومتر در طول موج‌های۶۶۵/۲، ۶۵۲/۴ و۴۷۰ نانومتر اندازه‌گیری شدند. میزان کلروفیل a،b و کاروتنویید با استفاده از روشWellburn (۱۹۹۴) محاسبه گردید.

روش نمونه‌گیری و محاسبات آماری

آزمایش‌ها با روش کاملاً تصادفی انجام گرفت. تیمارها چهار بار تکرار شد. آنالیز آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS (ویرایش سیزدهم) از مسیر Anova یک‌طرفه انجام گرفت. مقایسهٔ میانگین‌ها با استفاده از تست دانکن و معنی‌داری در سطح P≤ ۰/۰۵ تعیین و شکل‌ها با نرم‌افزارExcel رسم شد.

www.SID.ir

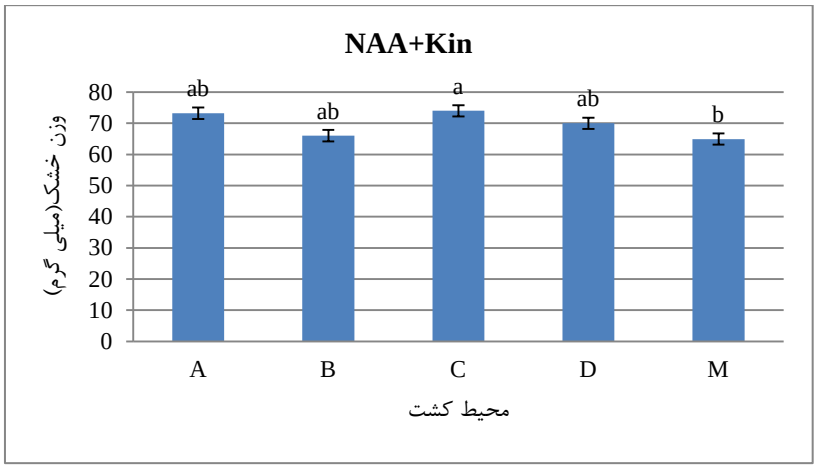
Archive of SID

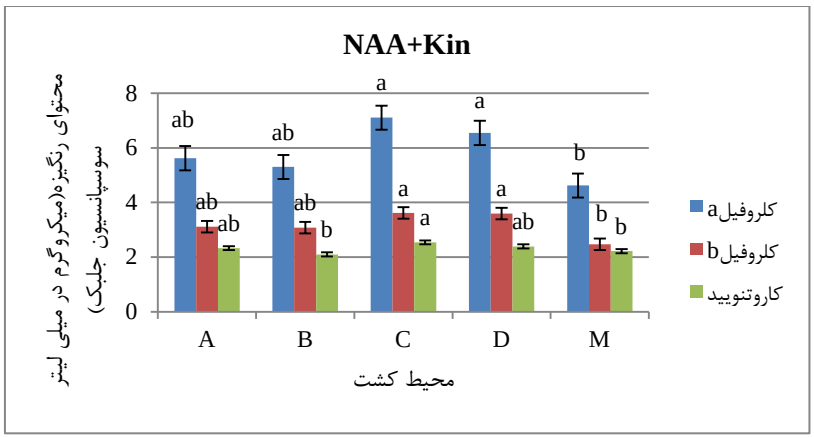
نتایج وبحث

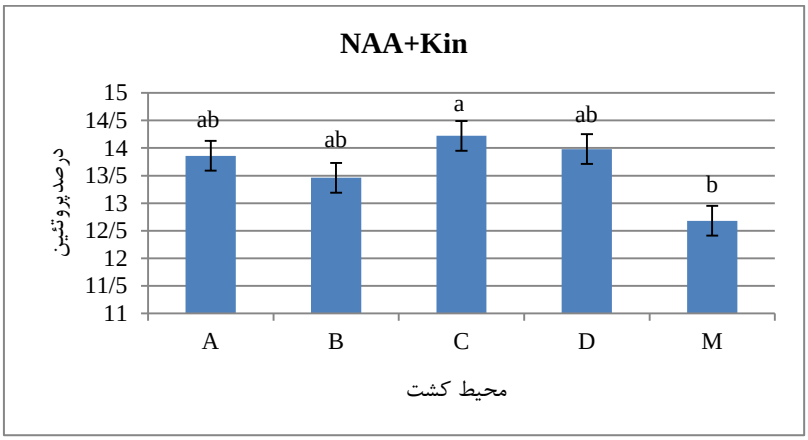
در اکثر ترکیبات NAA+Kinوزن خشک، تعداد سلول و محتویات رنگیزه‌ها نسبت به شاهد افزایش یافت. اما فقط در تیمار با NAA (۱۰میلی‌گرم در لیتر) +Kin (یک میلی‌گرم درلیتر) وزن خشک، محتویات رنگیزه‌ها و پروتئین و در تیمار با NAA (۱۰میلی‌گرم در لیتر) +Kin (دو میلی‌گرم درلیتر) محتوای کلروفیل a و b به طور معنی‌داری نسبت به شاهد افزایش یافت (شکل۱). نتایج نشان می‌دهد که بهترین محیط برای رشد و تولید متابولیت‌های این جلبک محیط NAA (۱۰میلی‌گرم در لیتر) +Kin (یک میلی‌گرم در لیتر) می‌باشد و افزایش کینتین از (یک به دو میلی‌گرم درلیتر) در هر دو غلظت NAA (۱۰ و پنج میلی‌گرم در لیتر) اکثراً سبب کاهش غیرمعنی‌دار رشد و محتوای متابولیت‌ها شد (شکل۱).

www.SID.ir

Archive of SID







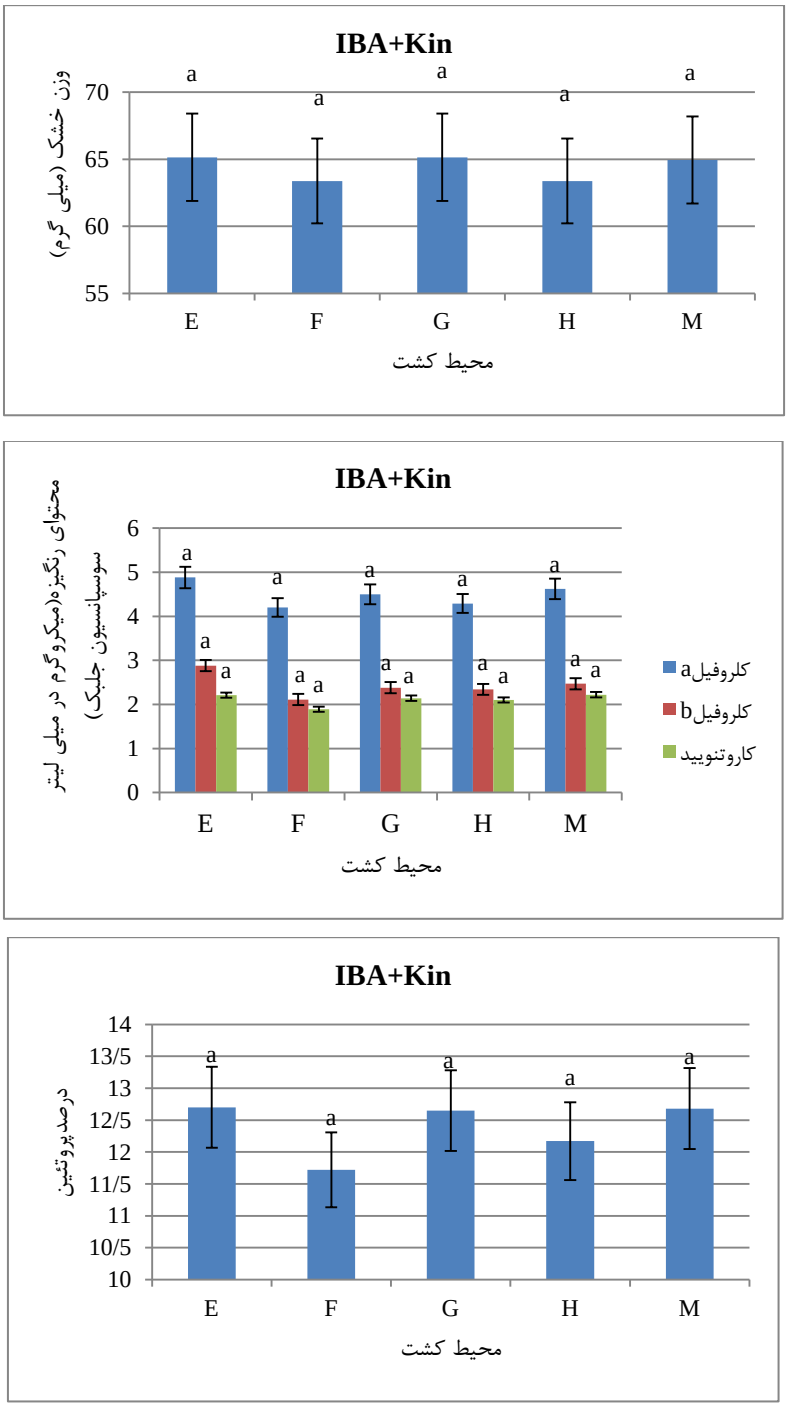
شکل۱: میزان وزن خشک ۴۰ میلی لیتر سوسپانسیون جلبک، رنگیزه‌ها و درصد پروتئین جلبک درتیماربا ترکیب

A: NAA(۵)+ Kin(۱) ،B: NAA(۵)+ Kin(۲) ،C: NAA(۱۰)+ Kin(۱) ،D: NAA(۱۰)+ Kin(۲) ،M : شاهد.

در هیچ یک از ترکیبات IBA+Kin وزن خشک، محتویات رنگیزه‌ها و پروتئین نسبت به شاهد اختلاف معنی‌داری نداشت (شکل۲).

www.SID.ir

Archive of SID



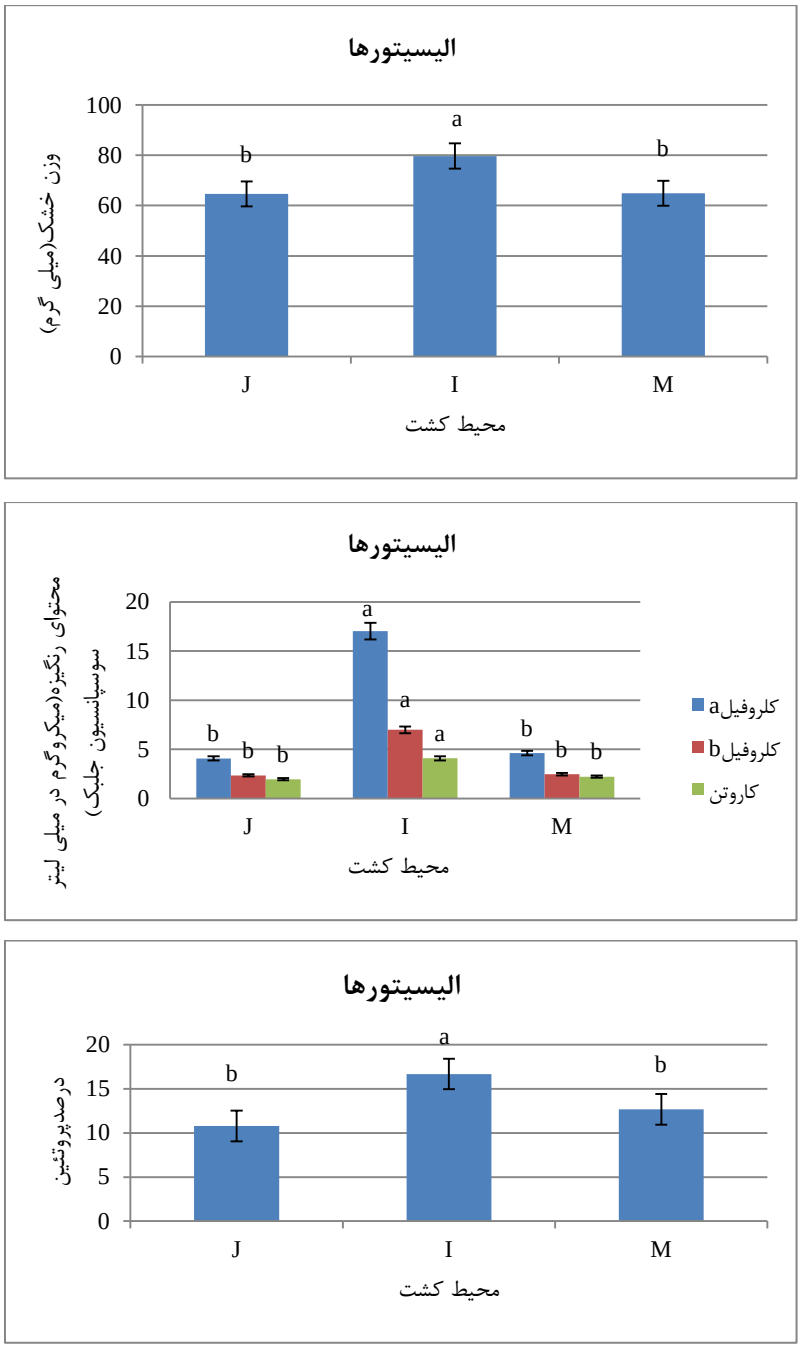
شکل۲: میزان وزن خشک ۴۰ میلی‌لیتر سوسپانسیون جلبک، رنگیزه‌ها و درصد پروتئین جلبک در تیمار با ترکیب

IBA(۱۰)+ Kin(۲/۵) :H ،IBA(۱۰)+ Kin(۲) :G ،IBA(۵)+ Kin(۲) :F ،IBA(۵)+ Kin(۱) : E :M شاهد

با تیمار دو برابر نیترات و فسفات رشد و محتوای متابولیت‌ها و رنگیزه‌ها نسبت به شاهد افزایش معنی‌داری یافت، اما افزایش تیامین پیروفسفات اثر معنی‌داری بر رشد و محتوای متابولیت‌ها نداشت (شکل۳).

www.SID.ir

Archive of SID



شکل۳: میزان وزن خشک ۴۰ میلی‌لیتر سوسپانسیون جلبک، رنگیزه‌ها و درصد پروتئین جلبک در تیمار با ترکیب

J: ۵ میلی‌گرم در لیترTPP، I: نیترات و فسفات دوبرابر، M: شاهد

مقایسهٔ کلی تیمارها با هم نشان می‌دهد که افزایش هم‌زمان نیترات و فسفات اثر افزایشی معنی‌داری بر رشد و محتوای متابولیت‌های جلبک دارد؛ در صورتی‌که ترکیب هورمونی اثر کمتری بر رشد و صفات رشد دارد (جدول۲).

www.SID.ir

Archive of SID

جدول۲: مقایسه اثر هورمون‌ها و الیسیتورها بر صفات رشد جلبک

Protein percent	(mg/l) caroten	chlorophyll b (mg/l)	chlorophyll a (mg/l)	Dry weight (mg)	treatment
16.6 a	4.09 a	6.99 a	17.04 a	79.7 a	2(nitrate+phosphate)
10.3 d	1.97 b	2.7 b	4.48 bc	70.5 ab	TPP
12.7 bc	2.2 b	2.8 b	4.8 bc	65.1 b	IBA(5)+ Kin(1)
11.7 bcd	1.89 b	2.11 b	4.2 c	63.3 b	IBA(5)+ Kin(2)
12.6 bc	2.14 b	2.38 b	4.5 bc	65.14 b	IBA(10)+ Kin(2)
12.1 bcd	2.1 b	2.34 b	4.29 c	63.3 b	IBA(10)+ Kin(2.5)
13.8 ab	2.33 b	3.11 b	5.6 bc	73.2 ab	NAA(5)+ Kin(1)
13.4 bc	2.1 b	3.08 b	5.3 bc	66 b	NAA(5)+ Kin(2)
14.2 ab	2.54 b	3.62 b	7.1 b	74 ab	NAA(10)+ Kin(1)
13.9 ab	2.39 b	3.59 b	6.55 b	70 ab	NAA(10)+ Kin(2)
12.68 bc	2.22 b	2.47 b	4.6 b	64.9 b	control

میانگین‌هایی که درهرستون و برای هرصفت دارای حروف‌مشابه می‌باشند، براساس آزمون دانکن و P≤۰/۰۵ اختلاف معنی‌داری با یکدیگرندارند

طبق گزارش محققین، اثر اکسین‌ها بر جلبک‌ها در مواردی اثر بر دیوارهٔ سلولی، فعال‌سازی پمپ ATPase و طویل شدن سلول (Stirk *et al*., 2014) و تقسیم سلولی است (Bajguz, 2000) و اثر سیتوکینین در جلبک تحریک تقسیم سلول، فعال‌سازی رشد و تولید پروتئین و تشدید برخی فرایندهای فتوسنتزی است (Kiseleva *et al.*, 2012, García-Jiménez *et al*., 1998). در این پژوهش، در تیمار با اکثر ترکیبات NAA+ Kin بیوماس و سایر صفات رشد نسبت به شاهد افزایش یافت. اما در تیمار با NAA (۱۰میلی‌گرم در لیتر) + Kin (یک میلی‌گرم در لیتر) این افزایش، معنی‌دار بود. در تیمار با NAA (۱۰میلی‌گرم در لیتر) + Kin (دو میلی‌گرم در لیتر) فقط افزایش کلروفیل‌ها معنی‌دار بود. گزارش کنونی مشابه گزارش Czerpak و همکاران (۱۹۹۴) است که هورمون NAA در غلظت ۵×۱۰^{-۵} مولار (۹/۳ میلی‌گرم در لیتر) بیشترین تأثیر را بر افزایش وزن تر، وزن خشک و محتویات کلروفیل، کاروتن، پروتئین محلول و خاکستر جلبک *C. pyrenoidosa* داشت و تقریباً مشابه گزارشات Huntو همکاران (۲۰۱۰ ، ۲۰۱۱) در مورد جلبک *C. sorokiniana* است که در مورد اول از ترکیب پنج پی پی ام، NAA + یک پی پی ام، ZT (زآتین) و در مورد دوم از ترکیب پنج پی پی ام، NAA +۵۰۰ پی پی ام، اتانول استفاده شد که به ترتیب سبب ۱۳۶ و ۱۲۰درصد افزایش رشد جلبک گردید. البته در پژوهش حاضر نیز در تیمار با NAA (پنج میلی‌گرم در لیتر) + Kin(یک و دو میلی‌گرم در لیتر) رشد و متابولیت‌ها افزایش یافت، ولی تفاوت‌ها معنی‌دار نبود. ترکیب IBA+ Kin اثر چندانی روی رشد نداشت، در همهٔ غلظت‌های IBA+ Kin رشد و محتوای متابولیت‌ها با شاهد اختلاف معنی‌داری نداشت. گزارش حاضر با گزارش Mehdizadeh Allaf (۲۰۱۳) هم‌خوانی دارد. در بعضی موارد، مثلاً ترکیبات IBA (پنج و ۱۰ میلی‌گرم در لیتر) +Kin (یک میلی‌گرم در لیتر) سبب اندکی افزایش رشد گردید که مشابه گزارش Piotrowska-Niczyporuk وBajguz (۲۰۱۴) است که تیمار IBA (۱۰ میکرومول) سبب اندکی افزایش رشد شد. طبق گزارش Ozioko و همکاران (۲۰۱۵)، کاربرد

www.SID.ir

Archive of SID

IBAدر غلظت ۱۰-۱۵ میلی‌گرم در لیتر اثر معنی‌داری بر محتویات کلروفیل و پروتئین جلبک *C. sorokiniana* نداشت که با نتایج کنونی هم‌خوانی دارد. در این پژوهش در اکثر ترکیبات IBA وNAA با Kin افزایش کینتین از (یک به دو یا دو ونیم میلی‌گرم درلیتر) سبب کاهش غیرمعنی‌دار صفات رشد گردید که با گزارش Bajguz (۲۰۱۴) هم‌خوانی دارد. در برخی موارد، محققین با کاربرد غلظت‌های هورمونی متفاوت، از پژوهش کنونی نتیجه گرفتند؛ مثلاً Liu و همکاران (a ۲۰۱۷) گزارش کردند که در تنش آمونیوم (محیط واجد یک تا۱۰۰میلی‌گرم در لیتر آمونیوم) کینتین با غلظت ۵۰ میلی‌گرم در لیتر سبب افزایش رشد (بیوماس) *C. Pyrenoidosa* گردید. طبق گزارش‌هایی NAA در غلظت پایین‌تر از پژوهش کنونی سبب رشد جلبک شد. بر اساس گزارش Liu و همکاران (b ۲۰۱۷)، NAA در غلظت‌های نیم، یک، دو و دو ونیم میلی‌گرم در لیتر سبب افزایش رشد *C. vulgaris*گردید و حداکثر رشد در غلظت یک میلی‌گرم در لیتر مشاهده شد. طبق گزارش Fu و همکاران (۲۰۰۶) نیز با استفاده از NAA در غلظت بیست وپنج صدم، دو و چهارمیلی‌گرم در لیتر بر روی جلبک *C vulgaris*. بهترین غلظت برای افزایش رشد جلبک، غلظت دو میلی‌گرم در لیتر بود. به گزارش Hunt و همکاران(۲۰۱۰)، حداکثر رشد جلبک *C. sorokiniana* درغلظت پنج پی پی ام، IBA مشاهده گردید. طبق گزارش Piotrowska-Niczyporuk وBajguz (۲۰۱۴) کاربرد یک دهم میکرو مول (دوصدم میلی‌گرم در لیتر) IBA در محیط کشت جلبک *C. vulgaris* باعث حداکثر افزایش رشد جلبک شد. احتمالاً علت اختلاف بین گزارشات متفاوت محققین، متفاوت بودن میزان هورمون‌های درونی جلبک یا متفاوت بودن گونهٔ جلبک و محتویات محیط کشت و شرایط نوری است. نتایج حاضر نیز با برخی محققین مشابه و با برخی متفاوت است. اما به‌طورکلی طبق این گزارش‌ها هورمون‌ها به شکلی سبب تغییر میزان رشد جلبک می‌شود. Kawano (۲۰۰۳) پیشنهاد کرد که اکسین ممکن است رشد سلول را از طریق مهار رادیکال آزاد اکسیژن انجام دهد. در طی سست شدن دیوارهٔ سلولی توسط اکسین، ممکن است مادهٔ اصلی مکانیزم بیوشیمیایی، رادیکال آزاد اکسیژن باشد (Kiseleva *et al*., 2012). اکسین خارجی سبب افزایش سطح فعالیت آنزیم‌های مهارکنندهٔ رادیکال آزاد اکسیژن می‌شود (Piotrowska-Niczyporuk & Bajguz, 2014). اکسین‌های طبیعی (IAA) و مصنوعی (2,4-D) می‌توانند فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان مثل کاتالاز و پراکسیداز را تحریک کنند (Szechyn ´ska-Hebda *et al*., 2007). اکسین‌های طبیعی و مصنوعی سبب کاهش تجمع رادیکال آزاد اکسیژن ظرف ۴۸ ساعت می‌گردند. کاهش رادیکال آزاد اکسیژن سبب پیشرفت چرخهٔ سلولی و تمایز دیوارهٔ ثانویهٔ سلول می‌شود. هورمون سیتوکینین نیز سبب تحریک تقسیم سلول، فعال‌سازی رشد و تولید پروتئین و تشدید برخی فرایندهای فتوسنتزی جلبک می‌شود (Kiseleva *et al*., 2012). در نتیجه فتوسنتز و رشدجلبک افزایش می‌یابد. درپژوهش حاضر، درتیمار با دو برابر نیترات و فسفات رشدومحتوای متابولیت‌ها ورنگیزه‌ها نسبت به شاهد افزایش معنی‌داری یافت. ازآن جایی‌که نیتروژن و فسفر هردو درساختار ماکرومولکول‌های آلی، مثل پروتئین‌ها واسیدهای نوکلئیک شرکت می‌کنند، افزایش آنها سبب

www.SID.ir

Archive of SID

افزایش رشد می‌گردد(Fried *et al.*, 2003). در این شرایط نیترات و فسفات به شکل پروتئین و رنگیزه‌های فتوسنتزی درمی‌آیند (Ribeiro *et al.*, 2013) و سبب افزایش معنی‌دار این مواد شده، رنگیزه‌های فتوسنتزی هم سبب افزایش فتوسنتز و رشد می‌گردند. Nigam و همکاران (۲۰۱۱) نشان دادند که افزایش نیترات پتاسیم از پنج صدم به چهار دهم گرم در لیتر سبب افزایش رشد جلبک *C. pyrenoidosa* شد که گزارش‌های این محققین با نتایج کنونی هم‌خوانی دارد. Mccaffrey و همکاران (۲۰۱۱) از تیامین پیروفسفات همراه با هورمون‌ها استفاده کردند و سبب رشد بیشتر جلبک کلرلا شدند. در پژوهش حاضر کاربرد تنهای تیامین پیروفسفات افزایش معنی‌داری در رشد و متابولیت‌های جلبک ایجاد نکرد و این موضوع نشان می‌دهد که در صورت کمبود مواد اصلی سازندهٔ ماکرومولکول‌ها، وجود فراوان کوآنزیم کم‌اثر یا بی‌اثر است.

نتیجه گیری

طبق نتایج کنونی، برای رشد جلبک *C. sorokiniana* وجود مواد معدنی (نیترات وفسفات) سازندهٔ ماکرومولکول‌ها از وجود هورمون‌ها مؤثرتر است؛ زیرا هورمون‌ها به طریقی سبب افزایش تقسیم یا طویل شدن سلول‌ها می‌شوند که برای هر دوی این فعالیت‌ها نیاز به مواد اولیهٔ سازندهٔ ماکرومولکول‌های سازنده سلول می‌باشد. مقایسهٔ کلی بین تیمارها نشان می‌دهد که افزایش هم‌زمان نیترات و فسفات نسبت به کاربرد هورمون‌ها اثر بیشتری بر رشد و محتوای متابولیت‌های جلبک دارد. به همین علت استفاده از آن برای افزایش بیوماس و تولید متابولیت‌های این جلبک مناسب‌تر است.

منابع

Agrawal, S.S. and Paridhavi, M. (2007) Herbal Drug Technology. Universities Press, 730Pp, Hyderabad.

Andersen, R. A. (2005) Algal Culturing Techniques. Elsevier Inc, 578Pp, New York.

Arora, N., Patel, A., Pruthi, P. A. and Pruthi, V.(2016) Synergistic dynamics of nitrogen and phosphorous influences lipid productivity in *Chlorella minutissima* for biodiesel production. Bioresource Technology 213 : 79–87.

Bajguz, A. and Piotrowska-Niczyporuk, A. (2013) Synergistic effect of auxins and brassinosteroids on the growth and regulation of metabolite content in the green alga *Chlorella vulgaris* (Trebouxiophyceae). Plant Physiology and Biochemistry 71:290-7.

Bajguz, A. (2000) Effect of brassinosteroids on nNucleic acids and protein content in cultured of *Chlorella vulgaris*. Plant Physiology and Biochemistry 38: 209–215.

Bajguz, A. and Piotrowska-Niczyporuk, A. (2014) Interactive effect of brassinosteroids and cytokinins on growth, chlorophyll, mono saccharide, and protein content in the green alga *Chlorella vulgaris* (Trebouxiophyceae). Plant Physiology and Biochemistry 80:176-83.

Czerpak, R., Bajguz, A., Białecka, Ba., Wierzchołowska, L. E. and Wolańska , M. M. (1994) Effect of auxin

www.SID.ir

Archive of SID

precursors and chemical analogues on the growth and chemical composition in *Chlorella pyrenoidosa*, Acta Societatis Botanicurm Poloniae 63: 279-286.

Fried, S., Mackie, B. and Nothwehr, E. (2003) Nitrate and phosphate levels positively affect the growth of algae species found in Perry Pond. Tillers 4: 21-24.

Fu, L., Wei-feng, L. and **Xiang-gen, SH. (2006)** The Effects of NAA on the growth, chlorophyll and protein content of *Chlorella vulgaris*. Journal of Yancheng Institute of Technology 2: 917-921.

García-Jiménez, P., Rodrigo, M. and Robaina, R.R. (1998) Influence of Plant growth regulators, polyamines and glycerol interaction on growth and morphogenesis of carposporelingsof *Grateloupia doryphora* cultured in vitro. Journal of Applied Phycology 10 :95–100.

Hunt, R.W., Chinnasamy S., Bhatnagar, A. and Das, K.C. (2010) Effect of biochemical stimulants on biomass productivity and metabolite content of the microalgae, *Chlorella sorokiniana*. Applied Biochemistry and Biotechnology 162: 2400-2410.

Hunt, R.W., Chinnasamy, S. and Das, K.C. (2011) The effect of naphthalene-acetic acid on biomass productivity and chlorophyll content of green algae, coccolithophore, diatom, and cyanobacterium cultures. Applied Biochemistry and Biotechnology164:1350–1365.

Kawano, T. (2003) Roles of reactive oxygen species-generating peroxidase reactions in plant defense and growth induction. Plant Cell Reports. 9:829–837.

Kiseleva, A.A., Tarachovskaya, E.R. and Shishova, M.F. (2012) Biosynthesis of phytohormones in algae. Russian Journal of Plant Physiology 59: 595-610.

Kobayashi, N., Noel, E., Barnes, A., Watson, A., Rosenberg, J., Erickson, G. and Oyler, G. (2013) Characterization on three Chlorella sorokiniana strains in anaerobic digested effluent from cattle manure. Bioresource Technology 150: 377–386.

Li, Z., Yuan, H., Yang, J.Sh. and Li, B.Z. (2011) Optimization of the biomass production of oil algae Chlorella minutissima UTEX2341. Bioresource Technology 102 9128–9134.

Lu, Y. and Xu, J. (2015) Phytohormones in microalgae: a new opportunity for microalgal biotechnology. Trends in Plant Science 20: 273-282.

Lui, J., Qiu, W., Song, Y., Peng, H. and Zhao, Y. (2017a) The growth and lipid productivity of *Chlorella pyrenoidosa* enhanced by plant hormones under ammonium stress. Environmental Progress & Sustainable Energy 0 : 1-7.

Lui, T., Liu, F., Wang, C., Wang, Z. and Li, Y. (2017b) Lipid accumulation in *Chlorella vulgaris* by supplementation of synthetic phytohormone analogs. Bioresource Technology 232: 44-52.

Mehdizadeh Allaf, M. (2013) Effect of plant hormones on the production of biomass and lipid in microalgae. Thesis (Master of Engineering Science) University of Western Ontario London, Ontario Canada. Pp109.

Nigam, S., Prakash Rai, M. and Sharma, R. (2011) Effect of nitrogen on growth and lipid content of *Chlorella pyrenoidosa*. American Journal of Biochemistry and Biotechnology 7 : 124-129.

Ozioko, F.U., Chiejina, N.V. and Ogbonna, J.C. (2015) Effect of some phytohormones on growth characteristics of *Chlorella sorokiniana* IAM-C212 under photoautotrophic conditions. African Jounal of Biotechnology 14: 2367-2376.

Piotrowska-Niczyporuk, A. and Bajguz, A. (2014) The effect of natural and synthetic auxins on the growth,

www.SID.ir

Archive of SID

metabolite content and antioxidant response of green alga *Chlorella vulgaris* (Trebouxiophycea). Plant Growth Regulator 73:57–66.

Ramanna, L., Guldhe, A., Rawat, I. and Bux, F. (2014) The optimization of biomass and lipid yields of *Chlorella sorokiniana* when using wastewater supplemented with different nitrogen sources. Bioresource Technology 168:127-131.

Ribeiro, A., Tesima, K., Souza, J. and Yokoya, N. (2013) Effects of nitrogen and phosphorus availabilities on growth, pigment, and protein contents in *Hypnea cervicornis* J. Agardh (Gigartinales, Rhodophyta). Journal of Applied Phycology 25: 1151-1157.

Robles-Heredia, J.C., Sacramento-Rivero, J.C., Canedo-López, Y., Ruiz-Marín, A. and Vilchiz-Bravo, L. E. (2015) Amulti stage gradual nitrogen reduction strategy for increased lipid productivity and nitrogen removal in wastewater using *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus obliquus.* Brazilian Journal of Chemical Engineering 32: 335 – 345.

Ruiz, J., Alvarez, P., Arbib, Z., Garrido, C., Barrag´an, J. and Perales, J.A. (2011) Effect of nitrogen and phosphorus concentration on their removal kinetic treated urban wastewater by *Chlorella vulgaris*. International Journal of Phytoremediation 13:884-96.

Sharma, R., Singh, G.P. and Sharma, V.K. (2012) Effects of culture conditions on growth and biochemical profile of *Chlorella vulgaris*. Journal of Plant Pathology and Microbiology 3: 1000131.

Srivasatava, L.M. (2002) Plant growth and development: hormones and environment. Academic Press. 772 pp, San Diego.

Stirk, W.A., Bálint, P., Tarkowská, D., Novák, O., Strnad, M., Ördög, V. and Van Staden, J. (2013) Hormone profiles in microalgae: gibberellins and brasinosteroids. Plant Physioloy and Biochemistry 70:348-53.

Stirk, W.A.,Bálint, P.,Tarkowská, D.,Novák, O., Maróti, G.,Ljung, K., Turečková, V.,Strand, M.,Ordög, V. and Staden, J. (2014) Effect of light on growth and endogenous hormones in *Chlorella minutissima* (Trebouxiophyceae). Plant Physioloy and Biochemistry 79: 66-76.

Szechyn ´ska-Hebda, M., Skrzypek, E., Da˛browska, G., Biesaga-Kos ´cielniak, J., Filek, M. and Wedzony, M. (2007) The role of oxidative stress induced by growth regulators in the regeneration process of wheat. Acta Physiologia Plantarum.29:327–33.

Tarakhovskaya, E.R.,. Maslov, Y.I. and Shishova, M. (2007) Phytohormones in algae. Russian Journal of Plant Physiology 54:163-170.

Tate, J.J., Gutierrez-Wing, M.T., Rusch, K.A. and Benton, M.G. (2012) The effects of plant growth substances and mixed cultures on growth and metabolite production of green algae *Chlorella sp.*: A Review. Journal of Plant Growth Regulation 32:417–428.

Wellburn, A.R. (1994) The spectral determination chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. Journal of Plant Physiology 144: 307-313.

Yokoya, N.S. and Handro, W. (1996) Effects of auxins and cytokinins on tissue culture of *Grateloupia dichotoma* (Gigartinales, Rhodophyta). Hydrobiology 326/327: 393–400.

Zabochnicka-Swiatek, M. (2010) Algae feedstock of the future. Archivum Combustionis 30 : 225–236.

www.SID.ir