magiran.com

بررسی اثر غلظت‌های مختلف عنصر کلسیم بر میزان رشد و بیوماس جلبک سبز *Chlorella vulgaris*

سید محمد صلواتیان و مریم فلاحی

Salavatian_2002@yahoo.com

بخش بیوتکنولوژی، مرکز تحقیقات ماهیان استخوانی دریای خزر،

بندرانزلی صندوق پستی: ۶۶

تاریخ ورود: اردیبهشت ۱۳۸۳ تاریخ پذیرش: شهریور ۱۳۸۳

چکیده

در این تحقیق اثر غلظتهای مختلف عنصر کلسیم بر میزان رشد و بیوماس جلبک سبز *Chlorella vulgaris* به مدت یکسال (۸۲-۱۳۸۱) در مرکز تحقیقات ماهیان استخوانی دریای خزر، بندرانزلی بصورت آزمایشگاهی مورد بررسی قرار گرفت.

این آزمایش با ۷ تیمار و یک شاهد در سه تکرار (در مجموع ۲۴ عدد) با استفاده از استوک خالص جلبک سبز کلرلا ولگاریس و محیط کشت زایندر Z-8±N (با تغییرات غلظت کلسیم در تیمارها) در شرایط آزمایشگاهی (دمای۲± ۲۵ درجه سانتیگراد و شدت نور ۳۵۰ ±۳۵۰۰ لوکس) برای مدت ۹۶ ساعت انجام پذیرفت. پس از مدت مذکور، بوسیله دستگاه اسپکتروفتومتر (طیف سنج) میزان جذب نمونه‌ها در طول موج ۷۵۰ نانومتر خوانده شد. علاوه بر آن شمارش جلبک کلرلا ولگاریس با استفاده از لام توما در دو مرحله شروع آزمایش و پایان آزمایش صورت گرفت. با توجه به آنالیز داده‌ها و استفاده از نرم‌افزار SPSS نتایج بدست آمده نشان داد که غلظت موثر کلسیم در محدوده ۰/۱ تا ۱۵ میلی‌گرم در لیتر بوده و میزان مؤثر کلسیم نیز برای حداکثر رشد این جلبک ۲/۸ میلی‌گرم در لیتر می‌باشد. در حالی که مقدار آنها در محیط کشت شاهد ۹/۲ میلی‌گرم در لیتر بود. میزان شمارش سلولی در غلظت فوق به مقدار ۱۷۵۷۵۶۷۵عدد سلول در هر میلی‌لیتر، میزان جذب به ۰/۵۴۲ و میزان بیوماس جلبکی به ۱۷۶۷۶ عدد در هر میلی‌لیتر رسید.

با آزمایشاتی که انجام شد رشد و بیوماس جلبک کلرلا در مقادیر یاد شده بیشتر بوده و مقادیر بالاتر از این اعداد می‌تواند رشد بازدارنده داشته باشد. از اینرو می‌توان محیط اصلاح شده زایندر را بعنوان یک نظریه جدید مطرح نمود.

لغات کلیدی: کلسیم، کلرلا ولگاریس، *Chlorella vulgaris*، محیط کشت زایندر

magiran.com

مقدمه

جلبک *Chlorella vulgaris* از شاخه جلبکهای سبز (Chlorophyta) می‌باشد. فیتوپلانکتونها با استفاده از اشعه خورشید و مواد غذایی موجود در درون آب از طریق عمل فتوسنتز مواد غذایی مورد نیاز خود را ساخته و به مصرف می‌رسانند. آنها جهت رشد به نور، CO_2، شوری، pH مناسب، مواد مغذی، مواد غذایی و برخی از آنها به ویتامینها و سایر مواد نیازمند می‌باشند (صلواتیان، ۱۳۸۲).

با توجه به اینکه جلبکهای مختلف تحت شرایط محیطی متفاوت دارای رشد یکسانی نخواهند بود و با توجه به اهمیت اقتصادی این جلبکها در زمینه‌های غذایی، دارویی، ویتامینی و غیره، ضرورت رشد سریعتر و ارزانتر احساس می‌گردد. از اینرو با تغییر بعضی از عناصر غذایی می‌توان میزان رشد و تراکم سلولی را به حداکثر مقدار خود بخصوص در مقادیر انبوه رساند. لذا می‌بایست مطالعاتی بر روی تاثیر میزان این عناصر روی واریته‌ها و گونه‌های بومی کشورمان صورت گیرد تا بتوان گامی جهت خودکفایی و رفع مشکلات آبزی‌پروری برداشت.

کلسیم در شرایط طبیعی همیشه بیش از نیاز جلبکها وجود دارد. نقش کلسیم در غشاء سیتوپلاسمی و دیواره سلولی آنها می‌باشد. گاهی اوقات عنصر استرانسیوم در بعضی از جلبکها که نیاز کمی به کلسیم دارند جانشین شده و کلسیم بصورت کلسیت و آراگونیت در غشاء خارجی و داخلی دیواره سلولهای جلبکی ذخیره می‌شود. در بعضی از جلبکها مثل گلوتریشیا، کلسیم می‌تواند در ماده موسیلاژی دیواره سلولی ذخیره شود. کلسیم در اسکلت سلولی نقش مهمی داشته و بعضی از جلبکهای نظیر دزمیدها (Desmide) کلسیم دوست هستند (Round, 1975).

با توجه به اهمیت کلرلا ولگاریس در بحث آبزی پروری (فلاحی و همکاران، ۱۳۸۲) و سایر صنایع و استفاده‌های روزافزونی که از این نوع جلبک بعمل می‌آورند (استفاده‌های غذایی برای انسان در کشورهایی مانند تایوان، استفاده‌های دارویی، ویتامینی و غیره ....) لزوم این بررسی احساس می‌شود.

طبق مطالعات انجام شده، میزان عنصر کلسیم در محیط‌های آبی مختلف از کمیت متفاوتی برخوردار بوده و با توجه به اینکه در زمینه تعیین میزان مقادیر موثر این عناصر در رشد (آستانه بردباری) جلبک کلرلا ولگاریس تحقیقی در ایران صورت نگرفته، لذا یکی از مهمترین دلایل انتخاب این مطالعه تعیین میزان حد آستانه بردباری و اثرات غلظتهای مختلف این عنصر بر تراکم فیتوپلانکتون کلرلا ولگاریس است.

مواد و روش کار

ابتدا باید جلبک کلرلا را خالص نمود، برای اینکار باید نمونه‌ای از آب محیط طبیعی که از تور فیتوپلانکتونی ۲۰ میکرون عبور داده شده را به اطاق کشت که توسط اشعه ماوراء بنفش (UV) استریل

magiran.com

شده منتقل و توسط میکروسکوپ اینورت خالص‌سازی و در محیط کشت زایندر در دمای ۲۳ الی ۲۵ درجه سانتیگراد و نور ۳۰۰±۳۵۰۰ لوکس کشت نیمه انبوه داد.

جهت انجام آزمایشات تاثیر کلسیم بر روی این جلبک از روش استاندارد Selenastrum bottle test (Miller *et al.*, 1978) و TRS , 1984 و محیط کشت زایندر (Miller *et al.*, 1978 ; Komarek, 1973) استفاده گردید. در این بررسی ۷ تیمار با غلظتهای مختلف کلسیم در ۲۵۰ سی سی محیط کشت و یک نمونه شاهد استفاده شد (جدول ۱) که هر یک در سه تکرار مورد بررسی قرار گرفت. لازم به ذکر است که غلظتهای فوق پس از آزمایشات متعددی بدست آمدند.

جدول ۱ : غلظت مصرفی کلسیم برحسب ppm با توجه به تیمارها

تیمارها	غلظت مصرفی کلسیم
شاهد	۹/۲ شاهد
۱	۰/۱
۲	۰/۲۰
۳	۰/۵۳
۴	۱/۲۱
۵	۲/۸
۶	۶/۴۵
۷	۱۵

پس از آماده سازی محیطهای کشت در تیمارها و شاهد از نمونه خالص جلبک کلرلا ولگاریس به میزان یک میلی گرم در لیتر در تیمارها و شاهد ریخته شد (Piri & Ordog, 1997). پس از همگن نمودن، پنج سی سی از این محلول جهت شمارش اولیه جلبکی برداشت گردید. در مرحله بعدی جهت هوادهی با پی‌پت های هوا همراه با فیلتر، سر ارلن ها بسته و به میزهای کشت با شرایط دمای۲۳ الی ۲۵ درجه سانتیگراد و میزان نور ۳۰۰±۳۵۰۰ لوکس بمدت ۹۶ ساعت منتقل شدند. پس

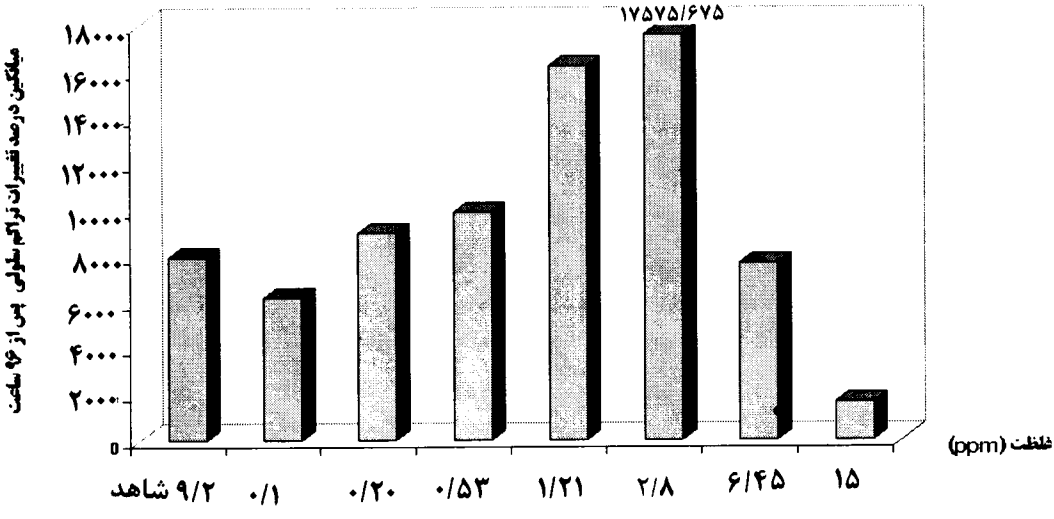
magiran.com

از این مرحله، پنج سی سی از هر تیمار جهت شمارش ثانویه جلبکی برداشت و میزان جذب در طول موج ۷۵۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر یادداشت می گردد .

جهت آنالیز داده‌ها از آزمون توکی برای مقایسه میانگین رشد در تیمارهای مختلف و رگرسیون جهت ارتباط بین غلظت کلسیم و رشد کلرلا و همچنین از آزمون مقایسه چند دامنه LSD و نرم افزار SPSS و برای ترسیم نمودارها و جداول از نرم افزار Excel استفاده شد .

نتایج

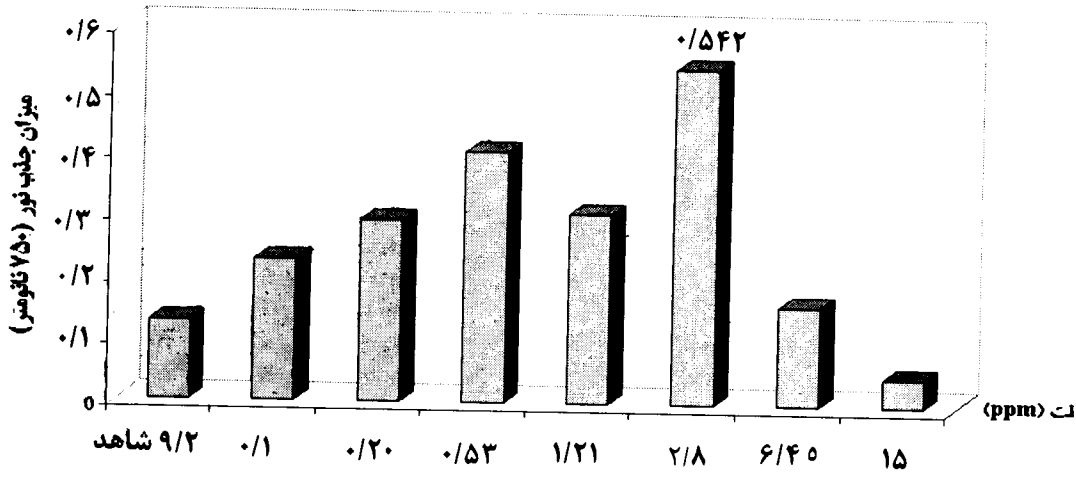
غلظت موثر عنصر کلسیم بر جلبک سبز کلرلا ولگاریس پس از انجام آزمایشات متعدد بین ۰/۱ تا ۱۵ میلی‌گرم در لیتر تعیین گردید. میانگین شمارش اولیه و ثانویه نمونه‌ها در یک میلی‌لیتر و میانگین درصد تغییرات تراکم سلولی نسبت به شاهد برای عنصر کلسیم در نمودار یک ارائه شده است که طبق آن، بیشترین میانگین درصد تغییرات تراکم سلولی در غلظت ۲/۸ میلی‌گرم در لیتر بوده است.



نمودار ۱: تاثیر عنصر کلسیم بر میانگین درصد تغییرات تراکم سلولی جلبک *Chlorella vulgaris* پس از ۹۶ ساعت

با توجه به غلظتهای مختلف عنصر کلسیم، میزان جذب پس از ۹۶ ساعت رشد در نهایت توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (طیف سنج) با طول موج ۷۵۰ نانومتر خوانده شد. نتایج نشان داد که بیشترین میزان جذب در غلظت ۲/۸ میلی‌گرم در لیتر برای عنصر کلسیم می‌باشد (نمودار ۲).

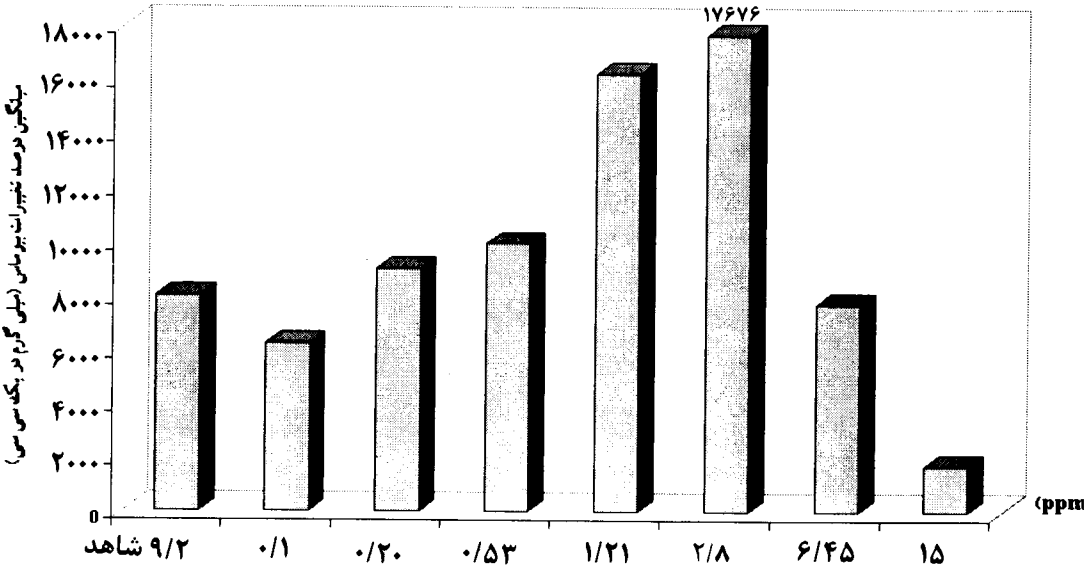
magiran.com



نمودار ۲: تاثیر غلظتهای مختلف عنصر کلسیم بر میزان جذب جلبک *Chlorella vulgaris*

با کاهش شمارش اولیه از ثانویه و نیز مقایسه میزان جذب در طول موج ۷۵۰ نانومتر در تیمارهای مختلف و نمونه شاهد می‌توان درصد افزایش رشد را محاسبه و بهترین غلظت کلسیم که بالاترین رشد جلبک در آن صورت می‌گیرد را ارائه نمود.

در این بررسی مقادیر بیوماس جلبک کلرلا ولگاریس در غلظتهای مختلف نیز تعیین گردید. بر این اساس طبق (نمودار ۳) بالاترین عدد میانگین درصد تغییرات بیوماس نیز در غلظت مصرفی ۲/۸ میلی‌گرم در لیتر کلسیم بود که مطابق با اطلاعات حاصله از روش شمارش سلولی می‌باشد.



نمودار ۳: تاثیر عنصر کلسیم بر میزان بیوماس جلبک *Chlorella vulgaris*

magiran.com

بحث

نتایج نشان دادند که غلظت کلسیم از ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر تا ۲/۸ میلی‌گرم در لیتر بتدریج رشد کلرلا ولگاریس را افزایش داده و در غلظت ۲/۸ بیشترین تراکم را موجب گردیده است. با افزایش غلظت کلسیم از ۲/۸ میلی‌گرم در لیتر تاثیر بازدارنده عنصر کلسیم در روند افزایشی تراکم سلولی بوضوح نمایان می‌گردد. این مسئله در میزان جذب و بیوماس نیز مشخص می باشد. لذا غلظت‌های بسیار کم یا زیاد این عنصر می‌تواند برای جلبک کلرلا ولگاریس نقش ممانعت از رشد و تغییرات pH را داشته باشد. بطور کلی طبق نمودارهای ۱، ۲ و ۳ در محدوده تیمارهای ۱ تا ۳ روند تاثیر کلسیم بر این جلبک از افزایش تدریجی برخوردار بود اما در غلظت‌های بالاتر و پایین‌تر تاثیر در کاهش رشد عمده می‌باشد.

Warburg در سال ۱۹۱۹ کاربرد جلبک کلرلا را در مطالعات فتوسنتزی عنوان نمود. سلولها در یک محلول غذایی مثلا Knop کشت داده شدند که این محیط کشت برای تقویت رشد و نمو گیاهان عالی هم استفاده می‌شد. این محیط کشت شامل نیترات کلسیم، سولفات منیزیم، فسفات دی هیدروژن پتاسیم، نیترات پتاسیم (یا کلرید پتاسیم) و کلرید آهن ۳ ظرفیتی در آب بود. عناصر معدنی مورد نیاز مطرح شده برای رشد جلبکهای سبز نیتروژن، فسفر، پتاسیم، منیزیم، کلسیم، گوگرد، آهن، مس، منگنز و روی می‌باشند (Krauss, 1958 ; Okelly, 1968). Walker در سال ۱۹۵۳ نشان داد زمانی که نیترات تنها منبع نیتروژن در رشد *Chlorella pyrenoidosa* باشد، کلسیم و مس مورد نیاز می‌باشد.

نتایج آماری طبق آزمون مقایسه چند دامنه LSD نشان داده که بین تیمارهای مختلف اختلاف معنی‌دار وجود دارد($P<0.05$). بنابراین غلظتهای مختلف کلسیم بر روی رشد جلبک سبز کلرلا تاثیرات مختلفی داشته و رشد در غلظتهای مختلف معنی‌دار می‌باشد.

تشکر و قدردانی

از همکاریهای ارزشمند جناب آقای دکتر خانی پور ریاست محترم مرکز تحقیقات ماهیان استخوانی دریای خزر و معاونین محترم ایشان به جهت فراهم نمودن زمینه‌های لازم در انجام هر چه بهتر تحقیق و از همکاران محترم بخش بیوتکنولوژی مرکز برای مساعدتهای لازم در زمینه اجرای پژوهش و جناب آقای دکتر رضا رجبی‌نژاد به جهت راهنمائیهای لازم در کلیه مراحل پروژه کمال تشکر و قدردانی را داریم.

منابع

صلواتیان، م. ، ۱۳۸۲. گزارش دوره تکثیر و پرورش غذای زنده. مرکز تحقیقات ماهیان استخوانی دریای خزر، بندر انزلی. ۶۲ صفحه.

magiran.com

فلاحی، م. ؛ قناعت پرست، ا. ؛ صلواتیان، م. ؛ پیری، م. ؛ دانش، ع. ؛ پیری، ح. و شیخ، غ. ، ۱۳۸۲. گزارش بررسی نقش روتیفر *Brachionus pilicatilis* در افزایش بقاء لارو ماهی سفید و مقایسه آن با غذای کنسانتره. مؤسسه تحقیقات شیلات ایران. ۳۱ صفحه.

Komarek, J. , 1973. Culture collections. *In:* Carr N.G. and Whitton B.A. The biology of blue-green algae. Blackwell scientific publ., pp.519-524.

Krauss, R.W. , 1958. Physiology of the freshwater algae. Annual review of plant physiology. Vol. 9, pp.207-44.

Miller, D.E. ; Green. J.C. and Shiroyama, T. , 1978. The *Selenastrum capricornatum* printz algal assay bottle test:experimental design, application and interperation protocol, Us Epa 600/9. 126 P.

Okelly, J.C. , 1968. Mineral nutrition of algae. Annual review of plant physiology. Vol. 19, pp.89-112.

Piri, Z.M. and Ordog, V. , 1997. Effect of some herbicides commonly used in Iranian agriculture on aquatic food chian. pp:9-30.

Round, F.E. , 1975. The biology of the algae. Second edition. Edward Amold Publisher. London, UK. 287P.

TRC, 1984. OECD guidelines for testing of chemicals. Section 2, effects on biotic systems. pp.1-39.

Walker, J.B. , 1953. Inorganic micronutrient requirements like Calcium (or Strontium), Copper and Molybdenum of *Chlorella.* Archives of Biochemistry and Biophysics. Vol. 46, pp.1-11.

Warburg, O. , 1919. Uber die Geschwindigkeit der photochemischen kohlensaurezerset zung in Lebenden Zellen.Biochemische Zeitschbrift. 100, pp.230-270.

magiran.com

An investigation on the effects of varying Calcium concentrations on the growth and biomass of *Chlorella vulgaris*

Salavatian S.M. and Fallahi M.

Salavatian_ 2002@yahoo.com

Dept., of Biotechnology, Caspian Sea Bony Fishes Research Center,

P.O Box: 66 Bandar Anzali Iran

Recived: May 2004 Accepted: September 2004

Keywords: Calcium, *Chlorella vulgaris*, Zinder media

Abstract

The likely effects of varying Calcium concentrations on the growth and biomass production of *Chlorella vulgaris* algae have been studied during 2003–2004 in the Bony Fish Research Centre in Guilan Province, Iran. We cultured pure *Chlorella vulgaris* stocks in Zinder media applying seven Calcium concentrations as treatments, 3 replicates for each treatment and one control. The laboratory experiments lasted 96 hours during which the temperature and light intensity were kept at 25±2 degrees centigrade and 3500±350 lux respectively.

Spectrophotometer assessment of the samples at a wavelength of 750nm and visual counting at the start and end of the experiments were carried out to assess the growth and biomass of the green algae. Statistical analysis of the results in SPSS software showed the effective Calcium concentration to be between 0.1 to 15 mg/l while the highest growth of the algae was reached at 2.8 mg/l where as in control group (Z-8±N) the amounts was 9.2 mg/l. Density of the algae was 17575675 cells per milliliter of the culture medium and the absorption rate was 0.542 and algae biomass was 17676 cells per milliliter. Calcium concentrations above these rates can have a negative effect on the growth and biomass production of the algae.