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

• **مریم فلاحی**، عضو هیأت علمی مرکزی تحقیقات ماهیان استخوانی دریای خزر- بندر انزلی
• **سیدمحمد صلواتیان**، کارشناس ارشد مرکز تحقیقات ماهیان استخوانی دریای خزر- بندر انزلی

تاریخ دریافت: تیرماه ۱۳۸۳ تاریخ پذیرش: خرداد ماه ۱۳۸۴

Email: Mahyarparvaneh2003@yahoo.com

چکیده

در این تحقیق اثر غلظت‌های مختلف عنصر منیزیم بر میزان رشد و بیوماس جلبک سبز *Chlorella vulgaris* به مدت یکسال (۱۳۸۱)در مرکز تحقیقات ماهیان استخوانی دریای خزر –بندرانزلی به‌صورت آزمایشگاهی مورد بررسی قرار گرفت. این آزمایش با ۷ تیمار و یک شاهد در سه تکرار (مجموعاً ۲۴ عدد) با استفاده از استوک خالص جلبک سبز *Ch.vulgaris* و محیط کشت زایندر (با تغییر غلظت منیزیم در تیمارها) در شرایط آزمایشگاهی (درجه حرارت ۲± ۲۵ درجه سانتیگراد، 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 با استفاده از لام توما در دو مرحله شروع آزمایش و پایان آزمایش صورت گرفت. نتایج بدست آمده نشان داد که غلظت موثره این عنصر در محدوده ۰/۱ تا ۱۰ میلی گرم در لیتر بوده و میزان مؤثره منیزیم برای حداکثر رشد این جلبک ۰/۱ میلی گرم در لیتر می‌باشد، در حالی که مقدار آنها در محیط کشت شاهد ۴/۶ میلی گرم در لیتر بوده است . طبق این بررسی‌ها رشد و بیوماس جلبک کلرلا در غلظت‌های ذکر شده بیشترین مقدار بوده و مقادیر بالاتر از این اعداد می‌تواند رشد بازدارنده داشته باشد از این‌رو با توجه به نتایج حاضر می‌توان محیط اصلاح شده زایندر را به‌عنوان یک محیط کشت بهتر برای گونه *Ch.vulgaris* مطرح نمود.

کلمات کلیدی : منیزیم ، *Chlorella vulgaris* ، محیط کشت زایندر

Pajouhesh & Sazandegi No: 72 pp: 9-13

Study on effect of different concentrations of magnesium on growth and biomass of *Chlorella vulgaris*

By: M.Fallahi. and S,M.Salavatian., Caspian Sea Bony Fishes Research Center.Department of Biotechnology. Anzali, Iran.

In this project, We studied the effects of magnesium macroelement on growth of *Chlorella vulgaris* for annual period of 2002 - 2003 at department of biotechnology in Caspian Sea bony fishes research center, Bndar-e-anzeli of Gilan. The algal cultures by purified stock of *Chlorella vulgaris* were maintained in 7 treatments with control and Zinder media (by changed in Magnesium concentration of course in treatments) by triplicate under laboratory conditions (Temp.25±2^{0C} , light 3500±350 lux) for 96 hours. In the next stage we measurd amounts of absorbtion in 750 nm by

Spectrophotometer and then we count the number of Chlorella algae at the beginning and the end of experiment by a toma slide. It was found that the effective concentration range for this macro element was 0.1 – 10 mg/lit and the effective quantity of magnesium, for providing the maximum growth of chlorella is 0.1 mg/lit where as in control group (Z-8±N) the amounts was 4.6 mg/lit. This experiment shows us the growth of chlorella biomass in mentioned concentration has the best results where as higher concentrations can create a negative effect on the biomass growth of chlorella. By taking consideration of this experiment, it can be planned to better media for *Chlorella vulgaris* with the modification of Zinder media culture.

Key word: Magnesium , *Chlorella vulgaris*, Zinder

مقدمه

فیتوپلانکتون‌ها از تولیدکنندگان اصلی در اکوسیستم‌های آبی می‌باشند که عمل فتوسنتز را به‌عهده دارند . برخی از آنها به مقادیر مختلفی از ماکروالمنت و میکروالمنت جهت رشد نیاز دارند که در شرایط مصنوعی و طبیعی می‌بایست این عناصر را فراهم نمود (۲) . باید دقت نمود که جهت پرورش جلبک‌ها شرایط آزمایشگاهی نزدیک به شرایط طبیعی فراهم گردد ، لذا عواملی چون درجه حرارت، نور، هوادهی، CO_2 ، شوری، pH، ویتامین‌ها ، مواد معدنی، موادغذایی به میزان متفاوت در انواع جلبک‌ها جهت رشد و فتوسنتز لازم می‌باشند (۱) .

منیزیم یک عنصر اساسی در پدیده فتوسنتز بوده و نیاز جلبک‌های مختلف به آن متفاوت می‌باشد . وجود این عنصر برای بعضی از گونه های جلبکی بعنوان ماده تشکیل دهنده کلروفیل حیاتی بوده و به‌عنوان یکی از عناصر ماکروالمان نقش مهم و اساسی در رشد و نمو دارد(۱۲) .

جلبک *Ch. vulgaris* از گونه‌های مهم شاخه جلبک سبز (Chlorophyta) در استخرهای پرورش ماهی و اکوسیستم‌های آبی خصوصاً تالاب انزلی بوده که مورد تغذیه روتیفر ، انواع لارو آبزیان و بعضی از ماهیان (مثل ماهی فیتوفاگ) قرار می‌گیرد (۳). علاوه بر نقش آن در آبزی پروری از نظر دارویی، استخراج مواد و غیره نیز مهم می‌باشند .

تاکنون مطالعات مختلفی در رابطه با تاثیر برخی فاکتورهای فیزیکی از جمله نور ، pH ، دما بر روی این جلبک توسط محققین داخلی و خارجی صورت گرفته است ولیکن تاثیر عنصر منیزیم بر روی رشد آن ندرتاً مورد توجه بوده است.

به‌نظر می‌رسد تا کنون هیچ مقاله‌ای در زمینه تاثیر رشد عناصر ماکروالمان خصوصاً عنصر منیزیم بر روی جلبک *Ch. vulgaris* منتشر نشده است . در این راستا محققین محیط کشت‌های مختلفی برای رشد جلبک‌ها در نظر گرفته‌اند که غلظت منیزیم در آنها مشخص گردیده است، ولی تاکنون در ایران با توجه به گونه‌ها و واریته‌های اکوسیستم‌های آبی کشورمان هیچ مطالعه‌ای بر روی تغییر این غلظت‌ها و بدست آوردن بهترین شرایط مناسب برای تولید انبوه آنها انجام نشده است، لذا با التفات به اینکه این عنصر نقش اساسی در عمل فتوسنتز و ساختار رنگدانه‌ها دارد ضرورت ایجاب می‌کند که مورد بررسی و تحقیق قرار گیرد .

مواد و روش‌ها

ابتدا جلبک کلرلا خالص‌سازی گردید، برای اینکار نمونه‌ای از آب محیط طبیعی که از تور ۲۰ میکرون عبور داده شده بود به اطاق کشت که توسط اشعه ماوراء بنفش (UV) استریل شده منتقل و توسط دستگاه لامیناریاکس و زیر میکروسکوپ Invert خالص سازی و در محیط کشت Zinder(۹، ۶) که به اختصار Z-۸+N نوشته می‌شود در دمای ۲۳ الی ۲۵ درجه سانتیگراد ، نور ۳۰۰ ± ۳۵۰۰ لوکس و ۱۴ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی (۱۱)کشت نیمه انبوه داده شد. جلبک پس از رشد و اطمینان از خالص بودن آن به محیط کشت‌های بزرگتر منتقل گردید.

شایان ذکر است جهت کشت جلبک فوق از روش (۹) میزان برخی از عناصر آن توسط Ordog (۱۰) اصلاح گردیده بود استفاده گردید . جهت انجام آزمایشات تاثیر منیزیم بر روی جلبک از روش استاندارد Selenastrum bottle test (۹، ۱۳) استفاده گردید . در این بررسی ۷ تیمار و یک شاهد در ۳ تکرار در نظر گرفته و جهت ساختن محیط کشت برای ۷ تیمار و شاهد به روش ذیل عمل شد.

در شاهد محیط کشت Z-۸+N به میزان ۲۵۰ میلی لیتر در ارلن ۵۰۰ میلی لیتر ریخته و در تیمارها نیز (۷ تیمار) محیط کشت Z-۸+N به میزان ۲۵۰ میلی لیتر در ارلن ۵۰۰ میلی لیتر ریخته شد و غلظت

جدول ۱- غلظت مصرفی منیزیم در تیمارهای مختلف بر حسب ppm

تیمارها	غلظت مصرفی منیزیم (ppm)
شاهد	۴/۶
۱	۰/۱
۲	۰/۴۵
۳	۰/۹۷
۴	۲/۸۰
۵	۴/۴۶
۶	۶/۳۱
۷	۱۰

منیزیم محیط کشت در هر یک از تیمارها طبق جدول ۱ در نظر گرفته شد . یعنی محیط کشت زایندر با تغییر در میزان منیزیم مورد مطالعه قرار گرفت. شایان ذکر است که این محدوده غلظت پس از چندین مرحله آزمایش حاصل آمد .

پس از آماده سازی محیط کشت در تیمارها و شاهد از نمونه خالص جلبک Chlorella به میزان یک میلی گرم در لیتر (۱۱)در تیمارها و شاهد ریخته شد . ارلن‌ها را تکان داده و پس از همگن نمودن ، پنج میلی لیتر از آب آنها جهت شمارش اولیه جلبک برداشت گردید ، سپس با پیپت‌های هوا همراه با فیلتر سر ارلن‌ها بسته و به میزهای کشت با شرایط دمای۲۳ تا ۲۵ درجه سانتیگراد و نور ۳۰۰±۳۵۰۰ لوکس به‌مدت ۹۶ ساعت انتقال داده شد. پس از طی زمان فوق مجدداً پنج میلی‌لیتر از هر یک از ارلن‌ها را جهت شمارش ثانویه جلبک مورد بررسی قرار گرفت . جذب نیز با دستگاه اسپکتروفتومتر مدل HACH۲۰۰۰ خوانده و با کاستن میزان شمارش اولیه از ثانویه و مقایسه جذب ۷۵۰ در تیمارها و شاهد میزان درصد افزایش رشد محاسبه گردید و بهترین غلظت منیزیم جهت رشد این جلبک کسب شد . شایان ذکر است که شمارش جلبک فوق توسط لام توما (Toma) صورت گرفت .

در این بررسی از ضریب همبستگی جهت ارتباط بین غلظت منیزیم و تراکم کلرلا ، آزمون مقایسه میانگین ها (LSD) در تیمارهای مختلف از نرم افزار SPSS و برای ترسیم نمودارها و جداول از نرم افزار EXCEL استفاده گردید.

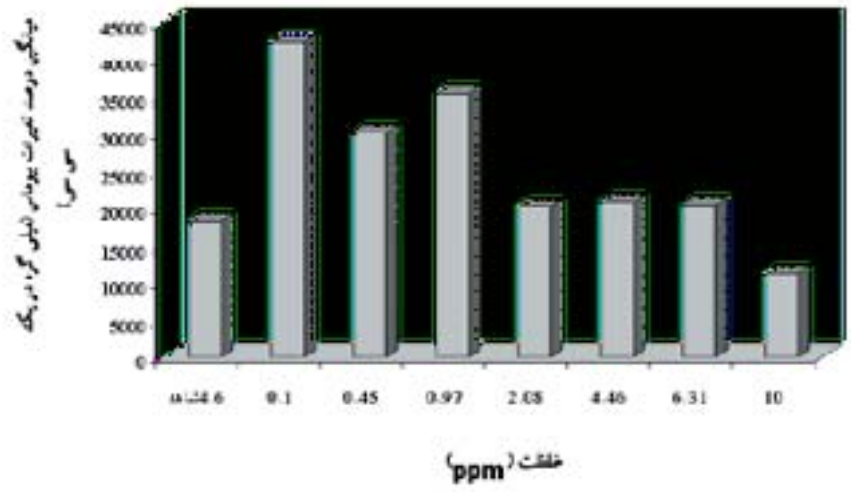
نتایج

غلظت موثره عنصر منیزیم بر جلبک سبز کلرلا پس از آزمایشاتی بین ۰/۱ تا ۱۰ میلی گرم در لیتر تشخیص داده شد. پس از شمارش جلبک‌ها با لام توما ، میانگین شمارش اولیه و ثانویه نمونه ها در یک میلی لیتر و میانگین درصد تغییرات تراکم سلولی نسبت به شاهد برای عنصر منیزیم (طبق نمودار شماره یک) محاسبه گردید و نشان داده شد که بیشترین میانگین درصد تغییرات تراکم سلولی در غلظت ۰/۱ میلی گرم در لیتر بوده است .

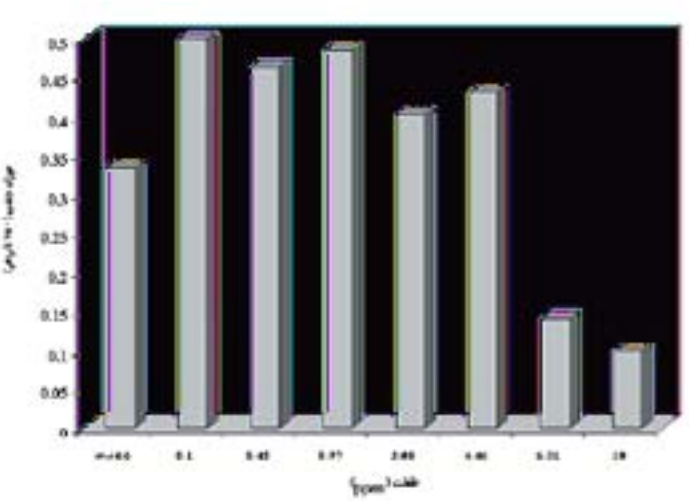
با توجه به غلظت‌های مختلف عنصر منیزیم ، میزان جذب پس از ۹۶ ساعت رشد ، در نهایت توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (طیف سنج) با طول موج ۷۵۰ نانومتر خوانده شد. نتایج نشان داد که بیشترین میزان جذب در غلظت ۰/۱ میلی گرم در لیتر برای عنصر منیزیم می‌باشد (نمودار شماره ۲) .

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 منیزیم که بالاترین رشد جلبک در آن صورت می‌گیرد را ارائه نمود .

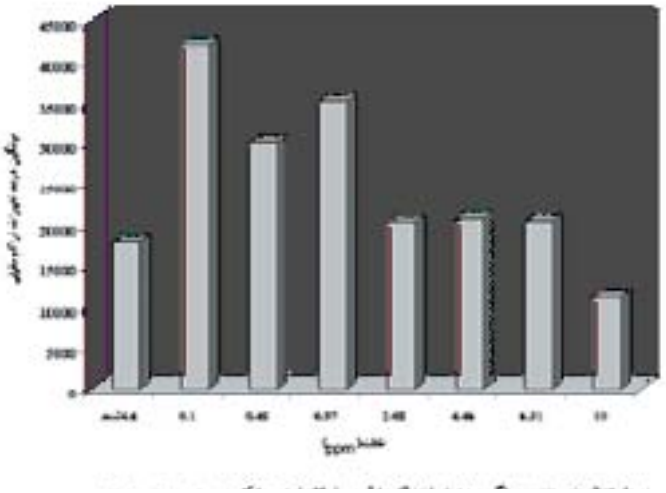
در این بررسی مقادیر بیوماس جلبک *Ch. vulgaris* در غلظت‌های مختلف نیز تعیین گردید ، بر این اساس (طبق نمودار شماره سه) بالاترین عدد میانگین درصد تغییرات بیوماس نیز در غلظت مصرفی ۰/۱ میلی گرم در لیتر منیزیم بوده که مطابق با اطلاعات حاصله از روش شمارش سلولی می‌باشد. نتایج آزمون LSD نشان داد که فقط زوج‌های (۶/۳۱ و ۴/۶) و (۱۰ و ۴/۶) در سطح ۹۵ درصد اختلاف معنی دار دارند. همچنین نتایج



نمودار۱- تاثیر عنصر منیزیم
بر میانگین درصد تغییرات تراکم سلولی
پس از ۹۶ ساعت بر جلبک *Chlorella vulgaris*



نمودار ۲- تاثیر غلظت‌های مختلف عنصر منیزیم بر میزان جذب جلبک *Chlorella vulgaris*



نمودار ۳- تأثیر عنصر منیزیم بر میزان بیوماس جلبک *Chlorella vulgaris*

همین آزمون برروی میزلن جذب در طول موج ۷۵۰ نانومترنشان داد که زوج‌های (۶/۳۱ و ۰/۱)،(۱۰و ۰/۴۵) ، (۶/۳۱ و۰/۴۵) ، (۱۰و۰/۹۷ .) ، (۶/۳۱و۰/۹۷)، (۱۰و۰/۰۸) ، (۱۰و۴/۴۶) و (۰/۱۰,۱) در سطح ۹۵ درصد اختلاف معنی‌داری را دارا می‌باشند.

بحث

منیزیم ماده تشکیل دهنده کلروفیل می‌باشد. به‌طور قطعی نیاز بیشتر پیگمان‌ها به این عنصر وجود دارد. نیازی که جلبک‌ها به منیزیم دارند بیش از نیازی است که به عنصر کلسیم دارند چون فقدان منیزیم در بسیاری از جلبک‌ها مانند جلبک کلرلا مانع تقسیم سلولی می‌شود (۱۲).

منیزیم یک بخش از کلروفیل a ، ریبوزوم و کروموزوم است (۴). منیزیم همچنین در بسیاری از واکنش‌های آنزیمی‌لازم است (۱۴).

عناصر کربن ، اکسیژن ، ئیدروژن ، نیتروژن ، فسفر ، پتاسیم، منیزیم ، گوگرد و آهن عمده‌ترین عناصر شیمیایی در رشد جلبک کلرلا و سندسموس (Scenedesmus)هستند (۷).

گروهی از محققین (۵) مطالعاتی روی رشد *Chlorella pyrenoidosa* در غلظت‌های مختلف ماکروالمان (شامل نیتریت، پتاسیم ، منیزیم ، گوگرد ، فسفر و کلر) و میکروالمان (آهن ، مس ، روی ، منگنز ، بر و مولیبدن) انجام دادند . نیازهای معدنی قابل رشد برای سیستم‌های اتوتروفی و هتروتروفی (بوسیله قند) به صورت زیر بیان شده است :

در مورد نیازهای غذایی برای سیستمهای اتوتروف و هتروتروفی رشد در جلبک کلرلا بیان نمودند که منیزیم برای رشد اتوتروفی به غلظت ۰/۰۰۲ میلی گرم در لیتر و برای رشد هتروتروفی به میزان ۰/۰۲ میلی گرم در لیتر نیاز است. طبق نمودار ۱ طی بررسی‌های حاضر وقتی‌که جلبک سبز کلرلا در محیط کشت زاندر کشت داده می‌شود بعد از ۹۶ ساعت بالاترین تراکم سلولی کلرلا در غلظت ۰/۱ میلی گرم در لیتر بدست آمد این در حالی بود که در محیط کشت شاهد غلظت منیزیم ۴/۶ میلی گرم در لیتر را نشان می‌داد . از این‌رو می‌توان گفت در شرایط آزمایشگاهی حداکثر تراکم سلولی برای جلبک *Ch. vulgaris* غلظت ۰/۱ میلی گرم در لیتر بوده (میانگین شمارش اولیه در یک میلی لیتر ۲۲۲۲۱ و میانگین شمارش ثانویه ۹۴۱۱۴۵۸ عدد در یک میلی لیتر) و غلظت‌های بالاتر از این مقدار سبب کاهش تراکم سلولی کلرلا طبق شمارش سلولی شد (خصوصاً در غلظت ۱۰ میلی گرم در لیتر که پایین ترین تراکم سلولی مشاهده شد)، بدین معنی که غلظت‌های بالاتر از ۰/۱ منیزیم عامل بازدارنده در رشد داشته که نمودار شماره ۲ این موضوع را کاملاً نشان می‌دهد . این موضوع را Mclachlan(۸) هم به اثبات رساند یعنی مقدار اپتیمم نسبت منیزیم به کلسیم برای جلبک دریایی Dunaliella ، چهار است و غلظت‌های بالای منیزیم می‌تواند عامل بازدارنده ایجاد کند . یعنی در غلظت ۱۰ میلی گرم در لیتر منیزیم ، تراکم سلولی کلرلا بعد از ۹۶ ساعت نه تنها رشد لگاریتمی نداشته بلکه روند کاهشی داشته و مقدار میانگین شمارش اولیه در یک میلی‌لیتر از ۲۲۲۲۲ به ۲۵۱۸۸۸۸ رسید .

طی نتایج حاضر علاوه بر شمارش نمونه‌های جلبکی، میزان جذب غلظت‌های مختلف منیزیم با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۷۵۰ نانومتر خوانده شد که اعداد بدست آمده هم عدد ۰/۱ میلی گرم در لیتر را تائید کرد یعنی در غلظت ۰/۱ میلی گرم در لیتر عدد میانگین جذب ۰/۴۹۸ بود، درحالی‌که در غلظت ۱۰ میلی گرم در لیتر منیزیم، جذب به عدد ۰/۰۹۸ رسید که تائیدی بر عامل بازدارندگی رشد بود (نمودار شماره ۲) .

در نهایت میانگین درصد تغییرات بیوماس جلبکی برحسب میلی گرم در یک میلی‌لیتر بدست آمده که حداکثر بیوماس

در غلظـت ۰/۱ میلی گرم در لیتر منیزیم عـدد ۱۸۱۳۳/۳۳ بوده که خود تأییدی بر رشـد بیشـتر این جلبـک در غلظت ۰/۱ میلی گـرم در لیتر از منیزیم می‌باشد .

از طـرفی نتایج آمـاری طبق آزمـون مقایسـه چند دامنه LSD نشـان داده کـه بین تیمارهـای مختلف اختلاف معنی دار وجـود دارد . بنابر این غلظت‌های مختلف منیزیم بر روی رشد جلبک سبز کلرلا تاثیرات مختلفی داشته و رشد در غلظت‌های مختلف معنی‌دار می‌باشد .

پیشنهادات

بـا توجه به اهمیت جلبک‌هـا از نظر ارزش غذایی، و سـایر جنبه‌های اقتصادی و متغییر بودن رشـد آن تحت شـرایط متفاوت و عنایت به اینکه تاکنون نیازمندی‌های کشـت از نظر ماکرو و میکروالمنت‌ها و ویتامین‌های مختلف برای گونه‌ها و واریته‌های مختلف اکوسیسـتم‌های آبی کشـورمان تعیین نگردیده اسـت ضرورت ایجاب می‌کند کـه مطالعاتی در این زمینه صـورت گیرد تا بتوان با کمترین هزینه اقدام به کشـت انبوه آنها در زمان کمتر و کیفیتی مطلوب‌تر نمود. .

تشکر و قدردانی

از همکاری‌های ارزشـمند جناب آقای دکتر خانی پور ریاسـت محترم مرکز تحقیقات ماهیان استخوانی دریای خزر - بندرانزلی و معاونین محترم ایشـان به‌جهت فراهم نمودن زمینه‌های لازم در انجام هر چه بهتر تحقیق و از همکاران محترم بخش بیوتکنولوژی مرکز برای مسـاعدت‌های لازم در زمینه اجرای پژوهش کمال تشکر و قدردانی را دارم .

منابع مورد استفاده

۱ - صلواتیان ، م . ۱۳۷۲ ؛ بررسـی اکولوژیکی فیتوپلانکتون‌ها و روش‌های نمونه برداری . مرکز تحقیقات شیلاتی استان بوشهر . صفحات ۲-۱۰

۲ - فلاحی ،م . ۱۳۷۲؛ بررسی پراکنش زئوپلانکتون‌های تالاب انزلی (آبکنار). پایان نامه دانشجویی . مرکز تحقیقات شیلاتی استان گیلان . صفحات ۷-۵

۳ - فلاحی ، م. قناعت پرست ، ا. صلواتیان ، م. پیری ، م . دانش ، ع . پیری ، ح و شـیخ ، غ ، ۱۳۸۲؛ گزارش بررسی نقش روتیفر *Brachionus pilicatilis* در افزایش بقاء لارو ماهی سـفید و مقایسـه آن با غذای کنسانتره . مؤسسه تحقیقات شیلات ایران . صفحات ۸-۷

4-Borowitzka,M.A and L.J.Borowitzka.1988; Micro-algal biothecnology Cambridge university press.New York.Port Chester Melbourne sydney.pp.14-15

5.Eyster, H .C. , T .E. Brown and H.A . Tanner . 1958; Mineral requirements for *Chlorella pyrenoidosa* under autotrophic and heterotrophic conditions.

6-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.

7.Krauss, R.W. 1958; Physiology of the freshwater algae. Annual Review of plant physiology;No.9,pp. :207-44.

8.McLachlan ,J . 1960; The culture of *Dunaliella tertiolecta* butcher a euryhaline organism. Canadian Journal of Microbiology,No.6.pp.367-75.

9 -Miller , D . E ,Green .J . C . and shiroyama ,T . 1978; The selenustrum capricornatum printz algal assay bottle test : Experimental design , application and interperation protocol,P.126.Us Epa 600/9.

10- Ordog , V. ,1982 ; Apparatus for laboratory algal bioassay. Int .Rev. Ges .Hydrobiol.,No.67.pp.127-136.

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

12- Round , F, E . 1975; The biology of the algae. Second edition. Edward amold.pp.216-230

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

14- Wyn J.R.G. and A. Pollard. 1983; Proteins, enzymes and inorganic ions . Encyclopedia of plant physiology ; A . Lauchli , & R . L. Bieleski (ed.), New series, Berlin, Springer Verlag; 15B. pp.528-62.