بررسی تاثیر محیط‌های مختلف نیتروژن بر بقا و رشد جلبک سبز *Scendesmus* sp در شرایط نور محدود و عدم تلقیح دی اکسید کربن

سید جابر میر بهبهانی، آرین ساطعی، شادمان شکروی

گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرگان

Archive of SID

چکیده

در این تحقیق تاثیر تغییر در غلظت‌های نیتروژن معدنی (نیترات و آمونیوم) و آلی (اوره) در شرایط نور محدود (۱۵۰۰ لوکس) و عدم هوادهی (محدودیت دی اکسید کربن) بر رشد و وضعیت رنگیزه‌ای (کاروتنویید) در جلبک سبز *Scenedesmus* sp. مورد بررسی قرار گرفته است. نمونه از شالیزارهای استان گلستان (گرگان) جمع آوری شده، پس از تخلیص، در شرایط نوری ۱۵۰۰ لوکس به صورت مستمر و غلظت‌های ۲ و ۵ و ۱۰ میلی مولار اوره، ۵ و ۱۰ میلی مولار نیترات، و ۱و ۲ میلی مولار آمونیوم قرار گرفت. از تلقیح دی اکسید کربن به نمونه در طول آزمایش خودداری گردید. در هر مورد رشد (بر اساس کدورت سنجی) و وضعیت رنگیزه‌ای (به صورت در زیوه و در شیشه) سنجش گردید. نتایج نشان داد که رشد در محیط نیترات (به طور کلی) با لاتر می‌باشد. به کارگیری نیتروژن آلی (اوره) در روزهای نخست و غلظت‌های ۵ و ۱۰ میلی مولار به خصوص در روزهای نخست سبب بروز تنش در نمونه می‌گردد. در شرایط نیتروژن معدنی، غلظت ۱۰ میلی مولار نیترات رشد بیش‌تری را سبب گردیده است. به همین ترتیب رشد در شرایط کاهش آمونیوم (۱ میلی مولار) بالاتر از افزایش آن (به حد ۲ میلی مولار) می‌باشد. رنگیزه‌های کاروتنوییدی در محیط نیترات، تحت تاثیر غلظت‌های مختلف، تغییر کمی، معنی داری از

www.SID.ir

خود نشان نمی‌دهند. به نظر می‌رسد که مکانیسم تراکمی فعال نمونه در شرایط محدودیت دی اکسید کربن، سبب حفظ بقای آن می‌گردد.

کلمات کلیدی: تغذیه‌ی نیتروژنه، رشد، سندسموس، مکانیسم تراکمی دی اکسید کربن.

مقدمه

جلبک سبز *Scenedesmus* از نظر بیوتکنولوژی توانمند می‌باشد (سلطانی و همکاران ۱۳۸۱). امروزه گونه‌های جلبک سبز *Scenedesmus* در کنار ریزجلبک‌هایی مانند Chlorella و Dunaliella در بیوتکنولوژی کاربردی ریز جلبک‌ها به طور کامل شناخته شده‌اند و کاربرد آن‌ها جنبه‌ی متداول دارد (شکروی و همکاران، ۱۳۸۱). با توجه به این که شناخت کامل ابعاد کاربردی هر ریزجلبک جدید به زمان طولانی و مراحل گوناگون غربال‌گری نیاز دارد، استفاده از جلبک‌هایی که از نظر اقتصادی جنبه کاربردی به خود گرفته‌اند، نوعی تفکر معقول علمی ـ اقتصادی است که موجب بهره‌وری قابل توجه خواهد گردید (شکروی و همکاران، ۱۳۸۱). در ایران تا زمان حاضر استفاده از ریزجلبک‌ها جنبه‌ی عمومی به خود نگرفته است ولی با توجه به رشد جمعیت و لزوم تحول در کشاورزی و صنایع غذایی، در آینده رویکرد دانش کشور به سمت ریزجلبک‌های کاربردی اجتناب ناپذیر خواهد بود (سلطانی و همکاران ۱۳۸۱). با توجه به این بررسی ابعاد متفاوت زیست شناختی *Scenedesmus* از جمله نشان ویژه‌سازی اکوفیزیولوژیک گونه‌های متفاوت آن در کشور از اهمیت برخوردار است. متاسفانه تا زمان حاضر پژوهشی که با این هدف طراحی شده باشد انجام نگرفته است.

ریزجلبک‌های خاک می‌بایست با مجموعه‌ی متنوعی از تنش‌های محیطی مقابله نمایند. این امر در مورد شالیزارها هم صادق است. جلبک‌های سبز و سبز- آبی که فلور غالب شالیزارها را تشکیل می‌دهند، به طور دایم در معرض نوسان نور، اسیدیته، دی اکسید کربن، و دیگر تنش‌های محیطی قرار دارند (Becker ۱۹۹۴). به عنوان مثال شدت نور در هنگام رویش برنج، کاهش چشم‌گیری می‌یابد (شکروی و همکاران، ۱۳۸۱). در این حالت ریزجلبک‌هایی که فلور خاک را تشکیل می‌دهند، می‌بایست بتوانند از طریق استراتژی‌های متابولیک بقای خود را حفظ نمایند. *Scenedesmus* توانایی خاصی جهت مقابله با تنش‌های اسیدی دارد (سلطانی و همکاران، ۱۳۷۱). دامنه‌ی بردباری به اسیدیته در این ریزجلبک قابل توجه است. این در حالی است که در شرایط قلیایی، به خصوص در هنگام غرقابی شدن شالیزارها، تعادل گازی به نحوی جا به جا می‌شود که بر محتوای بیکربنات به نحوی چشم‌گیر افزوده می‌شود (شکروی و همکاران، ۱۳۸۱). با توجه به این که آنزیم‌های فتوسنتزی نمی‌توانند از یون

Archive of SID

www.SID.ir

بیکربنات استفاده کنند، می‌بایست مکانیسمی جهت متراکم کردن دی اکسید کربن داشته باشند. این مکانیسم در جلبک سبز *Scenedesmus* شناخته شده است (سلطانی و همکاران، ۱۳۷۷).

نیازهای نیتروژنی در جلبک‌های سبز اجتناب ناپذیر است. این موجودات دی ازوتروف نیستند و می‌بایست ذخایر نیتروژن خود را از خاک برآورده کنند. در جلبک‌های سبز شکل عمده‌ی نیتروژن مورد نیاز، نیتروژن معدنی است. البته استفاده از نیتروژن آلی در بسیاری از جلبک‌های سبز گزارش شده است. جلبک‌های سبز در طی فرآیند اسمیلاسیون، نیتروژن معدنی را وارد مسیر گلوتامات/گلوتامین می‌نمایند و اسیدهای آمینه دیگر در ادامه‌ی مسیر ساخته می‌شود. استفاده از اوره و اسیدهای آمینه به عنوان منبع نیتروژن در گونه‌هایی از Chlorella, Chlamydomonas, Oocystis و Scenedesmus گزارش شده است. در جلبک‌های سبز، همانند بسیاری گونه‌های سبز- آبی استفاده از آمونیوم عمومیت دارد. در این گروه از ریزجلبک‌ها، میان جذب و انتقال ترکیبات نیتروژنه و شرایط محیطی ارتباط قابل توجه وجود دارد (شکروی و همکار، ۱۳۸۲).

در این بررسی بقا، رشد و وضعیت رنگیزه‌ای گونه‌ای از *Scenedesmus* در غلظت‌های مختلف نیتروژن آلی و معدنی، درشرایط نور محدود و عدم تلقیح دی اکسید کربن مورد بررسی قرار گرفته است. با توجه به کمبود اطلاعات در مورد ریزجلبک‌های بومی استان گلستان، این بررسی می‌تواند راه را برای دیگر پژوهش‌های مربوط به نشان ویژه‌سازی اکوفیزیولوژیک این جنس هموار سازد. تاکنون در استان گلستان، بررسی تخصصی در رابطه با جنس *Scenedesmus* انجام نگرفته است. بنابراین نتایج این بررسی در محدوده‌ی استان گلستان، برای اولین بار گزارش می‌شود.

مواد و روش‌ها

نمونه‌های خاک از استان گلستان، در طول دوره‌ی زمانی یک ساله جمع‌آوری شدند. کشت نمونه‌های خاک مطابق روش کشت ریزجلبک‌های‌های خاکزی انجام گرفت. پس از تشکیل کلنی، جداسازی و کشت‌های بعدی، *Scenedesmus* sp. به صورت خالص تهیه گردید (سلطانی و همکاران، ۱۳۷۷). شناسایی مقدماتی و شناسایی در حد گونه با استفاده از John et al., ۲۰۰۳, Prescott, ۱۹۶۲ انجام گرفت. کشت در محیط N۸ و در شرایط نوری ۸۰۰ لوکس که توسط یک لامپ فلورسانت تامین می‌گشت، دمای ۲۸ درجه‌ی سانتی‌گراد و۷/۲ pH انجام گرفت. بررسی‌ها در ارلن‌هایی با حجم۵۰۰ میلی لیتر محتوی ۳۰۰ میلی لیتر سوسپانسیون انجام شد. کشت‌ها به مدت ۱ ساعت هم زده شدند و سپس به محفظه‌ی روشنایی منتقل گردیدند. پیش از تلقیح نمونه به

Archive of SID
www.SID.ir

مدت ۴۸ ساعت جهت ایجاد سازگاری وارد محیط کشت مایع شد. رشد بر اساس کدورت‌سنجی، با استفاده از اسپکتروفتومتر ($OD_{۷۵۰}$) سنجش گردید. سنجش کلروفیل و کاروتنویید پس از استخراج با متانول با روش (Jensen, ۱۹۷۸) انجام گرفت. بررسی‌های مورفولوژیک با استفاده از نمونه‌های زنده و نمونه‌های تثبیت شده در مونت گلیسرین، انجام گرفتند (شکروی و همکاران، ۱۳۸۱). آنالیزهای آماری با استفاده از نرم‌افزارهای SPSS Ver ۱۱ انجام شد.

نتایج

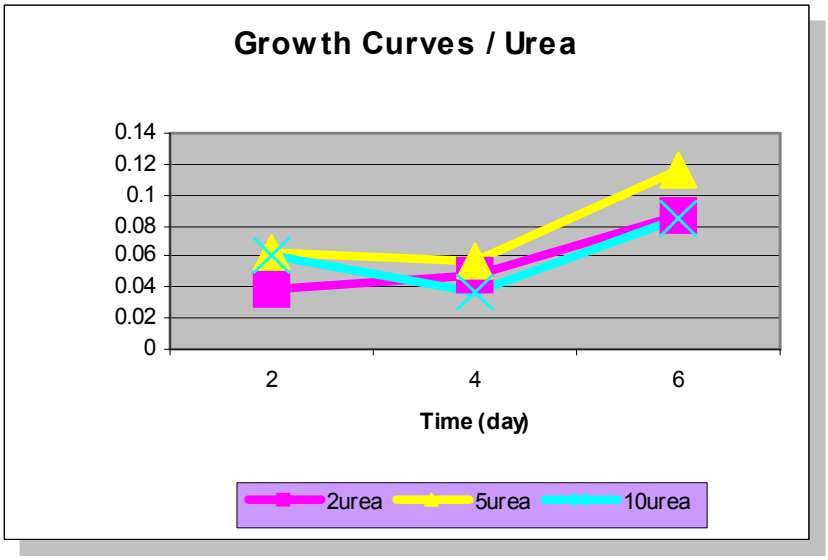
رشد در غلظت‌های بالاتر (۱۰ و۵ میلی مولار) نیتروژن آلی (اوره) در روزهای نخست (اول تا چهارم) پس از تلقیح، با اشکال مواجه است (شکل ۱). در این شرایط به نظر می‌رسد که بقای نمونه به سرعت پس از تلقیح تضعیف می‌گردد ولی در روزهای بعد (بعد از چهارمین روز) نمونه می‌تواند بقای خود را حفظ نماید. در غلظت‌های کمتر (۲ میلی مولار)، رشد عادی می‌باشد و از الگوی متداول رشد میکروارگانیسم‌ها تبعیت می‌کند.

در نیتروژن معدنی (نیترات)، شاهد رشد قابل توجهی هستیم (شکل ۲). به نظر می‌رسد که نمونه به شرایط نیتراته بهتر پاسخ می‌دهد. کاهش مقادیر نیترات (به نصف) به خصوص در روزهای نخست، تاثیر محسوسی بر رشد ندارد. به نظر می‌رسد که مقادیر به کار رفته‌ی نیتروژن آمونیومی (شکل ۳) سبب ایجاد سمیت در نمونه نمی‌گردند و احتمال قوی نمونه‌ی سیستم‌های لازم برای همگون سازی آمونیوم را به سرعت در خود ایجاد می‌کند. چنان که گفته شد، دو برابر کردن میزان آمونیوم (تا ۲ میلی مولار) سبب بروز سمیت نمی‌گردد.

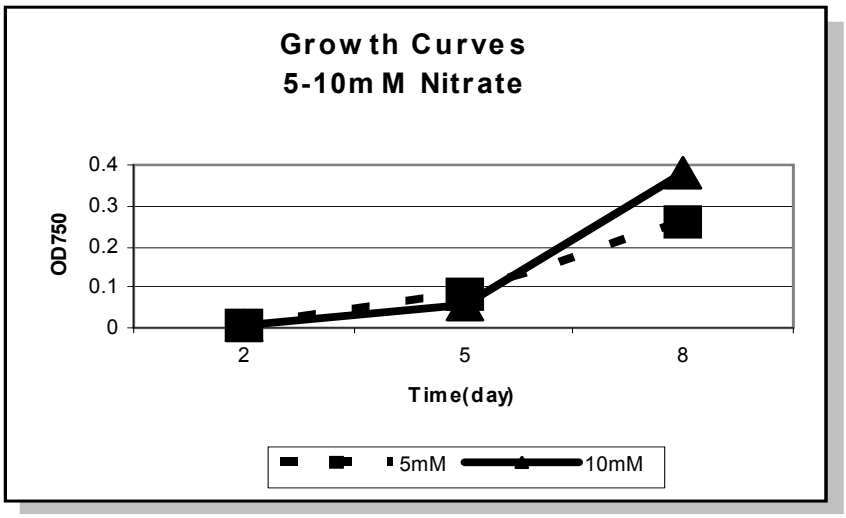
کاروتن‌ها و گزانتوفیل‌ها که رنگیزه‌های فرعی فتوسنتزی هستند، در غلظت‌های مختلف نیتروژن نیتراته، چه به صورت در زیوه (شکل ۴) و چه در شیشه، کاهش یا افزایش قابل توجهی نشان نمی‌دهند. از این نظر تغییر در مقادیر نیتروژن محیط با بروز تنش در سیستم رنگیزه‌ای فرعی نمونه همراه نیست. این امر در درک سازگاری نمونه با شرایط محدودیت دی اکسید کربن، سازگار است.

Archive of SID

www.SID.ir

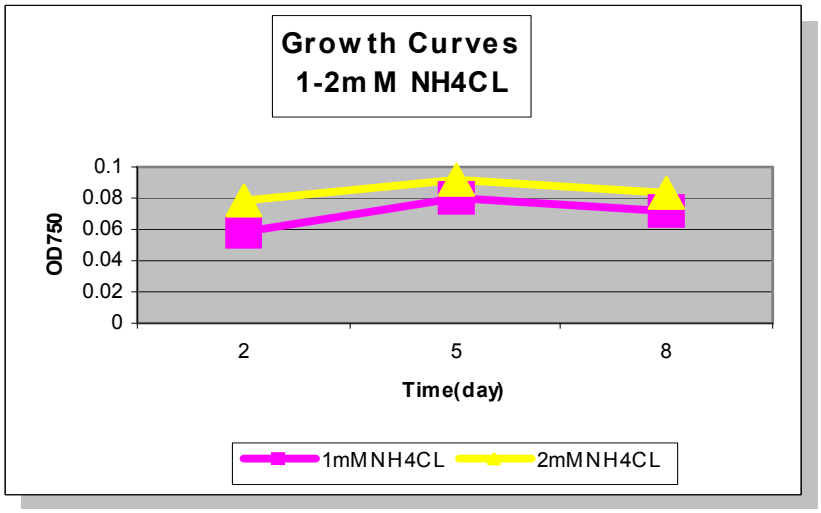


شکل ۱: مقایسه‌ی منحنی‌های رشد *Scenedesmus* sp در غلظت‌های متفاوت نیتروژن آلی (اوره)

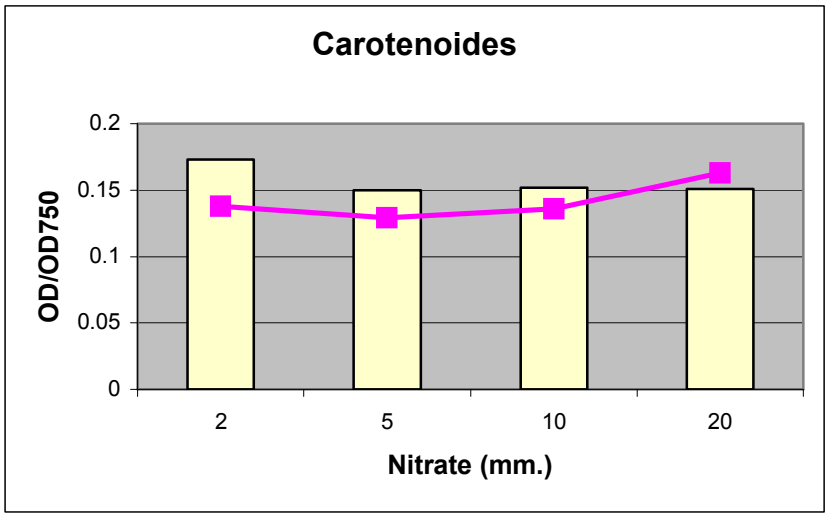


شکل ۲: مقایسه‌ی منحنی‌های رشد.*Scenedesmus* sp در غلظت‌های متفاوت نیتروژن معدنی (نیترات)

www.SID.ir



شکل ۳: مقایسه‌ی منحنی‌های رشد *Scenedesmus* sp در غلظت‌های متفاوت نیتروژن معدنی(آمونیوم)



شکل ۴: مقایسه‌ی محتوای کاروتنوییدی.*Scenedesmus* sp در غلظت‌های متفاوت نیتروژن معدنی (نیترات)

www.SID.ir

دی اکسید کربن، بقای خود را حفظ می‌نماید و این امر به نوع محیط نیتروژنه وابسته نیست. دقت در منحنی‌های رشد البته نشان می‌دهد که نمونه به طور بدیهی نیتروژن نیتراته را ترجیح می‌دهد. ولی این به آن معنی نیست که در دیگر میحط‌ها قادر به کسب نوعی انطبقاق نباشد. این امر به خصوص در محیط اوره صادق است. رشد در محیط اوره به خصوص در غلظت‌های بالا در روزهای نخست پس از تلقیح، سبب بروز نوعی تنش در بقای نمونه می‌گردد. در محیط آمونیوم رشد نمونه معقول است و هرچند نرخ رشد از محیط نیترات پایین‌تر است ولی نمونه از ابتدا وارد فاز تصاعدی رشد می‌گردد. به نظر می‌رسد که بقای نمونه در این شرایط از ابتدا حفظ می‌گردد (شکل‌های ۱، ۲ و ۳). روی هم رفته به نظر می‌رسد که جلبک سبز مورد آزمایش از نظر آهنگ رشد به شرایط نیتراته (بدون توجه به غلظت) تمایل بیش‌تری نشان می‌دهد و این با آن‌چه در مورد سیانو باکتریای دی ازوتروف و جلبک‌های سبز کلروکوکال در بررسی‌های (شکروی و همکاران، ۱۳۸۱) به دست آمده است مطابقت دارد. در (Stal, ۱۹۹۵) در خصوص تغذیه‌ی نیتروژنه‌ی جلبک‌ها، روی برتری نیترات از نظر اقتصاد انرژی بحث کرده است. هرچند ریزجلبک‌هایی نیز مورد مطالعه قرار گرفته‌اند که به طور جدی به نیتروژن آلی گرایش داشته‌اند.

این که جلبک سبز *Scenedesmus* sp قادر است در شرایط عدم تلقیح دی اکسید کربن، بقای خود را حفظ نماید و در محیط‌های مختلف نیتروژن به رشد ادامه دهد، با یافته‌های محققینی که در خصوص مکانیسم تراکمی دی اکسید کربن در این جلبک مطالعه کرده اند سازگار می‌باشد (سلطانی و همکاران، ۱۳۷۱). در شرایطی که نمونه در شرایط نیتراته قرار گیرد (شکل ۲)، نمونه‌ی فاز تاخیری نشان نمی‌دهد و در دو غلظت نیترات به کار رفته شاهد رشد تصاعدی ار ابتدای تلقیح هستیم. رشد تصاعدی به منزله‌ی ایجاد شرایط مطلوب برای نمونه جهت تولید مثل و ادامه‌ی مسیر زندگی یکنواخت رشد است (شکروی و همکار، ۱۳۸۲). می‌توان تصور کرد که نمونه در این شرایط از نظر مجموعه شرایط محیطی با اشکال مواجه نبوده است. مجموعه‌ی عوامل محیطی به طور طبیعی شامل دی اکسید کربن نیز می‌گردد. دی اکسید کربن به منزله‌ی ماده‌ی اولیه‌ی تولید ترکیبات فتوسنتیک است و محدودیت دی اکسید کربن می‌تواند سبب کاهش جدی رشد گردد. مطابق (Sdtal, ۱۹۹۵) مکانیسم‌های سازشی از آن نوع که در سیانوباکتریا دیده می‌شود (برون ریزش ترکیبات به منزله‌ی کلید مناسب جهت ورود به مرحله‌ی فاز تصاعدی)، مشاهده نگردیده است. بنابراین ورود به فاز تصاعدی، به منزله‌ی وجود منابع مکفی دی اکسید کربن است که خود ناشی از کارایی مکانیسم‌های انباشت دی اکسید کربن در درون سلول می‌باشد.

دقت در روند تولید رنگیزه‌های کاروتنوییدی (شکل ۴) نشان می‌دهد که در غلظت‌های مختلف نیتروژن نیتراته، محتوای رنگیزه‌ای نمونه (کاروتن‌ها و گزانتوفیل‌ها) تغییر معنی‌داری نمی‌کند (Anova $p<۰.۰۵$). این امر را به منزله‌ی شاهد دیگری بر کارایی سیستم فتوسنتزی می‌توان گرفت که خود تامین کننده‌ی انرژی برای راه‌اندازی مکانیسم تراکمی دی اکسید کربن در این جلبک می‌باشد. هر چند بررسی مذکور در رابطه با محیط‌های مختلف نیتروژن و رشد جلبک سبز- آبی (و نه سبز) انجام گرفته است.

Archive of SID
www.SID.ir

منابع

۱. سلطانی، ن.، خاوری نژاد، ر. و ریاحی، ح. (۱۳۷۱) تاثیر شدت‌های نوری بر رشد و وضعیت رنگیزه‌ای جلبک سبز *Scnedesmus brevispina*، پایان نامه‌ی کارشناسی ارشد، دانشگاه تربیت معلم.

۲. سلطانی، ن (۱۳۷۷) تاثیر شدت نور بر ترکیبات بیوشیمایی جلبک سبز *Scnedesmus brevispina* مجله علمی شیلات ایران، شماره ۱،سال ۷، صفحات ۲۴-۱۸.

۳. سلطانی، ن.، بافته چی، ل. و شکروی، ش.(۱۳۸۱) بررسی ابعاد صنعتی و دارویی جلبک‌ها با تاکید بر نمونه‌های شناسایی شده از ایران، گزارش طرح پژوهشی، پژوهشکده علوم پایه کاربردی، جهاد دانشگاهی، دانشگاه شهید بهشتی.

۴. شکروی، شادمان (۱۳۷۷) ایجاد موزه جلبکی بنتیک دردانشگاه آزاد اسلامی واحد گرگان، گزارش طرح پژوهشی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرگان.

۵. شکروی، ش.، سلطانی، ن. و بافته چی، ل. (۱۳۸۱) تدوین تکنولوژی استفاده از سیانوباکتری‌ها به عنوان کود بیولوژیک در شالیزارها، شورای عالی تحقیقات نهاد ریاست جمهوری (طرح ملی) مجری پژوهشکده علوم پایه کاربردی، جهاد دانشگاهی، دانشگاه شهید بهشتی.

۶. شکروی، ش. و ساطعی، آ. (۱۳۸۲) بررسی پتانسیل سیانوباکتری به منظور تلقیح در شالیزار، گزارش طرح پژوهشی، معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرگان.

۷. **Jensen, A. (۱۹۷۸)** Chlorophylls and carotenoides. In: Handbook of Phycological Methods, Physiological and Biochemical Methods, eds. J.A. Hellebust & J.S. Craigie, Cambridge University Press.

۸. **John, D.M., Whitton, B.W. & Brook, A.J. (۲۰۰۲)** The Freshwater Algal Flora of The British Isles -Cambridge University Press.

۹. **Prescott, G.W. (۱۹۶۲)** Algae of the western great lake area. W.M.C. Brown Company Pub.

۱۰. **Stal, J.S. (۱۹۹۵)** Physiological ecology of cyanobacteria in microbial mats and other communities. New Phytology ۱۳۱, ۱-۳۲.

Archive of SID

www.SID.ir