

## بررسی تأثیرات اسیدیته و دی اکسید کربن در شدت نور محدود بر بقاء، رشد و توانمندی تعدیل pH جلبک سبز خاکزی کلرلا (*Chlorella* sp.) جمع آوری شده از شالیزارهای استان گلستان

\*مطهره حبیبی<sup>۱</sup>، شادمان شکروی<sup>۱</sup>، زهره حبیبی<sup>۲</sup>

۱. گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرگان

۲. گروه شیمی، دانشگاه شهید بهشتی

دریافت: ۱۳۸۸/۲/۸ - پذیرش: ۱۳۸۸/۶/۸

### چکیده

زمین‌های کشاورزی به ویژه شالیزارها تحت تأثیر مجموعه‌ای از تنش‌ها از جمله نوسانات اسیدیته می‌باشند. همچنین هنگام شب در محیط‌های غرقابی محدودیت شدیدی از نظر دی اکسید کربن ایجاد می‌شود که فلور جلبکی می‌بایست با آن مقابله کند. ریزجلبک سبز کلرلا از نظر کاربردی نمونه‌ای استراتژیک است. تاکنون در استان گلستان پژوهشی در رابطه با امکان تلقیح آن به زمین‌های کشاورزی صورت نگرفته است. به این منظور نمونه‌برداری از شالیزارهای استان گلستان در طی یک دوره یک ساله انجام گرفت. کشت خاک و سپس تلخیص نمونه در محیط N8 انجام شد و ۲ مرحله آزمایشی در رابطه با تأثیر اسیدیته و میزان دی اکسید کربن طراحی گردید. نمونه به مدت کوتاه جهت خوگیری ابتدایی در شرایط محیط مایع قرار داده شد. رشد بر اساس کدورت‌سنجی و رنگیزه‌ها (کلروفیل a، b، کاروتن و گزانتوفیل) به صورت در زیوه و در شیشه پس از استخراج با عصاره متانولی اندازه‌گیری شدند. در مرحله اول تیمارهای اسیدیته به صورت منفرد از نوع کاملاً اسیدی (۵)، خنثی (۷)، قلیایی (۹) و به شدت قلیایی (۱۲) مهیا شدند و در مرحله دوم تیمارهای اسیدیته به همراه شرایط متفاوت دی اکسید کربن (بدون هوادهی، تلقیح دی اکسید کربن، و هوادهی بدون دی اکسید کربن) به صورت توأم مورد بررسی قرار گرفتند. در هر دو بررسی نمونه‌ها در روزهای آغازین در فاز تصاعدی رشد قرار گرفتند، ولی شرایط اسیدی (۵) سبب افت محسوس رشد در روز سوم به بعد گردید. در تیمارهای اسیدیته توأم با غلظت‌های متفاوت دی اکسید کربن میزان رشد افزایش یافت. در این تیمارها نمونه کلرلا توانست بقاء و رشد خود را در تمام شرایط حفظ کند و قابلیت خوگیری به pHهای متفاوت را از خود نشان دهد. همچنین توانست بهترین pH (۹/۵) را برای رشد بهینه خود در شرایط متفاوت pH ایجاد کند. بکارگیری بافرهای متفاوت در غلظت‌های مختلف توانست تغییری در این روند ایجاد کند.

کلمات کلیدی: اسیدیته، بقا، تعدیل pH، رشد، جلبک سبز کلرلا، دی اکسید کربن، شالیزارهای گلستان

### مقدمه

همکاران، ۱۳۸۱). در حقیقت کلرلا ابزار مناسبی است که به منظور تحقیقات فیزیولوژیکی به کار می‌رود و نقش مهمی را در تحقیقات فتوسنتزی، تنفس و سنتز کلروفیل بر عهده دارد (John et al., 1982).

جلبک سبز خاکزی کلرلا (*Chlorella*) از نظر بیوتکنولوژی نمونه‌ای بسیار توانمند است (شکروی و

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

#### مواد و روش‌ها

نمونه‌های خاک از شالیزارهای استان گلستان، در طول دوره زمانی یک ساله جمع آوری شدند. کشت نمونه‌های خاک مطابق روش کشت ریزجلبک‌های خاکزی انجام گرفت (Richmond et al., 1986). پس از تشکیل کلنی، جدا سازی و کشت‌های بعدی، *Chlorella sp.* به صورت خالص تهیه گردید (شکروی و همکاران، ۱۳۷۸).

نمونه از نظر فیزیولوژیک مورد ارزیابی ابتدایی قرار گرفته، در اتاقک کشت، تحت تاثیر نور مستمر ۸۰۰ لوکس که توسط یک لامپ فلورسنت تامین می‌گشت، در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد و شرایط مناسب اسیدیته ۷.۲ pH در محیط مایع N8 وارد شده پس از طی یک یا دو چرخه زندگی برای بررسی تیمارها آماده می‌شوند (Olvera et al., 2000).

بررسی‌ها در ارلن‌های با حجم ۵۰۰ میلی لیتر محتوی ۳۰۰ میلی لیتر سوسپانسیون انجام شد. ابتدا تیمارها در شرایط متفاوت اسیدیته (۵، ۷، ۹ و ۱۲) بررسی شدند. سپس در مرحله بعد شرایط متفاوت اسیدیته به همراه غلظت‌های متفاوتی از دی اکسید کربن (بدون هوادهی، هوادهی بدون دی اکسید کربن، تلقیح دی اکسید کربن) مورد بررسی قرار گرفتند. در هر کدام از تیمارها بقا و رشد بر اساس کدورت سنجی، با استفاده از اسپکتروفتومتر ( $OD_{750}$ ) سنجش گردید. سنجش کلروفیل و کاروتنوئیدها به صورت درزیوه و در شیشه پس از استخراج با متانول با روش Jensen (۱۹۷۸) انجام گرفت.

به منظور بررسی توان تعدیل اسیدیته در نمونه مورد نظر، سنجش اسیدیته در طی یک هفته انجام گرفت. در این مرحله مقادیر ۲، ۵، ۱۰ میلی مولار بافر تریس و بافر فسفات نیز مورد استفاده قرار گرفتند. آنالیزهای آماری توسط نرم افزار excel و spss 12 بررسی گردید.

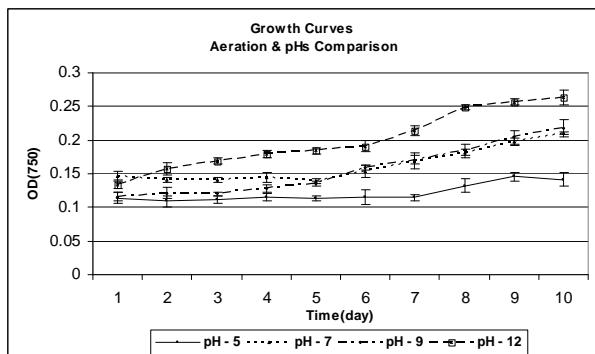
این نمونه از لحاظ غذایی نمونه ای بسیار با ارزش محسوب می‌گردد و حاوی مقادیر زیادی پروتئین، چربی و ویتامین است. خواص آنتی اکسیدانی کلرلا در حفاظت از پرتوهای مخرب به پوست ثابت شده است و به عنوان بهترین سم زدای طبیعی علیه فلزات سنگین نظیر جیوه، کادمیوم، کروم، حشره کش‌ها و سایر سموم شناخته شده است.

انتخاب کلرلا در این بررسی به دلیل اهمیت ویژه آن به عنوان کود بیولوژیک بوده است. زیرا مواد موثر موجود در کودهای جمع آوری شده از کلرلا می‌توانند به عنوان مواد تنظیم کننده رشد برای افزایش محصولات استراتژیک کشاورزی مانند گندم و برنج کارایی داشته باشند (فرهی آشتیانی، ۱۳۸۴). هم چنین به دلیل تزیید گازهای گلخانه‌ای در اتمسفر و گرم شدن کره زمین، تیمارهای شیمیایی و فیزیکی متنوعی به منظور جداسازی و بازجذب دی اکسید کربن از اتمسفر صورت گرفته است که استفاده از ریز جلبک‌هایی نظیر کلرلا بسیار مورد توجه بوده است (Kurano et al., 1995; Yang et al., 2001). تثبیت زیستی و مصرف دی اکسید کربن توسط ریز جلبک‌ها یکی از ارزش‌های بسیار سودمند زیستی برای کاهش آلاینده‌های صنعتی می‌باشند (Akimoto et al., 1997). تحقیقات انجام شده در رابطه با ریزجلبک‌های خاکزی مشخص نموده اند که آنها می‌بایست با مجموعه متنوعی از تنش‌های محیطی مقابله نمایند. این امر در مورد شالیزارها هم صادق است. جلبک‌های سبز و سیانوباکترها که فلور غالب شالیزارها را تشکیل می‌دهند، به طور دائم در معرض نوسان نور، اسیدیته، دی اکسید کربن و دیگر تنش‌های محیطی قرار دارند (Becker et al., 1994). در این حالت ریزجلبک‌هایی که فلور خاک را تشکیل می‌دهند، می‌بایست بتوانند از طریق راهکارهای متابولیک بقای خود را حفظ نمایند.

این در حالی است که در شرایط قلیایی، بخصوص در هنگام غرقابی شدن شالیزارها، تعادل گازی به نحوی جابجا می‌شود که بر محتوای بیکربنات به نحوی چشمگیر افزوده می‌شود. با توجه به اینکه آنزیم‌های فتوسنتزی نمی‌توانند از

### نتایج

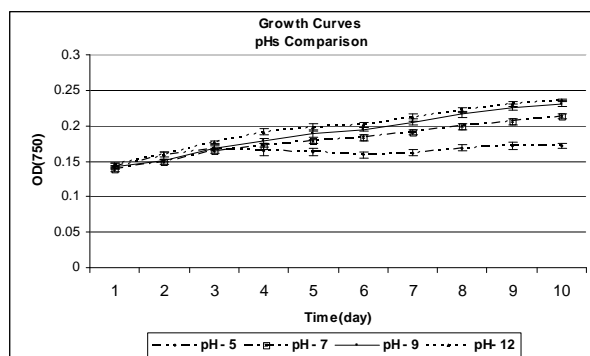
دقت در منحنی‌های رشد نمونه در شرایط بدون هوادهی در pH های ۵، ۷، ۹ و ۱۲ آشکار کرد که بالاترین مقدار رشد نمونه مربوط به pH های قلیایی ۹ و ۱۲ بوده است و در همه تیمارها نمونه از روز دوم بدون تاخیر وارد فاز لگاریتمی رشد گشته است و سیر صعودی مشابهی را طی نموده است.



شکل ۲: مقایسه منحنی‌های رشد در شرایط هوادهی و pH های

۵، ۷، ۹، ۱۲

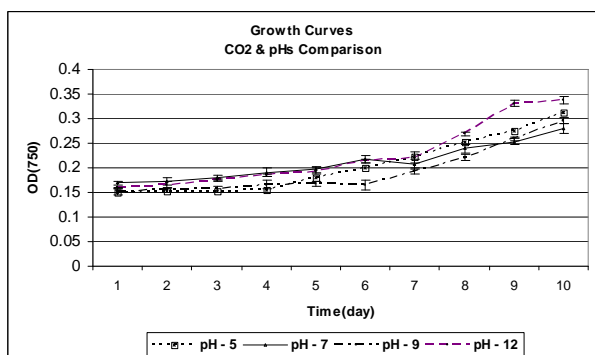
مشاهده منحنی‌های رشد نمونه هنگام استفاده از تلقیح دی اکسید کربن در محیط‌های با اسیدیته متفاوت نشان داد، در این شرایط بالاترین وضعیت رشد مربوط به pH قلیایی ۱۲ بوده است، با این تفاوت که در pH 5 نیز رشد خوبی به نسبت تیمارهای قبل مشاهده شده است. آنالیزهای آماری همبستگی مثبتی را میان تلقیح دی اکسید کربن و اسیدیته بر رشد نشان داده اند ( $R^2 = 0/84$ ).



شکل ۱: مقایسه منحنی‌های رشد در شرایط بدون هوادهی و

pH های ۵، ۷، ۹، ۱۲

در شرایط هوادهی (بدون تلقیح دی اکسید کربن) در محیط‌های با اسیدیته متفاوت نمونه بهترین رشد و جذب نوری را در pH 12 آشکار می‌سازد و همچنین نرخ ویژه رشد در pH 12 نسبت به دیگر pH ها بالاتر بوده است. کمترین رشد نمونه در این بررسی مربوط به pH 5 بوده است که نمونه پس از فاز تاخیری طولانی که تا روز هفتم به طول انجامیده، در روز هشتم وارد فاز تصاعدی رشد شده است.



شکل ۳: مقایسه منحنی‌های رشد در شرایط تلقیح دی اکسید کربن

و pH های ۵، ۷، ۹، ۱۲

جدول ۱: مقایسه نرخ‌های رشد در شرایط هوادهی و تلقیح دی اکسید کربن در pH های ۵، ۷، ۹، ۱۲

pH	pH 5 هوادهی	pH 5 دی اکسید کربن	pH 7 هوادهی	pH 7 دی اکسید کربن	pH 9 هوادهی	pH 9 دی اکسید کربن	pH 12 هوادهی	pH 12 دی اکسید کربن
نرخ رشد	0/07	0/11	0/073	0/103	0/085	0/152	0/146	0/214

جدول ۲: تغییرات pH بعد از یک هفته در شرایط هوادهی و تلقیح دی اکسید کربن در pH های ۵، ۷، ۹، ۱۲

pH	pH 5 هوادهی	pH 5 دی اکسید کربن	pH 7 هوادهی	pH 7 دی اکسید کربن	pH 9 هوادهی	pH 9 دی اکسید کربن	pH 12 هوادهی	pH 12 دی اکسید کربن
تغییرات pH بعد از ۸ روز	۹/۰۶	۹/۲۳	۹/۱۴	۹/۲۹	۹/۲۲	۹/۳۸	۹/۴۲	۹/۵۷

کشاورزی بررسی اکوفیزیولوژیک این نمونه‌ها و از جمله سنجش قابلیت بقای آنها کمال اهمیت را دارد (شکری و همکاران، ۱۳۸۱). بررسی‌های آماری نیز اختلاف معنی‌داری را میان رشد نمونه در pH 12 با دیگر شرایط اسیدیته آشکار می‌سازد (ANOVA,  $p < 0/05$ ). هم چنین با توجه به تغییرات محتوای دی اکسید کربن در زمین‌های کشاورزی و شالیزارها (کم و زیاد شدن محتوای دی اکسید کربن) نشان داده شد که نمونه توانمندی بقا در pH‌های متفاوت را داشته است (Yamamoto & Nakahara, 2005). به ویژه هنگام بالا بودن مقدار دی اکسید کربن جلبک خاکزی کلرلا توانسته در محدوده وسیعی از pH بقا و رشد خود را حفظ نماید (Richmond et al., 1999). هم چنین توانمندی تعدیل pH توسط نمونه مشخص نمود، به کار گیری مقادیر متفاوتی از بافرهای تریس و فسفات تاثیری بر pH مطلوب نمونه نداشته است.

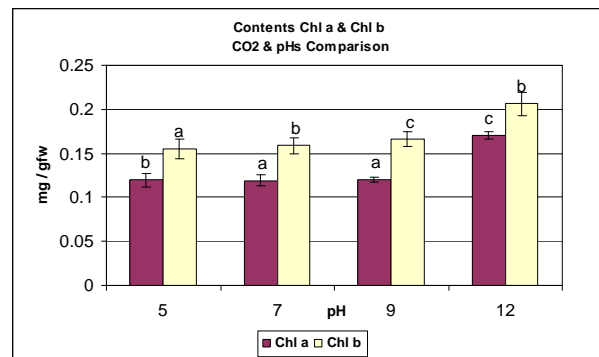
#### نتیجه گیری نهایی

بررسی وضعیت رشد نمونه در شرایط متفاوت دی اکسید کربن و pH آشکار نمود که جلبک سبز خاکزی کلرلا توان بقا و رشد در pH‌های قلیایی بالا نظیر ۱۱ و ۱۲ را داشته است و محتوای بالای رنگیزه ای در pH 12 مشاهده شده است. هم چنین در شرایط تلقیح دی اکسید کربن خارجی در pH 5 نیز نمونه رشد بالایی را آشکار نموده است. در این بررسی مشخص گردید نمونه کلرلا توان تعدیل اسیدیته را در محیط‌های متفاوت دارا می‌باشد.

#### سپاسگزاری

نگارندگان وظیفه خود می‌دانند از تمام عزیزانی که در این پژوهش همکاری نمودند، تشکر و سپاسگزاری نمایند. هم چنین تشکر و سپاسگزاری خاص از سرکار خانم کیانی مسئول محترم آزمایشگاه تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی گرگان به دلیل همراهی ایشان ضروری می‌باشد.

بررسی محتوای رنگیزه‌ها در تیمارهای بدون هوادهی و هوادهی اختلاف چندانی را در اسیدیته‌های متفاوت آشکار ننموده است. تنها هنگامی که از تلقیح دی اکسید کربن در محیط‌های با 5, 7, 9 and 12 pH استفاده شد، اختلاف معنی‌داری میان محتوای رنگیزه‌ها و اسیدیته مشخص شد (ANOVA,  $p < 0/05$ ). در این شرایط همبستگی مثبتی میان افزایش pH و بالارفتن محتوای رنگیزه‌ها مشاهده می‌گردد به گونه‌ای که بالاترین مقدار کلروفیل‌ها (a و b) مربوط به pH 12 می‌باشد که با توجه به یافته‌های Adams و همکاران (۱۹۹۹) می‌تواند ناشی از فعال بودن سیستم فتوسنتزی در شرایط تلقیح دی اکسید کربن باشد. مقدار کاروتنوئیدها نیز وضعیت مشابهی با کلروفیل‌ها دارد و در pH 12 بالاترین مقدار را نشان می‌دهد.



شکل ۴: مقایسه محتوای کلروفیل a و b در شرایط تلقیح دی اکسید کربن و pH‌های ۵، ۷، ۹، ۱۲.

هم چنین بررسی توانایی تعدیل اسیدیته توسط نمونه مشخص نمود که این نمونه خاکزی قادر است pH‌های متفاوت در شرایط متفاوت هوادهی و تلقیح دی اکسید کربن را به pH دلخواه و مطلوب خود (۹/۵ - ۹) رسانده و رشد مطلوب و بهینه خود را در این شرایط تداوم بخشد.

#### بحث

در این بررسی بقا و رشد نمونه در بالاترین pH قلیایی (۱۲) به خوبی صورت گرفته است که نشان دهنده توانمندی خوگیری نمونه به شرایط اسیدیته متفاوت و قلیایی بالا می‌باشد (Chang & Yang, 2003) این در حالی است که به دلیل توانمندی اقتصادی ذاتی نمونه در بیوتکنولوژی

Botanical Bulletin of Academia Sinica vol.44, Pp 43-52.

منابع

**Jensen, A. (1978).** Chlorophylls and carotenoids. In: Handbook of Phycological Methods, Physiological and Biochemical Methods, eds. J.A. Hellebust & J.S. Craigie, Cambridge University Press.

**John, U., Grobbelaar, Bernd, M.A., Kroon, Tineke Burger,-Wiersma and Luuc, R., Mur., (1982).** Influence of medium frequency light/dark cycles of equal duration on the photosynthesis and respiration of chlorella pyrenoidosa. Journal article. Vol. 238, Pp. 53-62.

**Kurano, N., H. Ikemoto, H. Miyashita, T. Hasegawa, and S. Miyachi. (1995)a.** Carbon dioxide uptake rate of *Chlorococcum littorale*. J. Mar. Biotech. 3:108-110.

**Richmond, A., Karg, S., & Boussiba, S., (1982).** Effects of Bicarbonate and Carbon Dioxide on the Competition between *Chlorella vulgaris* and *Spirulina platensis*. Plant and Cell Physiology, vol.23, No.1411– 1417.

**Richmond, A. (1999).** Efficient utilization of high irradiance for production of photoautotrophic cell mass: a survey. *J. Appl. Phycol.* 8, pp. 381–387.

**Yamamoto, Y., Nakahara, H. (2005).** Competitive dominance of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* in nutrient – rich culture conditions with special reference to dissolved inorganic carbon uptake. *Physiological Research* Vol. 53 P. 203.

**Yang, S.S., E.H. Chang, J.Y. Lee, Y.Y. Horng, and C.R. Lan. (2000).** Isolation and application of carbon dioxide fixation microbes in Taiwan. *Month. J. Taipower's Eng.* 624:65-82.

e.Botanical Bulletin of Academia Sinica vol.44.

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

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.

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.

فرهی آشتیانی، ص. (۱۳۸۴). از جلبک تک سلولی تا سوخت پاک، دانشگاه تربیت مدرس.

**Akimoto, M., Yamada, H., Ohtaguchi, K. and Koide, K., (1997).** Photoautotrophic cultivation of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* as a method for carbon dioxide fixation and alpha-linolenic acid production. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 74, pp. 181–183.

**Becker, E.W. (1994).** Microalgae: Biotechnology and Microbiology, Cambridge University Press, Cambridge.

**Chang, Ed-H., Yang, Sh. (2003).** Some characteristics of microalgae isolated (*Chlorella* sp.) in Taiwan for biofixation of carbon dioxide.

## Study of combination effects of pH and carbondioxide concentration on viability, growth and pH adjusting ability of green algae *Chlorella* sp. GAH0013 at limited irradiance conditions

Habibi, M<sup>1</sup>., Shokravi, Sh<sup>1</sup>., Hbibbi, Z<sup>2</sup>.

1. Departement of Biology, Azad university of Gorgan.Golestan, Iran

2. Departement of Chemistry, Shahid Beheshty of Tehran, Iran

### Abstract

Agricultural soils especially paddy-fields may be affected by a collection of different stresses including acidity fluctuations. We may see an extremely limited CO<sub>2</sub> condition in paddy-field that algal flora must be acclimate with them. Green algae *Chlorella*, seems a strategic algae with economic and applied point of views. We have no report about this algae in Golestan province especially about possibility of algalization with this algae. Soil samples were collected from paddy-fields of Golestan province during one year. Culturing, purification and preparing unialgal have been done in N8 culture media. Then two steps have been considered for analyzing of behavior of this algae in different acidity and carbon dioxide concentrations. This or short time primitive acclimation the algae were treated at different pHs and growth was measured using turbidity and biomass analysis and pigment including Chlorophyll a, b, β-carotene and xanthophylls were measured in vivo and in vitro after methanolic extraction. At the first step, pH treatments were extremely acidic (pH5), neutral (pH 7), alkaline (pH 9) and extremely alkaline (pH 12). At the second step, combination of pHs and that in all treatment, log phase of growth cure. Results showed that in all treatment, log phase of growth curve occurred in a short time. pH5 caused decline in growth in 3<sup>rd</sup> day after inoculation. Specific growth rate was significantly higher in limited CO<sub>2</sub> conditions. It was noticeable that in all treatments *Chlorella* sp. GHA0013 could adjust the pHs of the medium at optimum condition (pH9.5) using different buffer concentration had no effect on this ability.

**Key words:** *Chlorella*, CO<sub>2</sub>, Viability, Growth, pH Adjusting Ability, Paddy-fields Golestan.