تأثیر غلظت‌های مختلف فسفر بر زیست‌توده و رشد در جلبک سبز کلروکوکوم (*Chlorococcum* sp.)

امیدوار فرهادیان*، سید مجتبی فلاحی و نصرالله محبوبی صوفیانی

اصفهان، دانشگاه صنعتی اصفهان، دانشکده منابع طبیعی، گروه شیلات

تاریخ دریافت: ۹۱/۱/۱۶ تاریخ پذیرش: ۹۱/۱۰/۱۲

چکیده

فاکتورهای بسیاری بر افزایش و کاهش زیست‌توده در جمعیت جلبک‌های میکروسکوپی تأثیر می‌گذارد. یکی از مهمترین فاکتورها میزان فسفر (ارتوفسفات) محیط کشت جلبک‌های میکروسکوپی است. در این مطالعه تأثیر ۶ تیمار شامل BBM (Bold Basal's Medium) به‌عنوان شاهد، BBM + عصاره خاک (دارای ۰/۰۱ درصد وزنی فسفر)، BBM + ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۵ میلی‌گرم در لیتر همگی از فسفات سدیم (Na_3PO_4. $12H_2O$) هریک به‌عنوان یک تیمار در یک طرح کامل تصادفی با سه تکرار برای هر تیمار بر زیست‌توده (Biomass)، رشد و میزان کلروفیل *a* در جلبک سبز کلروکوکوم در شرایط آزمایشگاهی بررسی گردید. نتایج نشان داد که بالاترین میانگین تراکم جلبکی در تیمار ۲۵ +BBM ($۱۱/۰۴ \times ۱۰^{۶}$سلول در هر میلی لیتر) و در تیمار عصاره خاک + BBM ($۱۱/۵۴ \times ۱۰^{۶}$سلول در هر میلی لیتر) در روز ۱۰ پرورش بود، همچنین بالاترین میانگین زیست‌توده خشک در BBM + عصاره خاک و BBM + ۲۵ به‌ترتیب ۰/۷۹۲ و ۰/۷۷۳ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بدست آمد. نتایج نشان داد که بالاترین میانگین کلروفیل *a* بدست آمده در تیمار ۲۵ +BBM (۱۱/۳۹ میلی‌گرم در لیتر) و تیمار BBM + عصاره خاک (۱۱/۲۰ میلی گرم در لیتر) بود. بالاترین میانگین میزان رشد ویژه (*SGR*) و کمترین زمان دوبرابر شدن جمعیت *(Dt)* در تیمار BBM + عصاره خاک (۰/۱۲۸ در روز ، ۵/۴۳ روز) و تیمار ۲۵+ BBM (۰/۱۲۴ در روز، ۵/۶۰ روز) بدست آمد.

واژه‌های کلیدی: جلبک سبز *Chlorococcum*، محیط کشت BBM، فسفر (ارتو فسفات)، میزان رشد ویژه، کلروفیل *a*، عصاره خاک

* نویسنده مسئول، تلفن: ۳۹۱۳۵۶۴-۰۳۱۱ ، پست‌الکترونیکی: omfarhad@cc.iut.ac.ir

مقدمه

امروزه از جلبکهای میکروسکوپی و ماکروسکوپی بطور اصلی در غذای دام‌ها و آبزیان پرورشی، و همچنین به‌عنوان کودهای زیستی استفاده می‌شود. جلبک‌ها بدلیل منابع غذایی کاملی که برای لاروها در آغاز زندگیشان تولید می‌کنند بهترین گزینه برای استفاده در پرورش آبزیان هستند. وجود اسیدهای چرب، کاروتنوییدها، ویتامین‌ها و مواد مغذی مورد نیاز لاروها در جلبک‌ها، بر اهمیت بکارگیری آنها می‌افزاید (۴). از سوی دیگر، زیست‌توده جلبکی را می‌توان طی فرایندهای پیرولیز (Pyrolysis) و تخمیر (Fermentation) برای تولید سوخت‌های زیستی و فراورده‌هایی با قابلیت تولید انرژی تجدیدپذیر استفاده نمود (۱۱ و ۱۲). برای مثال تولید بیودیزل در کشور آلمان از حدود ۲۸۹۰ میلیون تن در سال ۲۰۰۷ به ۵۳۰۲ میلیون تن در سال ۲۰۰۸ رسیده است که نشان‌دهنده اهمیت این منابع انرژی در حال حاضر است (۱۱ و ۱۲). بنابراین تولید سوخت‌های زیستی از جلبک‌های میکروسکوپی مقادیر زیادی زیست‌توده جلبکی لازم دارد (۱۱ و ۱۲). تولیدکنندگان (جلبکها و گیاهان) فسفر محلول را جذب کرده و آن را با روشهای مختلف به فسفر آلی تبدیل می‌کنند. فسفر در چربی‌های موجود در غشاء سلولی،

بسیاری از کوآنزیم‌ها، DNA، RNA و حتی ATP مشارکت دارد. مصرف‌کنندگان فسفر را از طریق خوردن تولیدکنندگان بدست می‌آورند (۴). فسفر یازدهمین ماده معدنی است که به فراوانی در پوسته زمین یافت می‌شود و حالت گازی ندارد. فسفر طبیعی معدنی بطور اساسی بصورت فسفات است که به شکل آپاتیت یافت می‌شود. فسفات بعلت سنگین بودن وزن مولکولی هرگز در اتمسفر وجود ندارد و علاوه بر موجودات زنده بصورت محلول در آب وجود دارد. فرایندهای چرخه فسفر در سیستم‌های آبی و خشکی مشابه می‌باشند (۴). یکی از اشکال مهم فسفات ارتوفسفات ($H2PO4^-$, $HPO4^{2-}$) است که طی فرایندهای طبیعی حاصل می‌شود، اما بطور عمده از طریق فاضلابهای تصفیه نشده یا ناقص تصفیه شده، از پساب‌ها و یا رواناب‌های کشاورزی و آبزی پروری و استفاده از انواع کودهای فسفردار حاصل می‌شود. اگرچه جلبکها و گیاهان عناصر کلیدی در انتقال فسفات به موجودات زنده هستند اما اهمیت فسفر بطور اصلی به نقش آن در رشد موجودات مربوط است. بطور عمومی فسفر بصورت ارتوفسفات عامل محدودیت رشد موجودات در سیستم‌های آب شیرین است، زیرا تمام آن مصرف شده و رشد تولیدکنندگان متوقف می‌شود (۳۶).

Redfield در سال ۱۹۳۴ نشان داد که تولید بیوماس جلبکهای دریایی نیاز به کربن، نیتروژن و فسفر به نسبت‌های ۱۰۵ ، ۱۵ و ۱ دارد (۳۲) و بعداً توسط Uhlmann and Albrecht در سال ۱۹۶۸ به جلبکهای آب شیرین نیز تعمیم داده شد (۳۷). بطور طبیعی زمانی که میزان فسفر در آب افزایش می‌یابد میزان زیست‌توده جلبکی نیز افزایش می‌یابد. در کمتر از ۱۰۰ میکروگرم فسفر در لیتر ارتباط بین زیست‌توده و فسفر خطی است، در حالی‌که در بالاتر از این سطح عوامل دیگری از قبیل نور بطور افزایشی بر زیست‌توده تأثیر می‌گذارند (۳۱). بطور متوسط هر ۱ میکروگرم فسفر می‌تواند ۱ گرم کلروفیل *a* را تولید نماید (۳۷). از سوی دیگر، با توجه به موقعیت‌های اکولوژیکی تولیدکنندگان، نسبت بهینه N:P از۱ : ۴۵ تا۱ :۸/۵ بسیار متفاوت می‌باشد. گونه‌های تثبیت‌کننده نیتروژن مثل جلبک سبز-آبی اغلب نسبت بالای N:P را دارند. برای مثال شکوفایی (Bloom) جلبک *Trichodesmium* در نسبت N:P بین ۱ :۱۲۵ تا ۱ :۴۲ رخ می‌دهد. در حالی‌که در جلبک‌های سبز نسبت N:P مقدار۱ :۳۰ و در دیاتوم‌ها این مقدار ۱:۱۰ و در Dinophyceae ۱:۱۲ می‌باشد (۳۷).

جنس کلروکوکوم *Chlorococcum* از جلبکهای سبز در آبهای شیرین است که به خانواده Chlorococcaceae و رده Chlorophyceae تعلق دارد. کلروکوکوم‌ها در هر دو محیط آبی و خاکی زندگی می‌کنند و دارای ۱ تا چند کلروپلاست به همراه پیرونویید منفرد ستاره‌ای شکل از مشخصات سلولی آنهاست. اندازه سلولهای کلروکوکوم بین ۷/۸ تا ۱۵/۲ میکرون است و رنگ آن سبز و به صورت تکی و یا کلنی وجود دارد (۵، ۷، ۲۳). اسپورهای کلروکوکوم در شرایط نامساعد و تاریکی حیات خود را حفظ می‌کنند و زمانی که در شرایط مساعد رشد در آب شیرین قرار می‌گیرند قادر به تشکیل هزاران سلول جدید هستند. جلبک‌های کلروکوکوم‌ها قادر به تشکیل کلونی (Colonization)در محیط‌های خاکی و مرطوب، بر روی سنگ‌ها بوده و بطور پریفیتیک زندگی می‌کنند. وجود چنین ویژگی‌هایی باعث شده تا این گونه امروزه به‌عنوان گونه‌ای مناسب در آبزی پروری بخصوص پرورش جلبک‌های میکروسکوپی در تولید کارتنوئیدها مطرح شود (۵، ۷، ۲۳). Zhang و همکاران در سال ۱۹۹۷ (۳۹) بیان کردند که جلبک کلروکوکوم در pHهای گوناگون رشد و پرورش می‌یابد و گزارش دادند که بیشترین میزان رشد ویژه ۰/۰۱ تا ۰/۰۶ در ساعت در pHهای ۴ و ۸ است، در حالی‌که ۰/۰۳۲ در ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و ۰/۰۵۵ در ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد بود. همچنین آنها گزارش کردند با افزایش میزان نیتروژن محیط کشت از ۴ تا ۸ گرم در لیتر، میزان زیست توده در جلبک کلروکوکوم

افزایش می‌یابد و در روز ۱۰ پرورش در حدود ۱ گرم در لیتر است. با توجه به اینکه این گونه قادر است pHهای گوناگون را تحمل نماید کاندید مناسبی برای پرورش در مقایسه با سایر گونه‌ها ازقبیل کلرولا (*Chlorella*) و یا سندسموس (*Scenedesmus*) در محیط‌های باز است. این گونه مطالعات بیشتری لازم دارد تا بتوان از قابلیتهای آن در ایران برای مصارف صنعتی و دارویی نیز استفاده نمود.

هدف از انجام این تحقیق تأثیر غلظت‌های مختلف فسفر محیط کشت بر زیست‌توده، میزان رشد و کلروفیل *a* در جلبک سبز *Chlorococcum* می‌باشد که در شرایط آزمایشگاهی و کنترل شده انجام شد. اطلاعات حاصل از این تحقیق را می‌توان در تحقیقات در خصوص حذف فسفر از آبهای با فسفر بالا و یا آبهای با درجه یوتروفیکاسیون بالا برای پالایش آبها و حذف فسفر و همچنین تولید زیست‌توده جلبکی برای مصارف مختلف دارویی و صنعنی استفاده نمود.

مواد و روشها

جمع‌آوری و خالص‌سازی جلبک *Chlorococcum* : جمع‌آوری نمونه‌های جلبکی با نمونه‌برداری آب از استخرهای پرورش ماهی انجام گردید. سپس با استفاده از میکروپیپت سلول‌های فیتوپلانکتونی را بطور ناخالص جدا نموده و با بهره‌گیری از محیط کشت جامد آگار (Agar-Agar) و تجدید مداوم کشت ذخیره خالص جلبکی تهیه گردید. برای تهیه محیط کشت جامد به ۲۵۰ میلی لیتر آب مقطر، ۲ گرم آگار جامد به محیط کشت BBM (Bold Basal's Medium) در موارد بعدی بر اساس روش Nichols در سال ۱۹۷۳ اضافه شد محیط کشت تهیه شده در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه اتوکلاو گردید. آنگاه محلول حاصل را بصورت مایع و تقریبا گرم و در شرایط ضدعفونی و استریل شده در پتری‌دیش‌های پلاستیکی (۵۰ میلی‌متری) ریخته و درب آن با پارافیلم بسته شد. پس از آنکه محیط کشت تهیه شده در دمای اتاق به حالت جامد تبدیل گردید، نمونه ناخالص تهیه شده از استخرهای پرورش ماهی را بر روی محیط کشت قرار داده تا کلنی‌های جلبکی بعد از ۲۰ روز تشکیل شود. در مرحله بعد با مشاهده کلنی‌های جلبک کروکوکوم با میکروسکوپ و بعد از حصول اطمینان، کار پرورش آن با استفاده از با محیط کشت مایع BBM انجام گردید. جلبک‌ها بعد از کشت‌های متوالی در لوله آزمایش، ارلن مایرهای ۵۰ میلی لیتری، ۱۰۰ میلی لیتری و بدست آوردن تراکم نسبتا قابل ملاحظه‌ای از جلبک مورد نظر، کشت در ارلن مایرهای دو لیتری انجام شد.

عصاره خاک و اندازه‌گیری کربن، نیتروژن و فسفر: به‌منظور تهیه عصاره خاک، خاک با آب مقطر به نسبت ۱ به ۴ مخلوط و بعد اتوکلاو و به مدت ۷ روز به حالت ثابت گذاشته شد. سپس با استفاده از کاغذ صافی فیلتر گردید و مایع حاصل پس از سه روز نگهداری در استوانه مدرج آزمایشگاهی به حجم ۱۰۰۰ میلی لیتر رسانده شد؛ بخش رویی آن به آرامی و با دقت جداسازی گردید تا در تیمار عصاره خاک استفاده شود.

آنالیزهای لازم خاک مورد استفاده نشان داد که دارای ۰/۵۲ درصد وزنی ماده آلی، ۰/۰۱ درصد وزنی نیتروژن و ۰/۰۱ درصد وزنی فسفر بود. اندازه‌گیری کربن با استفاده از روش Black و Wilkie در ۱۹۳۴ بر اساس اکسیداسیون مرطوب مواد آلی انجام شد. از روش Kjeldal در سال ۱۹۶۵ برای اندازه‌گیری نیتروژن با استفاده از اسید سولفوریک غلیظ (۹۶ درصد) در دمای ۳۷۰ درجه سانتیگراد و کمک از کاتالسیت (شامل سولفات مس، پتاسیم ، دی اکسید سلنیوم) برای افزایش نقطه‌جوش تا تبدیل رنگ سبز به صورتی انجام شد. فسفر به روش Olson در سال ۱۹۶۵ با بکارگیری اسید آسکوربیک به‌عنوان ماده احیاءکننده بطریق کالریمتری با کمک اسپکتروفتومتر (JENWAY6400) با قرائت میزان جذب در طول موجهای ۸۸۰ نانومتر و ۷۲۰ نانومتر بدست آمد (۶).

نحوه انجام آزمایش: کشت جلبک کلروکوکوم در ۶ تیمار شامل BBM، BBM + عصاره خاک، BBM + ۵ میلی‌گرم در لیتر، BBM + ۱۰ میلی‌گرم در لیتر، BBM + ۱۵ میلی‌گرم در لیتر و BBM + ۲۵ میلی‌گرم در لیتر تماماً از فسفات سدیم ($Na_2HPO_4 .12H_2O$) در یک طرح کامل تصادفی با سه تکرار در هر تیمار در ارلن مایرهای ۲ لیتری به مدت ۱۴ روز انجام شد. برای تهیه تیمارهای آزمایش ابتدا محلولی با غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر فسفات سدیم تهیه گردید و بعد برای تهیه تیمارها با استفاده از آب مقطر دوبار تقطیر شده عمل رقیق سازی انجام گردید. جلبک‌ها در شرایط ۲۴ درجه سانتی‌گراد و شدت نور ۶۰ میکرومول فوتون بر متر مربع بر ثانیه و ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی کشت شدند. در روز ابتدایی از هر تیمار نمونه‌هایی برای اندازه‌گیری تعداد سلول جلبک برداشته شد و در پایان آزمایش نیز زیست‌توده خشک، تراکم سلول جلبک و میزان کلروفیل *a* اندازه‌گیری شد و براساس تراکم سلول‌های جلبک میزان رشد ویژه (*SGR*) (Specific Growth Rate) و زمان دوبرابر شدن جمعیت (*Dt*) (Doubling Time) مورد محاسبه قرار گرفت.

اندازه‌گیری تراکم جلبک‌ها، وزن خشک، کلروفیل *a*، میزان رشد و زمان دوبرابر شدن جمعیت : شمارش جلبک‌ها با استفاده از لام هموسیتومتر و با روش پیشنهاد شده توسط Martinez و Chakroff در سال ۱۹۷۵ بعد از تثبیت نمونه‌ها در محلول لوگل ایدین (مقدار ۰/۱ میلی لیتر در هر ۳ میلی لیتر نمونه) انجام شد. زیست‌توده خشک جلبک‌ها با استفاده از روش پیشنهاد شده توسط Lavens و Sorgeloos در سال ۱۹۹۶ با توزین حجم معینی از جلبک‌های شمارش شده بدست آمد. اندازه‌گیری کلروفیل *a* نمونه‌ها پس از فیلتراسیون نمونه‌ها و افزودن استون و سانتریفیوژ آنها با قرائت میزان جذب نمونه‌ها بوسیله اسپکتروفتومتر در طول موج‌های ۶۶۴، ۶۴۷ و ۶۳۰ نانومتر با روش شرح داده شده بوسیله Parsons و همکاران ۱۹۸۴ انجام شد. سپس میزان کلروفیل *a* با استفاده از رابطه $a_{\text{کلروفیل}} = 11.85(OD_{664}) - 1.54(OD_{647}) - 0.08\ (OD_{630})$ (بر حسب میلی‌گرم بر لیتر) محاسبه گردید.

میزان رشد ویژه (*SGR*) با استفاده از رابطه $SGR = (\ln N_2 - \ln N_1)/\Delta t$ محاسبه گردید که در آن N_2 تعداد سلولهای جلبک در انتهای آزمایش و N_1 تعداد سلولهای جلبک در ابتدای آزمایش و Δt مدت زمان انجام آزمایش است (۲۶). زمان دوبرابر شدن (D_t) جمعیت جلبک‌ها با استفاده از رابطه $D_t = \ln 2 / SGR$ محاسبه گردید (۲۶).

تجزیه و تحلیل آماری: تحلیل آماری داده‌ها با تجزیه واریانس یک‌طرفه (One-way ANOVA) پس از حصول اطمینان از مفروضات تجزیه واریانس انجام شد. برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون دانکن در سطح معنی‌دار ۵٪ استفاده شد (۳۸). کارهای آماری لازم با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS انجام گردید (۳۳).

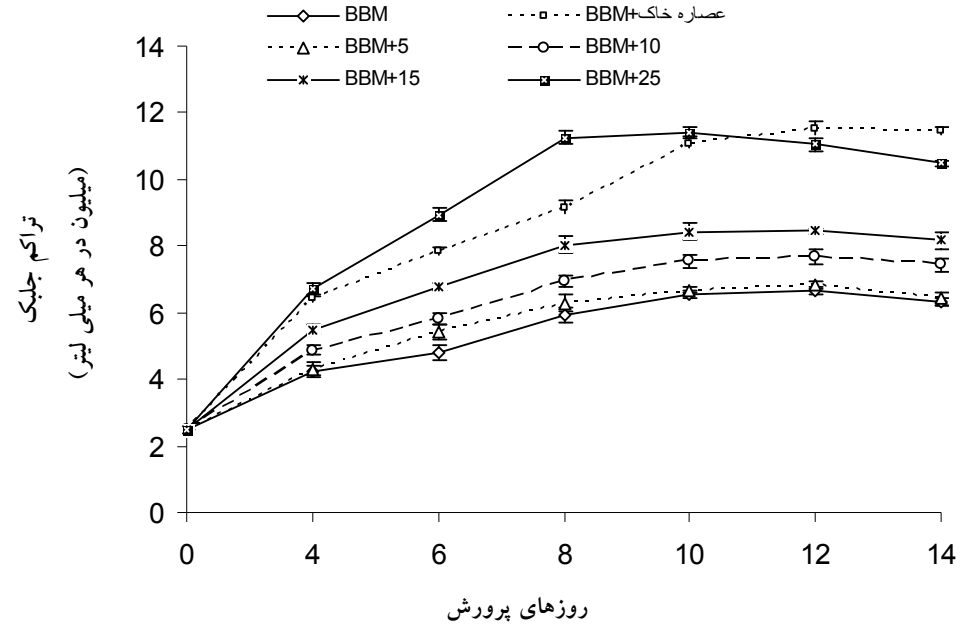
نتایج

آنالیز واریانس یک‌طرفه نتایج بدست آمده از تراکم سلول جلبک، زیست‌توده خشک، کلروفیل *a*، میزان رشد ویژه و زمان دو برابر شدن جمعیت جلبک سبز کلروکوکوم در تیمارهای مختلف آزمایشی اختلاف معنی داری را نشان داد ($P<0.05$) (جدول۱). شکل ۱ میانگین تراکم جلبک کلروکوکوم را در تیمارهای مختلف آزمایشی در طی روزهای مختلف پرورش نشان می‌دهد. در این مطالعه افزودن ۲۵ میلی‌گرم در لیتر فسفات سدیم به محیط کشت BBM باعث رشد مناسب و سریع جلبک سبز کلروکوکوم در روز ۴ پرورش گردید، این روند با شدت تا روز ۸ پرورش ادامه پیدا کرد و از روز ۸ تا ۱۰ افزایش تراکم جلبک قابل ملاحظه نبود و از روز ۱۰ تا ۱۴ روند کاهشی در تراکم اندازه‌گیری شد. در تیمار BBM + عصاره خاک یک روند افزایشی مداوم در طول پرورش کلروکوکوم دیده شد. بطورکلی نتایج شمارش در روزهای مختلف نشان داد

که بالاترین تراکم جمعیت جلبک کلروکوکوم در شرایط آزمایش طراحی شده در روز ۱۲ پرورش است.

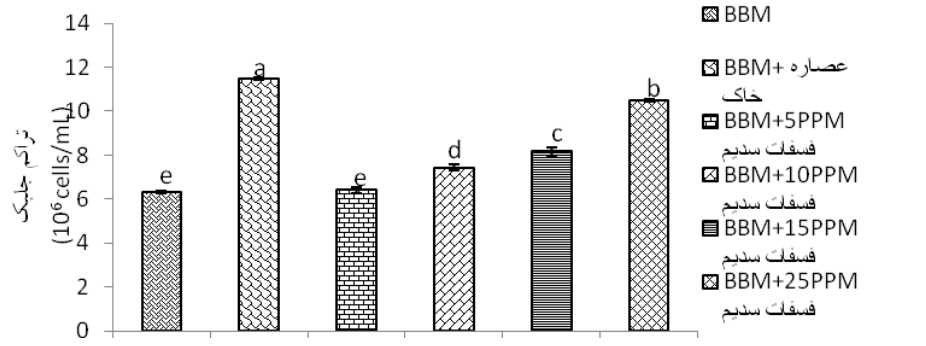
جدول۱- تجزیه واریانس یک‌طرفه (One-way ANOVA) تأثیر تیمارهای آزمایشی بر پارامترهای مختلف اندازه‌گیری شده در پرورش جلبک سبز کلروکوکوم

	منابع تیمار	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	میزان F	سطح معنی‌دار
تراکم سلول	تیمار	۵	$۶/۹\times۱۰^{۱۳}$	$۱/۳۷۸\times۱۰^{۱۳}$	۴۷۳/۴	۰/۰۰۰
	خطا	۱۲	$۳/۵\times۱۰^{۱۱}$	$۲/۹۱۰\times۱۰^{۱۰}$		
	کل	۱۷	$۶/۹\times۱۰^{۱۳}$			
کلروفیل *a*	تیمار	۵	۱۵۰/۲۰۹	۳۰/۰۴۲	۶۱۲۴۷/۴	۰/۰۰۰
	خطا	۱۲	۰/۰۰۶	۰/۰۰۰		
	کل	۱۷	۱۵۰/۲۱۵			
زیست‌توده خشک	تیمار	۵	۰/۵۸۴	۰/۱۱۷	۳۸۰/۳	۰/۰۰۰
	خطا	۱۲	۰/۰۰۴	۰/۰۰۰		
	کل	۱۷	۰/۵۸۸			
میزان رشد ویژه *(SGR)*	تیمار	۵	۰/۰۰۶	۰/۰۰۱	۴۴۸/۰	۰/۰۰۰
	خطا	۱۲	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰		
	کل	۱۷	۰/۰۰۶			
زمان دوبرابر شدن جمعیت *(Dt)*	تیمار	۵	۸۳/۰۴۵	۱۶/۶۰۹	۲۹۰/۱	۰/۰۰۰
	خطا	۱۲	۰/۶۸۷	۰/۰۵۷		
	کل	۱۷	۸۳/۷۳۲			

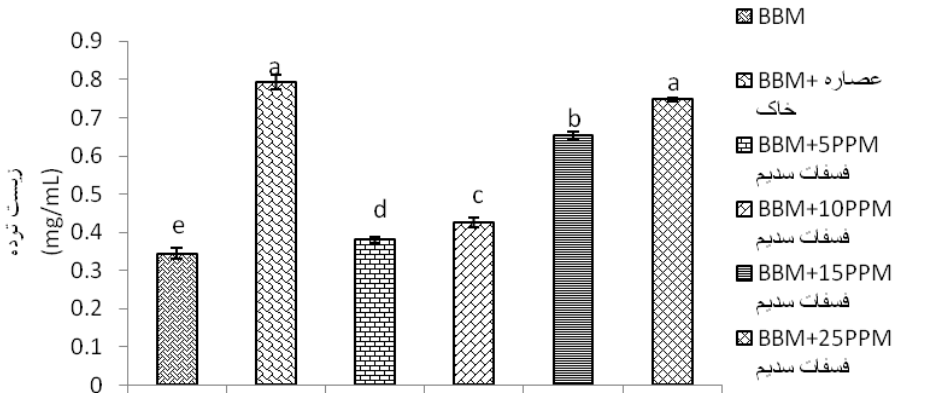


شکل ۱- میانگین (خطای استاندارد ±) تغییرات تراکم جمعیت کلروکوکوم در تیمارهای آزمایشی در روزهای پرورش (داده ها میانگین سه تکرار در هر تیمار هستند).

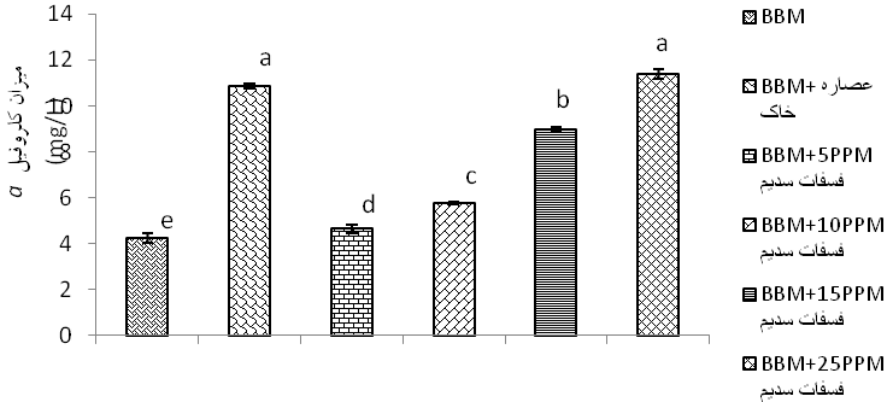
الف



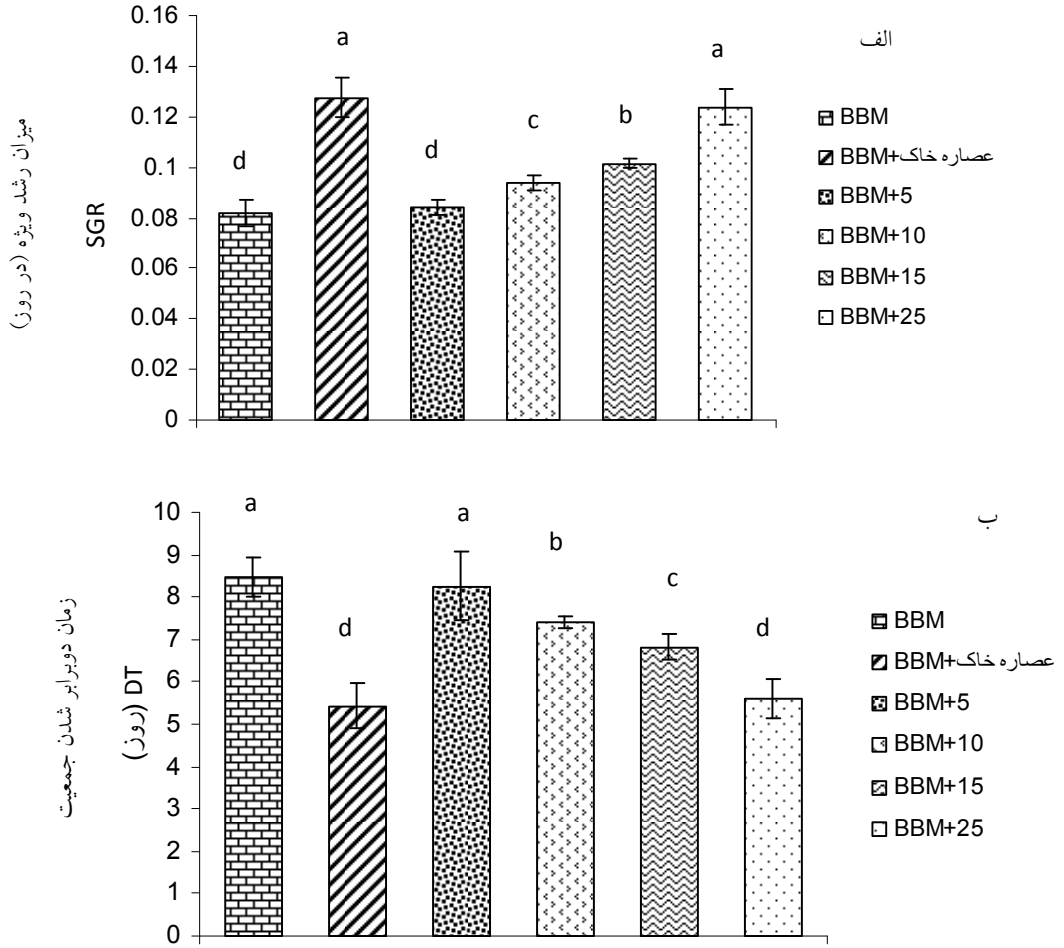
ب



ج



شکل ۲- میانگین (خطای استاندارد ±) الف: تراکم سلول جلبکی، ب: زیست‌توده خشک، ج: میزان کلروفیل a پرورش جلبک کلروکوکوم در تیمارهای آزمایشی (حروف مشخص شده در هر نمودار که دارای حداقل یک حرف مشابه هستند از نظر آماری با آزمون دانکن در سطح ۵ درصد اختلاف معنی‌داری ندارند) ($P>0.05$).



شکل ۳- میانگین (خطای استاندارد ±) الف: میزان رشد ویژه (SGR)، ب: زمان دو برابر شدن جمعیت جلبک کلروکوکوم در تیمارهای آزمایشی (حروف مشخص شده در هر نمودار که دارای حداقل یک حرف مشابه هستند از نظر آماری با آزمون دانکن در سطح ۵ درصد اختلاف معنی‌داری ندارند)($P>0.05$).

مقایسه میانگین‌های تراکم جلبک کلروکوکوم در تیمارهای مختلف نشان داد که بیشترین تراکم سلول جلبکی در تیمار عصاره خاک + BBM ($۱۱/۵۴ \times ۱۰^{۶}$ سلول در میلی لیتر) و بدنبال آن BBM +۲۵، BBM +۱۵، BBM + ۱۰، BBM +۵ و BBM (شاهد) بود (شکل۲- الف). مقایسه زیست‌توده خشک در تیمارهای مختلف در این آزمایش نشان داد که بالاترین میانگین وزن خشک بدست آمده مربوط به تیمارهای BBM + عصاره خاک و تیمار BBM +۲۵ به مقدار ۰/۷۹۲ و ۰/۷۷۳ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بود، در حالی‌که پایین‌ترین میانگین زیست‌توده خشک متعلق به تیمار BBM به میزان ۰/۳۴۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بود (شکل۲-ب). نتایج اندازه‌گیری میزان کلروفیل *a* نشان داد که بالاترین میانگین کلروفیل بدست آمده مربوط به تیمار BBM + ۲۵ (۱۱/۳۹ میلی‌گرم در لیتر) و تیمار BBM + عصاره خاک (۱۱/۲۰ میلی‌گرم در لیتر) و پایین‌ترین میانگین میزان کلروفیل بدست آمده از تیمار شاهد BBM

(۴/۲۵ میلی‌گرم در لیتر) بدست آمد (شکل۲–ج). چنین نتایجی بیان می‌کند که افزودن فسفر به محیط کشت BBM باعث افزایش جمعیت جلبک‌ها و بهبود زیست‌توده خشک و کلروفیل *a* در جمعیت کلروکوکوم می‌گردد. نتایج مقایسه *SGR* و *Dt* محاسبه شده از جمعیت در شکل ۳ ارائه شده است. بالاترین میانگین *SGR* بدست آمده مربوط به تیمار BBM + عصاره خاک و تیمار ۲۵+ BBM به‌ترتیب ۰/۱۲۸ و ۰/۱۲۴ در روز بود و پایین‌ترین میانگین *SGR* مربوط به تیمار BBM ۰/۰۵۶ در روز مشاهده گردید (شکل ۳–الف). بطور مشابهی کمترین زمان دوبرابر شدن جمعیت این جلبک در تیمار BBM + عصاره خاک و تیمار ۲۵+ BBM به‌ترتیب ۵/۴۴ و ۵/۶۰ روز محاسبه شد (شکل ۳– ب).

بحث و نتیجه‌گیری

عوامل مؤثر در مصرف فسفات در جلبک‌ها عمدتا غلظت فسفات، شدت نور و دمای آب هستند (۲۹). رشد و پرورش جلبک‌های میکروسکوپی باعث مصرف مواد مغذی محیط‌های کشت بخصوص فسفر می‌شود که در ساخت ترکیبات درون سلولی نظیر فسفولیپیدها، نوکلئوتیدها و اسیدهای نوکلئوئیک نقش اساسی دارد (۲۹).

در این مطالعه نتایج نشان داد که روند افزایش تراکم جلبک کلروکوکوم در تمام تیمارهای آزمایشی استفاده شده تقریبا یکسان بود، اما اضافه نمودن فسفر تا میزان ۲۵ میلی‌گرم در لیتر به محیط کشت BBM موجب افزایش معنی‌داری ($P<0.05$) در تراکم سلولها، میزان رشد ویژه، زیست‌توده خشک و کلروفیل *a* در جلبک کلروکوکوم در مقایسه با سایر تیمارها شد. نتایج مشابهی توسط Borowitzka و Borowitzka در سال ۱۹۸۸ در مورد پرورش کلروکوکوم با استفاده از ارتوفسفات‌های سدیم و پتاسیم ارائه شد. آنها گزارش کردند که دوره رشد سریع (Exponential Phase) این جلبک در غلظت ۲۵ میلی‌گرم در لیتر از فسفات بود که در ۹ روز آغازین از پرورش بود و بعد از آن کاهش یافت. در این مطالعه دوره رشد سریع در ۸ روز آغازین بود.

بهبود رشد و زیست‌توده جلبک کلروکوکوم با استفاده از عصاره خاک + BBM نشان داد که این تیمار در مقایسه با سایر تیمارها عملکرد مناسبتری بخصوص در روزهای پایانی آزمایش دارد. علت احتمالی را می‌توان به لحاظ داشتن میزان فسفر بالای خاک (حدود ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر) و تا حدودی میزان سایر یونها و حتی اشکال متنوع فسفر در آن دانست که باعث افزایش مناسب در کارایی جلبک و بخصوص کلروفیل *a* می‌شود. استفاده از عصاره خاک توسط McNuff در سال ۲۰۰۷ بیان شد. او استفاده از ۲۰ میلی لیتر عصاره خاک و ۵ میلی لیتر از محلول Chalkley's Medium (شامل ۰/۱۲ گرم کلرید کلسیم، ۰/۰۸ گرم کلرید پتاسیم و ۲ گرم کلرید سدیم در یک لیتر آب مقطر) را برای پرورش جلبک کلروکوکوم توصیه نمود.

De Pauw و Pruder در سال ۱۹۸۶ گزارش کردند که ترکیبات شیمیایی محیط‌کشت جلبک‌ها بخصوص ارتوفسفات نه تنها بر زیست‌توده و رشدجلبکی بلکه بر اندازه و شکل سلولها، محتوای رنگدانه‌ها و ترکیبات بیوشیمیایی آنها نیز مؤثر است. به عبارت دیگر، محدودیت‌های غذایی در جلبک‌ها به‌خصوص منابع فسفات باعث کاهش رشد در زئوپلانکتون‌های تغذیه‌کننده از این جلبک‌ها می‌گردد. در این خصوص، Sundbom و Vrede در سال ۱۹۹۷ بیان کردند که اضافه کردن ۰/۵۸ میکرومولار فسفر در روز به محیط کشت باعث می‌شود تا رشد سلولها و محتوای اسیدهای چرب ضروری جلبک سبز *Scenedesmus* به طور معنی‌داری در مقایسه با اضافه نمودن ۰/۴۰ و ۰/۲۴ میکرومولار فسفر در روز افزایش یابد. کم و همکاران در سال ۱۳۹۱ از ضایعات کارخانه پودر ماهی برای تولید جلبک استفاده نمودند و با داشتن میزان ۱۲/۱ میلی‌گرم در لیتر فسفات تغییر قابل ملاحظه‌ای در رشد جلبک کلرلا مشاهده نگردید (۲).

در این تحقیق افزایش میزان فسفر محیط کشت بر میزان زیست‌توده و محتوای کلروفیل *a* در جلبک کلروکوکوم تأثیر افزایشی معنی‌داری داشت (جدول ۱، شکل ۲) و می‌توان بیان کرد که غلظت فسفر در آب‌ها مهمترین معیار تنظیم‌کننده زیست‌توده فیتوپلانکتونها می‌باشد، و محتوای کلروفیل *a* در جلبک‌های مختلف بشدت تحت تأثیر میزان فسفر موجود در محیط می‌باشد. مکانیسم جذب فسفر برای تشکیل زیست‌توده و تولید کلروفیل از طریق جذب لوکسری (Luxury uptake) است (۲۴ و۳۰). فسفر در درون سلولهای جلبکی طی فرایندهای متعدد مصرف می‌شود. دو مسیر اصلی، تولید پلی‌فسفات‌ها و تولید موادی مانند فسفولیپیدها یا RNA هستند که برای متابولیسم لازم هستند. این بدان معنی است که مقدار فسفر در دسترس برای تولید پلی‌فسفات‌ها عمدتا به میزان جذب فسفات از طریق دیواره سلولی جلبکها بستگی دارد که این میزان در مراحل بعدی میزان فسفر را برای رشد و تکثیر جلبکها فراهم می‌نماید. انتقال فسفر در جلبکها توسط Miyachi و همکاران در سال ۱۹۶۴ بیان شده است (۲۴) و توسط Powell در سال ۲۰۰۹ مورد بررسی دقیق‌تر قرار گرفت (۳۰).

با توجه به اینکه منابع کربن و نیتروژن در محیط پرورش در افزایش میزان جذب سایر عناصر ضروری مهم است، بنابراین افزایش کلروفیل *a* ارتباط مستقیم به استفاده از منابع نیتروژن (مثلا نیترات و آمونیوم) و فسفات‌ها دارد (۱۸)، ازاین‌رو کاهش عملکرد جلبک کلروکوکوم در روزهای پایانی آزمایش (روزهای ۱۲ تا ۱۴) در مقایسه با روزهای قبل را می‌توان به کاهش ترکیبات نیتروژن‌دار محیط کشت‌های مورد آزمایش نسبت داد (۱۳ و ۲۰). Hessen در سال ۱۹۹۲ گزارش کرد که عدم تناسب بین نیتروژن به فسفر موجب کاهش رشد هم در جلبک‌ها و هم در موجودات مصرف‌کننده می‌شود. Buapet و همکاران در سال ۲۰۰۸ بیان نمودند که در گونه *Ulva reticulate* اضافه نمودن فسفر به تنهایی به محیط کشت جلبک بدون اضافه کردن منبع نیتروژن هیچگونه تأثیری در زیست‌توده و مقدار کلروفیل *a* نداشت که این مسئله مبین آن است که نسبت N:P بسیار مهم است.

در این تحقیق استنباط ما این است که تفاوت در میزان ترکیبات نیتروژن‌دار در تیمارهای مختلف در روزهای پایانی آزمایش وجود دارد. به‌طوری‌که چنین تأثیری در تیمار عصاره خاک +BBM به لحاظ بالا بودن نیتروژن خاک تأثیری بر تراکم سلولی جلبک‌ها در روزهای پایانی آزمایش نداشت، اما در سایر تیمارها موجب کاهش تراکم جلبک کلروکوکوم گردید. از سوی دیگر میزان مصرف فسفر در جلبک‌ها تابع سایر عوامل ازجمله نور و دمای آب نیز می‌باشد (۲۹). به‌عنوان مثال Hessen و همکاران در سال ۲۰۰۲ بیان نمودند که نسبت فسفر به کربن در جلبک‌های سبز *Selenastrum* با کاهش شدت نور افزایش می‌یابد و یا بطور مشابهی Martinez و همکاران در سال ۱۹۹۹ گزارش کردند که متابولیسم فسفر با کاهش نور در جلبک*Scenedesmus obliquus* افزایش نشان می‌دهد. علت چنین شرایطی را می‌توان به مکانیسم‌های جذب فسفر یعنی تجمع (accumulation) و مصرف (consumption) در سلولهای جلبکی نسبت داد. در شدت نورهای بالا (برای مثال ۱۵۰ میکرومول فوتون بر متر مربع بر ثانیه) جلبک‌ها به سرعت پلی‌فسفات‌ها را مصرف می‌کنند، به‌طوری‌که فسفر محلول تجمع کمی در سلولهای جلبکی می‌نماید؛ از سوی دیگر، مصرف آنها در شرایط نوری کم احتمالا بواسطه سرعت رشد پایین به تأخیر می‌افتد و پس از مدت ۵ تا ۷ روز مقدار ذخیره فسفر در شرایط نوری کم افزایش می‌یابد و باعث افزایش متابولیسم فسفر می‌گردد (۳۰). در این مطالعه تأثیر نور بطور حدواسط و شدت نسبتا ثابت در نظر گرفته شد و پرورش در دوره نوری ۱۲ ساعت نور با شدت ثابت انجام شد.

معمولا میزان مصرف فسفات از محیط کشت می‌تواند تابع دمای آب باشد. به‌طوری‌که Picot و همکاران در سال

۱۹۹۲ گزارش کردند که این میزان بین ۱۵ درصد در دوره سرد (نظیر زمستان) و ۳۰ درصد در دوره گرم (نظیرتابستان) تغییر می‌کند. دمای آب هم بر واکنش‌های بیولوژیکی و هم بر ترکیب سلولی تأثیر می‌گذارد، به‌طوری‌که بر میزان فسفات در جلبک‌ها تأثیر مثبت دارد (۲۸).

Powell و همکاران در سال ۲۰۰۸ بیان کردند که غلظت فسفات بر درصد فسفر جلبک‌ها تأثیر معنی‌داری ندارد، در حالی‌که Aitchison و Butt در سال ۱۹۷۳ دریافتند که غلظت فسفات بطور قابل ملاحظه‌ای بر مقدار فسفات زیست‌توده جلبکی تأثیرگذار است. با توجه به اینکه Powell و همکاران در سال ۲۰۰۸ غلظت فسفات را ۵ و ۱۵ میلی‌گرم در لیتر در نظر گرفتند، احتمالا آنها نتوانستند تأثیر مستقیم غلظت فسفات را بر زیست‌توده بدست آورند. علاوه بر این، سعادت نیا و همکاران در سال ۱۳۸۹ بیان کردند که جلبک‌های سبز-آبی در مزارع برنج نقش مهمی را در رشد گیاه برنج و تا حدودی بهبود شرایط کمی و کیفی خاک دارند (۱).

یافته‌های این تحقیق نشان داد که جلبک کلروکوکوم می‌تواند در محیط کشت‌های با فسفر کم نظیر BBM در مقایسه با محیط‌های دارای حدود ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر (تیمار BBM + عصاره خاک) یا ۵۰ میلی‌گرم در لیتر (تیمار BBM+ ۲۵ میلی‌گرم در لیتر) در مدت زمان کوتاه ۱۰-۸ روز پرورش یابد و رشد و زیست‌توده مناسبی تولید نماید. Gonzales و همکاران در سال ۱۹۹۷ مصرف ۵۵ درصد از فسفر را از پسابهای صنعتی و کشاورزی با غلظت کل فسفر ۱۱۱ میلی‌گرم در لیتر با پرورش *Chlorella vulgaris* و *Scenedesmus dimorphus* بدست آوردند. بطور کلی میزان مصرف فسفر در گونه‌های مختلف متفاوت است. به‌عنوان مثال ۱۰/۷ میلی‌گرم فسفر در روز در گونه *Chlorella pyrenoidosa* (۳۳)، ۲۰/۸۳ میلی‌گرم در لیتر در روز در گونه *Scenedesmus intermedius* و ۱۰/۱۵ میلی‌گرم در روز برای گونه *Nannochloris* sp. (۱۷) می‌توان ذکر نمود. Lau و همکاران در سال ۱۹۹۷ (۱۸) بیان کردند که اگر غلظت‌های فسفات بین ۷/۷ و ۱۴۹ میلی‌گرم در لیتر از محیط پرورش باشد میزان کلروفیل *a* از ۰/۲۰ تا ۰/۵۲ میلی‌گرم در روز افزایش می‌یابد. بطور کلی استنباط و گمان ما این است که جلبک کلروکوکوم برای جذب فسفر از منابع غنی از فسفر بسیار مناسب است که به مطالعه و بررسی بیشتری نیاز دارد.

سپاسگزاری

از معاون محترم پژوهشی دانشکده منابع طبیعی دانشگاه صنعتی اصفهان و معاون محترم پژوهشی دانشگاه صنعتی اصفهان به دلیل ایجاد شرایط مناسب در انجام این تحقیق کمال تشکر و سپاسگزاری را داریم.

منابع

۱- سعادت نیا، ه.، ریاحی، ح.، فخاری، ج. ۱۳۸۹. استفاده از جلبک های سبز-آبی جدا شده از یک شالیزار در استان گیلان بعنوان کود زیستی در گیاه برنج (*Oryza sativa*) . مجله زیست شناسی ایران جلد۲۳ ، شماره ۶، ۸۲۴-۸۱۶.

۲- کم، ص. ب ، عابدیان کناری، ع. و یونسی، ح. ا .۱۳۹۱ . تولید پروتئین تکیاخته از پساب کارخانجات تولید پودرماهی با استفاده از کشت مخمر جلبک *Chlorella* sp. ، باکتری *Pseudomonas aeruginosa* و مخمر *Saccharomyces cerevisiae*. مجله زیست شناسی ایران جلد ۲۵ شماره ۲، ۱۷۱-۱۵۸.

3- Aitchison, P.A. and Butt, V.S. 1973. The relation between the synthesis of inorganic polyphosphate and phosphate uptake by *Chlorella vulgaris*. Journal of Experimental Botany, 24: 497-510.

4- Barsanti, L. and Gualtieri, P. 2006. Algae: Anatomy, Biochemistry, and Biotechnology, CRC Press, Taylor and Francis Group.320 pp.

5- Becker, E.W. 1994. Microalgae: *Biotechnology and microbiology*. Cambridge University Press, Cambridge, Great Britain. 293 pp.

6- Black, C.A. 1982. Method of Soil Analysis, Vol.2, Chemical and Microbiological Properties, American Society. 211 pp.

7- Bold, H.C. and Parker, B.C. 1962. Some supplementary attributes in the classification of *Chlorococcum* species. Archives Mikrobiology, 42: 267-88.

8- Borowitzka, M.A. and Borowitzka, L.J. 1988. *Dunaliella*. In: Microalgal Biotechnology, M.A. Borowitzka and L.J. Borowitzka (Eds.), Cambridge University Press, Cambridge, UK, pp. 27-58.

9- Buapet, P., Hiranpan, R., Ritchie, R.J. and Prathep, A. 2008. Effect of nutrient inputs on growth, chlorophyll, and tissue nutrient concentration of *Ulva reticulata* from a tropical habitat. Science Asia, 34: 245–252.

10- De Pauw, N. and Pruder, G. 1986. Use and production of microalgae as food in aquaculture: practice, problems and research needs. Realism in Aquaculture: Achievements, Constraints, Perspectives. Aquaculture, 27:77-106.

11- Demirbas, A. and Demirbas, M.F. 2010. Algae energy: Algae as a new source of biodiesel. Springer, 199 pp.

12- Demirbas, A. 2006. Biogas potential of manure and straw mixtures. Energy Sources A, 28:71–78.

13- Dhargalkar, V.K. 2004. Effect of different temperature regimes on the chlorophyll *a* concentration in four species of Antarctic macroalgae. Seaweed Research Utilization, 26: 237 - 243.

14- Gonzales, L.E., Canizares, R.O. and Baena, S. 1997. Efficiency of ammonia and phosphorus removal from a Colombian agro industrial wastewater by the microalgae *Chlorealla vulgaris* and *Scenedesmus dimorphus*. Bioresource Technology, 60: 259–262.

15- Hessen, D.O. 1992. Nutrient element limitation of zooplankton production. American Naturalist, 140: 799-814.

16- Hessen, D.O. Faerovig, P.J. and Andersen, T. 2002. Light, nutrients, and P:C ratios in algae: Grazer performance related to food quality and quantity. Ecology, 83: 1886–1898.

17- Jimenez-Perez, M.V., Sanches-Castillo, P., Romera, O., Fernandez-Moreno, D. and Perez-Martinez, C. 2004. Growth and nutrient removal in free and immobilized planktonic green algae isolated from pig manure. Enzyme Microbial Technology, 34: 392–398.

18- Lau, P.S., Tom, N.F.Y. and Wong, Y.S. 1997. Wastewater nutrients (N and P) removal by carrageenan and alginate immobilized *Chlorella vulgaris*. Environmental Technology, 18: 945–51.

19- Lavens, P. and Sorgeloos, P. 1996. Manual on the production and use of live food for aquaculture. FAO Fisheries Technical, 295 pp.

20- Li, Y., Horsman, M., Wang, B., Wu, N. and Christopher, Q.L. 2008. Effects of nitrogen sources on cell growth and lipid accumulation of green alga *Neochloris oleoabundans*. Applied Microbiology and Biotechnology, 81:629–636.

21- Martines, M.P. and Chakroff, J.B.P. 1975. Direct phytoplankton counting technique using the hemacytometer. Philippine Agricultural Scientist, 59:43-50.

22- Martinez, M. E., Jimenez, J. M., and El Yousfi, F. 1999. Photoautrophic consumption of phosphorus by *Scenedesmus obliquus* in a continuous culture. Influence of light intensity. Process Biochemistry, 34: 811–818.

23- McNuff, B. 2007. *Hypsibius dujardini* collection notes and culture protocol. British National Grid, Ref. SD741078.

24- Miyachi, S., Kanai, R., Mihara, S., Miyachi, S. and Aoki, S. 1964. Metabolic role of inorganic polyphosphates in *Chlorella* cells. Biochimica et Biophysica Acta, 93: 625-634.

25- Nichols, H.W. 1973. Growth media–freshwater. In: Stein, J.R. (Ed.), Handbook of Phycological Methods – Culture Methods and Growth Measurements. Cambridge University Press, Cambridge, p. 7–24.

26- Omori, M. and Ikeda, T. 1984. Methods in marine zooplankton ecology. John Wiley and Sons Inc, New York, 332 pp.

27- Parsons, T.R., Maita, Y. and Lalli, C.M. 1984. A manual of chemical and biological methods for seawater analysis. Pergamon Press, Oxford.

28- Picot, B., Bahlaoui, A., Moersidik, B., Baleux, B., and Bontoux, J. 1992. Comparison of the purifying efficiency of high rate alga pond with stabilization pond. Water Science Technology, 25: 197-206.

29- Powell, N., Shilton, A.N., Pratt, S. and Chisti, Y. 2008. Factors influencing luxury uptake of phosphorus by microalgae in waste stabilization

ponds. Environmental Science and Technology, 42: 5958-5962.

30- Powell, N. 2009. Biological phosphorous removal by microalgae in waste stabilization ponds. Ph. D. thesis, Massey University, Palmerston North, New Zealand, 108 pp.

31- Prairie, Y.T., Duarte, C. M. and Kalff, J. 1989. Unifying nutrient chlorophyll relationship in lakes. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science, 46:1176-1182.

32- Redfield, A.C. 1934. On the proportions of organic derivatives in sea water and their relationship to the composition of plankton. In: James Johnston Memorial Volume, Liverpool University Press, Liverpool, pp. 176-192.

33- SPSS, 2002. Statistical Package of Social Science, Version, 11.5. Chicago, IL, USA.

34- Sundbom, M. and Vrede, T. 1997. Effects of fatty acid and phosphorus content of food on the growth, survival and reproduction of *Daphnia*. Freshwater Biology, 38:665-674.

35- Tam, N.F.Y. and Wong, Y.S., 1994. Feasibility of using *Chlorella pyrenoidosa* in the removal of inorganic nutrients from primary settled sewage. Algal Biotechnology in the Adia-Pacific region. Phang (Ed.), University of Malaya, pp. 291–299.

36- Tunney, H., Carton, O.T., Brookes, P.C., and Johnston, A. E. 1997. Phosphorus loss from soil to water. CAB International, 467 pp.

37- Uhlmann, D. and Albrecht, E. 1968. Biogeochemische Faktoren der Eutrophier-ung von Trinkwassen-Talsperren. Limnologica (Berlin), 6: 225-245.

38- Zar, J.H. 1984. Bioststistical analysis, 2nd edition. Prentice Hall Inc., Englewood Cliffs, New York, USA, 718 p.

39- Zhang, D.H., Lee, Y.K. and Phang, S.M. 1997. Composition and accumulation of secondary carotenoids in *Chlorococcum* sp. Journal of Applied Phycology, 9:147–155.

Effects of Different Phosphorus Concentrations on Biomass and Growth in Green Microalgae *Chlorococcum* sp.

Farhadian O., Fallahi S.M. and Mahboobi Soofiani N.

Fisheries Dept., Faculty of Natural Resources, Isfahan University of Technology, Isfahan, I.R. of Iran

Abstract

A large number of factors affects in the rise and fall of biomass and growth in microalgae populations. One of the most important factors is phosphorus (orthophosphate) in microalgae culture medium. In this study, effects of six treatments including; BBM (Bold's Basal Medium) as control, BBM+soil extract, BBM+5, 10, 15, and 25 mg/L of $Na_3PO_4.12H_20$ each as one treatment on dry biomass, growth and chlorophyll *a* of *Chlorococcum* sp. were investigated in completely randomize design with three replicates under laboratory conditions. Results showed that the maximum algal densities were peaked on 10-day culture with BBM+ 25 (11.04×10^6 cells/mL) and BBM+soil extract (11.54×10^6 cells/mL). In addition, the mean highest dry biomasses were obtained 0.792 and 0.773 mg/mL at BBM+soil extract and BBM+25, respectively. Results showed that the highest mean chlorophyll *a* was at BBM+ 25 (11.39 mg/L) and BBM+soil extract (11.20 mg/L). The mean maximum specific growth rate (*SGR*) and minimum doubling time (*Dt*) were obtained from BBM+ soil extract (0.128 /dayand 5.43 days) and BBM+25(0.124 /day and 5.60 days).

Key words: green microalgae *Chlorococcum*, BBM medium, phosphorus (orthophosphate), specific growth rate, chlorophyll *a*, soil extract