اثر تیتانیوم بر رشد و تولید رنگیزه‌های فتوسنتزی جلبک تک سلولی *Dunaliella* salina

سهیلا بهشتی‌فر و منصور شریعتی*

اصفهان، دانشگاه اصفهان، دانشکده علوم، زیست‌شناسی

تاریخ دریافت: ۹۲/۲/۲۳ تاریخ پذیرش: ۹۲/۷/۲۰

چکیده

تیتانیوم عنصر ضروری نمی‌باشد ولی گزارش شده است که می‌تواند سبب بهبود متابولیسم زیستی در گیاهان شود. در این تحقیق اثر تیتانیوم بر روند رشد، میزان رنگیزه‌ها، میزان فتوسنتز، و تنفس جلبک دونالیه لا در یک دوره رشد مورد بررسی قرار گرفت. به این منظور غلظت‌های۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میکرو مولار تیتانیوم در سه تکرار بر گونه *D. salina* اعمال و بعد میزان کلروفیل، بتاکاروتن و همچنین تقسیم سلولی در یک دورهٔ رشد اندازه‌گیری گردید. با توجه به نتایج در تمامی تیمارها تفاوتی در میزان پارامترهای ذکر شده نسبت به نمونه شاهد مشاهده نگردید، اما در حضور EDTA منجر به افزایش هر یک گردید. نتایج اثر pH مشابه با نتایج اثر تیتانیوم در حضور EDTA بود. میزان فتوسنتز و تنفس در تیمار بلندمدت (بررسی اثر تیتانیوم از زمان صفر تا ۲۴ ساعت پس از شروع آزمایش) ۱۵۰ میکرومولار تیتانیوم با گذشت ۲۴ ساعت نسبت به نمونه شاهد کاهش پیدا کرد و در تیمار کوتاه‌مدت (بررسی اثر تیتانیوم به صورت آنی و بلافاصله پس از شروع آزمایش) با افزایش غلظت تیتانیوم تا ۱۵۰ میکرو مولار درصد فتوسنتز افزایش یافت، اما از این غلظت بالاتر منجر به کاهش آن گردید. درصد تنفس در غلظت ۵۰ میکرو مولار نسبت به سایر غلظت‌ها بیشتر بود و با افزایش غلظت تیتانیوم تا ۲۰۰ میکرو مولار کاهش یافت.

واژه‌های کلیدی: تیتانیوم، *Dunaliella* ، رنگدانه، فتوسنتز، تنفس، pH.

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۳۳۱۵۹۹۹۲، پست الکترونیکی: mansour_shariati@yahoo.com

مقدمه

هر موجود زنده برای تأمین غذا، رشد و تولید مثل احتیاج به عناصر معدنی دارد، ارزش همه این عناصر در خاک از نظر احتیاج گیاه به آنها یکسان نیست (۱۲). عناصر را می‌توان به چند دسته تقسیم نمود، گروهی از این عناصر برای گیاه ضروری محسوب شده و باید در مقادیر کافی در دسترس گیاه باشند و باقی عناصر هر یک به مقدار بسیار کم برای گیاه ضروری هستند. گذشته از این، عناصر دیگری بدست آمده و شناخته شدند (۲)، که احتمالا برای گیاه ضروری نبوده ولی می‌توانند در رشد، حیات و تکمیل چرخه رویشی آن اثرات مفید داشته باشند، ازجمله تیتانیوم که یک عنصر با اثرات فیزیولوژیکی می‌باشد و یکی از عناصر مؤثر بر روند رشد، تولید مثل و فرایندهای اصلی متابولیسم می‌باشد (۲). این فلز در زمره عناصر ضروری نمی‌باشد و بر طبق برخی گزارش‌ها شواهدی مبنی بر اینکه این عنصر برای گیاهان عالی ضروری و یا اینکه سمی است وجود ندارد ولی به طور کلی مفید بوده و می‌تواند منجر به بهبود متابولیسم زیستی در گیاهان شود (۲)، که این اثرات قابل تعمیم به جلبک‌ها می‌باشد. دونالیه لا یک جلبک سبز تک‌یاخته‌ای مقاوم به نمک با پراکنش وسیع جغرافیایی است (۳). این جلبک بعلت فقدان دیواره یاخته‌ای سلولزی به سرعت نسبت به تغییرات و فشارهای اسمزی خارج و داخل سلولی واکنش نشان می دهد. از این رو می‌توان گفت دونالیه لا یک پروتوپلاست واقعی می‌باشد (۱)، همچنین بعلت ساده بودن ساختار یاخته‌ای می‌تواند به‌عنوان یک سیستم مدل در مطالعات فیزیولوژی گیاهی مورد توجه قرار گیرد (۳). بنابراین هدف این تحقیق

بررسی پارامترهای تعداد سلول، میزان رنگیزه‌ها در شرایط آزمایشگاهی جلبک فوق در حضور فلز تیتانیوم بوده است. پس با در نظر گرفتن اثرات مثبت آن آیا می‌توان تیتانیوم را به‌عنوان یک عنصر ضروری برای جلبک فوق استفاده نمود؟

مواد و روشها

گونه جلبکی *Dunaliella salina* و سویه UTX-200 از کلکسیون جلبک‌های دانشگاه تگزاس آمریکا تهیه شد و در محیط کشت مایع تغییر یافته جانسون و همکاران (۱۹۶۸) که حاوی ۱/۵ مولار نمک NaCl است کشت شده و در شرایط ۱۶۰ میکرومول فوتون بر مترمربع بر ثانیه و دمای ۳±۲۵ درجه سانتی‌گراد و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی قرار گرفت. در ادامه آزمایش محلول تری کلراید تیتانیوم ساخته شده به نحوی به ارلن‌ها اضافه گردید که در نهایت سوسپانسیون جلبکی حاوی غلظت‌های به‌ترتیب ۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میکرو مولار تیتانیوم باشد. برای اندازه‌گیری پارامترهای ذکر شده نمونه‌برداری در زمانهای۰ ، ۱، ۴، ۷، ۱۰، ۱۳، ۱۶، ۱۹، ۲۲ و ۲۵ روز انجام شد. در کلیه آزمایش‌ها pH توسط اسید کلریدریک و NaOH بر روی ۷/۵ تنظیم گردید. در برخی از آزمایش‌ها که نیاز به pH برابر ۵/۸ (نزدیک به ۶) بود از اسید استیک استفاده گردید. همچنین در آزمایش‌هایی که اثر تیتانیوم در حضور EDTA بررسی گردید از Na_2-EDTA(۱ میلی مولار) استفاده گردید که به محلول تری کلراید تیتانیوم اضافه شد. برای شمارش سلولها، نمونه‌های *D.salina* پس از تیمار با تیتانیوم، به لوله آزمایش منتقل گردید و بنا به تراکم سلولها در روزهای مختلف محیط کشت هم مولار (۱/۵ مولار نمک NaCl) برای رقیق کردن اضافه گردید. سپس یک قطره از نمونه توسط پاستور پیپت بر روی لام توما (هموسایتومتر) منتقل و توسط میکروسکوپ نوری تعداد سلولها شمارش و محاسبه گردید. عمل فوق در مورد شاهد و سوسپانسیونهای جلبکی گونه *D.salina* تیمار شده با تیتانیوم در روزهای مورد مطالعه در ۳ تکرار انجام شد. برای اندازه‌گیری مقدار کلروفیلa، کلروفیلb، کلروفیل کل و بتاکاروتن، ۱ میلی لیتر از نمونه جلبکی را در میکروفیوژ تیوب ریخته و با دور ۱۳۰۰۰ rpm به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ (EPPENDROF, AG 22331 Hamburg) نموده، سپس محلول رویی به دقت خارج و به آن استون ۸۰٪ اضافه گردید، پس از ورتکس در نهایت جذب نوری با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (SHIMADZU UV-160A) در طول موج‌های ۴۱۲، ۴۳۱، ۴۵۰، ۴۶۰ و ۴۸۰ قرائت و مقادیر مذکور با استفاده از فرمولهای مربوطه محاسبه گردید.این عمل برای همه تیمارهای جلبک *D.salina* در سه تکرار در روزهای اندازه‌گیری انجام شد (۴).

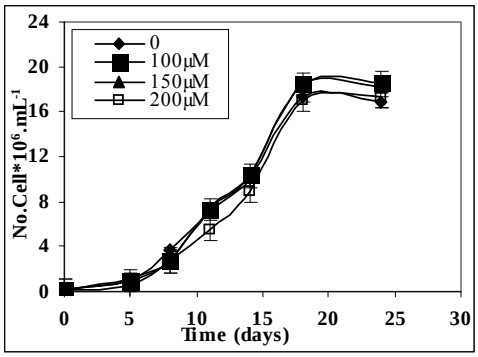
اندازه‌گیری فتوسنتز توسط دستگاه پلاروگراف (Hansatech, U.K) انجام گردید. به‌منظور بررسی اثر تیتانیوم بر فتوسنتز جلبک *D. salina* برای تیمارها از محلول تیتانیوم به همراه بافر فسفات و برای شاهد از بافر فسفات ۱/۵ مولار (با مولاریته نمکی NaCl یکسان با سوسپانسیون جلبکی) استفاده شد. آزمایش در دو بخش۲۴ ساعته (بلند مدت) و آنی (کوتاه مدت) انجام گردید، در بخش آنی پس از آماده سازی سوسپانسیون جلبکی، تیتانیوم بلافاصله و در همان لحظه اضافه و فتوسنتز و تنفس اندازه‌گیری و مورد بررسی قرار گرفت و در بخش بلندمدت در زمان صفر، ۶ و ۲۴ ساعت پس از شروع آزمایش فتوسنتز و تنفس اندازه‌گیری و بررسی گردید. برای ساخت بافر فسفات از KH_2PO_4 (۰/۲۵ میلی مولار)، K_2HPO_4 (۰/۲۵ میلی مولار)، $MgCl_2$ (۰/۲ میلی مولار)، $NaHCO_3$ (۲۵ میلی مولار) و NaCl استفاده گردید، که مولاریته (۱/۵ مولار نمک NaCl) آن با مولاریته محیط جلبکی گونه *D.salina* مورد آزمایش یکسان بود. به محلول مورد استفاده در تنش، بافر فسفات و نمک $TiCl_3$ اضافه شد. اسیدیته محلول بر روی ۷ تنظیم گردید.

نتایج

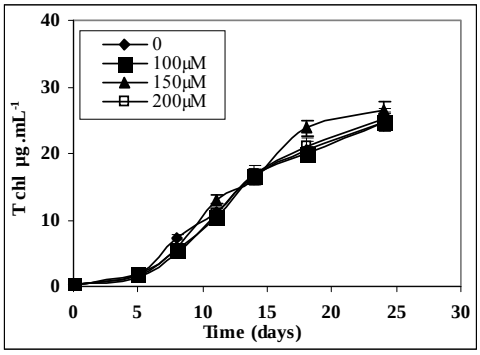
برای بررسی اثر فلز تیتانیوم بر تقسیم سلولی و میزان رشد، گونه جلبکی *Dunaliella salina* سویه UTEX-200 تحت تیمار غلظت‌های مختلف تیتانیوم شامل صفر (شاهد)، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میکرو مولار قرار گرفت و روند رشد و تقسیم سلولی در طی یک دوره رشد ۲۵ روزه بررسی گردید. به‌منظور انتخاب غلظت مناسب تیتانیوم و بررسی اثر آن بر تقسیم سلولی و میزان رشد، جلبک *Dunliella* ابتدا در غلظت‌های ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰، ۴۰۰ و ۵۰۰ کشت داده شد. با توجه به بررسی‌های انجام شده محدوده غلظت انتخابی برای تیمار سوسپانسیون جلبکی ۱۰۰ تا ۲۰۰ میکرو مولار تیتانیوم بوده، زیرا غلظت‌های بالاتر از ۳۰۰ میکرو مولار موجب مرگ تعداد زیادی از سلولها گردید، ازاین‌رو، این محدوده انتخاب گردید. نمودار ۱ میانگین تعداد سلولهای جلبکی در گونه *D. salina* را در غلظت‌های مورد نظر نشان می‌دهد. همان طور که ملاحظه می‌گردد شیب مشابهی از افزایش میزان رشد سلولی بین نمونه شاهد و سلولهای جلبکی در معرض تیمارهای ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میکرو مولار دیده می‌شود و تفاوت قابل ملاحظه‌ای در سرعت تقسیم سلولی تیمارها نسبت به شاهد وجود ندارد. با توجه به این که میزان کلروفیل و بتاکاروتن یکی از شاخص‌های رشد می‌باشند، بنابراین میزان کلروفیل و بتاکاروتن تحت تأثیر تیمار غلظت‌های مورد نظر تیتانیوم اندازه‌گیری شد. نمودار ۲ میزان کلروفیل کل در واحد حجم (میلی لیتر) در غلظت‌های مختلف تیتانیوم را نشان می‌دهد. همان طور که ملاحظه می‌گردد میزان کلروفیل کل در واحد حجم سوسپانسیون از تغییرات میزان تقسیم سلولی تبعیت می‌کند و روند میزان کلروفیل کل در تمامی تیمارها و شاهد مشابه می‌باشد و تفاوتی مشاهده نمی‌گردد. نمودار ۳ میزان بتاکاروتن را در واحد حجم (میلی لیتر) در غلظت‌های مختلف تیتانیوم نشان می‌دهد. در این نمودار روند کاملا هماهنگی در تیمارهای ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میکرو مولار تیتانیوم مشابه با نمونه شاهد در میزان بتاکاروتن دیده می‌شود.

نمودار ۴ میزان کلروفیل سلولی در غلظت‌های مختلف تیتانیوم را نشان می‌دهد. همان طور که ملاحظه می‌گردد میزان کلروفیل سلولی در تیمارها و شاهد نسبت به هم روند مشابهی داشته است و تغییر چندانی دیده نمی‌شود.

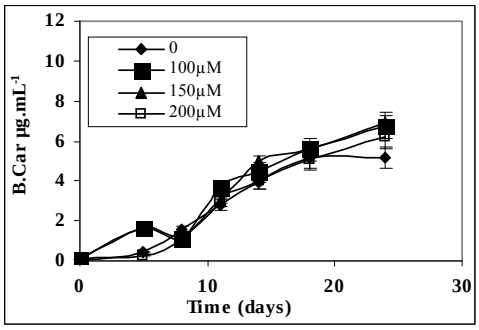
نمودار ۵ میزان بتاکاروتن سلولی را در غلظت‌های مختلف تیتانیوم نشان می‌دهد. همان گونه که مشاهده می‌گردد میزان بتاکاروتن در نمونه شاهد و تیمارها تقریبا به صورت روندی مشابه پیش می‌رود، و هیچ گونه تفاوتی مشاهده نمی‌گردد.



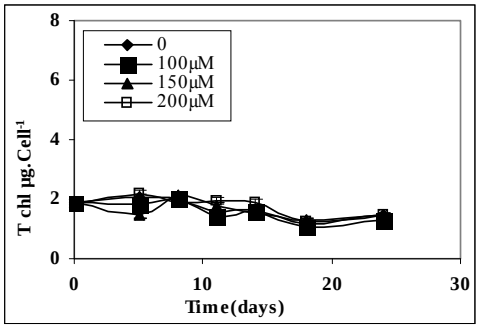
نمودار ۱- اثر غلظت‌های ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میکرو مولار تیتانیوم و شاهد بر تعداد سلول در جلبک *D. salina* (مقادیر میانگین سه تکرار ± انحراف معیار می‌باشد).



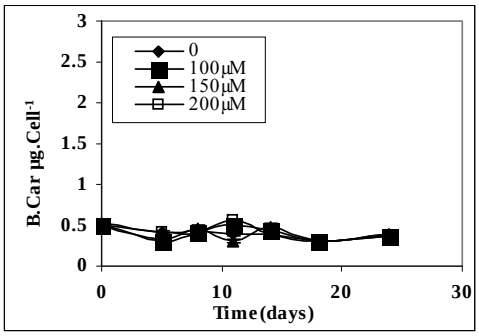
نمودار ۲- اثر غلظت‌های ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میکرو مولار تیتانیوم و شاهد بر میزان کلروفیل کل در واحد حجم (میلی لیتر) در جلبک *D. salina* (مقادیر میانگین سه تکرار ± انحراف معیار می‌باشد).



نمودار ۳- اثر غلظت‌های ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میکرو مولار تیتانیوم و شاهد بر میزان بتاکاروتن در واحد حجم (میلی لیتر) در جلبک *D. salina* (مقادیر میانگین سه تکرار ± انحراف معیار می‌باشد).



نمودار ۴- اثر غلظت‌های ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میکرو مولار تیتانیوم و شاهد بر میزان کلروفیل سلولی در جلبک *D. salina* (مقادیر میانگین سه تکرار ± انحراف معیار می‌باشد).

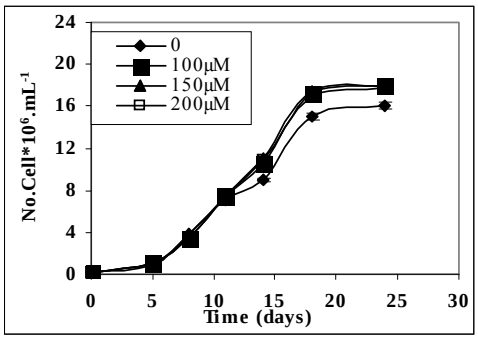


نمودار ۵- اثر غلظت‌های ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میکرو مولار تیتانیوم و شاهد بر میزان بتاکاروتن سلولی در جلبک *D. salina* (مقادیر میانگین سه تکرار ± انحراف معیار می‌باشد).

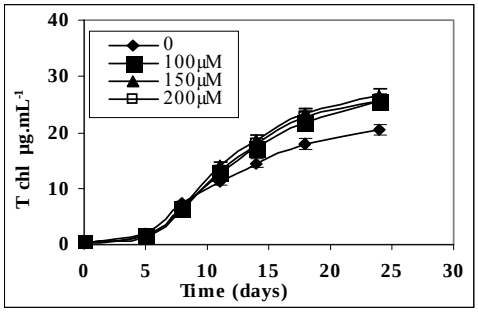
اثر تیتانیوم بر تقسیم سلولی، میزان کلروفیل و بتاکاروتن در حضور EDTA : با توجه به این که برخی از کاتیون‌ها در شرایط قلیایی به صورت آزاد نبوده و به فرم غیر محلول و رسوب در می‌آیند، بنابراین اضافه کردن EDTA در محیط از غیر محلول شدن کاتیون‌ها جلوگیری می‌کند، از این رو در بخش دوم این تحقیق اثر تیتانیوم بر میزان تقسیم سلولی، میزان کلروفیل و بتاکاروتن در حضور EDTA بررسی گردید.

نمودار ۶ اثر غلظت‌های متفاوت از تیتانیوم بر تقسیم سلولی در حضور EDTA را نشان می‌دهد. همان طور که ملاحظه می‌گردد در روزهای اولیه تقسیم سلولی در تمامی تیمارها با نمونه شاهد تفاوتی وجود نداشته است ولی از روز ۱۲ به بعد تیمارهای ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میکرو مولار تیتانیوم در حضور EDTA تقسیم سلولی بیشتری نسبت به شاهد داشته و این افزایش در تیمارها نسبت به شاهد از تفاوت مشهودی برخوردار می‌باشد ولی بین غلظت‌های ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میکرو مولار تفاوتی مشاهده نمی‌گردد. تعداد سلولها در روز ۲۵ در حضور EDTA در کلیه تیمارها تقریبا ۱۷ میلیون سلول در میلی لیتر بوده است. نمودار ۷ اثر غلظت‌های متفاوت تیتانیوم بر میزان کلروفیل کل در واحد (حجم میلی لیتر) در حضور EDTA را نشان می‌دهد. همان طور که ملاحظه می‌گردد میزان کلروفیل نمونه شاهد و غلظت‌های ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میکرو مولار تیتانیوم تا روز ۱۰ مشابه بوده ولی از این روز به بعد میزان کلروفیل تیمارهای ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میکرو مولار تیتانیوم مشابه ولی نسبت به شاهد افزایش داشته و تفاوت مشهودی در مقدار کلروفیل کل در واحد حجم (میلی لیتر) تمامی تیمارها در مقایسه با شاهد مشاهده می‌گردد. میزان کلروفیل در تمامی تیمارها در روز ۲۵ تقریبا ۲۵ میکروگرم در میلی لیتر بوده است. در نمودار ۸ میزان بتاکاروتن در واحد حجم (میلی لیتر) تمامی تیمارها نسبت به شاهد از روز ۱۲ به بعد افزایش داشته است ولی بین غلظت‌های ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میکرو مولار تفاوت چندانی مشاهده نمی‌گردد. میزان بتاکاروتن در تمامی تیمارها در روز ۲۵ تقریبا ۷ میکروگرم در میلی لیتر بوده است. نمودار ۹ اثر غلظت‌های متفاوت تیتانیوم بر میزان کلروفیل سلولی در حضور EDTA را نشان می‌دهد. همان طور که ملاحظه

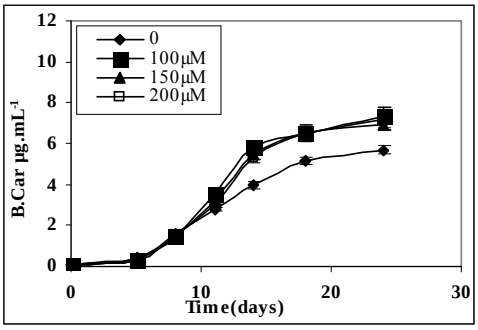
می‌گردد در کلیه تیمارها تفاوت قابل ملاحظه‌ای با نمونه شاهد دیده نمی‌شود و با گذشت زمان هیچ گونه تغییری در میزان کلروفیل سلولی ملاحظه نمی‌گردد و از روند ثابتی پیروی می‌کند. در نمودار ۱۰ اثر غلظت‌های متفاوت تیتانیوم بر میزان بتاکاروتن سلولی در حضور EDTA نشان داده شده است، همان طور که ملاحظه می‌گردد میزان تغییرات بتاکاروتن سلولی مشابه روند تغییرات کلروفیل سلولی بوده و تفاوت قابل ملاحظه‌ای بین تیمارها با یکدیگر و هر کدام با شاهد ملاحظه نمی‌گردد.



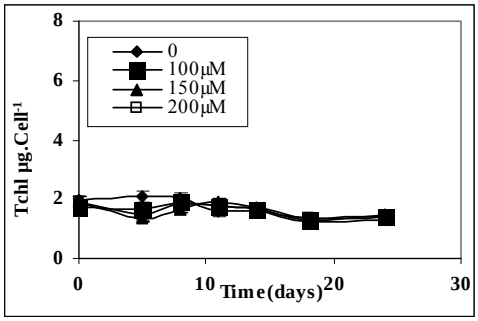
نمودار ۶–اثر غلظت‌های ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میکرو مولار تیتانیوم و شاهد بر تعداد سلول در حضور EDTA در جلبک *D. salina* (میزان شوری محیط کشت ۱/۵ مولار NaCl می‌باشد. مقادیر میانگین سه تکرار ± انحراف معیار می‌باشد).



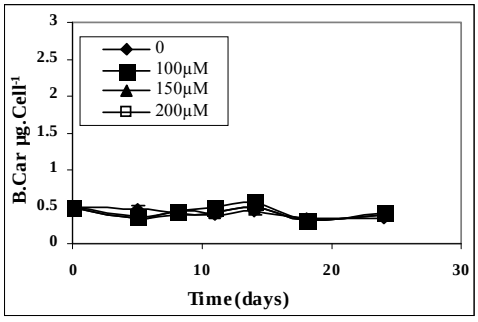
نمودار ۷–اثر غلظت‌های ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میکرو مولار تیتانیوم و شاهد بر کلروفیل کل در واحد حجم (میلی لیتر) در حضور EDTA در جلبک *D. salina* (میزان شوری محیط کشت ۱/۵ مولار NaCl می باشد. مقادیر میانگین سه تکرار ± انحراف معیار می‌باشد).



نمودار ۸– اثر غلظت‌های ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میکرو مولار تیتانیوم و شاهد بر بتاکاروتن در واحد حجم (میلی لیتر) در حضور EDTA در جلبک *D. salina* (میزان شوری محیط کشت ۱/۵ مولار NaCl می‌باشد. مقادیر میانگین سه تکرار ± انحراف معیار می‌باشد).



نمودار ۹– اثر غلظت‌های ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میکرو مولار تیتانیوم و شاهد بر کلروفیل سلولی در حضور EDTA در جلبک *D. salina* (میزان شوری محیط کشت ۱/۵ مولار NaCl می‌باشد. مقادیر میانگین سه تکرار ± انحراف معیار می‌باشد).

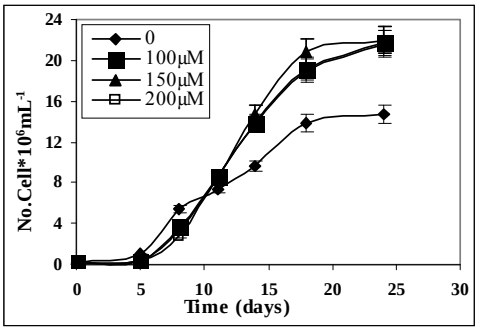


نمودار ۱۰– اثر غلظت‌های ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میکرو مولار تیتانیوم و شاهد بر بتاکاروتن سلولی در حضور EDTA در جلبک *D salina* (میزان شوری محیط کشت ۱/۵ مولار NaCl می‌باشد. مقادیر میانگین سه تکرار ± انحراف معیار می‌باشد).

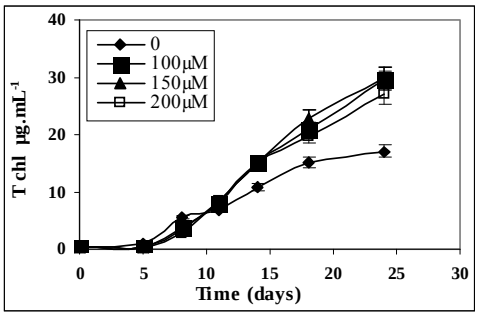
اثر تیتانیوم در pH اسیدی بر میزان تقسیم سلولی، کلروفیل و بتاکاروتن: جلبک دونالیه لا در محدوده pH قلیایی رشد و چرخه زندگی خود را کامل می‌کند. اما با

توجه به اینکه در برخی گزارش‌ها دیده شده است تیتانیوم در pH اسیدی (نزدیک به ۶) بیشترین اثر و جذب را داشته است، بنابراین در این تحقیق اثر غلظت‌های متفاوت تیتانیوم در pH اسیدی (حدود۶) بر میزان رشد سلولی، کلروفیل و بتاکاروتن در دونالیه لا مورد بررسی قرار گرفت. نمودار ۱۱ اثر غلظت‌های متفاوت تیتاتیوم را در pH اسیدی بر رشد سلولی نشان می‌دهد. همان طور که ملاحظه می‌گردد روند هماهنگی در میزان تعداد سلول در تمامی غلظت‌های اعمال شده از تیتانیوم و شاهد تا روز ۵ مشاهده می‌گردد و الگوی رشد سلولی مشابهی در تیمارها نسبت به شاهد تا این روز دیده می‌شود ولی از روز ۱۰ به بعد در تمامی تیمارها میزان تعداد سلول نسبت به شاهد با شیب تندی رو به افزایش است و تفات قابل ملاحظه‌ای در روند رشد سلولی شاهد با تمامی تیمارها دیده می‌شود و در بین کلیه غلظت‌های اعمال شده ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میکرو مولار تفاوتی مشاهده نمی‌گردد. تعداد سلولها در روز ۲۵ با pH اسیدی در کلیه تیمارها تقریبا ۲۲ میلیون سلول در میلی لیتر بوده است. نمودار ۱۲ اثر غلظت‌های متفاوت تیتانیوم در pH حدود ۶ بر میزان کلروفیل کل در واحد حجم (میلی لیتر) را نشان می‌دهد. همان طور که ملاحظه می‌گردد میزان کلروفیل در تمامی تیمارها از روز ۱۰ به بعد نسبت به شاهد از سیر صعودی برخوردار می‌باشد. به طور کلی میزان کلروفیل شاهد در سطح بسیار پایین‌تری نسبت به میزان کلروفیل در تمامی تیمارها می‌باشد؛ به‌نحوی‌که میزان کلروفیل در تمامی تیمارها در روز ۲۵ تقریبا ۳۰ میکروگرم در میلی لیتر بوده است.

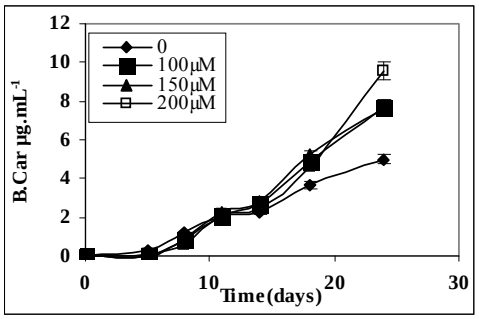
بر طبق نمودار ۱۳ روند هماهنگی در میزان بتاکاروتن در تمامی غلظت‌های اعمال شده از تیتانیوم و نمونه شاهد تا روز ۱۸ مشاهده می‌گردد و پس از این زمان میزان بتاکاروتن در تیمارهای تیتانیوم با شیب تندی نسبت به نمونه شاهد رو به افزایش می‌باشد. در روز ۲۵ میزان بتاکاروتن در تیمارهای ۱۰۰ و ۱۵۰ میکرو مولار تیتانیوم تقریبا ۸ میکروگرم در میلی لیتر بوده است. اما بالاترین میزان بتاکاروتن در تیمار ۲۰۰ میکرو مولار تیتانیوم مشاهده می‌شود و این مقدار تقریبا ۱۰ میکروگرم در میلی لیتر بوده است. نمودار ۱۴ میزان کلروفیل سلولی را نشان می‌دهد. همان طور که ملاحظه می‌گردد میزان کلروفیل سلولی در تمامی تیمارها نسبت به نمونه شاهد مشابه می‌باشد و تفاوت قابل ملاحظه‌ای بین میزان کلروفیل سلولی در تیمارها و شاهد دیده نمی‌شود. نمودار ۱۵ میزان بتاکاروتن سلولی را نشان می‌دهد، میزان تغییرات بتاکاروتن سلولی مشابه روند تغیرات کلروفیل سلولی بوده و تفاوت قابل ملاحظه‌ای بین تیمارها با یکدیگر و هر کدام با شاهد مشاهده نمی‌گردد.



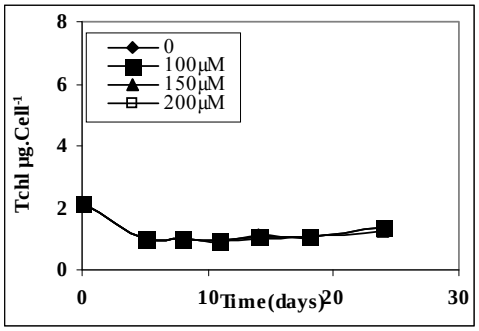
نمودار ۱۱- اثر غلظت‌های ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میکرو مولار تیتانیوم و شاهد در pH اسیدی (حدود۶) بر تعداد سلول در جلبک *D. salina* (میزان شوری محیط کشت ۱/۵ مولار NaCl می‌باشد. مقادیر میانگین سه تکرار ± انحراف معیار می‌باشد).



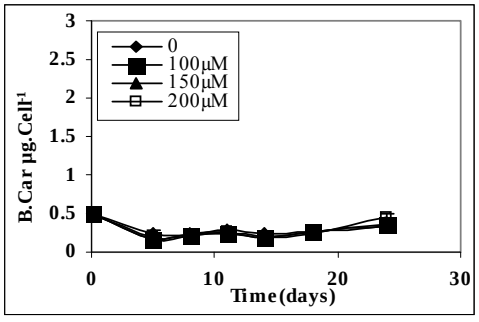
نمودار ۱۲- اثر غلظت‌های ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میکرو مولار تیتانیوم و شاهد در pH اسیدی (حدود۶) بر کلروفیل کل در واحد حجم (میلی لیتر) جلبک *D. salina* (میزان شوری محیط کشت ۱/۵ مولار NaCl می‌باشد. مقادیر میانگین سه تکرار ± انحراف معیار می‌باشد).



نمودار ۱۳- اثر غلظت‌های ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میکرو مولار تیتانیوم و شاهد در pH اسیدی (حدود۶) بر بتاکاروتن در واحد حجم (میلی لیتر) جلبک *D. salina* (میزان شوری محیط کشت ۱/۵ مولار NaCl می‌باشد. مقادیر میانگین سه تکرار ± انحراف معیار می‌باشد).



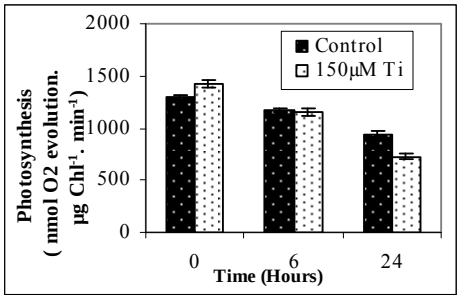
نمودار ۱۴- اثر غلظت‌های ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میکرو مولار تیتانیوم و شاهد در pH اسیدی (حدود۶) بر کلروفیل سلولی در جلبک *D. salina* . (میزان شوری محیط کشت ۱/۵ مولار NaCl می‌باشد. مقادیر میانگین سه تکرار ± انحراف معیار می‌باشد).



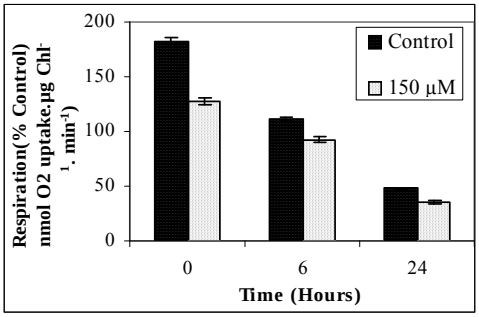
نمودار ۱۵- اثر غلظت‌های ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میکرو مولار تیتانیوم و شاهد در pH اسیدی (حدود۶) بر بتاکاروتن سلولی در جلبک *D. salina* (میزان شوری محیط کشت ۱/۵ مولار NaCl می‌باشد. مقادیر میانگین سه تکرار ± انحراف معیار می‌باشد).

بررسی اثر تیتانیوم بر فتوسنتز و تنفس: در این تحقیق اثر تیتانیوم بر متابولیسم (فتوسنتز و تنفس) جلبک *D. salina* مورد مطالعه قرار گرفت که در بخش اول اثر بلندمدت تیتانیوم بر میزان فتوسنتز و تنفس در طی ۲۴ ساعت مورد بررسی قرار گرفت. از بین غلظت‌های۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میکرو مولار غلظت ۱۵۰ میکرو مولار انتخاب گردید، زیرا در آزمایش‌های انتخاب غلظت مطلوب برای تیمار بلندمدت، غلظت‌های ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرو مولار هیچ تفاوتی با شاهد نداشتند. در نتیجه غلظت ۱۵۰ میکرو مولار به‌عنوان غلظت اصلی برای آزمایش بلندمدت انتخاب گردید. نمودار ۱۶ نتایج حاصل از اعمال بلندمدت تیتانیوم بر فتوسنتز می‌باشد. همان طور که ملاحظه می‌گردد در ساعات اولیه میزان فتوسنتز در تیمار ۱۵۰ میکرو مولار تیتانیوم نسبت به شاهد افزایش داشته است و پس از گذشت ۶ ساعت از شروع آزمایش میزان فتوسنتز در نمونه شاهد و تیمار در هر دو برابر شد و بعد از ۲۴ ساعت میزان فتوسنتز در تیمار ۱۵۰ میکرو مولار نسبت به نمونه شاهد به طور معنی‌داری کاهش یافت. نمودار ۱۷ نتایج حاصل از اعمال بلندمدت تیتانیوم بر تنفس را نشان می‌دهد. همان طور که ملاحظه می‌گردد میزان تنفس در تیمار ۱۵۰ میکرو مولار تیتانیوم نسبت به نمونه شاهد به تدریج رو به کاهش می‌باشد، به طوری که ۲۴ ساعت بعد از اعمال تنش، کاهش تنفس در تیمار نسبت به شاهد از تفاوت مشهودی برخوردار می‌باشد. میزان تنفس در نمونه شاهد هم بعد از ۲۴ ساعت کاهش یافته است. در بخش دوم اثر آنی یا همان کوتاه‌مدت افزایش تیتاتیوم از غلظت ۵۰ میکرو مولار تا ۲۰۰ میکرو مولار بر فتوسنتز و تنفس بررسی گردید. در تمام آزمایش‌ها هر کدام از تیمارها با شاهد مربوط به خود سنجیده شدند و بعد نمودارها با استفاده از نرم‌افزار ترسیم شدند. نمودار ۱۸ درصد تغییرات فتوسنتز در تیمارهای کوتاه‌مدت ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میکرو مولار تیتانیوم را نشان می‌دهد. همان طور که ملاحظه می‌گردد با افزایش غلظت تیتانیوم از ۵۰ تا ۱۵۰ میکرو مولار میزان فتوسنتز افزایش یافته است اما از این غلظت بالاتر منجر به کاهش میزان فتوسنتز گردیده است، به طوری که در تیمار ۲۰۰ میکرو مولار نسبت به سایر تیمارها فتوسنتز در سطح

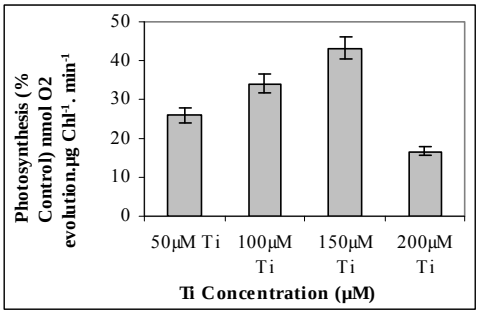
پایین‌تری قرار دارد، یعنی با ۴ برابر کردن تیتانیوم میزان فتوسنتز کمتر می‌شود. نمودار ۱۹ درصد تغییرات تنفس در تیمارهای کوتاه‌مدت ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میکرو مولار تیتانیوم را نشان می‌دهد، در غلظت ۵۰ میکرو مولار میزان تنفس افزایش یافته ولی با افزایش غلظت تیتانیوم تا ۲۰۰ میکرو مولار میزان تنفس کاهش یافته است که بیشترین میزان کاهش در غلظت ۲۰۰ میکرو مولار تیتانیوم می‌باشد.



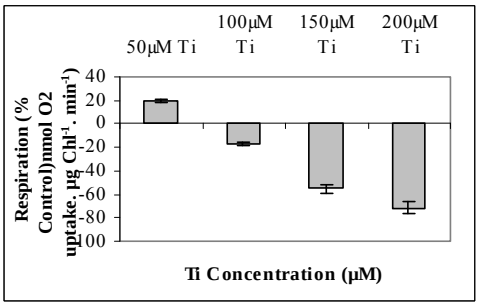
نمودار ۱۶- نتایج حاصل از اعمال تنش بلندمدت تیتانیوم بر فتوسنتز خالص در نمونه *D. salina* (مقادیر میانگین سه تکرار ± انحراف معیار می‌باشد).



نمودار ۱۷. نتایج حاصل از اعمال تنش بلندمدت تیتانیوم بر تنفس در نمونه *D. salin* (مقادیر میانگین سه تکرار ± انحراف معیار می‌باشد).



نموار ۱۸. درصد تغییرات فتوسنتز خالص با افزایش غلظت تیتانیوم از ۵۰ میکرو مولار تا ۲۰۰ میکرو مولار در آزمایش کوتاه‌مدت در نمونه *D.salina* (میانگین سه تکرار ± انحراف معیار می‌باشد).



نمودار ۱۹- درصد تغییرات تنفس با افزایش غلظت تیتانیوم از ۵۰ میکرو مولار تا ۲۰۰ میکرو مولار در آزمایش کوتاه‌مدت در نمونه *D. salina* (مقادیر میانگین سه تکرار ± انحراف معیار می‌باشد).

بحث

با وجود این که تیتانیوم در زمره عناصر ضروری نمی‌باشد ولی در گزارش‌ها (۱۳، ۱۱، ۶، ۲) دیده شده است که این عنصر برای گیاهان عالی مفید می‌باشد و می‌تواند منجر به بهبود متابولیسم زیستی در گیاهان شود. بنابراین در این تحقیق اثر تیتانیوم بر فاکتورهای رشد مورد بررسی قرار گرفت. به این منظور غلظت مطلوب تیتانیوم به نحوی انتخاب گردید که اثر کشندگی شدید در سلول نداشته باشد، محدوده غلظت انتخابی برای تیمار سوسپانسیونهای جلبکی ۲۰۰-۱۰۰ میکرو مولار تیتانیوم بوده، زیرا غلظت‌های بالاتر موجب مرگ تعداد زیادی از سلولهاگردید. در بخش اول پژوهش حاضر تیمار غلظت‌های ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میکرو مولار تیتانیوم به سوسپانسیون جلبکی دونالیه لا اعمال شد و مقدار کلروفیل و تعداد سلول مورد بررسی قرار گرفت. بر طبق نتایج هیچ گونه افزایشی در تقسیم سلولی و میزان کلروفیل و بتاکاروتن در واحد حجم (میلی لیتر) و در سلول جلبک مشاهده نگردید، در حالی که بر اساس گزارش (۶) تیمار تیتانیوم منجر به افزایش در پارامترهای فیزیولوژیک و رنگیزه‌های گیاهان شده است، از این رو به نظر می‌رسد تیتانیوم در غلظت‌های غیر کشنده ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میکرو مولار به دلایلی نظیر نبود pH مناسب و غیر قابل دسترس بودن، نتواند از خلال غشا عبور و تأثیر مناسب بر متابولیسم و روند تقسیم سلولی جلبک دونالیه لا بگذارد و

در غلظت‌های بالاتر به دلیل باند شدن با غشا ممکن است مانع فعالیت سلول شده و آن را مختل کند (۸). گزارش شده است (۸) که عنصر آلومینیوم به واسطه اتصال به غشا سلول دونالیه لا می‌تواند از فعالیت آن جلوگیری نماید. یکی از مشکلات قابل ذکر در مورد برخی از کاتیون‌ها و فلزات سنگین این می‌باشد که در محیط‌های قلیایی به صورت آزاد نبوده و به فرم غیر محلول و رسوب در می‌آیند، در نتیجه از دسترس گیاهان خارج می‌شوند (۱۴). از طرفی حضور عامل‌های کلات کننده مانند EDTA از غیر محلول شدن کاتیون‌ها در محیط جلوگیری می‌کند و با انتقال یون‌ها در نزدیکی سطح ریشه آن را بهتر در دسترس گیاهان قرار می‌دهد (۱۵). بنابراین به نظر می‌رسد در آزمایش‌های قبلی، تیتانیوم احتمالا به فرم غیر محلول در آمده و از دسترس جلبک خارج شده است، از این رو تأثیر تیتانیوم بر میزان تقسیم سلولی، میزان کلروفیل و بتاکاروتن در حضور EDTA بررسی گردید. طبق نتایج میزان تقسیم سلولی در حضور EDTA اثر افزایشی در کلیه تیمارها داشته است، همچنین میزان کلروفیل و بتاکاروتن در واحد حجم (میلی لیتر) تمامی تیمارها نسبت به نمونه شاهد یک روند افزایشی داشته است. چنین نتایجی با گزارش‌ها (۲، ۶) مبنی بر افزایش پارامترهای فیزیولوژیک ازجمله رشد سلولی و رنگیزه‌ها در گیاهان مطابقت دارد، به طوری که تیتانیوم روی بیوماس گیاهان اثرات مطلوب و تأثیر بسزایی در جذب سایر عناصر و تجمع کاتیونهای ضروری برای رشد داشته است که تیتانیوم بر ATPase و یا تحریک سنتز کوفاکتورهای فلزی اثر گذاشته و باعث افزایش جذب سایر عناصر شده است (۱۱). با توجه به این که حضور EDTA باعث افزایش تأثیر تیتانیوم بر سیستم سلولی و رنگیزه‌ها شده است، از این رو به نظر می‌رسد که در بخش اول، علت عدم تأثیر تیتانیوم ناشی از عدم جذب آن بوده است که در بخش دوم تحقیق EDTA با تیتانیوم باند شده و باعث جذب بیشتر و تأثیر آن شده است (۱۵). بنابراین عدم افزایش کلروفیل و بتاکاروتن در سلول در هر دو بخش آزمایش می‌تواند بیانگر این باشد که افزایش میزان کلروفیل و بتاکاروتن در واحد حجم به واسطه اثر تیتانیوم بر متابولیسم سلول نبوده، بلکه ناشی از افزایش تقسیم سلولی بوده که به تبع افزایش در حجم را به دنبال داشته است. در گزارش (۱۰) دیده شده است که یون‌های بسیاری از فلزات در یک محدوده مطلوب و بهینه از pH به صورت محلول بوده، بنابراین در دسترس و قابل جذب برای گیاهان می‌باشند و این که در چه محدوده‌ای از pH قابل جذب باشند به طبیعت شیمیایی فلز مربوطه برمی‌گردد. فلز تیتانیوم در pH تقریبا ۶ (اسیدی) جذب بیشتری داشته است (۷)، از این رو تیمار تیتانیوم در این pH انجام شد؛ با توجه به نتایج، میزان تقسیم سلولی به طور قابل ملاحظه‌ای نسبت به نمونه شاهد افزایش داشته است. میزان کلروفیل و بتاکاروتن در واحد حجم (میلی لیتر) در تمامی تیمارها نسبت به نمونه شاهد یک روند افزایشی داشته است که این نتایج با گزارش مبنی بر این که حلالیت فلزات در pH اسیدی بیشتر شده (۷) و منجر به افزایش رنگیزه‌ها در جلبک‌ها می‌شود (۶، ۱۳)، مطابقت دارد. نتایج اثر pH مشابه با نتایج اثر تیتانیوم در حضور EDTA بوده است، زیرا همانند حضور EDTA، در pH اسیدی (محدوده ۶) میزان تقسیم سلولی و رنگیزه‌ها در واحد حجم افزایش داشته است، اما میزان کلروفیل و بتاکاروتن در سلول همانند آزمایش‌های قبلی هیچ افزایشی را به دنبال نداشته است که حکایت از عدم تأثیر تیتانیوم بر متابولیسم سلول بوده و افزایش در رنگیزه‌ها ناشی از افزایش تعداد سلولها بوده است. با توجه به مقادیر ذکر شده در بخش نتایج، مقایسه میزان تقسیم سلولی در حضور EDTA و pH نشان می‌دهدکه در pH اسیدی میزان تقسیم سلولی بیشتر (۲۲ میلیون سلول در میلی لیتر) از تقسیم سلولی در حضور EDTA (۱۷ میلیون سلول در میلی لیتر) می‌باشد، پس به نظر می‌رسد pH و حل‌پذیری تیتانیوم اثر بیشتری نسبت به باند شدن آن در حضور EDTA دارد. گزارش شده است که تیتانیوم می‌تواند منجر به افزایش فتوسنتز در

گیاهان گردد (۵)، هر چند در خصوص تنفس اطلاعات چندانی وجود ندارد، همین طور تحقیق جامعی در خصوص اثر تیتانیوم بر فتوسنتز و تنفس بر جلبک‌های پرسلولی و تک سلولی وجود ندارد. پس از انجام آزمایش نتایج حکایت از کاهش میزان فتوسنتز و تنفس در حضور تیتانیوم در طی یک دوره ۲۴ ساعته داشت که بر خلاف گزارش‌های موجود در مورد گیاهان بود. از این رو به نظر می‌رسد تیتانیوم با تأثیر بر ساختار غشاء مانع فعالیت‌های متابولیسمی نظیر فتوسنتز و تنفس گردد (۵)، از طرفی در آزمایش کوتاه‌مدت که به صورت آنی و بلافاصله اعمال شده است با افزایش تیتانیوم تا ۱۵۰ میکرو مولار میزان فتوسنتز افزایش یافته است ولی در غلظت‌های بالاتر کاهش می‌یابد؛ بنابراین این افزایش می‌تواند بیانگر ورود تیتانیوم به داخل سلول و تأثیر مثبت بر فتوسنتز و اثر منفی بر تنفس باشد. البته در نتایج تقسیم سلولی و رنگیزه‌ها تفاوتی بین غلظت‌های ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میکرومولار تیتانیوم ملاحظه نشد ولی در تأثیر آنی تیتانیوم در بخش فتوسنتز و تنفس بین غلظت‌ها تفاوت معنی‌داری مشاهده گردید که خود حکایت از این داشت که بررسی فتوسنتز و تنفس نسبت به تقسیم سلولی تحت این شرایط یک شاخص دقیق‌تر بوده و تفاوت را بهتر و بیشتر نشان می‌دهد. همچنین نتایج بخش‌های قبلی حکایت از این بوده که افزایش در واحد حجم رنگیزه‌ها ناشی از افزایش تعداد سلول بوده نه اثر آن بر متابولیسم سلول، اما نتایج حاصل از فتوسنتز و تنفس نشان می‌دهد که تیتانیوم می‌تواند بر متابولیسم سلول نیز اثر داشته باشد. از طرفی گزارش شده است (۵) که تیتانیوم می‌تواند در زنجیره انتقال الکترون جایگزین برخی از فلزات شود و میزان انتقال الکترون را بهبود ببخشد که به نظر می‌رسد در شرایط کوتاه‌مدت این جایگزینی در زنجیره انتقال الکترون فتوسنتزی باعث افزایش فتوسنتز ولی در تنفس احتمالا با تأثیر بر سایر بخش‌های میتوکندریایی تنفس را مختل نماید. در شرایط طولانی‌مدت به نظر می‌رسد این افزایش در انتقال الکترون اختلالاتی را در سلول ایجاد نماید (۵). لازم به یادآوریست که همیشه فعالیت‌های فتوسنتزی با تعداد سلول رابطه مستقیم ندارد.

سپاسگزاری

بدین‌وسیله از مسئولان محترم تحصیلات تکمیلی دانشگاه اصفهان به‌دلیل حمایت مالی در انجام این تحقیق قدردانی می‌گردد. نویسندگان مقاله از دست‌اندرکاران قطب تنش‌های گیاهی در دانشگاه اصفهان نیز تشکر و قدردانی می‌نمایند.

منابع

1- Avron, M. and Ben-Amotz, A. 1992. *Dunaliella*: Physiology, Biochemistry, and Biotechnology. CRC Press, Boca Rotan.

2- Carvajal, M. and Alcaraz, C. F. 1998. Why titanium is a beneficial element for plants. Journal of Plant Nutrition. 21, 655-664.

3- Cowan, A. K., Rose, P. D. and. Hrone, L. G. 1992. *Dunaliella salina* a model system studying the response of plant cells to stress. Journal of Experimental Botany. 43, 1535-1574.

4- Eijckelhoff, C. and Dekker, J. P. 1997. A routine method to determine the chlorophyll a, pheophytin and β-carotene contents of isolated photosystem Π reaction center complexes. Photosynthesis Research. 52, 69-73.

5- Kiss, F., Deak, Gy., Feher, M., Balough, A., Szabolcsi, L. and Pais, I. 1985. The effect of titanium and gallium on photosynthetic rate of algae. Journal of Plant Nutrition. 8, 825-831.

6- Kuzel, S., Martin, H., Cigler, P., Tlustos, P. and Nguyen, P. V. 2003. Mechanism of physiological effects of titanium leaf sprays on plants grown on soil. Biological Trace Element Research. 91, 179-189.

7- Mehta, S. K. and Gaur, J. P. 2005. Use of algae for removing heavy metal. ions from wastewater: progress and prospects. Bio Resour Technology. 25, 113-52.

8- Osawa, H. and Matsomoto, H. 2001. Possible involvement of protein phosphorylation in aluminium-responsive malate efflux from wheat root apex. Plant Physioloy. 126, 411-420.

9- Shariati. M. and. Lilley, R. McC. 1994. Loss of intracellular glycerol from *Dunaliella* by lectroporation at constant osmotic pressure: subsequent restoration of glycerol content and

associated volume changes.Journal of Plant Cell and Environment. 1295-1304.
10- Sheng, G., Yanga, Y., Huang., M and. Yang, Kai. 2005. Influence of pH on pesticide sorption by soil containing wheat residue-derived char.Journal of Environmental Pollution. 134, 457-463.
11-Tlustos, P., Cigler, P., Hruby, M., Kuzel, S., Szakova, J and. Balik, J. 2005. The role of titanium in biomass production and its influence on essential elements contents in field growing crops. Journal of Plant Soil and Environment. 51, 19-25.
12- Uchida, R. and Silva, J. A. 2000. Essential nutrients for plant growth: nutrient function and deficiency symptoms. College of Tropical of Hawaii at Manoa. 31-55.
13- Wojcik, P. and Klamkowski, K. 2005. Szampion apple tree response to foliar titanium application. Journal of Plant Nutrition. 27, 2033-2046.
14- Zeremski-Skoric, T.m., Sekulic, P. D., Maksimovic, I. V., Seremesic, S. I., Ninkov, J. M., Milic, S. B. and Vasin, J. R. 2010. Chelate-assisted phytoextraction: effect of EDTA and EDDS on copper uptake by *Brassica napus L.* Journal of Serbian Chemical Society. 75, 1279-1289.
15- Zhao, Z., Xia, m., jiang, G., Liu, X., Bai, Z.and Huang, Y. 2010. Effect of IDSA, EDDS and EDTA on heavy metals accumulation in hydroponically grown maize(*Zea may, L*). Journal of Hazardous Materials. 185, 455-459.

Effect of Titanium on growth and synthesis of photosynthetic pigments in unicellular green alga *Dunaliella* salina

Beheshtifar S. and Shariati M.

Biology Dept., University of Isfahan, Isfahan, I.R. of Iran

Abstract

Titanium is not an essential element but it has been reported that it is useful for better growth and improvement of metabolic processes in plants. In this study, the effect of titanium on growth rate and synthesis of pigments, rate of photosynthesis and respiration of algae was investigated. For this purpose, the different concentrations of 0, 100, 150 and 200 μM of Ti^{+3} were applied to the culture medium of *D. salina* in 3 replications. Based on these results, any significant changes in the mentioned parameters weren't observed in the all treatments compared to the control, but the parameters showed marked increasing in the presence of EDTA. Effect of pH was similar to the results of titanium effect in the presence of EDTA. Photosynthesis and respiration in the long-time treatment of 150 μM of Ti^{+3} decreased over 24 hours. In the short-time treatment, photosynthesis increased by the increase of titanium concentration in the medium by 150 μM. Higher concentration had a negative effect on photosynthesis and respiration. Respiration in 50 μM of Ti^{+3} increased in comparison with the other concentrations and it was decreased with increasing Ti^{+3} concentration by 200 μM.

Key words: Titanium, *Dunaliella*, Pigment, Photosynthesis, pH, Respiration