بررسی تراکم سلولی و میزان کلروفیل ریزجلبک *Nannochloropsis oculata* در شوری و محیط کشت های مختلف

مهسا نقیبی[۱]
منصوره قائری[۲]
سپیده زهرا معصومی زاده[۳]

۱. دانشگاه آزاد اسلام ی واحد اهواز، دانشکده کشاورزی ومنابع طبیعی، دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه شیلات، اهواز، ایران
۲، ۳. دانشگاه آزاد اسلام ی واحد اهواز،دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، استاد یار گروه شیلات، اهواز، ایران

***مسئول مکاتبات:**
Mahsnaghibi@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۱/۲۸
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۲/۱۰
کد مقاله: ۱۳۹۳۰۲۰۱۹۴

چکیده

ریزجلبک *Nannochloropsis oculata* از جلبک های تک‌سلولی دریایی متعلق به شاخه ی Chlorophyta و زیرشاخه Eustigmatophyceae می‌باشد که در این تحقیق طی ۱۴ روز کشت، رشد آن در چهار محیط کشت (کانوی، گیلارد N_8 وTMRL) و سه درجه شوری متفاوت (۲۰ و ۲۵ و۳۰ قسمت در هزار)در محیط آزمایشگاه(دمای ۲۵ درجه سانتی گراد، PH = ۷ ، شدت نور ۲۵۰۰ لوکس و دوره نوری ۱۸ ساعت روشنایی و ۶ ساعت تاریکی و همچنین هوادهی با استفاده از پمپ آکواریوم به صورت شبانه روزی) مورد بررسی قرار گرفت . میزان رشد این ریز جلبک و اندازه-گیری تراکم سلولی با دو روش، شمارش با لام نئوبار و سنجش کلروفیل با روش اسپکتروفتومتری مورد مطالعه قرار گرفت . برطبق نتایج بدست آمده اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای محیط کشت و شوری‌های متفاوت وجود داشت ($P<۰/۰۵$). محیط کشت کانوی با شوری ۲۵ قسمت در هزار از نظر افزایش تراکم و با شوری ۲۰ قسمت در هزار از نظر میزان کلروفیل a در رتبه اول ، محیط کشت گیلارد با شوری ۲۰ قسمت در هزار از نظر افزایش تراکم وکلروفیل a در رتبه دوم ، محیط کشت TMRL با شوری ۲۵ قسمت در هزار از نظر افزایش تراکم وکلروفیل a در رتبه سوم و محیط کشت N_8 با شوری ۲۵ قسمت در هزار از نظر افزایش تراکم و با شوری ۲۰ قسمت در هزار از نظر میزان کلروفیلa در رتبه چهارم قرار می گیرند . تغییر در مواد اولیه محیط کشت ها باعث تغییر در میزان رشد و کلروفیل می‌شود.

کلمات کلیدی : ریز جلبک، *Nannochloropsis oculata*، محیط کشت، رشد، شوری، کلروفیل a.

مقدمه

ریزجلبک *Nannochlorosis oculata* یکی از جلبک های تک سلولی دریایی است که به شاخه ی Chlorophyta و زیر شاخه Eustigmatophyceae تعلق دارد. جلبک نانوکلروپسیس به دلیل دارا بودن اسیدهای چرب غیراشباع و میزان بالای پروتئین درآبزی پروری از اهمیت بالایی برخورداراست . ارزش غذایی زیاد از جمله محتوای بالای ایکوزاپنتانوئیک اسید (EPA) وهمچنین نقش موثر این جلبک به عنوان جایگزین اسیدهای چرب غیراشباع چندگانه (PUFA) اهمیت آن را در تغذیه ی لاروماهیان دریایی بارزمی سازد. از گونه-ی جلبکی *N.oculata* به صورت مستقیم و به منظورتغذیه ی روتیفرهای آب شور با نام علمی *Brachionus plicatilis* در پرورش

Archive of SID
www.SID.ir

سیم قرمز *Pagrus major* کفال ماهیان *Mugilidae*، خامه ماهی *Chanos chanos* و سرخوماهیان (Lutjanidae) درمراکز تکثیر آب های شور بیشتر مناطق جه ان از سال ۱۹۸۰ تاکنون استفاده می شود. غالبا این جلبک ها با گونه های دیگری از جلبک ها نظیر *Monochrysis sp.* و *Isochrysis galbana* درمراحل اولیه‌ی پرورش لاروهای ماهیان دریایی برای تغذیه و غنی سازی روتیفرها و همچنین به وجودآوردن آب سبز درمخازن هچری استفاده می شود و به عنوان یکی از تولیدات فتواتوتروفیک ایده‌آل محسوب می‌شود که در افزایش سطح EPA درشبکه غذایی موثراست(صلواتیان وهمکاران ، ۱۳۸۵).

جلبک‌ها علاوه بر عوامل فیزیکی(نور، درجه حرات، هوا دهی و ...)، برای انجام فعالیتهای حیاتی به محیط کشت نیاز دارند. محیط کشت یا ماده غذایی شامل عناصر ماکرو المان و میکرو المان بوده که عناصر ماکروالمان شامل عناصری نظیر فسفر، کلسیم، منیزیم، سیلیس، پتاسیم و غیره است؛ درحالی که عناصر میکروالمان شامل عناصر آهن، مولیبدن، منگنز، مس، کبالت، وانادیم و غیره می باشد، این مواد در قالب فرمول‌های محیط کشت برای رشد جلبک‌ها طراحی می‌شود. بنابراین، با اضافه کردن محلول‌های غذایی و کودهای آماده یا کودهای شیمیایی این مواد برای جلبک‌ها تهیه می‌شود تا بتوانند رشد و افزایش تراکم سلولی را در محیط کشت‌های خاص داشته باشند. مواد ذکر شده برای رشد جلبک‌ها ضروری است و معمولا در پیکره جلبک‌ها نقش مهمی دارند؛ به عنوان مثال در ساختمان RNA و DNAدر اسکلت سازی، تامین انرژی به صورت ATP، در ساختمان پروتئین و اسیدهای آمینه در دیواره سلولی جلبک‌ها و همچنین سایر فواید در جلبک‌ها موثرند(صلواتیان وهمکاران ، ۱۳۸۵).

صلواتیان و همکاران (۱۳۸۵) رشد و زی توده جلبک *N. oculata* در محیط کشت‌های مختلف را مورد ارزیابی قرار دادند در حالی که قادری اردکانی و همکاران (۱۳۸۹) تاثیر شوری و دما بر رشد این ریز جلبک را بررسی کردند . Banerjee و همکاران (۲۰۱۱) رشد و ترکیبات تقریبی جلبک *Nannochloropsis oculata* را در شرایط کشت بیرون بررسی کردند. قزلباش و همکاران (۱۳۸۸) اثر شوری را بر رشد جلبک *Nannochloropsis sp* در محیط کشت والنه جهت خالص سازی بررسی کردند. Na و همکاران (۲۰۱۲) اثرات شوری را بر رشد، ترکیب شیمیایی وتولید چربی جلبک *Nannochloropsis oculata* بررسی کردند. با توجه به اینکه اکثر هزینه های کشت ریز جلبک ها متعلق به محیط کشت اختصاصی آنها می باشد، هدف از اجرای این تحقیق بررسی همزمان محیط کشت و شوری بر تراکم سلولی و میزان کلروفیل بود تا امکان کشت وتولید انبوه جلبک دریایی نانوکلروپسیس در شرایط منطقه ای با معرفی بهترین محیط کشت و درجه ی شوری حاصل گردد تا ضمن صرفه ی اقتصادی بتواند بالاترین میزان تولید جلبکی را تامین کند.

مواد و روش ها

ریز جلبک *Nannochloropsis oculata* در ۴ محیط کشت (کانوی، گیلارد، N_8 و TMRL) و سه درجه شوری (۲۰ و ۲۵ و ۳۰ قسمت در هزار) با ۳ تکرار در نمونه برداری به مدت ۱۴ روز و به میزان ۵۰ سی سی از بذر ریز جلبک با میانگین تراکم ۲۶×۱۰^{۶} سلول در میلی‌لیتر و ۴۵۰ سی‌سی از محیط کشت در ارلن مایر به حجم ۵۰۰ سی‌سی تحت شرایط زیستی یکسان (دمای ۲۵ درجه سانتی گراد، PH = ۷ و شدت نوری ۲۵۰۰ لوکس و دوره نوری ۱۸ ساعت روشنایی و ۶ ساعت تاریکی وهوادهی مداوم با استفاده از پمپ اکواریوم) در شرایط آزمایشگاهی کشت داده شد . در این تحقیق روزانه شوری با شوری‌سنج ATAGO ساخت کشور ژاپن ، pH با pH سنج Hach-sension1 ساخت آمریکا با دقت ۰/۰۱، دما توسط دماسنج جیوه ای استفاده گردید همچنین جهت تنظیم زمان روشنایی به تاریکی از زمان سنج Theben ساخت آلمان با دقت ۱۵ دقیقه و برای تنظیم نور از دستگاه نورسنج Phywe CG 2877/3400000 ساخت کشور آلمان استفاده شد و تراکم سلولی با لام هموسیتوم تر و اسپکتروفتومتری اندازه‌گیری شد. همچنین میزان کلروفیل a با سنجش غلظت محیط کشت با دستگاه اسپکتروفتومتر سنجش و با فرموله مربوطه محاسبه شد.

تعیین تراکم سلولی ریز جلبک *Nannochloropsis oculata*

الف-روش شمارش مستقیم با استفاده از لام

Archive of SID
www.SID.ir

بررسی رشد ریز جلبک *N. oculata* طی مدت کشت، روزانه شمارش سلولی با استفاده از لام هموسیتومتر طبق فرمول زیر انجام می شد.

تعداد کل سلولها در ۲۵ مربع= تعداد سلول در ۵ مربع × ۵.

تعداد کل سلولها در ۱ میلی لیتر از محیط کشت = $۱۰^{۴}$ × تعداد کل سلولها در ۲۵ مربع (Haran، 1992)

ب - روش محاسبه رور سنجی زیست توده ریز جلبک *Nannochloropsis oculata*

بررسی رشد ریزجلبک *N. oculata* طی مدت کشت، تراکم سلولی(نشان دهنده ی تعیین میزان رشد)روزانه با استفاده از اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۴۰ نانومتر اندازه گیری شد(Henriques، 2007).

اندازه گیری میزان کلروفیل (a)

برای اندازه گیری میزان کلروفیل a طی مدت کشت، روزانه ۱۰ میلی لیتر از جلبک برداشته و تراکم سلولی در هر میلی لیتر بدست آورده شد جلبک برداشته شده با سانتریفیوژ ۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه تغلیظ گردید. مایع اضافی خارج و ۱۰ میلی لیتر محلول استون ۹۰ درصد اشباع به مواد باقیمانده افزوده شد . مرحله ۲ را مجددا تکرار کرده، یک نمونه دارای استون خالص در اسپکتروفتومتر (UV-Visible Varian, Cary 50 scan) قرار داده شد و میزان جذب دستگاه برای نمونه شفاف صفر (تنظیم) گردید. نمونه‌ی خالی را برداشته و نمونه‌ی حاوی کلروفیل a در اسپکتروفتومتر قرارگرفت و میزان جذب در طول موج های ۶۶۴، ۶۴۷ و ۶۳۰ نانومتردر دستگاه اسپکتروفتومتر مدل (UV-Visible Varian, Cary 50 scan) قرائت کرده و در فرمول زیر قرار داده و میزان کلروفیل را محاسبه شد (Toyub *et al*.,2011).

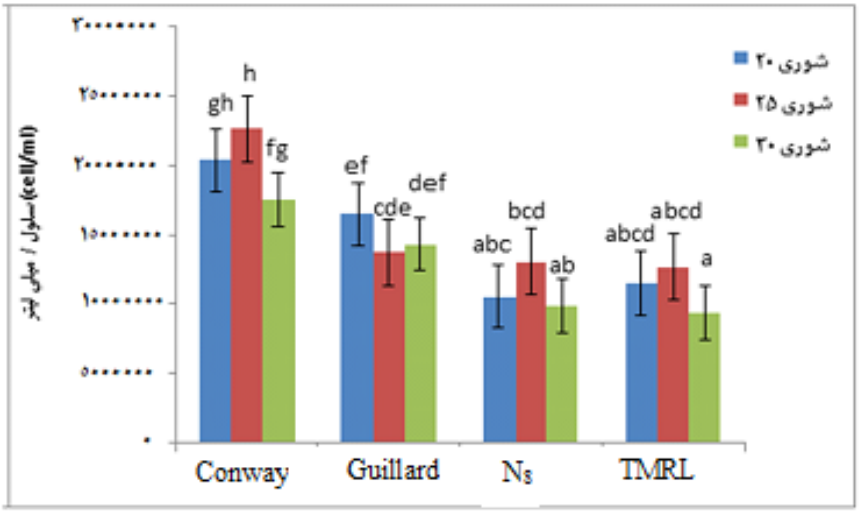
$$\text{Chlorophyll a } (\mu g/l) = ۱۱/۸۵ (OD۶۶۴) - ۱/۵۴ (OD۶۴۷) - ۰/۰۸ (OD۶۳۰)$$

تجزیه و تحلیل اطلاعات

نتایج بدست آمده با استفاده از برنامه‌های نرم افزاری EXCELL و SPSS انجام شد. نرمال بودن داده‌ها با آنالیزکولموگراف – اسمیرنف در تیمارهای مختلف و اختلاف بین تیمارها با آنالیز واریانس یکطرفه وتست دانکن بررسی شد.

نتایج

تراکم سلولی ریز جلبک *N. oculata* با استفاده از لام نئوبار در مدت ۱۴ روز دوره کشت، در شکل ۱ نشان داده شده است.



Archive of SID
www.SID.ir

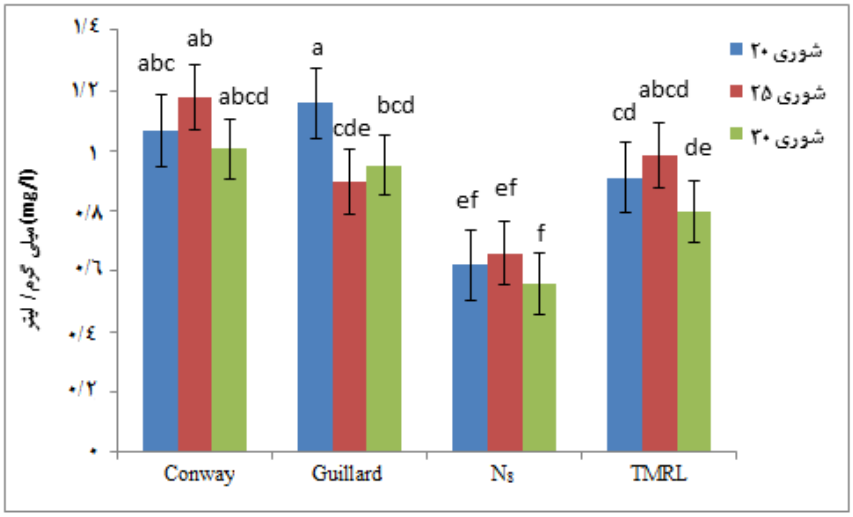
شکل ۱: مقایسه تیمارها در خصوص شمارش سلولی در محیط کشت و شوری متفاوت.

(حروف غیر همنام نشان دهنده تفاوت معنی دار نسبت به هم در سطح ۰/۰۵ می باشد)

در خصوص شمارش سلولی نتایج حاصله نشان می دهد که بین تیمارها با محیط کشت و شوری متفاوت اختلاف معنی داری وجود دارد ($P<۰/۰۵$). در محیط کشت TMRL بین تیمارهای با شوری ۲۰ و۲۵ اختلاف معنی داری وجود ندارد. بر طبق نتایج بدست آمده محیط کشت کانوی با شوری ۲۵ قسمت در هزار با میانگین تعداد ۲۲×۱۰^{۶} سلول در میلی لیتر بیشترین میزان رشدرا پس از آن گیلارد با درجه شوری ۲۰ قسمت در هزار و با میانگین تعداد ۱۶×۱۰^{۶} سلول در میلی لیتر در رتبه دوم و محیط کشت N_8 با درجه شوری ۲۵ قسمت در هزار و با میانگین تعداد ۱۳×۱۰^{۶} سلول در میلی لیتر در رتبه سوم و محیط کشت TMRLبا درجه شوری ۲۵ قسمت در هزار و با میانگین تعداد ۱۲×۱۰^{۶} سلول در میلی لیتر در رتبه چهارم قرار می گیرند.

نتایج تراکم سلولی روزانه ریزجلبک *Nannochloropsis oculata*

نتایج تعیین تراکم سلولی ریز جلبک *N. oculata* با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در شکل ۲ نشان داده شده است.



شکل ۲: مقایسه تیمارها در خصوص تراکم سلولی در محیط کشت و شوری متفاوت.

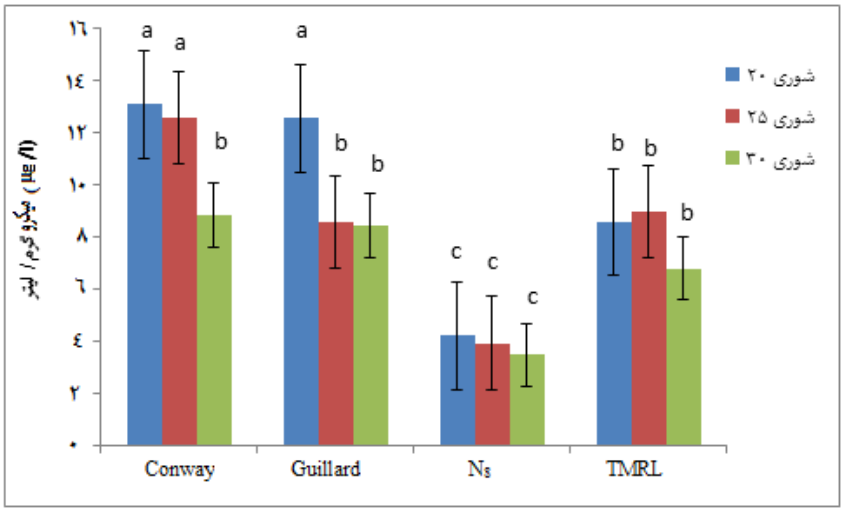
(حروف غیر همنام نشان دهنده تفاوت معنی دار نسبت به هم در سطح ۰/۰۵ می باشد)

در خصوص تراکم سلولی نتایج نشان می‌دهد که اختلاف معنی‌داری بین تیمارها با محیط کشت و شوری متفاوت وجود دارد($P<۰/۰۵$). بین تیمار کانوی با شوری ۳۰ قسمت در هزار با تیمار TMRL با شوری ۲۵ قسمت در هزار تفاوت معنی‌داری وجود ندارد($P<۰/۰۵$). همچنین بین تیمار N_8 با شوری ۲۰ و ۲۵ قسمت در هزار اختلاف معنی داری وجود نداردد($P<۰/۰۵$). طبق نتایج بدست آمده ، محیط کشت کانوی با درجه شوری ۲۵ قسمت در هزار و با میانگین ۱/۱۷۷ میلی گرم بر لیتر در رتبه اول وگیلارد با درجه شوری ۲۰ قسمت در هزار و با میانگین ۱/۱۵۶میلی‌گرم بر لیتر در رتبه دوم پس از آن محیط کشت TMRL با درجه شوری ۲۵ قسمت در هزار و با میانگین ۰/۹۸۴ میلی‌گرم بر لیتر در رتبه سوم و محیط کشت N_8 با درجه شوری ۲۵قسمت در هزار و با میانگین ۰/۶۵۹ میلی‌گرم بر لیتردر رتبه چهارم قرار می گیرد.

نتایج میزان کلروفیل a ریز جلبک *Nannochloropsis oculata*

نتایج حاصل از اندازه گیری میزان کلرو فیل a ریز جلبک نانوکلروپسیس درشکل ۳ نشان داده شد.

www.SID.ir



شکل ۳: مقایسه تیمارها در خصوص میزان کلروفیل a در محیط کشت و شوری متفاوت.

(حروف غیر همنام نشان دهنده تفاوت معنی دار نسبت به هم در سطح ۰/۰۵ می باشد)

در خصوص اندازه گیری میزان کلروفیل a در بین تیمار ها با محیط کشت و شوری متفاوت اختلاف معنی‌داری در سه سطح a, b, c وجود دارد ($P<0/05$). کلروفیل a در محیط کشت کانوی با شوری ۲۰،۲۵ و گیلارد با شوری ۲۰ اختلاف آماری معنی‌داری ندارند(سطح a و $P<0/05$). کلروفیل a بین تیمارکانوی با شوری ۳۰ وگیلارد با شوری ۲۵و۳۰ و TMRL باشوری ۲۰ و۲۵ و ۳۰ اختلاف معنی دارنیست(سطح b و $P<0/05$). کلروفیل a بین تیمارهای N_8 با شوری های ۲۰ و۲۵ و۳۰ اختلاف معنی دارنیست (سطح c و $P<0/05$). کلروفیل a بین تیمارهای N_8 باشوری ۲۰ و۲۵ و۳۰ باتیمارهای کانوی باشوری ۲۰ و۲۵ وگیلارد با شوری ۲۰ معنی داراست ($P<0/05$). وهمچنین با تیمار های کانوی با شوری ۳۰ و گیلارد با شوری ۲۵ و ۳۰ و TMRL با شوری ۲۰ و ۲۵ و۳۰ppt اختلاف معنی دار ی وجود دارد($P< 0/05$).

در بین تیمارها محیط کشت کانوی با شوری ۲۰ قسمت در هزار و با میانگین ۱۳/۰۸ میکرو گرم بر لیتر در رتبه اول و محیط کشت گیلارد با شوری ۲۰ قسمت در هزار و با میانگین۱۲/۵۵ میکرو گرم برلیتر در رتبه دوم ومحیط کشت TMRL با شوری ۲۵قسمت در هزار و با میانگین ۸/۹۶ میکرو گرم بر لیتر در رتبه سوم و محیط کشت N_8 با شوری ۲۰ قسمت در هزار و با میانگین ۴/۲۱ میکرو گرم برلیتر در رتبه چهارم قرار می گیرند.

بحث و نتیجه گیری

معمول‌ترین نوع کشت در شرایط آزمایشگاهی این است که حجم معینی از محیط کشت شامل مواد غذایی آلی و معدنی مورد نیاز تهیه گردد و تعداد نسبتا کمی از جلبک به آن تلقیح شده و سپس تحت شرایط ثابت نور، دما و هوادهی قرار گیرد ضمنا کوتاهی دوره رشد و مصرف مواد کم هزینه در ساخت محیط کشت، تولید ریز جلبک ها را اقتصادی تر می‌نماید(قزلباش و همکاران، ۱۳۸۸). با توجه به اینکه هدف مطالعه حاضر انتخاب بهترین محیط کشت و شوری مناسب برای نانوکلروپسیس بوده است، با ثابت نگه داشتن سایر متغیرهای کشت دو فاکتور مذکور با ارزیابی رشد به دو روش سنجش تراکم سلولی و میزان کلروفیل مورد بررسی قرار گرفت.

صلواتیان و همکاران(۱۳۸۵) رشد و توده زنده نانوکلروپسیس را در محیط های کشت مختلف از جمله کانوی، میگویلس، ساتو و تی ام آر ال بررسی کردند و نتیجه گرفتند که محیط کشت کانوی با میانگین تعداد ۵۹×۱۰^{۶} سلول در ۱ میلی لیتر بهترین محیط کشت برای تولید

Archive of SID
www.SID.ir

انبوه در شرایط آزمایشگاهی می باشد که در تحقیق حاضر نیز محیط کشت کانوی با میانگین تعداد ۲۲×۱۰^{۶} بهترین محیط کشت برای رشد در شرایط آزمایشگاهی می باشد.

Banerjee و همکاران (۲۰۱۱) رشد و ترکیبات تقریبی جلبک *Nannochloropsis oculata* را درمحیط کشت کانوی با شوری ۳۰ppt و pH= ۸ در شرایط بیرونی در سایه با دمای ۲۴تا۳۶ درجه سانتیگراد و شدت نور ۱۴۰ میکرومول در مترمربع بر ثانیه و شرایط آزمایشگاهی در دمای ۲۰ درجه سانتیگراد و شدت نور ۱۵۰ میکرومول در مترمربع بر ثانیه بررسی کردند، نتایج نشان داد که رشد در محیط بیرون بیشتر و سریعتر و به میزان ۱۱×۱۰^{۶} سلول در میلی‌لیتر بود که در تحقیق حاضر باتوجه به اینکه در شرایط آزمایشگاهی ودر دمای ۲۵ درجه سانتیگراد انجام شد میزان رشد در محیط کشت کانوی با شوری ۳۰ppt به ۱۷×۱۰^{۶}سلول در میلی لیتر رسید که در نتیجه بازده بهتری نسبت به تحقیق فوق داشته است.

بررسی اثر شوری ومحیط کشت بر تراکم این ریزجلبک نشان داد که بیشترین تراکم محاسبه شده به دو روش (شمارش با لام و استفاده از روش اسپکتروفتومتری) در سه محیط کشت TMRL, Conway, N_8 ppt ۲۵ بوده است. زیرا فشار اسمزی ناشی از این شوری برای این جلبک مناسبترین بوده و درنتیجه بیشترین رشد را دارد، در صورتی که با کاهش شوری (۲۰ ppt)و یا با افزایش آن (۳۰ ppt)این ریزجلبک تحت استرس ناشی از شوری قرار میگیرد و رشد کاهش می‌یابد. همچنین در تحقیق قزلباش و همکاران(۱۳۸۸)اثر سه شوری ۴۵ ppt، ۳۵، ۲۵ بر رشد جلبک *Nannochloropsis sp* در محیط کشت والنه جهت خالص سازی بررسی شد که نشان داد بیشترین رشد این جلبک در شوری ۲۵ ppt بوده است و با افزایش شوری رشد کاهش می‌یابد و لذا با این تحقیق همخوانی دارد. در این تحقیق در محیط کشت Guillard بیشترین رشد در دو روش، در شوری ۲۰ ppt بوده است در حالی که در دیگر محیط کشت ها در شوری ۲۵ ppt بوده است. بررسی مواد اولیه محیط کشت نشان می‌دهد که بین مواد محیط کشت ها اختلاف وجود دارد مثلاً محیط کشت گیلارد دارای موادی است که در بقیه محیط کشت ها وجود ندارد. این مواد شامل ویتامین B_6 و سیلیکات سدیم می‌باشد که در محیط کشت های دیگر وجود ندارد. از آنجا که سیلیکات در ساختمان نانوکلروپسیس وجود ندارد و مورد نیاز نیست شاید وجود ویتامین B_6 در این محیط کشت باعث شده تا این جلبک در شوری کمتر نیز رشد بهتری داشته باشد و برای آن مناسب باشد . چنانچه با بررسی تراکم به روش اسپکتروفتومتری اختلاف معنی داری بین تیمارهای ۲۰ ppt با بقیه تیمارها مشاهده میشود و در این شوری بیشترین رشد مشاهده میشود. لذا در صورتی که برای غذادهی به آبزیانی که درشوری ۲۰ ppt نگهداری می شود بهتر است از محیط کشت گیلارد استفاده کرد زیرا این ریزجلبک رشد بیشتری در این شوری و محیط کشت دارد.

در بررسی اثر شوری و محیط کشت بر میزان کلروفیل در نمودار ۳ مشاهده می‌شود که بین محیط کشت ها و شوری ها اختلاف معنی-داری در سه سطح a,b,c وجود دارد ($p< ۰/۰۵$). بیشترین میزان کلروفیل در محیط کشت کانوی شوری ۲۵ ppt و ۲۰ و محیط کشت گیلارد در شوری۲۰ ppt (سطح a) بوده است که در این تیمارها اختلاف معنی داری وجود ندارد. در این سطح به دلیل اینکه محیط کشت کانوی و گیلارد دارای ویتامین هستند(کانوی: B_1, B_{12} و گیلارد: B_1,B6, B_{12}) و دیگر محیط کشت ها(TMRL , N_8) فاقد ویتامین هستند لذا احتمالاً به دلیل وجود ویتامین میزان کلروفیل نیز بیشتر بوده است . در سطحb که مربوط به محیط کشت TMRL و در سه شوری، محیط کشت گیلارد شوری ۳۰ ppt و ۲۵ و همچنین محیط کشت کانوی با شوری ۳۰ ppt می‌باشد از نظر آماری اختلاف معنی-داری با یکدیگر ندارند. در این سطح اگرچه محیط کشت های گیلارد و کانوی دارای ویتامین هستند ولی از نظر میزان کلروفیل با محیط کشت TMRL در سه شوری تفاوت ندارند در واقع این نتیجه نشان می‌دهد که ویتامین بر میزان کلروفیل در شوری بالا (۳۰ ppt و ۲۵) بی‌تاثیر بوده است. سطح c مربوط به محیط کشت N_8 با سه شوری می‌باشد که با سطح a و b اختلاف معنی‌داری دارد. به دلیل وجود ویتامین‌ها و مولیبدات در محیط کشت های گیلارد و کانوی در مقایسه با محیط کشت N_8 ، بالا بودن میزان کلروفیل در این محیط کشت ها قابل توجیه است در حالی که در سطح b، محیط کشت TMRL وجود دارد که میزان کلروفیل بالاتری نسبت به محیط کشت N_8 دارد ولی دارای ویتامین نیست . در بررسی مواد اولیه محیط کشت‌های TMRL و N_8 مشخص می‌شود اگرچه هر دو محیط بدون ویتامین

www.SID.ir

هستند و حتی محیط N_8 دارای برخی عناصر کمیاب است که در محیط TMRL وجود ندارد ولی میزان مواد اصلی مانند نیترات، فسفات و آهن محیط کشت TMRL بسیار بیشتر از محیط کشت N_8 است لذا احتمالاً به دلیل غلظت با لای مواد اصلی ، میزان کلروفیل TMRL بیشتر از N_8 بوده است. در این بررسی بیشترین میزان کلروفیل در سه محیط کشت (کانوی، گیلارد و N_8)در شوری ppt ۲۰ بوده است و فقط در محیط کشت TMRL در شوری ppt ۲۵ بیشترین کلروفیل مشاهده شده است. این مطلب نشان می‌دهد که افزایش شوری و استرس ناشی از آن می تواند باعث کاهش میزان کلروفیل شود . Na و همکاران (۲۰۱۲) اثرات ۵ سطح شوری (‰ ۱۵،۲۵،۳۵،۴۵،۵۵) را بر رشد، ترکیب شیمیایی و تولید چربی جلبک *Nannochloropsis oculata* در شرایط کنترل شده در مدت ۱۹ روز بررسی کردند. نتایج نشان داد که زی توده خشک در شوری‰ ۲۵ در روز دهم بیشترین میزان بوده است. همچنین بیشترین کلروفیل a در همین شوری و به میزان mg/g^{-1} ۲۶/۴۷ بوده است.

چنانچه مشاهده می‌شود بیشترین تراکم و بیشترین میزان کلروفیل مربوط به محیط کشت کانوی است. در بررسی مواد محیط کشت ها مشاهده می‌شود که این محیط کشت دارای اسید بوریک و مولیبدات آمونیوم است که در دیگر محیط کشت‌ها وجود ندارد. بور برای رشد جلبک ها یک عنصر ضروری است که شکل غالب آن در آب، اسید بوریک است. بور قابلیت تجمع در گیاهان را دارد(WHO.,1980) این عنصر را می‌توان به عنوان کود به محیط کشت اضافه کرد که باعث جذب بیشتر نیترات در محیط می‌شود. همچنین می‌تواند به طور مستقیم در متابولیسم کلسیم، فسفر و منیزیم تأثیر گذارد. از طرف دیگر محیط کشت کانوی دارای دو منبع نیتروژنی است که شامل مولیبدات آمونیوم و نیترات پتاسیم است که یون آمونیوم و یون نیترات مورد نیاز ریزجلبک را تأمین می‌کنند.

میزان نیتروژن ریز جلبک‌ها از ۱٪ تا بیش از ۱۰٪ وزن خشک متغییر است. میزان نیتروژن نه فقط در بین گروه های مختلف متفاوت است (به عنوان مثال در دیاتومه‌ها کمتر می‌باشد)بلکه در خصوص گونه‌ها نیز بستگی به میزان ذخیره و قابلیت در دسترس بودن دارد . نیتروژن اکثراً به شکل نیترات (NO_3^-) مورد استفاده قرار می‌گیرد اما اغلب از آمونیوم(NH_4^+) و اوره نیز استفاده می‌شود. ترکیبات آلی نیتروژنی متنوعی توسط جلبک‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد و تعدادی از آنها فقط می‌توانند به عنوان منبع نیتروژنی باشند. نیتروژن آمونیوم اغلب به عنوان یک منبع نیتروژن برای میکروارگانیسم‌ها ترجیح داده می‌شود (معصومی زاده، ۱۳۸۳). گیاهان منبع آمونیومی را راحت تر از منابع نیتراته جذب می‌کنند و در پدیده فتوسنتز در درجه اول منبع آمونیومی و در صورت فقدان از منبع نیتراته استفاده می کنند (صلواتیان، ۱۳۸۵). تخمین زده می‌شود که نیترات و آمونیوم در ارتباط با pH محیط کشت مؤثر باشند. هنگامی که نیتروژن آمونیوم به عنوان تنها منبع نیتروژن مورد استفاده قرار می گیرد pH در طول رشد درنتیجه رها ساختن یون H^+ کاهش می یابد . افزایش pH زمانی اتفاق می‌افتد که نیترات به عنوان تنها منبع نیتروژن مورد استفاده قرار می‌گیرد(Richmond,2004) .لذا در محیط کشت‌های دیگر که فقط از نیترات به عنوان منبع نیتروژنی استفاده شده است احتمالاً به دلیل کاهش pH و لذا اسیدی شدن محیط در رشد میکروجلبک‌ها اثر منفی داشته و به عنوان یک عامل محدود کننده می‌باشد.

بیوتین(B_6) و تیامین(B_1) و B_{12} در مسیرهای متابولیکی که در تمام ارگانیسم ها وجود دارند و به عنوان کوفاکتور مورد استفاده قرار می‌گیرند. در گیاهان عالی‌تر این دو ویتامین توسط سلولها سنتز می‌شوند(Sournia., 1987). از آنجا که فقط محیط کشت کانوی و گیلارد دارای ویتامین هستند لذا نیازهای رشد ریزجلبک را به خوبی تامین کرده و رشد و میزان کلروفیل در این محیط کشت ها بیش از محیط کشت های TMRL و N_8 است.

بطور کلی در کشت ریز جلبک ها تغییر در عوامل فیزیکی و شیمیایی، زمان برداشت و نحوه فراوری روی ترکیبات شیمیای تاثیر گذار است. با توجه به اینکه در تحقیق حاضر از محیط کشت های مختلف در شوری های متفاوت استفاده گردید نتایج نشان دادند که محیط کشت کانوی با شوری۲۵ قسمت در هزار از نظر افزایش تراکم سلولی و با شوری۲۰ قسمت در هزار از نظر میزان کلروفیل a بیشترین بازده را در بین محیط کشت های دیگر نشان داد که بر این اساس می توان چنین نتیجه گیری نمود که درجه شوری به طور مستقل می تواند بر تراکم

Archive of SID
www.SID.ir

سلولی و میزان کلروفیل a تاثیر گذار باشد. همچنین وجود تفاوت در مواد تشکیل دهنده محیط کشت‌ها نیز سبب تغییرات در رشد می‌شود. لذا با توجه به هدف کشت می توان از محیط کشت کانوی با شوری ۲۵ ppt یا گیلارد با شوری ۲۰ ppt استفاده نمود. مثلاً برای غذادهی به آبزیانی که در شوری ۲۰ ppt سازش یافته‌اند از محیط کشت گیلارد استفاده شود.

منابع

صلواتیان، م. آذری تاکامی، ق . کیوان، ا. وهابزاده رودسری، ح . رجبی نژاد، ر .، ۱۳۸۵. ارزیابی رشد و زی توده جلبک *Nannochloropsis oculata* در محیط کشتهای مختلف. مجله علوم دریایی ایران، دوره پنجم، شماره ۱و ۲،۵۳-۴۳

قادری اردکانی ف . ، قائنی م . ، رومیانی ل .، ۱۳۸۹. بررسی شوری و دما بر رشد ریز جلبک *Nannochloropsis oculata* در محیط کشت های مختلف ، شانزدهمین همایش ملی و اولین همایش بین المللی زیست شناسی ایران، دانشگاه فردوسی مشهد.

قزلباش، ف. فربودنیا، ط. آق، ن.، ۱۳۸۸. خالص سازی جلبکهای تک سلول *Nannochloropsis sp.* و *Isochrysis sp.* با استفاده از غلظتهای مختلف نمک و شدتهای روشنایی مختلف، مجله زیست شناسی ایران، دوره ۲۲، شماره ۱، ۱۰۲-۹۵

معصومی زاده، س. ز.، ۱۳۸۳. بررسی روند رشد برخی فیتوپلانکتونهای بومی استان خوزستان در شرایط آزمایشگاهی ، پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، دانشکده علوم دریایی، ۳۵۰.

Banerjee, S., Hew, W. E., Khatoon, K. and Shariff, M., 2011, Growth and proximate composition of tropical marin *Chaetoceros calcitrans* and *Nannochloropsis oculata* cultured out door and under laboratory conditions, DOI: 10.5897/AJB10.1748.

Haran M. P., 1992, Monual on shrimp hatechery operation and management (*Penaeus monodon*). Publ: TASPARC. 114pp

Henriques, M., Silva A. and Rocha J., 2007, Extraction and quantification of pigments from a marine microalga: a simple and reproducible method.

Na, G., Qiang, L., Gang L., Yehui T., Liangmin, H. and Junda, L., 2012. ffect of salinity on growth, biochemical composition, and lipid productivity of Nannochloropsis oculata CS 179**.** Engineering in Life Sciences, vol: 12, Issue 6, 631-637

Richmond, A., 2004, Hand book of microalgal culture: Biotechnology and Applied phycology blackwell publishing. 566pp

Sournia, A., 1978. Phytoplakton manual.Publ:Parise Unisco.337p

Toyub, M., Uddin M., Miah M. and Habib M., 2011. Growth Performance and Nutritional Analysis of *Spirulina platensis* in Different Concentrations of Papaya Skin Powder Media , Bangladesh J. Sci. Ind. Res. 46(3), 333-338, 2011 .

WHO Technical Report Series No. 647; 1980. (Recommended health-based limits in occupational exposure to heavy metals)

Archive of SID

www.SID.ir