بررسی رشد میکروجلبک سندسموس (*Scenedesmus* sp.) با محیط کشت‌های TMRL و Z-8+N در شرایط آزمایشگاهی (Indoor)

*زهره صیدانلو[۱]، علی گنجیان خناری[۲]، افشین قلیچی[۳] و سیدابراهیم احمدی[۴]

[۱]دانشجوی واحد آزادشهر، دانشگاه آزاداسلامی، [۲]گروه پژوهشی شیلات و آلاینده‌های آبی خزر، [۳]عضو هیات‌علمی واحد آزادشهر، دانشگاه آزاد اسلامی، [۴]دانشکده علوم و فنون دریایی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاداسلامی

تاریخ دریافت: ۹۱/٤/۳ ؛ تاریخ پذیرش: ۹۱/۱۰/۲

چکیده

میکروجلبک سبز سندسموس (*Scenedesmus* sp.) ابتدا به‌وسیله تور پلانکتون‌گیر با چشمه تور۲۰ میکرون از منابع آبی منطقه فرح‌آباد نمونه‌برداری و بعد از انتقال به آزمایشگاه، از روش پی‌پت پاستور جداسازی و خالص‌سازی شدند. پس از ساخت محیط کشت‌های TMRL و Z-8+N، استوک میکروجلبک سبز فوق با تراکم کشت اولیه ۷×۱۰^{۶} عدد در میلی‌لیتر تلقیح و در سیستم فایکولاب با دمای ۲±۲۵ درجه سانتی‌گراد و شدت نور ۳۵۰±۳۵۰۰ لوکس به‌منظور بررسی رشد قرار داده شد. این آزمایش با ۲ تیمار و ۳ تکرار در نظر گرفته شد و میکروجلبک‌ها ۵ بار طی ۱۰ روز با استفاده از میکروسکوپ نوری معمولی بوده با بزرگنمایی عدسی ٤۰ و لام نئوبار (شمارش ۵ خانه) مورد شمارش قرار گرفتند. علاوه بر تعداد سلول‌ها، از تعداد کلنی‌ها نیز به‌صورت مجزا شمارش به‌عمل آمد. میانگین شمارش محیط کشت‌هایTMRL و Z-8+N در ۵ مرحله به‌ترتیب $۱/٤۷\times۱۰^{۶}\pm۶/۰۶\times۱۰^{۶}$ و $۲۱/۷۰\times۱۰^{۶}\pm۱/۳۹\times۱۰^{۶}$ عدد سلول در میلی‌لیتر بدست آمد. کلنی تک سلولی با میانگین ۵۳/۵ درصد و کلنی ٤ سلولی با میانگین ۳۹/۷ درصد به‌ترتیب بیشترین کلنی‌ها در دو محیط کشت TMRL و Z-8+N بودند. نرخ رشد و ضریب رشد ویژه، TMRL و Z-8+N به‌ترتیب برابر ۰/۵۲ و ۰/۲٦ مورد محاسبه قرار گرفت. برای مقایسه میزان رشد جلبک فوق در مجموع شمارشها از آزمون غیرپارامتریک کروسکال-والیس استفاده شد که اختلاف معنی‌دار بین شمارش‌های اول تا پنجم محیط کشت‌های Z-8+N (P=۰/۰۰۹) و TMRL (P=۰/۰۲۷) نشان داد ولی نتایج آزمون من- ویتنی اختلاف آماری را در دو محیط کشت نشان نداد (P=۰/۰٦۵). بطورکلی نتایج حاصله موید آن است که محیط کشت Z-8+N در مقایسه با محیط کشت TMRL برای رشد میکروجلبک سندسموس در شرایط آزمایشگاهی کارآمدتر می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: سندسموس؛ TMRL- Z-8+N ؛ شرایط آزمایشگاهی

مقدمه

میکروجلبک‌ها، گیاهان شناور یا به فیتوپلانکتون‌هایی اطلاق می‌گردد که غذای آغازین همه جانوران را در اکوسیستم‌های آبی تشکیل می‌دهند و تمام حلقه‌های بالاتر شبکه غذایی انرژی خود را از مواد آلی ساخته شده از میکرو جلبک‌ها دریافت می‌کنند. اکثر موجودات فیتوپلانکتونی تک سلولی بوده و از تولیدکنندگان اولیه در زیستگاه‌های آبی محسوب می‌گردند. میکروجلبک‌ها منبع غنی از پروتئین، کربوهیدرات‌ها و به‌ویژه اسیدهای چرب ضروری می‌باشند. همچنین میکروجلبک‌ها پیگمان یا رنگدانه اصلی را در ماهیان و مهره‌داران تولید

*مسئول مکاتبه: seidanlou_z@yahoo.com

Archive of SID

www.SID.ir

می‌نمایند (گنجیان، ۱۳۸۹). جلبک‌ها به لحاظ نقش اساسی و حیاتی در تامین بخش عمده‌ای از پروتئین و اکسیژن مصرفی انسان‌ها جزء گیاهان مفید و ارزش‌مند محسوب می‌گردند. با توجه به اهمیت جلبک‌ها درخصوص آبزی‌پروری که اساس تولید را با توجه به‌عمل فتوسنتز در اکوسیستم‌های آبی ارزیابی می‌نماید، پرورش اقتصادی آبزیان بطور قابل ملاحظه-ای به تولید و استفاده از میکروجلبک‌ها به‌عنوان غذای زنده برای پرورش اقتصادی آبزیان حائز اهمیت است، منجمله نرم‌تنان، شکم‌پایان، میگوها، ماهیان و زئوپلانکتون‌ها که جهت پرورش کلیه مراحل لاروی از آنها استفاده می‌شود (کیان مهر، ۱۳۷۱). کلروفیتا یا جلبک‌های سبز به علت تنوع گونه ای و پراکنش بالا به‌عنوان یکی از گروه‌های عمده جلبک‌ها محسوب می‌گردند (Bold و همکاران، ۱۹۸۵). میکروجلبک‌ها به لحاظ تغذیه ماهیان منجمله ماهی فیتوفاگ و زئوپلانکتون ها حایز اهمیت می‌باشند و همچنین در صنایع مختلف منجمله صنایع غذایی و دارویی، کود سبز (کود بیولوژیک) و بیودیزل (سوخت‌سبز) استفاده می‌گردند (گنجیان، ۱۳۸۹). صنعت پرورش آبزیان به‌خصوص جلبک‌های دریایی به جمع‌آوری و نیز دسته‌بندی اطلاعات در مورد گونه انتخاب شده، تکنولوژی کشت و پرورش، پاسخ گونه‌های منتخب و بعضی از پارامترهای محیطی و نیز تعیین بهترین محیط کشت به لحاظ مواد مغذی نیاز می‌باشد (Doboer، ۱۹۸۱).

پرورش و تولید غذای زنده با کیفیت و کمیت مناسب جهت تغذیه لاروها به‌خصوص در مراحل ابتدایی پرورش آن‌ها یعنی آغاز تغذیه فعال از اهمیت زیادی برخوردار است. زیرا موفقیت در این مرحله رشد را سریع‌تر، سلامت را بهتر و درصد بقاء بیشتر بچه‌ماهیان را در مراحل بعدی پرورش تضمین می‌کند (مخدومی، ۱۳۸۱). جیره غذایی حاوی جلبک به‌خوبی توسط کپور نقره‌ای (*Hypophthalmichthys molitrix*) پذیرفته می‌شود و میزان بقاء در آن نیز بالاست. بررسی‌ها نشان می‌دهد که جلبکها به‌راحتی می‌توانند به‌جای دانه سویا در پرورش کپور نقره ای به‌کار گرفته شوند (Venkataraman، ۱۹۸۵). آزمایش‌هایی با مقادیر مختلف پروتئین در مدت ۱۳۲ روز انجام شد و نشان داد که جلبک‌ها را به راحتی می‌توان در قسمتی از جیره غذایی ماهی جایگزین نمود (Venkataraman، ۱۹۸۵).تحقیقات پیرامون مواد غذایی مورد نیاز زئوپلانکتون‌ها از سال ۱۹۹۰ شروع شده است. این تحقیقات ابتدا در مورد گونه‌های جلبکی دریایی انجام گردید (Corner و همکاران، ۱۹٦۸). حضور اسیدهای چرب در ساختمان مولکولی جلبک‌های کشف شده از مباحث بسیار جالب برای آبزیان بوده و امروزه، فیتوپلانکتون‌ها و میکروزئوپلانکتون‌ها به جهت دارا بودن مواد قندی غنی برای رژیم غذایی مراحل لاروی ماهی و صدف‌هایی که دارای اهمیت تجاری می‌باشند توصیه می‌شوند (Taube، ۱۹۷۰؛ Deppauw و همکاران، ۱۹۸٦). نقش جلبک در تغذیه نرم‌تنان از سایر مواردی است که توسط دانشمندان زیادی بحث و بررسی شده است (Mann، ۱۹۷۹). شرایط رشد طیف وسیعی از جلبک‌ها به واسطه محیط کشت شان تامین می‌شود. محیط کشت‌های مختلف بر حسب گروه‌ها و گونه‌های مختلف جلبکی تهیه می‌گردند، بطوری‌که رشد آن‌ها متغیر می‌باشد (فلاحی و همکاران، ۱۳۸۵). محیط کشت فیتوپلانکتون‌ها با توجه به نوع جلبک و گونه‌های آن در آب شیرین و شور می‌تواند تغییر کند. بعضی از جلبک‌ها محیط کشت اختصاصی لازم دارند مثل محیط کشت زاروک و بعضی دیگر در محیط کشت عمومی رشد می‌کنند مثل زایندر و برخی در محیط‌کشت‌های آب شور قادر به رشد هستند مثل ساتو، گیلارد، TMRL. در

Archive of SID

www.SID.ir

آزمایشگاه انتخاب محیط کشت، ابتدا باید توجیه اقتصادی داشته باشد از این‌رو باید به‌دنبال محیط کشتی باشیم که بتواند محدوده وسیعی از فیتوپلانکتون‌ها را پوشش دهد و برای جمیع فیتوپلانکتون‌های سبز-آبی و سبز کاربرد داشته باشد به‌همین دلیل از محیط کشت زایندر استفاده می‌شود (خان محمدی، ۱۳۸۸). با توجه به هزینه بالای تولید محیط کشت، می‌توان تغییراتی را در نوع محیط کشت مورد استفاده میکروجلبک‌ها اعمال نمود که علاوه بر کم کردن هزینه‌ها ، بعنوان بهترین محیط کشت، راندمان تولید را نیز افزایش داد (معصومی و همکاران، ۱۳۸٦). در بسیاری از کشورها، جلبک‌ها بخش عمده‌ای از سیستم اقتصادی را تشکیل داده و ارقام بزرگی از صادرات آنها به‌وسیله‌ی جلبک‌ها تامین می‌شود. در حال حاضر، جلبک‌های تک سلولی به‌عنوان منبع سوخت حیاتی (Biofuel) و حتی منبع تولید و استخراج انواع آنتی‌بیوتیک‌ها نیز کاربردهای فراوانی یافته‌اند (Katricioglu و همکاران، ۲۰۰٦؛ Mutanda و همکاران، ۲۰۰۱).

برای کشت جلبک‌های سبز و سبز-آبی از محیط کشت زایندر (Z-8±N) استفاده می‌شود. محیط کشت TMRL با طیف وسیع به‌کار گرفته شده و به‌عنوان یک ماده غذایی در پرورش فیتوپلانکتون‌ها لحاظ می‌گردد، همچنین در محیط کشت فوق می‌توان از مواد مغذی مختلفی مثل کلرید آهن، نیترات پتاسیم و متاسیلیکات سدیم و فسفات دی هیدروژن سدیم استفاده نمود (Navaro و همکاران، ۱۹۹۹). هدف از این تحقیق بررسی و مقایسه رشد میکروجلبک سندسموس با دو محیط کشت TMRL و Z-8+N در شرایط آزمایشگاهی (Indoor) و به‌دست آوردن بالاترین تراکم سلولی در کمترین زمان ممکن بود.

مواد و روش‌ها

میکروجلبک سبز سندسموس، ابتدا به‌وسیله تور پلانکتون‌گیر با چشمه تور ۲۰ میکرون از منابع آبی منطقه فرح نمونه‌برداری و سیستم فایکولاب گرو پژوهشی شیلات و آلاینده‌های آبی خزر جداسازی و خالص‌سازی از روش پی‌پت پاستور انجام گردید. پس از ساخت محیط کشت‌های TMRL و Z-8+N با عناصر عمده (ماکروالمنت هایی مانند کلر C، هیدروژن H، فسفر P، پتاسیم K، سولفور S، کلسیم Ca، آهن Fe، منیزیوم Mg و تعدادی از عناصر به صورت جزئی (میکروالمنت‌هایی مانند روی Zn، سیلیکون Si، منگنز Mn، مولیبدن Mo، سدیم Na، کلر Cl، مس Cu، کبالت Co و برم B) با تراکم ذخیره سازی اولیه ۷ ×۱۰^{٦} عدد سلول در میلی لیتر در آن‌ها تزریق شد و در یک اطاق کشت استریل (سیستم فایکولاب) با دمای ۲±۲۵درجه سانتی‌گراد و با شدت نور ۳۵۰±۳۵۰۰ لوکس و پریود نوری توسط تایمر اتوماتیک به‌صورت تناوب (L/D(۱۲/۱۲) ساعت تنظیم گردید. هوادهی ارلن مایرهای حاوی جلبک سندسموس موجود در محیط کشت‌های Z-8+N و TMRL در هر میز با استفاده از دستگاه پمپ آکواریوم که به‌وسیله چند رابط به‌هم متصل شده بود، انجام شد. در این آزمایش ۲ تیمار در ۳ تکرار در نظر گرفته شد و میکروجلبک‌ها ۵ بار طی ۱۰ روز شمارش شدند. شمارش با میکروسکوپ نوری معمولی با بزرگنمایی عدسی ٤۰ و لام نئوبار (شمارش ۵ خانه و ۲ تکرار) شمارش انجام شد. علاوه بر تعداد سلول‌ها، از تعداد کلنی‌ها نیز به‌صورت مجزا شمارش به‌عمل آمد. داده‌ها با استفاده از نرم‌افزارهای Excel 2007 و SPSS 18 مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند.

میانگین، انحراف معیار و ضریب تغییرات: میانگین، انحراف معیار، حداقل- حداکثر و ضریب تغییرات

Archive of SID
www.SID.ir

عددی میکروجلبک سندسموس در ۱۰ روز شمارش در محیط کشت‌های TMRL و Z-8+N محاسبه گردید تا با داده‌های موجود از نرخ رشد جلبک در محیط کشت‌های مذکور اطلاع حاصل گردد.

ضریب رشد ویژه: برای محاسبه سرعت رشد (ضریب رشدویژه) Specific Growth Rate (SGR) در روزهای مختلف از فرمول زیر استفاده می‌کنیم:

$$SGR= \frac{\ln W1-\ln W2}{T1-T2}$$

که W2= تعداد آخرین روز–W1 =تعداد اولین روز–T1= اولین روز و T2= آخرین روز (مسعودی اصیل و همکاران، ۱۳۸۸).

نرخ رشد: بامشخص شدن مرحله نهایی، نرخ رشد با استفاده از فرمول زیر محاسبه می‌شود.

$K=\ln Nt-\ln N0/t$

K = نرخ رشد

N0 = تعداد سلول‌های اولیه در زمان شروع آزمایش

t = زمان (روزها)

Nt = تعداد سلولها در زمان t

درصد رشد: محاسبه درصدی افزایش تعداد سلول‌ها از اولین روز تا آخرین روز (فلاحی و همکاران، ۱۳۸۷).

از آزمون‌های t تست، کروسکال –والیس و من–ویتنی جهت تجزیه و تحلیل‌های آماری استفاده شد (خاتمی، ۱۳۸۲).

نتایج

میزان رشد و تراکم سلولی جلبک سبز سند سموس در محیط کشت‌های TMRL و Z-8+N ظرف مدت ۱۰ روز در شرایط آزمایشگاهی مورد بررسی قرار گرفت. هر دو روز یک بار شمارش از دو محیط کشت صورت گرفت و در مجموع ۵ بار شمارش از نمونه‌ها انجام شد. در اولین شمارش (روز دوم)، تعداد سلول‌ها در محیط کشت‌های TMRL و Z-8+N به‌ترتیب برابر با $۱/۱\times۱۰^{۶}$ و $۰/۷\times۱۰^{۶}$ عدد سلول در میلی‌لیتر، در حالی که ضریب تغییرات محیط کشت Z-8+N، ۷ درصد و در محیط کشت TMRL، ۵/۲ درصد بوده است. در دومین شمارش (روز چهارم)، میزان رشد میکروجلبک سندسموس در محیط کشت Z-8+N به‌صورت محسوسی بالاتر از محیط کشت TMRL بوده به نحوی که تعداد جلبک درمحیط کشت Z-8+N، برابر $٦/٤\times۱۰^{٦}$ و در محیط TMRL، برابر $۳/۲\times۱۰^{٦}$ عدد سلول در میلی‌لیتر بوده است. همچنین ضریب تغییر در محیط کشت TMRL برابر ۳۳/۵ درصد و در محیط کشت Z-8+N برابر ۱۲/۷درصد بود.

در سومین شمارش (روز ششم)، در محیط کشت TMRL، تعداد سلول‌های جلبکی $۸/٦\times۱۰^{٦}$ عدد سلول در میلی‌لیتر بوده در حالی که در محیط کشت Z-8+N، تعداد سلول‌ها به‌طور فزاینده‌ای افزایش یافته و برابر با $۱۵/۱\times۱۰^{٦}$ عدد سلول در میلی‌لیتر بوده است. ضریب تغییرات در دو محیط کشت TMRL و Z-8+N به‌ترتیب برابر با ۲۸/۹ و ۷/٦ درصد می‌باشد. اختلاف محسوس ضریب تغییر بین دو محیط کشت، نشان‌دهنده اختلاف بین تیمارها بوده و درصد ضریب تغییر هرچقدر بالاتر باشد نشان‌دهنده اختلاف آماری بیشتر در بین تیمارهاست. در چهارمین شمارش (روز هشتم) ، تعداد سلول‌های محیط کشت TMRL و Z-8+N به‌ترتیب $۸/۳\times۱۰^{٦}$ و $۳۵/۵\times۱۰^{٦}$ عدد سلول در میلی‌لیتر بود. ضریب تغییر در دو محیط کشت Z-8+N و TMRL به‌ترتیب ۹/٦ و ٦/۵ درصد می‌باشد. در پنجمین شمارش (روز دهم) ضریب تغییرات در دو محیط کشت TMRL و Z-8+N به‌ترتیب برابر ۳۲/۳ و ۵/٦ درصد بود. تعداد سلول‌ها در دو محیط کشت TMRL و Z-8+N در پنجمین شمارش به‌ترتیب برابر با $۹/۱\times۱۰^{٦}$ و $۵۰/۸\times۱۰^{٦}$ عدد سلول در میلی‌لیتر بودند. همان‌طور که از نتایج

Archive of SID

www.SID.ir

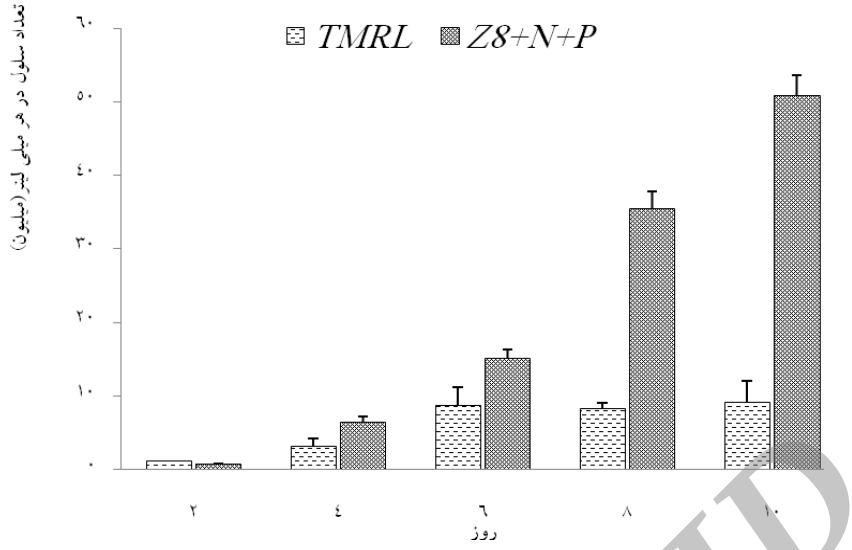
پیداست سرعت رشد میکروجلبک سندسموس در محیط کشت Z-8+N در آخرین روز شمارش، ۵ برابر محیط کشت TMRL بوده است. همچنین میانگین مجموع شمارش‌ها در محیط‌کشت TMRL برابر $۶/۱\times۱۰^{۶}$ و در محیط کشت Z-8+N برابر $۲/۲\times۱۰^{۶}$ بود. در نتیجه سرعت رشد میکروجلبک سندسموس در محیط کشت Z-8+N بسیار بیشتر از محیط کشت TMRL بوده و در صورت ادامه شمارش میکروجلبک در محیط کشت Z-8+N، رشد به‌میزان بسیار بالاتری می‌رسید. میانگین ضریب تغییرات (C.V) محیط کشت TMRL در مجموع ۶۱/۲ درصد و در محیط کشت Z-8+N برابر ۸۹/۶ درصد به‌دست آمد.

جدول ۱- شمارش کلی میکروجلبک سندسموس (عدد سلول در میلی‌لیتر) در محیط کشت‌های TMRL و Z-8+N

روز	انحراف معیار ± میانگین (حداکثر – حداقل)		انحراف معیار ± میانگین (حداکثر – حداقل)		ضریب تغییرات (C.V ٪)	
	TMRL		Z-8+N		TMRL	Z-8+N
۲	۱۱۰۸۰۰۰±۵۸۰۰۰ ۱۰۷۵۰۰۰–۱۱۷۵۰۰۰		۷۴۲۰۰۰±۵۲۰۰۰ ۷۰۰۰۰۰–۸۰۰۰۰۰		۵/۲	۷/۰
٤	۳۲۲۵۰۰۰±۱۰۸۲۰۰۰ ۲٤۰۰۰۰۰–٤٤۵۰۰۰۰		٦۳۷۵۰۰۰±۸۱۳۰۰۰ ۵۵۷۵۰۰۰–۷۲۰۰۰۰۰		۳۳/۵	۱۲/۷
٦	۸٦٦۷۰۰۰±۲۵۰٤۰۰۰ ٦۲۵۰۰۰۰–۱۱۲۵۰۰۰۰		۱۵۱٦۷۰۰۰±۱۱۵۵۰۰۰ ۱٤۵۰۰۰۰۰–۱٦۵۰۰۰۰۰		۲۸/۹	۷/٦
۸	۸۳۳۳۰۰۰±۸۰٤۰۰۰ ۷۷۵۰۰۰۰–۹۲۵۰۰۰۰		۳۵۵۰۰۰۰۰±۲۲۹۱۰۰۰ ۳۳۵۰۰۰۰۰–۳۸۰۰۰۰۰۰		۹/٦	٦/۵
۱۰	۹۰۸۳۰۰۰±۲۹۳۰۰۰۰ ۵۷۵۰۰۰۰–۱۱۲۵۰۰۰۰		۵۰۸۳۳۰۰۰±۲۸٤۳۰۰۰ ٤۸۵۰۰۰۰۰–۵٤۰۰۰۰۰۰		۳۲/۳	۵/٦
مجموع	٦۰۸۳۰۰۰±۳۷۲٦۰۰۰ ۱۰۷۵۰۰۰–۱۱۲۵۰۰۰۰		۲۱۷۲۳۰۰۰±۱۹٤۵٤۰۰۰ ۷۰۰۰۰۰–۵٤۰۰۰۰۰۰		٦۱/۲	۸۹/٦

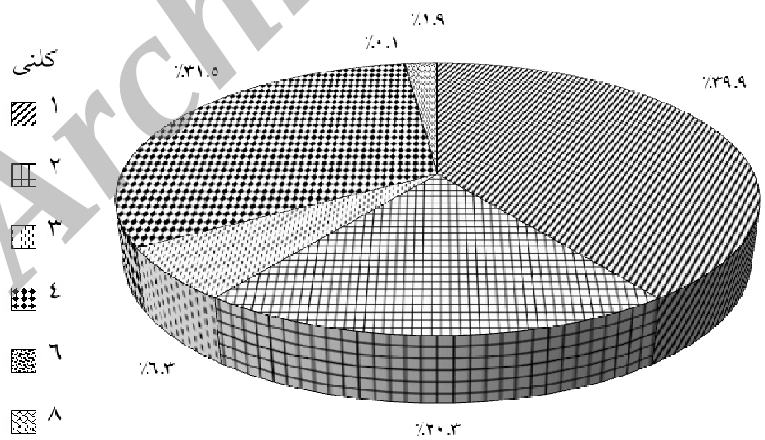
فراوانی کل میکروجلبک سندسموس در ۱۰ روز شمارش به تفکیک روزها برای محیط کشت‌های TMRL و Z-8+N در شکل ۱ آمده است. این شکل به‌نوعی نشان‌دهنده سرعت تکثیر جلبک در این محیط کشت‌ها می‌باشد، به‌طوری‌که تعداد سلول‌های جلبکی برای محیط کشت‌های TMRL و Z-8+N به‌ترتیب از ۱/۱ میلیون و ۷٤/۰ میلیون عدد سلول در میلی‌لیتر در اولین شمارش در روز دوم به ۹/۱ میلیون و ۵۰/۸ میلیون عدد سلول در میلی‌لیتر در آخرین شمارش در روز دهم ختم شده است (شکل ۱).

Archive of SID
www.SID.ir



شکل ۱- میانگین فراوانی میکروجلبک سندسموس در ۱۰ روز شمارش در محیط کشت‌های TMRL و Z-8+N.

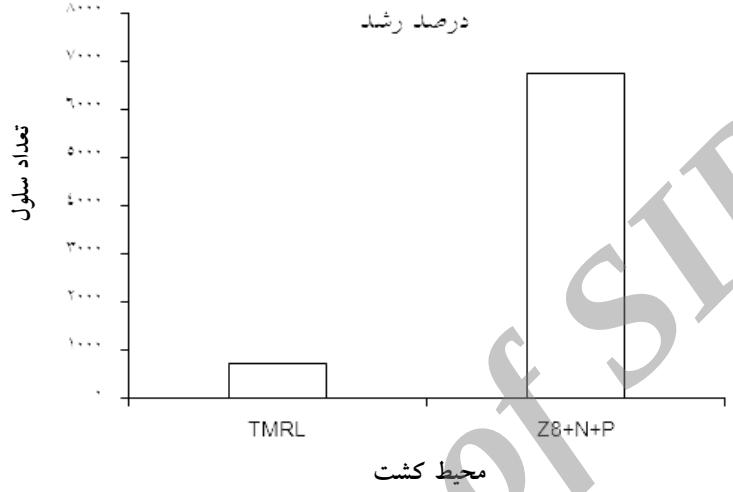
مجموع میانگین فراوانی کلنی‌های میکروجلبک سندسموس در دو محیط TMRL و Z-8+N در کل شمارش‌ها در شکل ۲ آورده شده است. بیشترین فراوانی کلنی‌ها مربوط به کلنی تک سلولی به تعداد ۳۹/۹ درصد و کلنی ٤ سلولی به تعداد ۵/۳۱ درصد در جایگاه دوم فراوانی قرار گرفت. کلنی ۲ سلولی نیز در جایگاه سوم فراوانی و به تعداد ۲۰/۳ درصد بود. بعد از آن کلنی‌های ۳ سلولی، ۸سلولی و ٦ سلولی به‌ترتیب در رتبه‌های بعدی به‌ترتیب با تعداد ٦/۳، ۱/۹ و ۰/۱ درصد مشاهده شدند.



شکل۲- میانگین فراوانی کلنی‌های میکروجلبک سندسموس در مجموع دو محیط کشت بر حسب درصد.

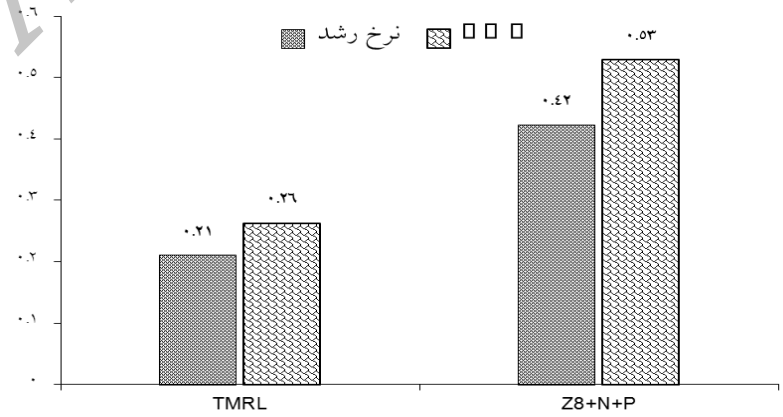
Archive of SID
www.SID.ir

درصد رشد دو محیط کشت که از اولین تا آخرین شمارش محاسبه شده در شکل ۳ آورده شده است. داده‌ها نشان‌دهنده رشد عددی فزاینده محیط کشت Z-8+N بوده ، چرا که از تعداد ۷۴۲/۰۰۰ سلول در اولین روز شمارش به ۵۰/۸۳۳/۰۰۰ سلول در آخرین روز شمارش ختم می‌شود. درصد رشد محیط کشت TMRL از اولین شمارش تا آخرین شمارش برابر با ۷۲۰ درصد می‌باشد. البته این مقیاس در فواصل شمارشهای سوم تا چهارم به‌صورت منفی درآمد ، اما درصد رشد در محیط کشت Z-8+N بسیار بالاتر از محیط کشت TMRL بوده و برابر ۶۷۵۰ درصد بوده است.



شکل ۳- درصد رشد دو محیط کشت از اولین شمارش تا آخرین شمارش.

نرخ رشد میکروجلبک سندسموس در دو محیط کشت مذکور که با حرف K نشان داده می‌شود بیانگر شرایط مساعد محیط کشت Z-8+N برای رشد میکروجلبک سندسموس می‌باشد. نرخ رشد این محیط کشت ۰/۴۲ در حالی که نرخ رشد TMRL ۰/۲۱ محاسبه شد. در این آزمایش ضریب رشد ویژه در محیط کشت TMRL برابر ۰/۲۶ و در محیط کشت Z-8+N برابر ۰/۵۳ بوده که نتایج نشان‌دهنده رشد سریع‌تر محیط کشت Z-8+N است. در شکل ٤ نتایج نرخ رشد و ضریب رشد ویژه میکروجلبک سندسموس در دو محیط کشت TMRL و Z-8+N به‌صورت ستونی نشان داده شده است.



شکل ٤- مقایسه نرخ رشد و ضریب رشد لحظه‌ای میکروجلبک سندسموس در دو محیط کشت TMRL و Z-8+N

Archive of SID
www.SID.ir

نتایج حاصل از تحلیل‌های t تست به‌منظور مقایسه میانگین تعداد سلول‌های میکروجلبک سندسموس در محیط کشت‌های TMRL و Z-8+N بیانگر اختلاف معنی‌دار بین دو محیط کشت مذکور می‌باشد (P=۰/۰۰۸). نتایج آزمون ناپارامتریک کروسکال-والیس اختلاف معنی‌داری را در محیط کشت‌های Z-8+N (P=۰/۰۰۹، X^2=۱۳/۵۲) و TMRL (P=۰/۰۲۷، X^2=۱۰/۹۵) نشان داد ولی آزمون من-ویتنی اختلاف معنی‌داری را بین دو محیط کشت نشان نداد (P> ۰/۰۶۵).

بحث

در طی تحقیقی که معصومی و همکاران در سال ۱۳۸٦ برروی رشد جلبک *Tetraselmis suecica* در محیط کشت‌های مختلف TMRL و با رژیم‌های نوری متفاوت انجام دادند به این نتیجه رسیدند که تفاوت آماری معنی‌داری در بین تیمارهای نوری مختلف وجود دارد و با افزایش نور رشد نیز افزایش می یابد. در تحقیق حاضر نرخ رشد میکروجلبک سندسموس در محیط Z-8+N با شدت نور ۳۵۰۰ لوکس برابر ۰/۵۳ و محیط TMRL برابر ۰/۲٦ بوده است. اما در تحقیق معصومی و همکاران نرخ رشد میکروجلبک تتراسالمیس در محیط کشت TMRL در نور ۵۰۰ لوکس ۰/٤۳، نور ۱۵۰۰ لوکس ۰/۷۵ و در نور ۲۵۰۰ لوکس برابر ۰/۹۸ محاسبه شده است. می‌توان نتیجه گرفت که علاوه بر نوع محیط کشت، شدت نور نیز در میزان نرخ رشد جلبک تتراسالمیس تاثیر بسزایی دارد.

در تحقیقی که توسط Knuckey و همکاران در سال ۲۰۰۲ انجام شد نرخ رشد گونه‌های دیاتومه آب‌های استرالیا که با روش‌های آگار، سانتریفیوژ و میکروپیپت جدا شدند، بین ۰/۵۵ تا ۲/۰٤ در روز به‌دست آمد که نسبت به محیط TMRL بسیار بیشتر و نسبت به محیط Z-8+N تقریباً مشابه بوده است. البته جلبک سندسموس نرخ رشد کمتری نسبت به دیاتومه ها دارا می‌باشد. در تحقیق حاضر مشاهده شد هر چه تعداد میکروجلبک‌ها در روزهای مختلف افزایش می‌یابد، تغییرات قابل ملاحظه‌ای در رنگ محیط کشت به‌وجود آمده و به رنگ سبز پررنگ نزدیک می‌شود ولی در محیط TMRL وقتی به فاز ساکن رشد رسید، تغییرات قابل مشاهده‌ای در رنگ محیط کشت پدید نمی‌آید. یکی از عناصر بسیار با ارزشی که در محیط Z-8+N باعث رشد سریع میکروجلبک سندسموس شده است عنصر منیزیم است. منیزیم ماده تشکیل دهنده کلروفیل می‌باشد. به-طور قطعی نیاز بیشتر پیگمان‌ها به این عنصر وجود دارد. نیازی که جلبک‌ها به منیزیم دارند بیش از نیاز آن‌ها به کلسیم است، چون فقدان منیزیم مانع تقسیم سلولی می‌شود (Round، ۱۹۷۵). منیزیم بخشی از کلروفیل a، ریبوزوم و کروموزوم است (Borowitzka، ۱۹۸۸). عناصر کربن، اکسیژن، هیدروژن، نیتروژن، فسفر،پتاسیم، منیزیم، گوگرد و آهن عمده‌ترین عناصر شیمیایی در رشد جلبک کلرلا و سندسموس هستند (Krauss و ۱۹۵۸). منیزیم همچنین در بسیاری از واکنش‌های آنزیمی لازم است (Wyn و همکاران، ۱۹۸۳). میزان اپتیمم منیزیم برای رشد جلبک‌ها در محیط Z-8+N، ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر است و بالاتر از آن نقش بازدارنده دارد (فلاحی و همکاران، ۱۳۸۵).

همچنین طی تحقیقات مسعودی اصیل و همکاران در سال ۱۳۸۸ مقدار SGR برای جلبک نانوکلروپسیس در شوری ۲۵ppt برابر ۰/۵٦ و در شوری ۳۵ppt برابر ۰/۵۰ بود. اما در این پروژه میزان SGR برای جلبک سندسموس در محیط Z-8+N برابر ۰/۵۲ و برای محیط TMRL برابر ۰/۲٦ است. با مقایسه این پارامترها نتیجه می‌گیریم که میزان رشد

Archive of SID

www.SID.ir

و نرخ رشد جمعیت نسبت به جمعیت اولیه در محیط Z-8+N بالاتر است. این اختلاف می‌تواند ناشی از ترکیبات موجود در محیط کشت Z-8+N بوده که از نظر ماکروالمان‌ها و میکروالمان‌ها غنی‌تر از محیط کشت TMRL می‌باشند.

در طی تحقیق Cetin و همکاران (۲۰۰۶) بر روی نرخ رشد جلبک *Scenedesmus acutus* در طی ۵ روز در حضور محیط کشت Trifluralin به این نتیجه رسیدند که مقدار توده جلبک در محیط کشت شاهد که غلظت آن کمتر از ۲۰ میکروگرم در لیتر است، نسبت به محیط کشت‌های غلیظ‌تر بسیار بیشتر است، این روند در ۵ شمارش حفظ شده ولی تفاوت آن با تیمارهای غلیظ‌تر در این است که نرخ رشد آن تیمارها پس از گذشت ۵ روز به‌صورت منفی درآمده است. اختلاف تیمارهای شاهد با ۱۰ تیمار ۲۰ تا ۲۰۰ میکروگرم در لیتر است که اختلاف آن‌ها پس از شمارش روز سوم با سایر تیمارها معنی‌دار بوده است و این حالت نیز از شمارش سوم تا آخرین شمارش جلبک سندسموس در دو محیط کشت TMRL و Z-8+N مشابه است.

در طی تحقیق انجام شده توسط Kadri cetin و همکاران (۲۰۱۱) بر روی نرخ رشد جلبک *Scenedesmus acutus* توسط سم دیازینون به این نتیجه رسیدند که تاثیر این دارو در نرخ رشد جلبک سندسموس روند معکوسی داشته و هر چه میزان دز آن کمتر باشد، نرخ رشد جلبک بالاتر است. از آن - جایی که محیط کشت TMRL یک محیط کشت عمومی در رشد جلبک‌ها محسوب می‌شود می‌توان با آزمایش Kadri cetin و همکاران مقایسه نمود که گاهی با تغییر دز برخی عناصر در محیط کشت‌ها، می‌توان باعث کاهش رشد و یا حتی افزایش شدید رشد شد. کما این که در مورد سم دیازینون می‌توان نتیجه گرفت که با کاهش دز این سم، رشد به مراتب بهتری حاصل شده تا آن جا که پس از روز سوم، اختلاف معنی‌دار شدیدی با سایر دزها برای این جلبک حاصل شده است.

در پژوهشی که حیدری و همکاران (۱۳۹۰) انجام دادند اثرات مختلف نیترات و آمونیوم را در محیط کشت برای رشد جلبک سبز *Scenedesmus quadricauda* بررسی کردند. پرورش این گونه در محیط کشت BBM (Bold Basals Medium) در ۷ تیمار (۲/۹، ۱۵، ۵۰، ۲۵، ۷۵، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌مولار نیترات و آمونیوم) در شرایط آزمایشگاهی انجام گردید. بالاترین تراکم سلول جلبکی $۳۲/۵\times۱۰^{۵}$ عدد سلول در میلی‌لیتر برای نیترات و $۲۵/۲\times۱۰^{۵}$ عدد سلول در میلی‌لیتر برای آمونیوم بود و در مطالعه حاضر بیشترین تراکم سلولی در محیط کشت Z-8+N و به‌میزان $۵۰/۸\times۱۰^{۶}$ و در محیط کشت TMRL به میزان $۹/۱\times۱۰^{۶}$ عدد سلول در میلی لیتر در دهمین روز شمارش بود. بیشترین میزان رشد ویژه ۰/۰۹ برای نیترات و ۰/۰۸ برای آمونیوم از تیمار ۱۵ میلی‌مولار نیترات و آمونیوم به‌دست آمد. بیشترین ضریب رشد ویژه در محیط کشت Z-8+N برابر با ۰/۵۳ و در محیط کشت TMRL برابر با ۰/۲۶ در روز بود. تراکم سلولی در تیمار ۱۰۰ میلی‌مولار نیترات به بالا نسبت به تراکم سلولی در آغاز آزمایش کمتر بوده که نمایانگر رشد منفی زی‌توده جلبکی در این غلظت بود. بنابراین غلظت ۱۰۰ میلی‌مولار نیترات برای این گونه از جلبک سندسموس بازدارنده رشد بود. تراکم سلولی در تیمار ۷۵ میلی‌مولار آمونیوم به بالا نسبت به تراکم سلولی در آغاز آزمایش کمتر بود که نمایانگر رشد منفی زی‌توده جلبکی در این غلظت می‌باشد. بنابراین غلظت ۷۵ میلی‌مولار آمونیوم برای این گونه از جلبک سبز سندسموس بازدارنده رشد می باشد. در محیط کشت Z-8+N تراکم سلولی از اولین روز تا آخرین روز شمارش رو به افزایش بود

Archive of SID
www.SID.ir

اما در محیط کشت TMRL تا سومین شمارش تراکم سلولی رو به افزایش بود و در روز چهارم شمارش کاهش رشد مشاهده شد و در آخرین شمارش رشد کمی افزایش یافت و با ادامه شمارش سلولی ممکن بود رشد به‌صورت منفی شود.

علاوه بر تاثیرات منابع نیتروژن‌دار بر رشد و فیزیولوژی جلبک‌ها استفاده از آنها می‌تواند بر مورفولوژی و اندازه جلبک‌ها تاثیرات قابل ملاحظه‌ای داشته باشد. در پژوهش انجام شده توسط حیدری و همکاران (۱۳۹۰)، در زمان شمارش تعداد سلول‌های جلبک در سندسموس در تیمارهای مختلف از نیترات، درصدی از سلول‌ها در جمعیت (حدود ۱۰-۵ درصد) به‌صورت سلول‌های ٤ تایی و به‌ندرت به‌صورت هشت تایی مشاهده شدند در حالی که در واحدهای آزمایشی تیمار شده با آمونیوم این دسته از سلول‌های چهارتایی و هشت تایی بسیار بسیار کم دیده شدند. در مطالعه حاضر در محیط کشت Z-8+N کلنی‌های ۵ سلولی، ٦ سلولی و ۷ سلولی در طی ۱۰ روز شمارش مشاهده نشد و کلنی ۸ سلولی نیز در چهارمین شمارش دیده نشد. در محیط کشت TMRL کلنی‌های ۵ سلولی و ۷ سلولی طی ۱۰ روز شمارش مشاهده نشدند و کلنی ۳ سلولی در چهارمین شمارش دیده نشد و همچنین کلنی ٦ سلولی فقط در دومین و چهارمین شمارش مشاهده شد اما در ششمین ، هشتمین و دهمین شمارش دیده نشد. کلنی ۸ سلولی نیز در سومین شمارش مشاهده نشد. در محیط کشت TMRL بیشترین میانگین فراوانی کلنی طی ۱۰ روز شمارش ۵۳/۵ درصد مربوط به کلنی تک سلولی و کمترین میانگین فراوانی کلنی ۰/۱ درصد مربوط به کلنی ٦ سلولی بود. در محیط کشت Z-8+N بیشترین میانگین فراوانی کلنی طی ۱۰ روز شمارش مربوط به کلنی ٤ سلولی و ۳۹/۷ درصد و کم‌ترین میانگین فراوانی کلنی مربوط به کلنی ۸ سلولی و ۱/۸ درصد بود. بیشترین نسبت کلنی نیز در محیط کشت TMRL مربوط به تک سلولی و در اولین شمارش به میزان ۵۸ درصد و کمترین نسبت کلنی مربوط به ٦ سلولی و در اولین شمارش به میزان ۲ درصد بود. در محیط کشت Z-8+N بیشترین نسبت کلنی مربوط به تک سلولی و در اولین شمارش به میزان ٥٦ درصد و کمترین نسبت کلنی مربوط به ۳ سلولی در سومین شمارش به میزان ۱۱ درصد بود.

در پژوهش حیدری و همکاران (۱۳۹۰)، سادگی پرورش و تشکیل جمعیت جلبکی در فاز رشد با کم‌ترین تغییرات در نیترات و آمونیوم از ویژگی‌های جلبک سبز *Scenedesmus quadricauda* بود. در تحقیق حاضر نیز به‌علت افزایش رشد میکرو جلبک سندسموس در محیط کشت Z-8+N نسبت به محیط کشت TMRL می‌توان از این محیط کشت در شرایط آزمایشگاهی برای صنعت آبزی پروری مخصوصا جهت حفظ گونه‌های که ارزش اقتصادی دارند استفاده نمود.

در مطالعه محیط کشت‌های Z-8+N و TMRL، طی ۱۰ روز شمارش، در محیط کشت Z-8+N افزایش روزافزون سلول‌ها مشاهده شده اما در محیط کشت TMRL از روز چهارم شمارش رشد سلول به کندی صورت گرفت و ادامه رشد مقرون به‌صرفه نبود. نتایج حاصل از میزان رشد سلول نشان می‌دهد که محیط کشت Z-8+N نسبت به محیط کشت TMRL دارای برتری می‌باشد. در میکروجلبک سندسموس نیز ممکن است به‌علت وجود یون آمونیوم در محیط کشت Z-8+N و این‌که این یون در محیط کشت TMRL وجود ندارد باعث برتری میزان رشد و تراکم سلولی محیط کشت Z-8+N نسبت به محیط کشت TMRL شده باشد. آزمون کروسکال-والیس نیز نشان داد که در هر دو محیط کشت سرعت رشد لحظه‌ای کمتر از ۰/۰۵ بوده و معنی‌دار می‌باشد.

Archive of SID

www.SID.ir

تشکر و قدردانی

از مسئول محترم گروه پژوهشی شیلات و آلاینده‌های آبی خزر جناب آقای دکتر علی گنجیان خناری که امکانات لازم جهت اجرای پروژه را فراهم نمودند و همچنین آقای دکتر حسن فضلی جهت کمک در تجزیه و تحلیل داده‌ها و تمامی عزیزانی که کمال همکاری را داشته‌اند، سپاسگزارم.

منابع

۱. حیدری، ص.، هادیان، ا.، و محبوبی صوفیانی، ن. ۱۳۹۰. اثرات سطوح مختلف نیترات و آمونیوم در محیط کشت برای رشد جلبک سبز *Scenedesmus quadricauda*. نشریه شیلات، مجله منابع طبیعی ایران، دوره ٦٤، شماره ۱. صفحات ۲۹ تا ٤۰.

۲. خان‌محمدی، ا. ۱۳۸۸. کشت و پرورش میکروآلگ‌ها. دانشکده علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری. صفحات ٦۱۵-٦۱۸.

۳. فلاحی، م.، پیری، ح.، رمضانی، ر.، محمدی، س.، صلواتیان، م. ۱۳۸۵-۱. کشت و پرورش جلبک و بررسی جنبه‌های اقتصادی آن با تاکید بر جلبک‌های سبز و سبز – آبی. موسسه تحقیقات شیلات ایران. ۷۱ صفحه.

٤. فلاحی، م.، عابدیان کناری، ع.، و احمدی‌فرد، ن.، ۱۳۸۷. اثر غلظت‌های مختلف جلبک‌سبز *Chlorella* sp. بر رشد و ترکیب اسیدهای چرب روتیفر آب شیرین *Brachionus calciflorus* تالاب‌انزلی. مجله پژوهش و سازندگی، شماره ۸۱ ۷ صفحه.

۵. فلاحی، م.، و صلواتیان، م. ۱۳۸۵-۲. بررسی اثر غلظت‌های مختلف عنصر منیزیم بر میزان رشد و بیوماس جلبک سبز *Chlorella Vulgaris*. مجله پژوهش. سازندگی، شماره ۷۲. ۵ صفحه.

٦. کیان مهر، هـ ۱۳۷۱. مبانی جلبک‌شناسی. جهاددانشگاهی مشهد.

۷. گنجیان، ع. ۱۳۸۹. دوره آموزشی و کارگاه کشت جلبک. گروه پژوهشی شیلات و آلاینده‌های آبی خزر. ۳۳ صفحه.

۸. مخدومی، ن. ۱۳۸۱. بررسی و شناسایی منابع آرتمیا در برکه‌های آب شور منطقه گنبد. مجله علمی شیلات ایران، شماره ۳. صفحات ٦۱ تا ۷۲.

۹. مسعودی اصیل، ش.، و اسماعیلی فریدونی، ا. ۱۳۸۸. اثر سطوح مختلف شوری بر رشد میکروجلبک نانو کلروپسیس. دانشکده کشاورزی و منابع‌طبیعی ساری. صفحات ۵۲-۵٦.

۱۰. معصومی، ز.، یاوری، و.، کوچنین، پ.، سواری، ا. ۱۳۸٦. بررسی تاثیر رژیم نوری بر رشد میکروجلبک *Tetraselmis suecica* در محیط کشت های ویتامینه و فاقد ویتامین. مجله پژوهش و سازندگی، شماره ۷٤. ۱۰ صفحه.

11. Bold, H.C., and Micheal Wynne, L. 1985. Introduction to the Algae Structured and Reproduction, Second ed. Prentice Hall, INC.
12. Borowitzka, M.A. 1988. Microalgal biotechnology Cambridge university press. New York. Port Chester Melbourne abora. 14-15.
13. Cetin, A.K., and Mert, N. 2006. Growth rate of *Scenedesmus acutus* (*Meyen*) in Cultures Exposed to Trifluralin. Polish Journal of Environmental Studies. 15(4): 631-633.
14. Corner, E.D.S., and Coway, C.B., 1968. Biochemical studies of the production of marine zoo plankton. Biol. Rev., 43: 363-426.
15. Deboer, J.A., 1981. The biology of seaweeds, Oxford, 436 pp.
16. Deppauw, N., and Pruder, G. 1986. Use and production as food in aquaculture: practice, problems and research needs. In Bilio, M., Rosenthal, H., and Sindermann, C.J., (eds), Realism in Aquaculture: Achievements Constraints, perspectives. European Aquaculture Society, Bredene, Belgium. 77-106.
17. Kadri Cetin, A., Gur, N., and Firat, Z. 2011. Growth rate of *Scenedesmus acutus* in aboratory culture exposed to diazinon. African Journal of Biotechnology. 10(34), 6540-6543.
18. Katircioglu, H., Beyatli, Y., Aslim, B., Yüksekdag, Z., and Atici, T. 2006. Screening for antimicrobial agent production of some freshwater. The Internet Journal of Microbiology, Vol. 2(2).

Archive of SID

www.SID.ir

19. Knuckey, R.M., Brown, M.R., Barrett, S.M., and Halleyreff, G.M. 2002. Isolation of new nannoplanktonic diatom strains and their evaluation as diets for Juvenile Pacific *oysters* (*Crassostrea gigas*). Aquaculture, 211: 253-274.
20. Krauss, R.W. 1958. Physiology of the freshwater algae. Annual Review of plant physiology. 9, 207-44.
21. Mann, R. 1979. Some biochemical and physiological aspects of growth and gametogenesis in *Crassostrea gigas* and Strea edulis grown at sustained elevated temperatures. Journal of the marine Biology Association, U. K 59, 95–110.
22. Mutanda, T., Ramesh, D., Karthikeyan, S., Kumari, S., Anandraj, A., and Bux, F. 2011. Bio prospecting for hyper-lipid producing microalga strains for sustainable biofuel production. Bio resource Technology, 102, pp. 57-70.
23. Navaro, L.A., and Robledo, D. 1999. Effects of nitrogen source, N: P ratio and N–pulse concentration and frequency on the growth of *Gracilaria comea* in culture. Hydrobiologia. 398/399, 315–320 pp.
24. Round, F.E. 1975. The biology of the algae. Second edition Edward amold. 216-230 pp.
25. Taub, F.B. 1970. Algal culture as a source of food. Proc. Of the first Annual Workshop world Mari culture Society. Louisiana State University. Baton Rouge. 101–117 pp.
26. Venkataraman, L.V. 1985. Biotechnology and Utilization of microbial proteins in feeds in: Role of proteins in foods and feeds. Eds: A. Srinivasan and S. Gopalan. Proteins Resaarch unit, Loyola college. Nadras. 90 – 170.
27. Wyn, J.R.G., and Pollard, A. 1983. Proteins, enzymes and inorganic ions. Encyclopedia of plant physiology; A. Lauchli and R.L. Bieleski (ed.). New series. Berlin. Springer Verlag; 15B. 528-62.

Archive of SID

www.SID.ir