Archive of SID

پژوهش و سازندگی
در
امور دام و آبزیان شماره ۷۳، زمستان ۱۳۸۵

مطالعه جداسازی و کشت گونه‌های بومی فیتوپلانکتونی از دهانه رودخانه‌های اروند و بهمنشیر

• **سیده زهرا معصومی‌زاده،**
دانشگاه آزاد اسلامی واحد اهواز، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، گروه شیلات
• **وحید یاوری و** • **پریتا کوچنین،**
دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، دانشکده علوم دریایی، گروه شیلات
• **احمد سواری،**
دانشگاه علوم و فنون دریای خرمشهر، دانشکده علوم دریایی، گروه بیولوژی

تاریخ دریافت: دی ماه ۱۳۸۳ تاریخ پذیرش: مهر ماه ۱۳۸۴

Email: Zmasoomi@yahoo.com

چکیده

بسیاری از گونه‌های فیتوپلانکتونی در صنایع مختلف، اهمیت و کاربرد فراوان دارند. تهیهٔ مواد مغذی جهت کشت آنها از یک طرف و واردات گونه‌های میکروجلبکی از طرف دیگر همراه با صرف هزینهٔ زیاد می‌باشد. علاوه بر این، گونه‌های وارداتی به دلیل عدم سازگاری با شرایط محیطی منطقه، دارای کارایی بالا نمی‌باشند. لذا جداسازی گونه‌های بومی‌جهت افزایش راندمان رشد از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. نمونه برداری این تحقیق، از دهانهٔ اروند و دهانهٔ بهمنشیر انجام شد. جداسازی نمونه‌های فیتوپلانکتونی با استفاده از روش‌های رقیق سازی، پلیت آگار، سانتریفوژ- نورگرایی همچنین با استفاده از تغییر فاکتورهای فیزیکی مانند نور و شوری انجام شد. با توجه به روش‌های مختلف جداسازی نتیجه می‌شود که در نور کم دیاتومه‌ها غالب می‌شوند و با افزایش نور امکان جداسازی گونه‌های بیشتری موجود می‌باشد. به طور کلی محیط کشت TMRL یک محیط کشت عمومی برای جداسازی انواع فیتوپلانکتونها است. همچنین می‌توان از محیط کشت Guillard جهت جداسازی دیاتومه‌ها استفاده نمود و در محیط کشت Conway امکان رشد میکرو جلبک‌های سبز بیشتر است. در این تحقیق ۱۵ گونهٔ فیتوپلانکتونی جداسازی شد.

کلمات کلیدی: جداسازی، نور، شوری، محیط کشت، فیتوپلانکتون، اروند رود، بهمنشیر

www.SID.ir

Archive of SID

Pajouhesh & Sazandegi No 73 pp: 147-154

Isolation of native species of phytoplankton from Arvand and Bahmanshir rivers

By: Masoumi Zadeh ,S,Z. Fisheries Department, Azad university. Ahvaz
Yavari,V. Kochanian, P. Members of Scientific Board of Fisheries Department , Khoramshahr university. Iran
Savari,A. Member of Scientific Board of Biology Department , Khoramshahr university. Iran

The important role of phytoplankton in aquaculture and other industries is well documented. The recent research and experiences shows that use of native species compared to imported one could be highly advantageos. Taking into consideration the above facts and following standard techniques number of native species were isolated. The results obtained indicate that intensity of light can have important role in isolation of different groups of phytoplankton. While TMRL proved to be a suitable culture medium for isolation all the groups of phytoplanktons, Guillard and Conway culture medium were particularly more suitable for isolation of diatoms and chlorophycea, respectively.

Key words: Light, Isolation, Salinity, Culture medium, Phytoplankton, Arvand, Bahmanshir

مقدمه

پـرورش و تولید غذای زنده با کیفیت و کمیت مناسـب جهت تغذیه لاروها به خصـوص در مراحل ابتدایی پرورش آنهایعنی آغاز تغذیه فعال از اهمیت بسـیار زیادی برخوردار اسـت، زیرا موفقیت در این مرحله رشد را سـریع تر، سـلامت را بهتر و درصد بقاء بیشـتر بچه ماهیان را در مراحل بعدی پـرورش تضمین می‌کند (۲).گونه‌های مختلفـی از میکروجلبک‌ها شناخته شـده‌اند که به عنوان یک منبع غذایی ضروری برای پرورش کلیه مراحـل لاروی دوکفه‌ای‌ها و نرمتنان دریایی (کلم، اویسـتر، اسـکالوپ) و مراحل پسـت لارو برخی از شـکم پایان (مانند ابالون) و همچنین مراحل لاروی برخی‌گونه‌هـای ماهی، میگوهـای خانواده پنئیـد و پلانکتون‌های جانوری می‌باشـند(۷). در آبزی پروری، کشـت فیتوپلانکتونهـا که مقدار زیادی اسـترول‌های قابل متابولیز و اسیدهای چرب ضروری دارند اهمیت زیاد داشته و باعث رشد سریع سخت پوستان و نرمتنان می‌شوند(۱۵).

میزان پروتئین زیاد انواع گونه‌های میکروجلبکی یکی از دلایلی اسـت که این ارگانیسـم‌ها، به عنوان منبع پروتئین در نظر گرفته می‌شوند. علاوه بـر پروتئین، میکروجلبک‌هـا دارای ترکیبات دیگری ماننـد کربوهیدرات فیبر و . . . هسـتند. کربوهیدرات‌های جلبک‌ها به شـکل نشاسـته، سلولز ، قندهاو دیگر پلی‌سـاکاریدها می‌باشـند. چربی‌ها و اسـیدهای چرب در تمام سـلول‌های گیاهی وجود دارند. آنها به عنوان ترکیبات غشاء، تولیدات ذخیره‌ای، متابولیت‌ها و منبع انرژی عمل می‌کنند. میانگین چربی بین ۱ تا ۴۰٪ متفاوت است و تحت شرایط معینی می‌تواند تا ٪۸۵ وزن خشک آنهارا شـامل گـردد (۱۳). Nannochloropsis، Chlorella ، Chlamydomona ، Nitzshia ، وCyclotella از جنس‌هـای مهـم فیتوپلانکتونی مهم در آبزی پروری به شـمار میآیند. Nannochloropsis حاوی میزان زیادی اسیدهای چرب غیراشـباع (Eicosapentaenoic acid) می‌باشد و به عنوان یک غذای مناسـب در صنایع آبزی پروری مورد اسـتفاده قرار می‌گیرد (۷). به دلیل ارزش غذایی، تناسب ترکیب شیمیایی ، Nannochloropsis به صورت یک غذای بسـیار مناسـب برای تغذیهٔ روتیفر مزارع پرورش ماهی معرفی شده اسـت. همچنین به عنوان یک منبع رنگیزه‌ای ارزشـمند کـه رنگیزه‌های متفاوتی مانند کلروفیل a, Canthaxanthin ، Zeaxanthin و Astaxanthin را به میزان زیادی تولید می‌کند، شناخته شده است. این گونه به عنوان یک منبع با پتانسـیل بالایی از اسید چرب EPA (۲۰:۵W۳) که برای محافظت در برابر بسـیاری از بیماری‌ها مورد مصرف انسـان قرار می‌گیرد از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است(۱۴).

مقـدار پروتئیـن در میکروجلبـک *Chlorella vulgaris* و ۵۱-۵۸٪ وزن خشـک می‌باشـد. همچنین میکروجلبک کلامیدوموناس دارای بیش از ۲۰۰ پلی‌پپتیـد اسـت و میـزان پروتئین در گونـه *Chlamydomonas rheinhavdii* ۴۸٪ وزن خشـک آن می‌باشد. از کلامیدوموناس جهت انجام تحقیقات آزمایشـگاهی مانند انجام پروژه‌های ژنتیکی استفاده می‌شود که با کشـف رنجی از مواد شـیمیایی فعال بیولوژیکی، افق جدیدی در جهت عملکردهای اقتصادی پدیدار می‌شود (۱۳). از لارو Chlamydomonas برای تغذیـه لارو و پسـت‌لارو نرمتنان دوکفه‌ای، زئوپلانکتون‌های آب شـیرین، روتیفرهـای دریایی و آرتمیا اسـتفاده می‌شـود. همچنیـن از Nitzshia و Cyclotella نیز جهت تغذیه لارو آرتمیا می‌توان استفاده کرد(۱۱). برخی از میکروجلبک‌ها جهت آبـزی پروری و همچنین به عنوان منبع مهمی‌جهت تولیدات در صنایع دارویی، غذایی، بهداشتی و آرایشی استفاده می‌شوند که لزوم تحقیقات بیشتر بر این ارگانیسمها بیش از پیش آشکار می‌شود.

Chroomonas placoidea اولین گونه فیتوپلانکتون می‌باشـد که در سال ۱۹۵۹ توسـط Butcher از استخرهای انگلسـتان جدا گردید (۹). گونه‌های میکروجلبکی مورد اسـتفاده در صنعـت آبزی پروری اکثراً از خارج کشور وارد می‌شوند که هزینه زیادی صرف واردات آنها می‌شد. از طرفـی این گونه‌ها توانایی تحمل شـرایط آب و هوایی منطقه را ندارند. جداسـازی فیتوپلانکتون‌هـا در کشـور ما از سـابقه طولانـی برخوردار نیسـت و در حال حاضر اکثر گونه‌های مورد اسـتفاده از خارج کشـور وارد می‌شوند. در طی گزارشی اولین بار در سال ۱۳۷۴ از آبهای بوشهر میکروجلبـک Skeletonema توسـط عربی‌نژاد جـدا گردید که از روش محیط کشـت آگار، میکروپیپت و کشت مداوم جهت جداسازی استفاده نمود. (تحقیق جداسـازی گونه‌های بومی فیتوپلانکتونی از دانه اروندرود و بهمنشـیر در جهت کاهش هزینه واردات و افزایش راندمان در صنعت غذایی زنده انجام شـده اسـت). با توجه به نوسـانات شـوری در دهانه

Archive of SID
www.SID.ir

Archive of SID

رودخانه‌ها با نمونه‌برداری از این محل امکان جداسازی گونه‌هایی با تحمل رنج وسیع شوری فراهم می‌شود و می‌توان از گونه‌های سازگار با تغییرات شوری نیز جهت کشت در دامنه شوری‌های مختلف می‌توان بهره فراوان برد.

مواد و روش‌ها

نظر به اینکه تغییر در عوامل فیزیکی مانند نور، شوری و دما می‌تواند در رشد یک گونه و بالتبع غالبیت یک گونه نسبت به گونه‌های دیگر اثر داشته باشد لذا در این قسمت از دو فاکتور نور و شوری در جداسازی فیتوپلانکتون‌ها استفاده شد.

الف) نور: معمولاً در آزمایشگاه‌های غذای زنده از ۲ لامپ مهتابی ۲۵۰ وات و یا از ۲، ۱ و حد اکثر ۳ لامپ مهتابی ۵۰۰ وات استفاده می‌شود. جهت جداسازی با هدف تعیین مقدار نور مناسب، از محیط کشت‌های TMRL ، Conway و Guillard استفاده شد که این محیط کشت‌ها تحت تیمارهای نوری مختلف با میانگین شدت‌های نوری ۵۱۱ lux (دو لامپ مهتابی ۲۵۰ وات)، ۱۵۲۲ lux (یک لامپ مهتابی ۵۰۰ وات)، ۲۵۶۷lux (سه لامپ مهتابی ۵۰۰ وات) قرار گرفتند که به طور تقریب ۲۵۰۰ lux، ۱۵۰۰، ۵۰۰ در نظر گرفته شد. جهت اندازه‌گیری شدت نور از دستگاه نور سنج Phywe cg مدل ۳۴۰۰۰۰۰/۲۸۷۷ ساخت کشور آلمان با دقت ۱ lux استفاده گردید. در تیمارهای مختلف نوری جهت جداسازی فیتوپلانکتون‌ها از روش‌های رقیق سازی و محیط کشت جامد آگار استفاده گردید.

ب) شوری : با توجه به اینکه محل نمونه برداری‌ها مصب رودخانه می‌باشد و مصب نیز با نوسانات شوری مواجه است لذا از تغییرات شوری جهت جداسازی نیز استفاده شده است. سه محیط کشت Guillard (۶) TMRL ، (۶) Conway ،(۱۱) در شوری‌های ppt ۵،۱۵،۲۵ تهیه شدند. جهت جداسازی فیتوپلانکتون‌ها از روش‌های رقیق سازی و محیط کشت جامد آگار در محیط کشت‌هایی با شوری‌های مختلف یاد شده استفاده شد.

شناسایی فیتوپلانکتون‌ها با استفاده از کلیدهای شناسایی (۵، ۸، ۱۲)، و با میکروسکوپ نوری Olympus مدل CH ۴۰ و میکروسکوپ اینورت Olympus مدل IX ۷۰ انجام شد. نمونه برداری در تاریخ ۸۲/۱۱/۱۶ از دهانه بهمنشیر به وسیله فیلتر کردن آب با استفاده از پمپ لنج و تورهای ۳۰ و ۶۰ میکرون و در تاریخ ۸۲/۱۲/۱۴ از دهانه اروند با کشیدن تور ۳۰ میکرون در سطح آب انجام شد.

جهت جداسازی از سه روش رقیق سازی (۶)، پلیت آگار(۱۱) و روش سانتریفوژ- نورگرایی استفاده گردید.

روش سانتریفوژ - نورگرایی

این روش، جهت جداسازی گونه‌های متحرک کاربرد فراوان دارد. در این روش ۱ میلی‌لیتر از نمونه فیتوپلانکتون، با حدود ۵ میلی لیتر محیط کشت Guillard در سانتریفوژ به مدت ۳۰ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰ rpm قرار داده می‌شود. سپس با یک فویل آلومینیوم اطراف لوله سانتریفوژ طوری باید پوشانده شود که قسمت کمی از محیط کشت در بالای ظرف در معرض نور قرار گیرد. سپس این لوله‌های آزمایش در معرض نور قرار می‌گیرند. پس از مدتی تراکم فیتوپلانکتون‌ها در بالای لوله زیاد شده که به وسیله یک پیپت استریل مقداری از آن به لوله حاوی محیط کشت انتقال یافته و در معرض شرایط مناسب جهت رشد قرار می‌گیرد (۳).

نتایج

فاکتورهای فیزیکو شیمیایی اندازه‌گیری شده در دهانه بهمنشیر شامل شوری ppt ۱۱/۰۴ ، اکسیژن محلول ۷/۵۳ میلی گرم در لیتر، pH=۷/۶، دما ۱۵/۹۹ درجه سانتیگراد و در دهانه اروند، شوری ppt ۲/۶، دما ۱۵/۴ درجه سانتیگراد، pH=۷/۹ ، و اکسیژن محلول ۸/۵ میلی گرم در لیتر بوده است.

الف- جداسازی نمونه‌های جمع‌آوری شده در محیط کشت‌های مختلف در دهانه بهمنشیر با استفاده از روش رقیق سازی

در محیط کشت گیلارد میکروجلبکCyclotella sp جدا شد. در این محیط کشت جلبک Melosira sp نیز در برخی از ظروف کشت غالبیت داشت ولی پس از مدتی از بین رفت. در محیط کشت TMRL نیز گونه *Lyngbya lemnetica* غالبیت داشت، درحالی که در محیط کشت Conway رشد چشمگیری صورت نگرفت.

با استفاده از روش پلیت-آگار

در جداسازی فیتوپلانکتون‌ها از روش جداسازی پلیت- آگار استفاده شد که در این روش سه محیط کشت Conway، Guillard و TMRL با شوری ppt ۲۵ تهیه شد که در نور lux ۲۵۰۰ قرار گرفتند و نمونه‌های جمع‌آوری شده از مصب بر روی این محیط کشت‌های جامد تلقیح شدند. در کلیه محیط کشت‌ها، کلونی‌های باکتریایی مشاهده شد و در هیچ یک از آنها نمونه فیتوپلانکتونی رشد نکرد.

ب- جداسازی نمونه های جمع‌آوری شده از دهانه اروند در محیط کشت، شوری و نورهای مختلف با استفاده از روش رقیق سازی

در lux ۲۵۰۰ محیط کشت TMRL و در شوری ppt ۵ نیز *Nannochloropsis oculata* غالبیت یافت ولی به دلیل وجود زئوپلانکتون از جداسازی آن صرفنظر گردید. دیاتومه Nitzschia sp نیز از شوری ۱۵ppt جدا سازی شد که در کشت مجدد خالص سازی صورت گرفت.

در بعضی از لوله‌های آزمایش زئوپلانکتون‌هایی مانند Coleps مشاهده شد که به نظر می‌رسد با تغذیه خود رشد فیتوپلانکتون‌ها را تحت تأثیر قرار داده بودند. نمونه‌ها در محیط کشت TMRL با شوری‌های ppt ۲۵و ۱۵، ۵ و در شدت نور lux ۱۵۰۰ قرار گرفتند. میکروجلبک‌های *Ankistrodesmus* sp و *Chlorella* sp از شوری ۵ppt جدا شدند که به وسیله کشت مجدد خالص سازی صورت گرفت. این گونه‌ها به ترتیب در شوری ۱۵ و سپس ۲۵ ppt کشت داده شدند. جلبک سبز-آبی *Oscilatoria thiebauti* نیز توسط روش رقیق سازی در شوری ۱۵ppt جداسازی شد. زمان رشد

www.SID.ir

Archive of SID

فیتوپلانکتون‌ها در این محیط کشت بین ۲۳-۱۴ روز در رقت‌های مختلف به طول انجامیده است.

۲-۱- محیط کشت Conway

از محیط کشت‌هایی که در معرض نور lux ۲۵۰۰ قرار گرفتند سه گونه *Chlorella vulgaris* در شوری ppt ۵ و *Hallochlorocuccum* sp و *Amphiprora* sp در شوری ppt ۱۵ جداسازی شدند. در محیط کشت Conway در شدت نور lux ۱۵۰۰ و در شوری ppt۵ میکروجلبک *Chlorella vulgaris* جدا گردید. سپس نمونه‌های جدا شده در شوری‌های ppt ۲۵ و ۱۵ کشت داده شدند. زمان رشد فیتوپلانکتون‌ها در این محیط کشت بین ۵۵-۳۰ روز در رقت‌های مختلف بوده است.

۳-۱- محیط کشت Guillard

رشد دیاتومه‌ها نسبت به دیگر گروه‌ها در این محیط کشت بیشتر است. در شوری ppt ۱۵ و نور lux ۱۵۰۰ گونه *Nannochloropsis oculata* جدا شد و در نور lux ۲۵۰۰ در شوری ppt ۵ نیز همین گونه غالبیت داشت. در بعضی لوله‌ها در شوری ppt ۱۵ و ۵ نیز میکروجلبک *Oocystis* sp دارای تراکم قابل ملاحظه‌ای بود.در شوری ppt ۲۵ و در شدت نور lux ۱۵۰۰ تراکم *Cyclotella* sp بیش از دیگر گونه‌ها بوده و به روش کشت مجدد، خالص گردید. زمان رشد فیتوپلانکتون‌ها در این محیط کشت بین ۱۴-۵ روز بوده است.

با استفاده از روش پلیت‌آگار

از محیط کشت جامد آگار- آگار نیز جهت جداسازی استفاده گردید که به طور جداگانه مواد مغذی سه محیط کشت Conway، Guillard و TMRL اضافه شد. هر یک از محیط کشت‌ها در سه شوری ppt۱۵،۲۵و ۵ تهیه شده که پس از تلقیح این محیط کشت‌ها در سه نور متفاوت قرار گرفتند.

۱-۲- نور lux۲۵۰۰

در نور lux ۲۵۰۰ در محیط کشت Guillard با شوری ppt ۲۵ کلونی‌های قهوه‌ای رنگ براقی مشاهده گردید که طبق مشاهدات انجام شده این نمونه از جنس Diatoma بوده که این کلونی‌ها به محیط کشت مایع گیلارد با شوری ppt ۲۵ انتقال داده شد. در محیط کشت گیلارد با شوری ppt ۵ نیز ریسه‌های طولانی سبز رنگی مشاهده شد که با توجه به مشاهدات میکروسکوپی مربوط به جنس Oscillatoria می‌باشد.

همچنین در محیط کشت TMRL با شوری ppt ۵ نیز لکه‌های سبزرنگ میکرو جلبک Chlorella مشاهده شد که در بین کلونی‌های سفید رنگ موکوسی باکتریایی قرار داشتند.

در محیط کشت Conway با شوری ppt ۵، لکه‌های سبز رنگ میکروجلبک *Schroederella* sp مشاهده شد که پس از مشاهدات میکروسکوپی و با اطمینان از خالص بودن کلونی‌ها به محیط کشت گیلارد با شوری ۱۵ و سپس ppt ۲۵ انتقال داده شد و به شکل خالص تهیه گردید. در محیط کشت‌های Conway با شوری ppt ۲۵ و ۱۵ همچنین محیط کشت‌های گیلارد با شوری ppt ۱۵ و TMRL با شوری ppt ۱۵، لکه‌های سفید موکوسی و لکه‌های مات بیرنگ و حاشیه دار، همچنین لکه‌های زرد، صورتی و سبزکمرنگ مشاهده شد. بر روی محیط کشت TMRL با شوری ppt ۲۵ علاوه بر کلونی‌های یاد شده رشته‌های سیاه رنگ کپک نیز مشاهده شد. بدین ترتیب در محیط کشت‌های ذکر شده فقط کلونی‌های باکتریایی و قارچ رشد نمودند.

۲-۲- نور lux۱۵۰۰

در نور lux ۱۵۰۰ در محیط کشت Conway با شوری ppt ۵ ، کلونی‌های قهوه‌ای رنگ Nitzschia مشاهده شد که به محیط کشت گیلارد با شوری ppt۲۵ و ۱۵ انتقال یافت و به صورت خالص کشت داده شد. در محیط کشت TMRL با شوری ppt ۵ نیز لکه‌های قهوه‌ای دیگر از گروه دیاتومه مشاهده شد که به دلیل مجاورت با کلونی‌های میکروبی از جداسازی آنها صرف‌نظر گردید.

درمحیط کشت‌های گیلارد، با شوری ppt۱۵،۲۵و ۵ محیط کشت Conway با شوری ppt ۲۵ و ۱۵، محیط کشت TMRL با شوری ppt ۲۵، ۱۵ و ۵ نیز کلونی‌های زرد، سفید رنگ با رگه‌های زرد رنگ، همچنین کلونی‌های سبز و صورتی مشاهده گردید. در محیط کشت‌های Guillard با شوری ۱۵ و Conway با شوری ۲۵ علاوه بر کلونیهای باکتریایی یک نوع قارچ سیاهرنگ مشاهده شد و نمونهٔ فیتوپلانکتونی بر روی این محیط کشت‌ها رشد نکرد.

۳-۲- نور lux۵۰۰

در نور lux ۵۰۰ نیز فقط در محیط کشت گیلارد با شوری ppt ۵ ریسه‌های سبز رنگ Oscilatonia و لکه‌های قهوه‌ای مربوط به گروه دیاتومه‌ها مشاهده شد که بر روی این کلونی‌های باکتر رشد کرده بودند و لذا از جداسازی آنهاخودداری گردید. درکلیه محیط کشت‌های دیگر با شوری‌های متفاوت، کلونی‌های صورتی، سفید و زرد مشاهده گردید. در محیط کشت TMRL با شوری ppt ۲۵ کپک‌های سبز و سیاه رنگ مشاهده شد. زمان رشد کلونی‌های جلبکی بین ۷ الی ۲۵ روز در محیط کشت‌های مختلف و در نورهای متفاوت به طول انجامید.

در این پروژه طی نمونه برداری های انجام شده به روش‌های سانتریفوژ - نورگرایی، رقیق سازی و محیط کشت آگار نمونه‌های فیتوپلانکتونی ذکر شده در جدول ۱ جداسازی شده‌اند.

بحث

اکنون کشت تجاری میکروجلبک‌ها بیش از ۳۰ سال است که با گونه‌های میکروجلبکی مهمی مانند Spirulina و Chlorella برای غذای سالم[1] و *Dunaliella salina* برای بتاکاروتن و همچنین Haematococcus برای آستاگزانتین و چندین گونه دیگر برای آبزی پروری انجام می‌شود (۴).

در تحقیقی که توسط Knuckey و همکاران در سال ۲۰۰۲ انجام شد نژادهای دیاتومه جدیدی از آبهای استرالیا جدا شده و پتانسیل آنها به عنوان گونه‌هایی که ارزش آبزی پروری دارند بر اساس اندازه، میزان تقسیم و ترکیب شیمیایی مورد بررسی قرار گرفت. این گونه‌ها به روش آگار، سانتریفوژ و میکروپیپت جدا شدند و نرخ رشد آنهابین $0/55\ d^{-1}$ تا $2/04\ d^{-1}$ در روز بوده است(۱۰).

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱ : نتایج حاصل از جداسازی فیتوپلانکتون‌ها

گروه	نمونه جدا شده	روش جداسازی			نور			شوری			محیط کشت			محل نمونه‌برداری	
		سانتریفوژ نورگرایی	محیط کشت جامد آگار	رقیق سازی	×lux ۵۰۰	×lux ۱۵۰۰	×lux ۲۵۰۰	×ppt ۵	×ppt ۱۵	×ppt ۲۵	TMRL	Conway	Guillard	دهانه بهمنشیر	دهانه اروند
Eustigmatophycean	*Nannochloropsis oculata*			√		√			√				√		√
				√			√	√					√		√
Chlorophycean	*Chlorella vulgaris*			√		√		√				√			√
				√			√	√				√			√
Diatoms	*Cyclotella sp*			√			√			√			√	√	
				√		√				√			√		√
Cyanobacteria	*Lyngbya lemnetica*			√			√			√	√			√	
Cyanobacteria	*Osilatoria thiebauti*			√		√			√		√				√
Chlorophycean	*Chlorella sp*			√		√		√			√				√
Chlorophycean	*Ankistrodesmus sp*			√		√		√			√				√
Diatoms	*Nitzschia sp*			√			√		√		√				√
Chlorophecean	*Oocystis sp*			√			√	√					√		√
Diatoms	*Amphiprora sp*			√			√		√			√			√
Chlorophycean	*Hallochlorocucum sp*			√			√		√			√			√
Chlorophycean	*Chlamydomonas sp*	√					√			√			√		√
Diatoms	*Diatoma sp*		√				√			√			√		√
Chlorophycean	*Schroederella sp*		√				√	√				√			√
Diatoms	*Nitzschia sp*		√			√		√					√		√

www.SID.ir

Archive of SID

جداسازی نمونه‌های جمع‌آوری شده در محیط کشت‌ها، نورها و شوری‌های مختلف در ایستگاه‌های نمونه برداری شده

محیط کشت TMRL

با استفاده از روش رقیق سازی، در شوری ppt ۵ و در نور lux ۲۵۰۰ ، ۲ گونه Cyanobacteria ،۸ گونه Chlorophycean، ۳ گونه Diatoms و ۱ گونه Eustigmatophycean و در نور lux ۱۵۰۰، ۱ گونه Cyanobacteria و ۳ گونه Chlorophycean مشاهده شد. درشوری ppt ۱۵ در نور lux ۲۵۰۰، ۱ گونه Cyanobacteria ، ۳ گونه Chlorophycean ، ۴ گونه Diatoms درلوله‌های رقیق سازی مشاهده شد. در حالی‌که در نور lux ۱ ، ۱۵۰۰ گونه Cyanobacteria ، ۱ گونه Chlorophycean ، ۲ گونه Diatoms مشاهده گردید. در شوری ppt ۲۵ و در نور lux۲۵۰۰ ، ۷ گونه Chlorophycean ، ۴ گونه Diatoms وجود داشت در صورتی که در نور lux ۱،۱۵۰۰ گونه Cyanobacteria ، ۳ گونه Diatoms ، ۱ گونه Eustigmatophycean مشاهده شد. با توجه به نتایج حاصله مشخص می‌شود که تنوع گونه‌ای در نور lux ۲۵۰۰ در محیط کشت TMRL بیشتر از نور lux ۱۵۰۰ در همین محیط کشت می‌باشد. چنین به نظر می‌رسد که افزایش نور باعث رشد تعداد بیشتری از گونه‌ها می‌شود که اکثراً نیز جلبک‌های سبز می‌باشند. در این محیط کشت دو گونه از جلبک‌های سبز، ۱ گونه از جلبک‌های قهوه‌ای، ۱ گونه از جلبک‌های سبز-آبی و همچنین دو گونه از جلبک‌های Eustigmatophycean جدا شده است. پس با توجه به نتایج، محیط کشت TMRL یک محیط کشت عمومی جهت رشد فیتوپلانکتون‌ها می‌باشد.

محیط کشت Conway

در روش رقیق سازی ، در شوری ppt ۵ و در نور lux ۲۵۰۰ ، ۲ گونه Cyanobacteria ، ۱ گونه Diatoms ، ۱ گونه Eustigmatophycean و در نور lux ۱۵۰۰،۱ گونه Chlorophycean ، ۲ گونه Diatoms مشاهده شد. در شوری ppt ۱۵ ، در نور lux ۱،۲۵۰۰ گونه ۲ ، Cyanobacteria گونه Chlorophycean ، ۱ گونه Diatoms و در نور lux۱۵۰۰ و ۱ گونه Chlorophycean، ۳ گونه Diatoms وجود داشت. در شوری ppt ۲۵ و در نور lux۲۵۰۰، ۲ گونه Chlorophycean و ۱ گونه Diatoms و در نور lux۱۵۰۰، ۲ گونه Chlorophycean و ۱ گونه Diatoms مشاهده گردید. با توجه به نتایج مشاهده می‌شود تنوع گونه‌ای در هر دو نور lux۲۵۰۰ و ۱۵۰۰ در محیط کشت Conway تقریبا یکسان است. در نور lux۱۵۰۰ یک گونه (*Chlorella vulgaris*) و در نور lux۲۵۰۰ سه گونه (*Chlorella vulgaris* و *Hallochlorococcum sp* و *Amphiprora sp*) جدا شده‌اند. به نظر می‌رسد افزایش نور سبب مهیا شدن محیط مناسب‌تری جهت رشد بیشتر فیتوپلانکتون‌ها خصوصاً میکروجلبک‌های سبز در این محیط کشت می‌شود.

محیط کشت Guillard

در روش رقیق سازی، در شوری ppt ۵ و در نور lux ۲۵۰۰، ۱گونه Cyanobacteria ، ۲ گونه Chlorophycean ، ۴ گونه Diatoms ، ۱ گونه Eustigmatophycean مشاهده شد در حالیکه در نور lux ۱۵۰۰، ۱ گونه Cyanobacteria ، ۳ گونه Chlorophycean و ۹ گونه Diatoms رشد نمود. در شوری ppt ۱۵ و در نور lux ۱،۲۵۰۰ گونه Cyanobacteria ، ۲ گونه Chlorophycean ، ۷ گونه Diatoms دیده شد در حالی‌که درنور ppt ۱۵۰۰ ، ۱ گونه Cyanobacteria ، ۴ گونه Diatoms ، ۱ گونه Eustigmatophycean دیده شد. در شوری ppt ۲۵ و در نور lux۲۵۰۰، ۱ گونه Chlorophycean و ۴ گونه Diatoms و در نور lux ۱۵۰۰ نیز ۱ گونه Chlorophycean و ۴ گونه Diatoms مشاهده شد. نتایج نشان می‌دهد که رشد و تنوع دیاتومه‌ها در محیط کشت گیلارد نسبت به سایر محیط کشت‌ها بیشتر است. در مقایسه بین نورهای lux ۲۵۰۰ و ۱۵۰۰ در محیط کشت گیلارد مشاهده می‌شود که در نور کم امکان رشد دیاتومه‌ها بیشتر فراهم می‌شود. همچنین با توجه به آزمایشات مکرر که جهت جداسازی و خالص سازی Chlamydomonas از یک دیاتومه که با روش سانتریفوژ- نورگرایی و در نورهای مختلف (lux ۲۵۰۰،۱۵۰۰،۵۰۰) انجام شد مشاهده می‌شود که در نور زیاد امکان رشد جلبک‌های سبز بیشتر بوده درحالی‌که دیاتومه‌ها اکثراً در نور کمتری غالب می‌شوند (۳).

سلول‌های Chlamydomonas به طور مشخصی دارای خاصیت نورگرایی هستند و به طرف نور حرکت می‌کنند اگرچه از شدت نور زیاد نیز دوری می‌کنند. رفتار نورگرایی به دلیل وجود گیرنده‌های نوری شبه رودو پسین است که در غشای سلولی آنها قرار دارند و درست در بالای لکه چشمی هستند. فیتوپلانکتون‌های مختلف با سطوح نوری اپتیمم متفاوت سازش می‌یابند. کارایی فتوسنتز دیاتومه‌ها به طور ویژه‌ای در سطوح نوری کم افزایش یافته و سبب غالبیت آنها می‌شود (۷).

در جداسازی فیتوپلانکتونها از دهانه بهمنشیر در محیط کشت گیلارد، دو دیاتومه نسبت به دیگر گروه‌ها غالبیت داشته‌اند (Melosira و Cyclotella). از نمونه‌های جمع‌آوری شده از اروند که در این محیط کشت گیلارد کشت شده و در یخچال نگهداری می‌شدند نیز غالبیت دیاتومه‌ها چشمگیر بود که بیانگر این نتیجه است که محیط کشت گیلارد برای رشد دیاتومه‌ها مناسب‌تر است . نتایج حاصل از تحقیق عربی نژاد ۱۳۷۴ نشان می‌دهد که دیاتومه‌های اسکلتونما و کیتوسروس در محیط کشت گیلارد رشد بهتری دارند (۱).

در جداسازی با استفاده از روش پلیت - آگار،مشاهده می‌شود که در نور lux ۲۵۰۰ چهار نمونه فیتوپلانکتون رشد نموده است در حالیکه در نورlux ۱۵۰۰ دو نمونه فیتوپلانکتون و در نور lux ۵۰۰ فقط یک نمونه فیتوپلانکتون رشد کرده است که از این تعداد ۲ گونه در نور lux۲۵۰۰ و ۱ گونه در نور lux ۱۵۰۰ جداسازی شد. این نتایج مشخص می‌کنند که افزایش نور سبب رشد تعداد بیشتری از نمونه‌های فیتوپلانکتونی شده و امکان جداسازی تعداد بیشتری از نمونه‌ها را فراهم می‌کند.

با توجه به روش‌های مختلف جداسازی پیشنهاد می‌شود جهت جداسازی فیتوپلانکتونهای متحرک از روش سانتریفوژ- نورگرایی استفاده شود. همچنین جهت افزایش احتمال مشاهدهٔ گونه‌های بیشتر فیتوپلانکتونی از روش رقیق سازی استفاده شود. ضمناً به دلیل رشد تک کلونی‌هابر محیط کشت آگار خالص سازی یک گونه با استفاده از روش پلیت- آگار با سهولت بیشتری امکان پذیر است.

به طور کلی با توجه به نتایج حاصل از جداسازی و نظر به اینکه در نور کم علاوه بر کاهش تنوع، تعداد کمتری از گونه‌های فیتوپلانکتونی توانایی رشد را دارند لذا بهتر است که از شدت نور زیاد (بیش از lux۱۵۰۰)

www.SID.ir
Archive of SID

Archive of SID

اســتفاده شود. همچنین افزایش نور (حدود lux ۲۵۰۰) سبب رشد بیشتر فیتوپلانکتونها مخصوصاً جلبک‌های ســبز شده و امکان جداسازی آنها بهتر فراهم می‌شــود. در نور کم دیاتومه‌ها غالب می‌شــوند و با افزایش نور امکان جداسازی گونه‌های بیشتری موجود می‌باشد.

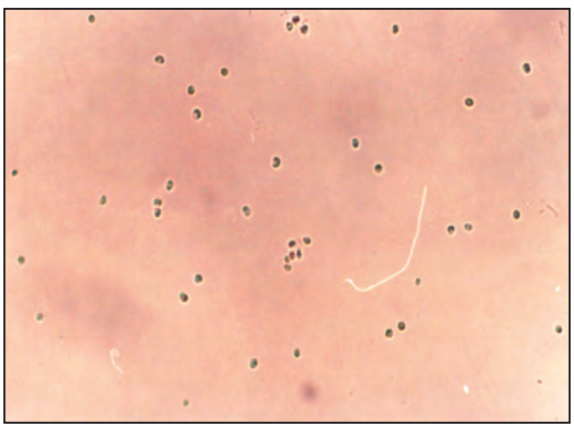
ضمناً پیشــنهاد می‌شود که جهت جداسازی گونه‌های فیتوپلانکتونی با تنوع گونه‌ای، از محیط کشــت TMRL استفاده شود زیرا یک محیط کشت عمومی‌جهت رشد محسوب می‌شــود. همچنین جهت جداسازی دیاتومه‌ها محیط کشــت گیلارد مناســب‌تر است و میکروجلبک‌های ســبز در محیط کشت Conway رشد بهتری دارند.

از میان ۱۵ گونه جداسازی شــده، *Nannochloropsis oculata* (تصویر ۱)، *Chlorella sp* (تصویر۲)، *Chlorella vulgaris* (تصویر ۳) و *Chlamydomonas sp* علاوه بر صنعت آبزی پروری، در صنایع غذایی، دارویی، بهداشتی و در تحقیقات اهمیت زیــادی دارند. از *Cyclotella* (تصویر۴) و *Nitzschia sp* (تصویر۵) نیز می‌توان در صنایع آبزی پروری استفاده نمود.

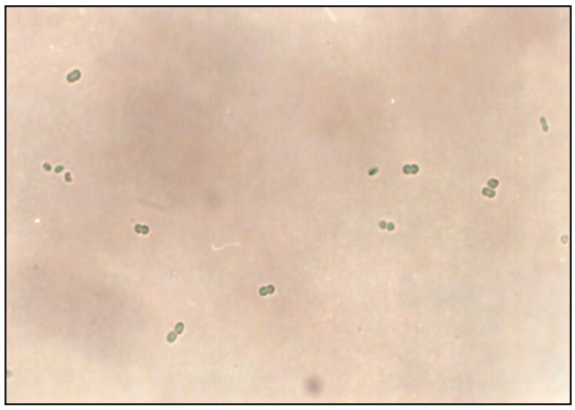
با توجه به انواع میکروجلبک‌های جداســازی شده و کاربرد آنها، می‌توان از آنها در صنایع مختلف مانند صنعت آبزی پروری ، داروسازی ، مواد غذایی و ... استفاده کرد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از همکاری و راهنمایی‌های سودمند خانم مهندس سیمین دهقــان عضو هیات علمــی و رئیس بخش اکولوژی مرکــز تحقیقات آبزی پروی جنوب کشور در این تحقیق صمیمانه قدردانی و سپاسگزاری می‌شود. از راهنمایی‌هــای مفید ســرکار خانم دکتر فروغ پاپهــن عضو هیأت علمی دانشــگاه شــهید چمران اهواز همچنین از همکاری خانم مهندس نســرین ســخایی و آقای مهندس بابک دوســت شــناس اعضاء هیات علمی‌دانشگاه علــوم و فنون دریایی خرمشــهر نیز تشــکر و قدردانی می‌نماییــم. از آقای مهندس علی قوام‌پور کارشــناس ارشــد تکثیر و پرورش شــیلات اســتان خوزستان جهت ارائه راهنمایی‌ها و نظرات سودمندشان و همکاری بی دریغ و مؤثر آقای مهندس ســید جواد حســینی کارشناس ارشد تکثیر و پرورش غذای زنده مرکز تحقیقات شیلات بندر امام کمال تشکر را داریم. از نظرات و

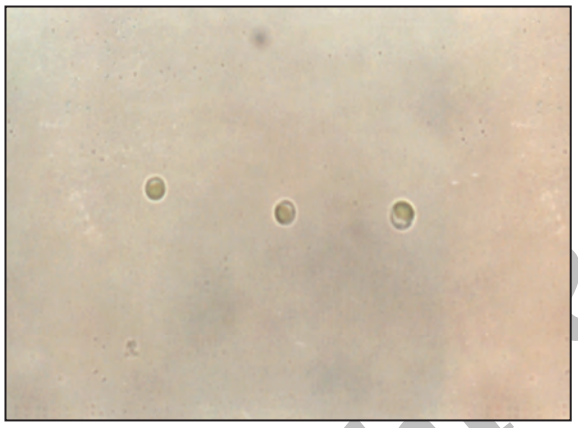


تصویر ۱: Nannochloropsis oculata



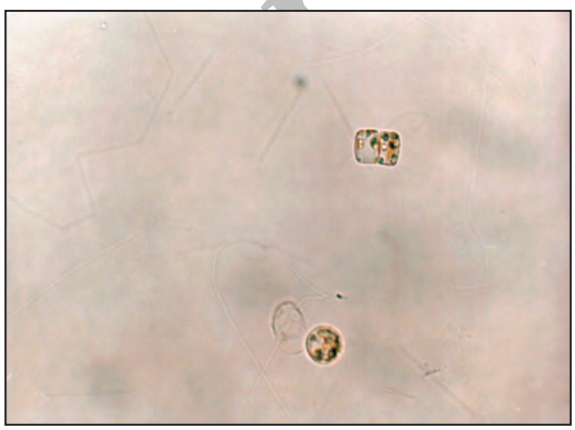
تصویر۲: Chlrella sp

بزرگنمایی عدسی × ۱۰



تصویر ۳: ***Chlorella vulgaris***

بزرگنمایی عدسی × ۴۰

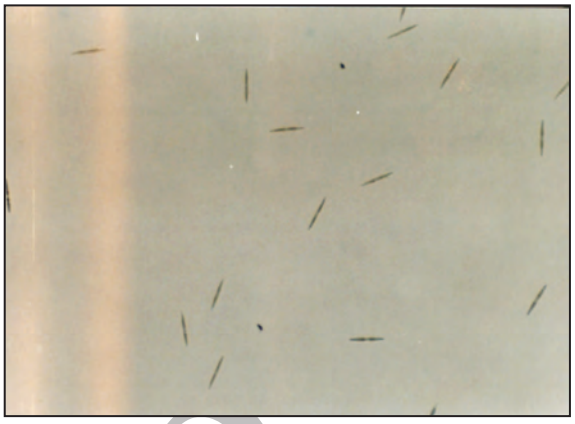


تصویر ۴: Cyclotella sp

بزرگنمایی عدسی × ۴۰

www.SID.ir

Archive of SID



تصویر ۵ : Nitzchia sp
بزرگنمایی عدسی ×۱۰

پیشنهادات خانم مهندس ماندانا زارعی در این تحقیق سپاسگزاریم.

پاورقی

1-Food Health

منابع مورد استفاده

۱ - عربی نژاد، عبدالحلیم سیامر. ۱۳۷۴؛ گزارش نهایی پروژه جداسازی فیتوپلانکتون اسکلتونما از آبهای خلیج فارس بوشهر. انتشارات مرکز تحقیقات شیلات، ۳۴ صفحه.

۲ - مخدومی، نورمحمد؛ ۱۳۷۹؛ بررسی و شناسایی منابع آرتمیا در برکه های آب شور منطقه گنبد. مجله علمی شیلات ایران. شماره۲. ص ۷۲-۶۱.

۳ - معصومی‌زاده، سیده زهرا؛ ۱۳۸۳؛ بررسی روند رشد برخی فیتوپلانکتون‌های بومی استان خوزستان در شرایط آزمایشگاهی، پایان نامه کارشناسی ارشد، ۲۵۰ صفحه.

4- Borowitzka. M.A., 1999; Commercial production of microalgae: Ponds, tanks, tubes and fermenters. Journal of biotechnology. 70: 313-321.

5- Edmondson.W.T.,1959; Fresh water biology. John Wiley & Sons, INC,1248pp

6- Gopinathan C. P., 1993; Hand book on aquafarming live feed. Publ: The Marin Products Expory Development Authority. 61pp

7- Graham, Linda E. and Wilcox, Lee W., 2000; Algae. Publ. Prentice hall. 640 pp.

8- I.F.F.C.,1980; Illustration of fresh water plankton China (training course) 168 pp.

9- Jeffrey, S. W., Black burn, S., 1990; CSIRO culture collection of Micro-algae. Species list, 11 pp.

10- Knuckey, R. M., Brown, M. R., Barrett, S.M., 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.

11- Lavens, P and Sorgeloos P., 1996; Manual on production and use of life food for aquaculture. Lab of Aquaculture and Artemia Research center university of Ghent Belgium pahlished by F.A.O, 438 pp.

12- Mitsuo Chihara & Masaaki Murano., 1997; An Illustrated Guide to Marine Plankton in Japan, publ: Tokai university press, 1573 pp.

13- Richmond, Amos., 2004; Hand book of microalgal culture: Biotechnology and Applied phycology. Publ: Blackwell publishing, 566 pp.

14- Rocha, J. M. S., Garcia. J. E. C., Henriques. M. H. F., 2003; Growth aspects of the marine microalga *Nannochlorosis gaditana*. Biomolecular Engineering, 20: 237-242.

15- Shannon L. MeseckT, Jennifer H. Alix, Gary H. Wikfors,. 2005; Photoperiod and light intensity effects on growth and utilization of nutrients by the aquaculture feed microalga, *Tetraselmis chui* (PLY429). Aquaculture, 246: 393-404.

Archive of SID

www.SID.ir