ارزیابی رشد و زي‌توده جلبك (*Nanochloropsis oculata*) در محیط‌کشتهاي مختلف

سیدمحمد صلواتیان[1]*, قباد آذري تاکامي[2], امین کیوان[3], حبیب وهابزاده رودسري[4], رضا رجبي نژاد[5]

۱- کارشناس ارشد، بخش آبزی پروری، پژوهشکده آبزي پروري آبهاي کشور، بندرانزلی
۲- استاد، گروه شیلات ، دانشکده دامپزشکي دانشگاه تهران، ایران، تهران
۳- استاد دانشگاه آزاد اسلامي واحد علوم و تحقیقات تهران، ایران، تهران
٤- استادیار، عضو هیأت علمي دانشگاه آزاد اسلامي واحد لاهیجان، ایران، لاهیجان
٥- مربی پژوهشی، عضو هیأت علمي دانشگاه آزاد اسلامي واحد بندرانزلي، ایران، بندرانزلی

چکیده

رشد و زی‌توده جلبک *Nannochloropsis oculata* در محیط کشتهای مختلف F/۲ (شاهد)، کانوی[1]، میگویلس[2]، ساتو[3] و تی.ام.ار.ال[4] با رای تولید نیمه انبوه جلبک استفاده شد. آزمایش با تراکم اولیه ۵×۱۰[6] سلول در هر میلی‌لیتر طی شش روز در دمای ۲ ± ۲۵°C و شدت نور ۳۵۰ ± ۳۵۰۰ لوکس در پنج مرحله و سه تکرار مقایسه گردید. نتایج نشان داد محیط کشتهای کانوی و تی.ام.ار.ال به‌ترتیب با ۴۴/۴ و ۱/۶درصد افزایش سلولی بیشترین و کمترین تراکم را در پایان روز ششم داشتند. میانگین افزایش تعداد سلول جلبکی در محیط کشت شاهد (F/۲) نسبت به تلقیح اولیه برابر با ۹/٦×۱۰[6]±۲۲×۱۰[6] به ازای هر میلی‌لیتر بود. بیشترین و کمترین افزایش تراکم سلولی به‌ترتیب در محیط کشتهای کانوی و تی.ام.ار.ال به تعداد ۱۸×۱۰[6] ± ۵۹ ×۱۰[6] و ۰/۵×۱۰[6]± ۲/۱×۱۰[6] عدد سلول در هر میلی‌لیتر به‌دست آمد. میزان جذب و کدورت در محیط کشت شاهد (F/۲) به‌ترتیب برابر با ۰/۱۵ ± ۰/۸ و ۶۲ ± ۳۷۰ و بیشترین میانگین جذب و کدورت در محیط کشت کانوی به‌ترتیب مقادیر ۰/۰۵±۱/۱، FTU ۲۹±۴۵۷ و کمترین میانگین جذب و کدورت در محیط کشت تی.ام.ار.ال به‌ترتیب مقادیر ۰/۲±۰/۳ و FTU ۳٦±۱۳٤محاسبه گردید. همچنین بغیر از دو محیط کشت ساتو و تی.ام.ار.ال سایر محیط کشتها از نظر میانگین درصد افزایش تراکم سلولی به ازای هر میلی‌لیتر با یکدیگر اختلاف معنادار آماری داشتند (S.L=۰/۰۱، P<۰/۰۵). براساس این نتایج، محیط کشت کانوی از توانایی بالایی در تأمین نیازهای غذایی و افزایش تراکم سلولی به منظور پرورش انبوه جلبک مذکور در محیط آزمایشگاهی برخوردار است که این خود می‌تواند در روند رشد و توسعه به کارگیری این جلبک در آبزی‌پروری بسیار حایز اهمیت باشد.

کلیدواژگان: محیط کشت، تراکم سلولی، *Nannochloropsis oculata*.

---

* نویسندهٔ مسؤول مقاله: تلفن: ۰۱۸۱-۳۲۲۴۰۵۵، Email: Salavatian_ 2002@yahoo.com

1. Conway
2. Miguels
3. Sato
4. Tung kang Marine Research Lab

Archive of SID
www.SID.ir

۱- مقدمه

جلبک *Nannochloropsis* یکی از جلبکهای تک سلولی دریایی است که به شاخه جلبکهای سبز[1] و زیر شاخه Eustigomatophyceae تعلق دارد و در گذشته به دلیل شکل ظاهری مدور خود که آن را بسیار به جلبک کلرلا شبیه می‌سازد با عنوان کلرلای دریایی[2] نامیده می‌شد. اساس ساختار این جلبک در سال ۱۹۸۶ به‌وسیلهٔ ماریاما[3] و همکاران شناخته شد و از آن زمان *Nannochloropsis* نام گرفت [۱].

جلبک نانوکلروپسیس به‌دلیل دارا بودن اسیدهای چرب غیراشباع و میزان بالای پروتئین در آبزی‌پروری از اهمیت بالایی برخوردار است، با چنین ارزشهایی لزوم بررسی بیشتر این گونه دو چندان شده است.

ارزش غذایی زیاد از جمله محتوای بالای ایکوزاپنتانوئیک اسید (EPA ω^{3} ۲۰:۵) [۲] و همچنین نقش مؤثر این جلبک به عنوان جایگزین اسیدهای چرب غیراشباع چندگانه (PUFA) اهمیت آن را در تغذیه لارو ماهیان دریایی بارز می‌سازد [۳].

از گونه جلبکی *N.oculata* به صورت مستقیم و به منظور تغذیه روتیفرهای آب شور با نام علمی *Brachionus plicatilis* در پرورش سیم قرمز با نام علمی *Pagrus major* [۴، ۵]، کفال ماهیان Mugilidae، خامه ماهی *Chanos chanos* [۶] و سرخو ماهیان (Lutjanidae) [۷] در مراکز تکثیر آبهای شور بیشتر مناطق جهان از سال ۱۹۸۰ تاکنون استفاده می‌شود.

در اغلب حالات این جلبکها با گونه‌های دیگری از جلبکها نظیر *Isochrysis galbana* و.sp *Monochrysis* در مراحل اولیه پرورش لاروهای ماهیان دریایی برای تغذیه و غنی‌سازی روتیفرها و همچنین به وجود آوردن آب سبز[4] در مخازن هچری استفاده شده و به عنوان یکی از تولیدات فتواتوتروفیک ایده‌آل محسوب می‌شود که در افزایش سطح EPA[5] در شبکه غذایی مؤثر است [۸، ۹].

در سال ۱۹۹۳ فرناندز[6] و همکاران بیان کردند که میزان فیلترکردن و مصرف جلبک *Nannochloropsis oculata* در مقایسه با جلبک *Chlorella* به‌وسیلهٔ زئوپلانکتون آب شیرین *Brachionus calyciflorus* به دلیل دارا بودن اندازه مناسب و امکان تأمین نیازهای غذایی آن بیشتر است [۱۰].

جلبکها علاوه بر عوامل فیزیکی (نور، درجه حرارت، هوادهی و ...)، برای انجام فعالیتهای حیاتی به محیط کشت نیاز دارند. محیط کشت یا ماده غذایی شامل عناصر ماکروالمان و میکروالمان 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 می‌باشد، این مواد در قالب فرمولهای محیط کشت برای مکانیزم 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 کشت های خاص داشته باشند. مواد ذکر شده برای رشد جلبکها ضروری است و معمولاً در پیکره جلبکها نقش مهمی دارند؛ مثلاً در ساختمان DNA و RNA ، در اسکلت سازی، تأمین انرژی به صورت ATP ، در ساختمان پروتئین و اسیدهای آمینه، در دیواره سلولی جلبکها و همچنین سایر فواید در جلبکها مؤثرند.

هدف از اجرای این تحقیق بررسی امکان کشت و تولید انبوه جلبک دریایی نانوکلروپسیس در شرایط منطقه‌ای و نیز معرفی بهترین محیط کشتی بود تا ضمن صرفه اقتصادی بتواند بالاترین میزان بازماندگی و تولید جلبکی را تأمین کند.

1. Chlorophyta
2. Marine Chlorella
3. Maruyama
4. green water
5. Eicosapentaenoic
6. Fernandez-Casalderry

Archive of SID
www.SID.ir

۲- مواد و روش‌کار

این تحقیق در کارگاه تکثیر و پرورش میگوی گمیشان واقع در استان گلستان در پاییز و زمستان ۱۳۸۲ انجام پذیرفت. جلبک نانوکلروپسیس در سال ۱۳۸۰ برای تأمین نیازهای غذای زنده پرورش ماهیان دریایی از کشور کویت وارد مرکز تحقیقات شیلاتی استان خوزستان گردید و در پاییز سال ۱۳۸۲ برای تغذیه لارو ماهیان کفال خاکستری *Mugil cephalus* به کارگاه گمیشان منتقل شد. برای ضدعفونی کردن محیط و لوازم و تجهیزات آزمایشگاهی از سیستمUV، فور Oven، اتوکلاو و محلولهای ضدعفونی کننده نظیر فرمالین، Deconex، آب ژاول و کلر استفاده شد. استوک جلبکی به میزان ۲/۵L بلافاصله در سه محیط کشت آگاری F/۲ به صورت رسوب جلبکی به منظور حفظ ذخیره‌سازی و در محیط کشتهای مایع F/۲ و هاوایی (IO) با حجم ۲۵۰cc و تلقیح اولیه ۲۰×۱۰^{۶} در هر سی‌سی به منظور تأمین ذخیره جلبکی برای کشت انبوه پرورش داده شد.

آزمایش در پنج تیمار محیط کشت مایع مختلف F/۲ (شاهد) [۱۱]، کانوی [۱۲]، میگویلس [۱۳]، ساتو [۱۴] و تی.ام.ار.ال [۱۵] و هر تیمار در پنج مرحله با احتساب سه تکرار طراحی گردید که در نهایت به وسیلهٔ دستگاه اسپکتروفتومتر (طیف سنج) میزان جذب نوری و کدورت به‌ترتیب در ۷۵۰ و ۴۵۰nm خوانده شد. همچنین شمارش نمونه‌های جلبکی با لام هموسیتومتر طی دو مرحله اولیه و ثانویه انجام گرفت.

قابل ذکر است زی توده جلبکی پس از به دست آوردن میانگین وزن تر هر سلول جلبکی، مشخص و محاسبه شد. به منظور تعیین اقتصادی‌ترین محیط کشت در شرایط آزمایشگاهی، مواد متشکله محیط کشت در تهیه یک لیتر از هر یک از محیط کشتهای پنجگانه، تعیین و هزینه‌های تولید آنها برآورد گردید.

در این تحقیق به دلیل عدم توزیع نرمال داده‌ها از آزمون کروسکال – والیس و برای مقایسه اختلاف میانگین تیمارهای متفاوت از آزمون چند دامنه دانکن استفاده شد. برای ترسیم نمودارها و جداول آماری، نرم‌افزارهای SPSS و اِکسل مورد استفاده قرار گرفت.

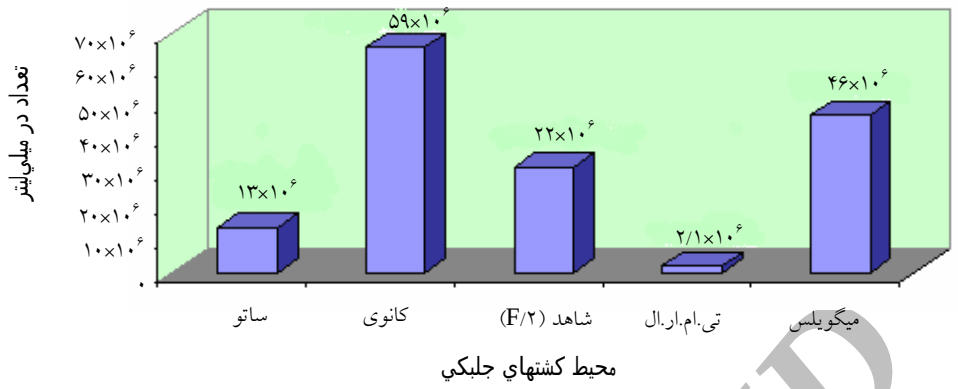
۳- نتایج

۳-۱- اثر محیط کشتهای مختلف بر رشد جلبک *Nannochloropsis oculata*

براساس نتایج به‌دست آمده میانگین افزایش تعداد سلول جلبک نانوکلروپسیس در محیط کشت شاهد (F/۲) نسبت به تلقیح اولیه برابر با $۲۲\times۱۰^{۶}\pm۹۶\times۱۰^{۵}$ به ازای هر میلی‌لیتر بود و بیشترین افزایش در تعداد سلولهای جلبکی در محیط کشت کانوی به تعداد $۵۹\times۱۰^{۶}\pm۱۸\times۱۰^{۶}$ و کمترین افزایش در محیط کشت تی.ام.ار.ال به تعداد $۲۱\times۱۰^{۶}\pm۵\times۱۰^{۵}$ عدد سلول در هر میلی‌لیتر مشاهده شد (نمودار ۱).

آزمونهای آماری نشان دهندهٔ وجود اختلاف معنادار در بین محیط کشتهای مختلف بوده (S.L=۰/۰۱ ،p>۰/۰۵) و آزمون چند دامنه دانکن مؤید آن است که آنها در گروههای همگن واقع نشدند. درصد افزایش تعداد سلول در هر میلی‌لیتر از محیط کشت شاهد برابر با ۱۶/۷۷٪ بود. محیط کشت کانوی با۴۴/۴٪ و محیط کشت تی.ام.ار.ال با ۱/۶٪ به ترتیب بیشترین و کمترین درصد افزایش تعداد سلول را به ازای هر میلی‌لیتر به خود اختصاص دادند.

Archive of SID
www.SID.ir



نمودار۱ اثر محیط کشتهای مختلف بر میانگین تراکم سلولی جلبک ***Nannochloropsis oculata***

جدول۱ ترکیبات مهم عناصر غذایی در محیط کشتهای مختلف جلبکی برحسب mM/L

محیط جلبکی	رتبه تولید	سیلیکات	منگنز	کبالت	مس	آهن	بی‌کربنات	مولیبدات	روی	فسفات	آمونیوم	نیترات	برمید	سزیم
کانوی	۱	ـــــ	ـــــ	$۱/۷\times۱۰^{-۵}$	$۱/۶\times۱۰^{-۵}$	۰/۰۰۴۸	ـــــ	ـــــ	$۳/۱\times۱۰^{-۵}$	۰/۱۹۲	۰/۰۴۱	۱	۰/۵۴	۰/۰۰۴
میگویلس	۲	۰/۰۱۶	۰/۰۲۲	$۴/۲\times۱۰^{-۴}$	۸×۱۰^{-۵}	۴×۱۰^{-۶}	ـــــ	$۳/۷\times۱۰^{-۳}$	۰/۰۰۳۶	۰/۱۹۰	ـــــ	$۱۰^{-۶}$	۰/۰۰۳	۰/۰۰۰۶
شاهد(F/۲)	۳	ـــــ	۹×۱۰^{-۴}	$۴/۲\times۱۰^{-۵}$	۴×۱۰^{-۵}	۰/۰۱۱	ـــــ	$۲/۵\times۱۰^{-۵}$	$۷/۷\times۱۰^{-۵}$	۰/۰۵	ـــــ	۰/۹	ـــــ	ـــــ
ساتو	۴	۰/۴	۰/۰۰۱۴	$۳/۴\times۱۰^{-۳}$	۰/۰۰۱۶	$۰/۸۸۹\times۱۰^{-۳}$	۲	ـــــ	۰/۰۰۰۳	۰/۰۹۶	ـــــ	۱/۱۸	۰/۰۵۵	ـــــ
تی.ام.ار.ال	۵	۰/۰۴	ـــــ	ـــــ	ـــــ	$۱۰^{-۵}$	ـــــ	ـــــ	ـــــ	۰/۰۹۶	ـــــ	۱/۸	ـــــ	ـــــ

با توجه به داده‌های جدول ۱، میزان نیترات در محیط کشت کانوی، ۱۱ و فسفات ۲۸۴ برابر نسبت به محیط کشت شاهد (F/۲) بالاتر است. علاوه بر یونهای نیترات و فسفات، در محیط کشت کانوی یون مولیبدات آمونیوم را داریم که در سایر محیط کشتهای جلبکی اصلاً مشاهده نمی‌شود. از آنجا که در پدیدهٔ فتوسنتز فیتوپلانکتونها منبع یون آمونیومی را راحتر جذب می‌کنند بنابراین یکی از دلایل افزایش رشد و زی‌توده جلبکی در محیط کشت کانوی نسبت به سایر محیطها می‌توان همین موضوع باشد.

در مقایسه محیط کشتهای کانوی با تی.ام.ار.ال، میزان یون نیترات در محیط کشت تی.ام.ار.ال به مراتب خیلی زیادتر از محیط کشت کانوی می‌باشد، اما از آنجا که یون آمونیوم وجود ندارد از اینرو میزان رشد و زی‌توده جلبکی در محیط کشت تی.ام.ار.ال نسبت به محیط کشت کانوی کمتر بوده و در رتبه آخر تولید قرار دارد.

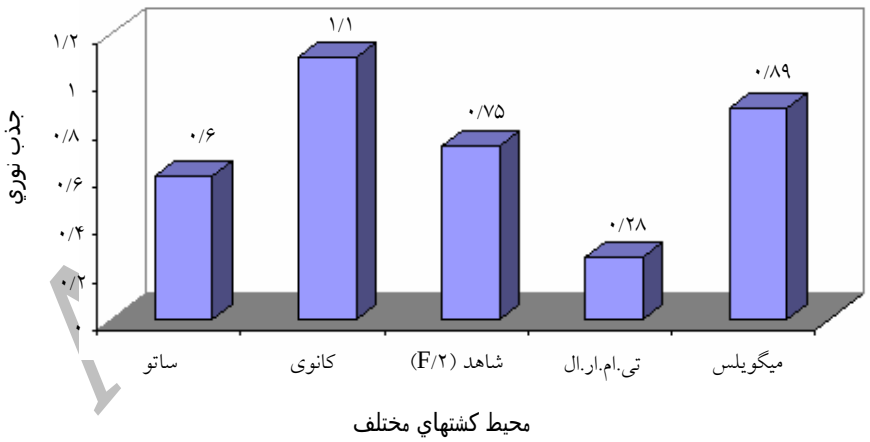
Archive of SID
www.SID.ir

۳-۲- اثـر محيـط‌كشتهـاي مختلف بـر ميزان جذب جلبك *Nannochloropsis oculata*

ميـزان جذب در محيط كشـت شـاهـد (F/2) برابر با ۰/۷۵۵۲±۰/۱۴۵۶ بـود. بيشترين ميانگين ميزان جـذب بـه مقـدار ۰/۰۵۲۵ ±۱/۱۱۰۷به محيط كشت كانوى و كمترين ميانگين جذب به مقدار۰/۱۷۰۰± ۰/۲۸۵۴ بـه محيط كشت تى.ام.ار.ال تعلق داشت كـه از ايـن نظـر بـا نتايج حاصل از شمـارش مستقيم جلبكـى همخـوانـى نشـان داد (نمودار۲). آزمونهاى آمارى وجود اختلاف معناداری را در ميزان جذب محيط كشتهاى مختلف و قـرار نگـرفتن آنهـا در گروههاى همگن نشان دادند (S.L=۰ ،p<۰/۰۵).

جدول۲ درصد افزايش تعداد سلول جلبک*Nannochloropsis oculata* به ازای هر ميلی‌ليتر پس از گذشت شش روز

محيط كشت	ساتو	كانوي	شاهد (F/۲)	تي.ام.ار.ال	ميگويلس
درصد افزايش تعداد سلول	۸/۷۱	٤٤/۳٦	١٦/٧٧	۱/۵۸	۲۸/۵۵
ميانگين تراكم سلولي	۱۳×۱۰^{۶}	۵۹×۱۰^{۶}	۲۲×۱۰^{۶}	۲/۱×۱۰^{۶}	۴۶×۱۰^{۶}
انحراف معيار	۹/۵×۱۰^{۶}	۱/۸×۱۰^{۶}	۹/۶×۱۰^{۶}	۰/۵×۱۰^{۶}	۷×۱۰^{۶}



نمودار۲ اثر محيط كشتهای مختلف بر ميانگين ميزان جذب نوری جلبک *Nannochloropsis oculata*

www.SID.ir

۳-۳- اثـر محيط كشتهاي مختلف بـر ميـزان كدورت جلبك *Nannochloropsis oculata*

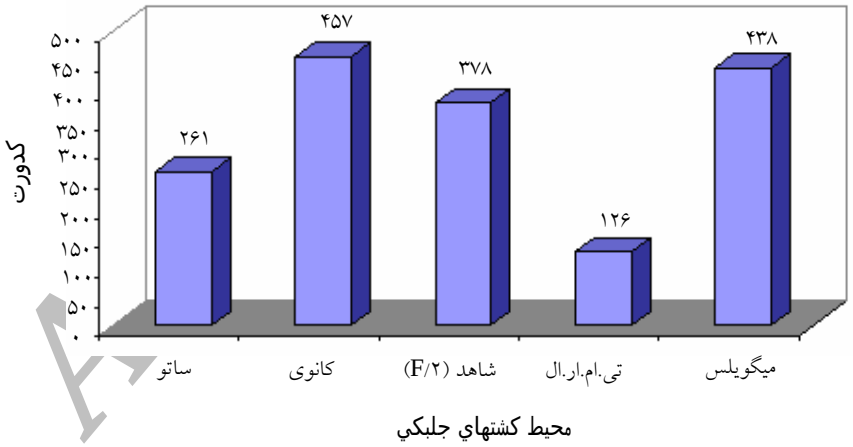
ميـزان كـدورت در محيط كشـت شـاهـد(F/۲) بـرابـر FTU[1] ۳۷۸±۶۱/۹۵۹ بود. بيشترين ميانگين كدورت به مقدارFTU ۴۵۷/۸±۲/۹۴۲۶ به محيط كشت كانوى و كمترين ميانگين كدورت به مقدارFTU ۱۳۴/۲±۳۶/۰۸۴ به محيط كشت تى.ام.ار.ال تعلق داشت كه از اين نظر با نتايج حاصل از شمارش مستقيم جلبكى و ميزان جذب همخوانى نشان داد (نمودار ۳). آزمونهاى آمارى وجـود اختلاف معنـادارى را در ميزان كدورت محيط كشتهاى مختلف و قـرار نگرفتن آنها در گـروههـاى همگن نشـان دادند (S.L=۰ ،p<۰/۰۵).

۳-٤- اثـر محيـط كشتهاي مختلـف بـر ميزان زي‌توده جلبك *Nannochloropsis oculata*

براساس نمودار۴، بالاترين ميزان ميانگين زى توده جلبكى بـه محيط كشت كانوى بـا عدد۲/۲mg/L و كمترين مقدار عدد ميانگين زى توده جلبكى به محيط كشت تى.ام.ار.ال بـا عدد ۰/۰۹mg/L مربوط بود (نمودار ۴).

۳- ۵- برآورد اقتصادي تهيه يك ليتر از محيط كشتهاي مختلف جلبكي

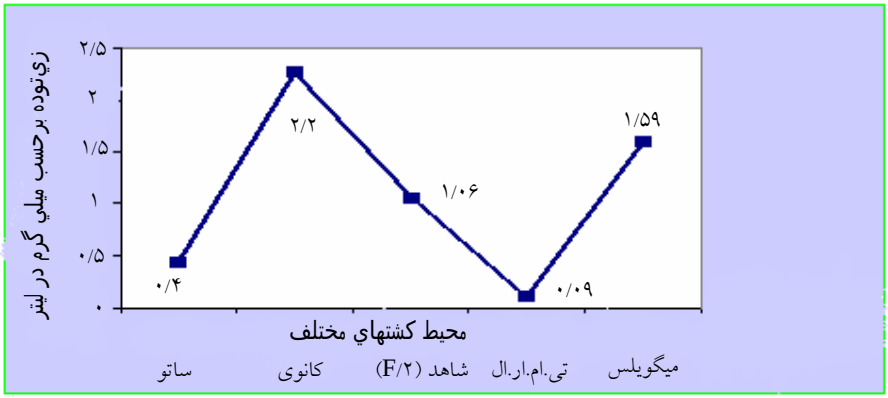
به منظور تعيين اقتصادى‌ترين محيط كشت در شرايط آزمايشگاهى، مواد متشكله در تهيه يک ليتر از هر يک از محيط كشتهاى پنجگانه تعيين و هزينه‌هاى توليد آنها محاسبه گرديد. براساس اين محيط كشت كانوى كـه بيشتـريـن تـراكم سلـولى را در شـرايط آزمايشگاهى فراهم مى‌كرد از توجيه اقتصادى لازم نسبت به سايرين برخوردار است. مقادير ريالى تهيه يک ليتر از محلول حاوى محيط كشتهاى مذكور در نمودار ۵ آورده شده است.



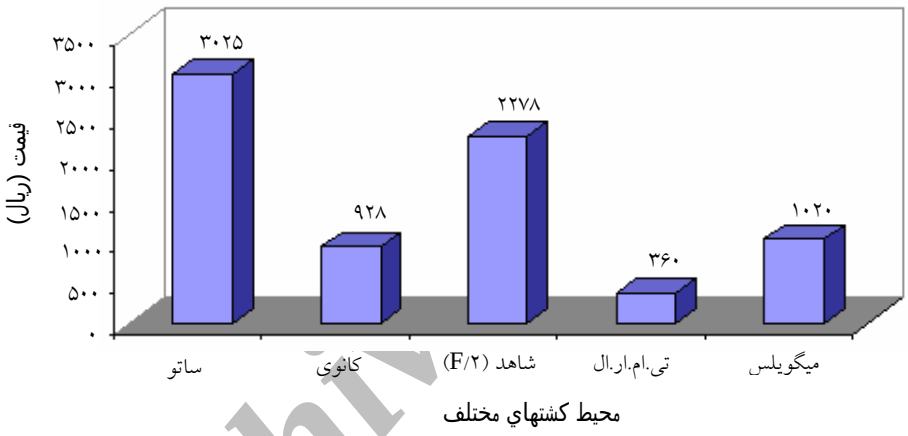
نمودار۳ اثر محيط كشتهاى مختلف بر ميانگين ميزان كدورت جلبک *Nannochloropsis oculata*

1. Formazin Turbidity Unit

Archive of SID
www.SID.ir



نمودار۴ میانگین میزان زی‌توده جلبکی برای محیط کشتهای مختلف



نمودار۵ برآورد ریالی برای تهیه یک لیتر از محیط کشتهای مختلف

٤- بحث

بعد از کربن، هیدروژن و اکسیژن، عنصر نیتروژن چهارمین عنصر در سلولهای زنده است که ۵٪ از وزن خشک سلولها را تشکیل می‌دهد. نیتروژن و آمونیوم ممکن است همواره در محیطهای آبی نباشند و عاملی محدودکننده محسوب شوند. آمونیوم یکی از ترکیبات ایده آل نیتروژنی برای رشد گیاهان بوده و میزان تجمع نیتروژن در سلولهای گیاهی و جانوری از ۱ تا ۱۰٪ وزن خشک متفاوت است. گیاهان منبع آمونیومی را راحتتر از منابع نیتراته جذب می‌کنند و در پدیده فتوسنتز در درجه اول منبع آمونیومی و در صورت فقدان از منبع نیتراته استفاده می‌کنند.

مقایسه عناصر غذایی محیط کشت شاهد (F/۲) با دو محیط کشت کانوی و میگویلس بیانگر آن است که F/۲ ضمن دارابودن مقادیر کمتری از نیتروژن و فسفر، فاقد عنصر مهم مولیبدن که نقش مهمی را در فرایند فتوسنتز ایفا می‌کند، می‌باشد. همین عامل موجب گردیده که محیط کشت F/۲ از نظر تراکم سلولی در رده سوم قرار گیرد اما برای اثبات و نیز ارائه راهکار مناسب به آزمایشهای اختصاصی دیگر نیاز است.

Archive of SID
www.SID.ir

براساس بررسیهای اخیر، در واکنشهای فسفریلاسیون عنصر مولیبدن می‌تواند نقش بازدارنده داشته باشد که این موضوع را نیز راند[1] در سال ۱۹۷۵ ارائه کرد[۱۶].

براساس نتایج حاصل، در روز ششم پرورش، بیشترین و کمترین فراوانی سلولی به ترتیب در محیط کشتهای کانوی و تی.ام.ار.ال به دست آمد و براساس آزمون دانکن، باستثنای دو محیط کشت ساتو و تی.ام.ار.ال سایر محیط کشتها از نظر میانگین فراوانی سلولی دو به دو با یکدیگر اختلاف معنادار آماری نشان دادند($S.L=۰/۰۱$، $p<۰/۰۵$) و پس از روز ششم فراوانی سلولی سیر نزولی داشت از اینرو تمام آزمایشها در یک دوره شش روزه انجام شد.

نتایج حاصل از بررسی به طور وضوح کاهش تراکم سلول جلبکی را از روز ششم به بعد خصوصاً در محیط کشت کانوی نشان داد. این امر می‌تواند به دلیل رقیق شدن املاح محیط کشت یا مواد مغذی نظیر فسفر و نیتروژن کل باشد که ادامه کار با وارد کردن مجدد مواد مغذی به محیط کشت مرتفع شد.

با بررسی مواد تشکیل دهنده محیط کشتهای مختلفی که در این تحقیق آزمایش شد (جدول ۲)، مشخص گردید که فقط محیط کشت کانوی از دو منبع نیتروژنی بهره‌مند بود و نیترات پتاسیم (KNO_3) و مولیبدات آمونیوم ($(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$) هر کدام به ترتیب یون نیترات و یون آمونیوم محیط کشت را تأمین می‌کردند (۱mM و ۰/۰۴۱mM/L). از آنجا که گیاهان مصرف یون آمونیوم را به عنوان تأمین نیتروژنی ترجیح داده و مستقیماً مورد مصرف قرار می‌دهند نقش مثبت آن در افزایش رشد در محیط کانوی بیش از پیش بارز می‌گردد. از سوی دیگر میزان فسفات (فسفر محلول) در این محیط کشت ۰/۱۹۲mM/L بود که مقدار آن نسبت به سایر محیط کشتها بیشتر بود. این موضوع نیز به وسیلهٔ فاتیما و یوسف[2] در سال ۲۰۰۱ گزارش شد [۱۷].

تراکم سلولی در محیط کشت میگویلس دومین رتبه را در بین سایرین به خود اختصاص داد. برخلاف محیط کشت کانوی منبع تأمین نیتروژن موجود در آن فقط نیترات پتاسیم (نیترات ۴mM) و منبع تأمین فسفات، سدیم فسفات ($NaPO_4$) (فسفات ۰/۱۵۷mM) بود. مقایسه میزان نیتروژن و فسفر موجود در این دو محیط کشت، وجود شباهت زیاد این دو را نسبت به هم نشان می‌دهد، اما این امکان وجود دارد که نبود یون آمونیوم در محیط کشت میگویلس عامل مؤثر در کمتر بودن میزان تراکم آن باشد که در آزمایشهای بعدی با تغییر منبع تأمین یون آمونیوم می‌توان به آثار ناشی از این ماده بر تغییرات تراکم سلولی پی برد.

عامل بیکربنات در محیط کشت با تحریک CO_2 و ایجاد شرایط اسیدی سبب کاهش جذب نیترات و یون آمونیوم در محیط می‌شود و از آنجا که در محیط کشت کانوی عامل بیکربنات موجود نبود از اینرو می‌تواند یکی از دلایل افزایش تراکم سلولی در محیط کشت مذکور باشد. روچ[3] و همکاران در سال ۲۰۰۳[۱۸] به این موضوع اشاره و بیان کردند که محیط کشت کانوی فاقد منبع کربنی است زیرا که موجودات اتوتروف قابلیت استفاده از CO_2 اتمسفری را دارند، با وجود این اضافه کردن غلظتهای کمی از گلوکز و سولفات آمونیوم میزان تراکم سلولی را افزایش می‌دهد. به عقیده آنها، افزودن سایر مقادیر منابع نیتروژنی نظیر نیترات پتاسیم، نیترات سدیم، $Ca(NO_3)_2.4H_2O$، اوره و گلایسین (به میزان ۱۰mM از هر کدام) می‌تواند دی‌اکسیدکربن اتمسفری را در محیط کشت ثابت نگهدارد و حتی افزودن مقادیری از اوره به تنهایی می‌تواند میزان رشد را به گونه‌ای چشمگیر افزایش دهد.

برای بررسی نقش محدود کننده هر یک از عناصر در محیط کشت باید با ثابت نگهداشتن یک عامل و تغییر عامل دیگر، بهترین میزان و نسبت را در محیط کشتها مشخص ساخت. نیتروژن عامل محدود کننده نبوده که در این راستا

1. Round
2. Fatimah & Yusoff
3. Roach

Archive of SID
www.SID.ir

یوسف و ناب[1] به ترتیب در سالهای ۱۹۸۹ و ۱۹۹۷ [۱۹، ۲۰] در آزمایشهای خود میزان غلظت نیتروژن را ۲۰ برابر فسفر محاسبه کردند تا مطمئن گردند نیتروژن عامل محدود کننده نیست و با تغییر مقادیر فسفر موجود در محیط کشت، بهترین نسبت و مقادیر بین ایندو را تعیین کردند.

برم برای رشد جلبکها یک عنصر ضروری است که شکل غالب آن در آب، اسید بوریک است. برم قابلیت تجمع در گیاهان را دارد[۲۱]. این عنصر به طور مستقیم به عنوان کود به محیط کشت اضافه و باعث جذب بیشتر نیترات در محیط می‌شود. آزمایشهای انجام شده نشان می‌دهد برم می‌تواند به طور مستقیم در متابولیسم کلسیم، فسفر و منیزیم تأثیر گذارد. براساس جدول ۲ میزان برمید در محیط کشت کانوی از سایر محیط کشتها بالاتر بود (۰/۵۴mM/L) که به این موضوع EPA در سال ۱۹۸۷ نیز اشاره کرد [۲۲].

مقادیر زیاد آهن باعث کندی رشد در جلبکها شده، اما رشد بعضی از باکتریها را افزایش می‌دهد. براساس جدول مذکور در محیط کشت کانوی پائینترین غلظت یون آهن دیده شد که EPA هم در سال ۱۹۹۷ به این موضوع اشاره کرد[۲۳].

گیاهان برای اعمال حیاتی به عنصر روی نیاز دارند و از سویی دیگر کمبود روی کاهش رشد را در پی دارد. عناصر مس و روی در جذب بر یکدیگر اثر بازدارندگی دارند به طوری که افزایش میزان روی در محیط منجر به کاهش جذب مس می‌شود. بالاترین میزان روی در محیط کشت کانوی مشاهده گردید که این موضوع را استانلی[2] در سال ۱۹۸۷ نیز عنوان کرد [۲۴].

محیط کشتهای ساتو و تی.ام.ار.ال هر یک کمترین میزان رشد و تراکم سلولی را ایجاد کردند. با بررسی مقادیر نیترات و فسفات در این دو محیط کشت مشخص می‌شود که تی.ام.ار.ال هر چند از نظر وجود نیترات (۰/۹۸mM) برابر با محیط کشت کانوی می‌باشد اما نقش کمبود فسفات (۰/۰۸۳mM) و یون آمونیوم به عنوان یک عامل مهم و تأثیرگذار در محدود کردن میزان رشد همراه با نبود سایر عناصر میکروالمان چشمگیر است. میزان پایین تراکم سلولی در محیط کشت ساتو به نحو دیگری قابل بیان است چرا که این محیط کشت نه تنها از نظر وجود نیترات بلکه فسفات نیز بسیار فقیر است و نقش هر دو به عنوان عامل حداقل مطرح می‌شود.

به منظور کسب نتایج بهتر توصیه می‌گردد که بررسی مقادیر فسفر و نیتروژن و نیز سایر عناصر میکروالمان و ماکروالمان موجود در محیط کشتهای مختلف در حجم وسیعتری اجرا گردد تا بتوان با معرفی بهترین محیط کشت که تأمین کننده رشد و تراکم ایده آل سلول جلبکی باشد و همچنین با بهبود ساختار محیط کشتها به منظور کاهش هزینه‌های اقتصادی بدون کاهش در میزان تولید به نتایج مطلوبی دست یافت.

براساس این نتایج مشخص گردید که محیط کشت کانوی از توانایی بالایی در تأمین نیازهای غذایی و افزایش تراکم سلولی به منظور پرورش انبوه جلبک یاد شده در محیط کشت آزمایشگاهی[3] برخوردار است که این خود می‌تواند در روند رشد و توسعه به کارگیری این جلبک در آبزی‌پروری بسیار حائز اهمیت باشد.

۵- سپاسگزاري

از ریاست محترم وقت پژوهشکده آبزی پروری کشور (آبهای داخلی) جناب آقای دکتر علی اصغر خانی پور، به دلیل همکاری در اجرای پروژه و آقایان مهندس کورش امینی، مهندس بینایی، مهندس فرشاد ماهی صفت، مهندس جلیل پور، دکتر شهرام عبدالملکی، همچنین از سرکار خانم دکتر مریم فلاحی و خانم مهندس احمدنژاد تشکر و قدردانی می‌شود.

1. Mc Nabb & Yusoff
1. Stanley

2. Indoor

Archive of SID
www.SID.ir

٦- منابع

[1] Maruyama I., Nakamura T., Matsubayashi T., Ando Y., Maeda T.; ((Identification of the alga known as ((Marine *Chlorella*)) as a member of the eustigmatophyceae)); *Jpn, J. Phycol.* 1986; 34: 319-325.

[2] Brown C., Davies M., Nimer N., Dong L. F., Merrett M. J.; Calcification, photosynthesis and intracellular regulation in emiliania haxleyi; Marine Biological Association, The Laboratory citadel Hill, Plymouth PL1 2PB, UK. 1993.

[3] Rodolfi L., Zittelli G. C., Barsanti L., Rosati G., Tredici M. R.; Growth medium recycling in *Nannochloropsis* sp. Mass cultivation; Biomolecular Engineering. 2003; 20: 243-248.

[4] Fugita S.; Importance of Zooplankton mass culture in producing marine fish seed for fish farming; Bull.Plankton Soc.Ypn.1973; 20:49-53.

[5] Nash C., Kuo C. M., Connel M.; ((Operational procedures for rearing larvae of the grey mullet (*Mugil cephalus*))); *Aquaculture*; 1974; 3:15-24.

[6] Liao I. C., Juario J. V., Umagia S. K., Natividad M., Buri P.; ((On the induced spawning and larval rearing of the milkfish (*Chanos chanos* Forska))); *Aquaculture*. 1979; 18:75-93.

[7] Watanabe W. O.; Species profile Mutton snapper *Lutjanus analis*, Southern regional Aquaculture Center (SARC) publication; 2001; No.725.

[8] Sukenik A., Zmora O., Carmeli Y.; ((Biochemical quality of marine unicellular algae with special emphasis on lipid composition.II)); *Nannochloropsis* sp; *Aquaculture*; 1993; 117: 313-326.

[9] Lubzens E., Gibson O., Zmora O., Sukenik A.; ((Potential advantages of frozen algae (*Nannochloropsis* sp.) for rotifer (*Brachionus plicatilis*) culture)); *Aquaculture*; 1997; 133: 295-310.

[10] Fernandez-Casalderrey A., Ferrando M. D., Andrea-Moliner E.; ((Chronic toxicity of methylparathion to the rotifer, *Brachionus calyciflorus*, fed on *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella pyrenoidosa*)); Hydrobiologia; 1993; 255/256:41-49.

[11] Guillard R. R. L., Ryther J. H.; ((Studies on marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran)); *Canadian Journal of Microbiolog*; 1962; 8: 229-39.

[12] Walne. Live feeds in Tailand rotifer and microalgae culture systems.inst; *Aquaculture*; 1974; 6: 7-25.

[13] Galtsoff P. S.; The American Oyster, *Crassostrea virginica*. U. S. Fish and Wildlife Service; Fish. Bull.,U.S. 1937; 64:1-480.

[14] Sato N., Murata N.; Membrane lipids. Methods in Enzymology; 1988; 167: 251-259.

[15] Liao I. C., Huang T. L., Katsutani K.; Experiments on the propagation and culture of prawns in Taiwan; Proceedings of the 14th session of the Indo-Pacific Fisheries Council. 1970a; pp. 1-26.

[16] Round F. E.; The Biology of the Algae; Adward Arnold; LONDON; 1975; pp.158.

[17] Yusoff F.M.; Matias H. B., Khalid Z. A., Phang S. M.; ((Culture of microalgae using interstital water extracted from shrimp pond bottom sediments)); *Aquaculture*; 2001; 201: 263-270.

[18] Roach J. M. S., Garcia J. E. C., Henriques M. H. F.; ((Growth aspects of the marine microalga *Nannochloropsis gaditana*)); Biomolecular Engineering; 2003; 20: 237-242.

[19] Yusoff F. M., McNabb C. D.; ((Effects of nutrient availability on primary productivity and fish production in fertilized tropical ponds)); *Aquaculture*; 1989; 78: 303-319.

Archive of SID

www.SID.ir

[20] Yusoff F. M., McNabb C. D.; ((The effects of phosphorus and nitrogen addition on phytoplankton dominance in tropical ponds)); *Aquaculture*; 1997; Res.28: 591-597.

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

[22] EPA; Health effects Assessment for Boron and Compounds; 1987.

[23] EPA; Drinking water standards Environment of Criteria and Assessment; 1997.

[24] Stanley S.; Rown and Yasushi Kodama, Toxicology of metals; 1987.

Archive of SID

www.SID.ir