

تأثیرات سختی محیط کشت بر خالص سازی و تشکیل کلونی در جلبک سبز

Scenedesmus quadricauda

امیدوار فرهادیان* و امید جعفری

اصفهان، دانشگاه صنعتی اصفهان، دانشکده منابع طبیعی، گروه شیلات

تاریخ پذیرش: ۹۳/۵/۱۶

تاریخ دریافت: ۹۲/۷/۶

چکیده

در این تحقیق تأثیرات محیط کشت با سختی های مختلف صفر (شاهد)، ۴۰۰، ۲۰۰ و ۶۰۰ میلی گرم بر لیتر از کربنات کلسیم بر خالص سازی و تشکیل کلونی در کشت های جلبک سبز سندسموس (*Scenedesmus quadricauda*) آلوده شده با سیانوباکتریها بررسی گردید. نتایج نشان داد که سختی محیط کشت تأثیر معنی داری ($P < 0/05$) بر خالص سازی جلبک سندسموس دارد. دامنه تراکم سلولی در هفته اول و دوم به ترتیب ۲۲۴-۱۴۴ و ۵۰۶/۷-۴۰۲/۷ هزار سلول در میلی لیتر برای سندسموس و برای سیانوباکتریها به ترتیب ۱۷/۳-۷/۱ و ۳۲/۸-۵/۱ هزار سلول در میلی لیتر بدست آمد. علاوه بر این، سختی های مختلف محیط کشت BBM بر جمعیت سیانوباکتر تفاوت معنی داری داشت ($P < 0/05$) در حالیکه بر سلولهای سندسموس تفاوت معنی داری مشاهده نگردید ($P > 0/05$). در محیط کشت BBM با سختی بالاتر (۴۰۰ و ۶۰۰ میلی گرم در لیتر از کربنات کلسیم) و دوره پرورش طولانی تر (دوهفته) سلولهای سیانوباکتریها بطور معنی داری کاهش نشان دادند ($P < 0/05$). علاوه بر این، در سختی بالای محیط کشت، تعداد کلونی های تک سلولی کاهش و تعداد کلونی های چندسلولی افزایش داشت در حالیکه پاسخ سیانوباکتریها با کاهش قابل توجه در تعداد سلولها همراه بود. بطور کلی در این تحقیق، کشت های جلبک سندسموس بوسیله افزایش سختی محیط کشت از آلودگی های سیانوباکتریایی خالص شده و همچنین جمعیت آن تمایل به تشکیل کلونی های چند سلولی پیدا نموده که زیست توده جلبکی را افزایش می دهد.

واژه های کلیدی: سختی آب، محیط کشت BBM، خالص سازی جلبکی، جلبک سندسموس، سیانوباکتریها، تشکیل کلونی

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۳۱۳۳۹۱۳۵۶۴، پست الکترونیکی: omfarhad@cc.iut.ac.ir

مقدمه

کاربردهای متنوع و شگفت انگیز جلبکها در تغذیه، پزشکی و خواص درمانی، پرورش آبزیان، کاغذ سازی، تکنولوژی های نوین محیط زیست و تصفیه خانه های آب به عنوان جاذب های زیستی باعث شده تا جلبکها بیش از گذشته مورد توجه و مطالعه قرار گیرند. این موجودات، تولید کنندگان اولیه غالب در اکثر محیط های آبی هستند و قسمت اعظم انرژی را برای بسیاری از شبکه های غذایی آب فراهم می کنند. وجود اسیدهای چرب، اسیدهای آمینه، ویتامین ها، کارتنوئیدها و مواد مغذی مورد نیاز لاروها در جلبکها بر اهمیت استفاده از آنها می افزاید (۳). علاوه بر

این، امروزه زیست توده جلبکی می تواند اساسا بعنوان غذای دام و آبزیان پرورشی، و بعنوان کودهای زیستی استفاده گردد. از زیست توده جلبکی می توان در طی فرایندهای مختلف تولید انرژی استفاده نمود که نشان دهنده اهمیت روز افزون در تولید سوخت زیستی (Biodiesel) متکی بر زیست توده جلبکی است (۱۱).

بطور کلی تولید جلبک های میکروسکوپی نیازمند شرایط فیزیوشیمیایی ویژه ای می باشد. اگرچه بسیاری از جلبک ها نیازهای اختصاصی دارند اما ۹۹/۹ درصد از تولید زیست توده جلبکی به قابلیت دسترسی ۶ عنصر عمده

استفاده از تغییرات در سختی محیط کشت می‌تواند راهکار مناسبی در حذف جلبک‌های سبز-آبی نامطلوب باشد. سختی آب بطور معمول بر ترکیب فیتوپلانکتونها و دینامیک جمعیت آنها تاثیر می‌گذارد. سختی می‌تواند معلول اختلاط انواع نمک‌های دو ظرفیتی باشد، هرچند که کلسیم و منیزیم معمول‌ترین منابع سختی آب هستند (۳۵). آبهای با غلظت بالای ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر (یا ۱/۴۹ میلی‌مولار) از کربنات کلسیم را آبهای سخت در نظر می‌گیرند (۵). بسیاری از خاک‌ها غنی از کربنات‌های کلسیم، منیزیم و سدیم می‌باشند که در واقع، شستشوی سطحی، آبهای جاری و روشهای آبیاری باعث تجمع و تراکم شدن این عناصر در اکوسیستمهای آبی میشود (۱۰). این املاح باعث افزایش ظرفیت هدایت الکتریکی، قلیائیت و سختی در منابع آب می‌شوند (۳۳).

افزایش سختی آب می‌تواند نقش مهمی در کاهش تراکم سیانوباکتریها از قبیل *Aphanocapsa Microcystis* و *Anabena* داشته باشد (۷ و ۸). Reynolds و همکاران در سال ۱۹۸۷ (۲۴) بیان نمودند که رشد و غالبیت در بسیاری از سیانوباکتریها مرتبط با مکانیسم شناوری آنها است و وجود واکوئل‌های گازی در آنها به سلولها اجازه می‌دهد تا جابجا شوند و خود را در شرایط نوری مناسب قرار دهند (۳۲). سختی آب با از بین بردن واکوئل‌های گازی در بعضی از سیانوباکتریهای آب شیرین باعث کاهش تعداد سلولها در جمعیت آنها می‌شود (۷ و ۸).

در این مطالعه تاثیر سختی‌های مختلف محیط کشت بر عملکرد ترکیب جلبک سندسموس (*quadricauda Scenedesmus*) و سیانوباکتریها با هدف اصلی خالص سازی جلبک سندسموس از سیانوباکتریها بررسی گردید. یافته‌های این تحقیق در خالص نمودن جلبک‌های سبز در محیط‌های آزمایشگاهی بخصوص در زمان آلوده شدن به سیانوباکتریها مفید است. از سوی دیگر، یافته‌های این تحقیق را می‌توان در مهار نمودن شکوفایی جلبکی ناشی

کربن، اکسیژن، هیدروژن، نیتروژن، سولفور و فسفر بستگی دارد. کربن و نیتروژن نقش بسیار مهمی در چرخه رشد جلبک‌ها و تولیدزیست توده دارند (۴). همچنین نقش و عملکرد سایر عناصر مانند کلسیم، منیزیم، آهن، مس، منگنز و روی برای فعالیت‌های فتوسنتزی در جلبک‌های میکروسکوپی بسیار حائز اهمیت است (۳).

علاوه بر تامین شرایط محیطی و عناصر مورد نیاز رشد، جداسازی و خالص سازی جلبک‌های میکروسکوپی از سایر گونه‌ها و انواع موجود در جامعه فیتوپلانکتونی و به منظور پایه گذاری کشت‌های خالص تک‌گونه‌ای، از اهمیت کاربردی بالایی برخوردار است. بنابراین، بهبود تکنیک‌های مرسوم خالص سازی همواره از موضوعات تحقیقی است. جداسازی و خالص سازی جلبک‌های میکروسکوپی از سایر گونه‌ها بخصوص جداسازی جلبک‌های سبز-آبی با تکنیک‌هایی از قبیل مشاهده و جمع آوری سلولها در زیر میکروسکوپ و کشت آنها با استفاده از محیط کشت جامد از قبیل آگار-آگار و یا محیط کشت مایع از قبیل BBM بسیار متداول است و همواره با کشت‌ها و پایش‌های متوالی انجام می‌شود. معمولاً این روشها کاری پرهزینه، زمان‌بر و در نهایت با کارایی نسبتاً پائین است (۱۷ و ۲۱).

یک دسته از جلبک‌های میکروسکوپی که در بسیاری از آبهای شیرین یافت میشوند جلبک‌های سبز (کلروفیت) است. این جلبک‌ها از قبیل کلرلا (*Chlorella spp.*) و سندسموس (*Scenedesmus spp.*) کاربردهای بسیاری دارند و همواره مورد توجه بسیاری از محققان هستند. جلبک‌های سبز-آبی (سیانوباکتریها) از مهمترین جلبک‌های آلوده کننده در کشت‌های جلبک‌های سبز است. به منظور بهبود روش‌های خالص سازی جلبک‌های سبز از جلبک‌های سبز-آبی، یکی از مهمترین روش‌ها ایجاد تغییرات در شرایط شیمیایی محیط کشت است.

محیط کشت در ۶/۸ تنظیم شده و محلول به حجم رسانیده شد. سپس کلیه ظروف حاوی محیط کشت‌های جلبک با سرپوش پنبه‌ای به همراه لوله‌های هوادهی در دمای ۱۲۱ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ دقیقه در دستگاه اتوکلاو (مدل 121A، ساخت ایران) ضدعفونی و استریل گردید. ۲۰۰ میلی لیتر از ذخیره جلبک سندسموس آلوده به سیانوباکتریها به عنوان ذخیره اولیه جلبک به محیط کشت دارای ویتامین B12 (یک میکروگرم در لیتر) اضافه گردید و در نهایت در دمای ۲۴ درجه سانتی گراد و شدت نور ۶۰ میکرومول فوتون بر متر مربع بر ثانیه و در شرایط نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی قرار داده شد. تراکم جمعیت جلبک سندسموس نسبت به سیانوباکتریها غالبیت داشت. این ذخیره مشترک از سندسموس و سیانوباکتر برای انجام آزمایش اصلی استفاده گردید.

از سیانوباکتریها در محیط‌های آبی و استخرهای پرورش ماهی آب شیرین با استفاده از تغییرات در سختی آب استفاده نمود.

مواد و روشها

کشت و تهیه سوسپانسیون سلولی ناخالص اولیه: کشت سوسپانسیون سلولی مخلوط که شامل جلبک *S. quadricauda* به همراه گونه‌های از سیانوباکتریها بوده، با پرورش مخلوط جلبکی در ارلن مایرهای ۲ لیتری حاوی محیط کشت BBM (Bold Basal Medium) (جدول ۱) بعنوان محیط کشت پایه انجام گردید تا ذخیره اولیه از جلبک سندسموس و سیانوباکتریها جهت انجام آزمایشات فراهم شود. برای کشت جلبک، ۲ لیتر آب مقطر در ارلن مایر ۲ لیتری شیشه‌ای ریخته شده و به آن‌ها طبق جدول ۱ مقادیر ۱۰، ۱، و ۱ میلی لیتر از استوک‌های A، B، C و D اضافه گردید. با استفاده از pH متر اسیدپته آغازین

جدول ۱- محیط کشت (۲۱).

استوک	نوع ماده مصرفی	مقدار ماده مصرفی (گرم)	حجم مورد نیاز (برای تهیه استوک ها)
A	NaNO ₃	۱۰	۴۰۰ میلی لیتر
	MgSO ₄ .7H ₂ O	۳	
	K ₂ HPO ₄	۴	
	KH ₂ PO ₄	۶	
	CaCl ₂	۱	
	NaCl	۱	
B	ZnSO ₄	۸/۸۲	۱ لیتر (این استوک جهت حل شدن باید اتوکلاو شود)
	MoO ₃	۰/۷۱	
	Co(NO ₃) ₂ .6H ₂ O	۰/۴۹	
	MnCl ₂	۱/۴۴	
	CuSO ₄ .5H ₂ O	۱/۵۷	
C	H ₃ BO ₄	۱/۱۴	۱۰۰ میلی لیتر
	EDTA	۵	
	KOH	۳/۱	
D	FeSO ₄ .7H ₂ O	۴/۹۸	۱ لیتر
	HCl	۱(ml)	

یاجداسازی) سیانوباکتریها در تیمارهای مختلف سختی نیازمند یک دوره آزمایش بود لذا ارزیابی و مقایسه تراکم جمعیت جلبک‌ها در پایان هفته اول و دوم انجام گرفت.

آنالیز آماری داده‌ها با تجزیه واریانس یک طرفه (One-way ANOVA) انجام شد. برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون چند دامنه دانکن (Duncan test) و آزمون تی تست (T-test) سطح معنی داری ۵ درصد استفاده شد (۳۶). آنالیزهای آماری با استفاده از نرم افزار SPSS انجام گردید.

نتایج

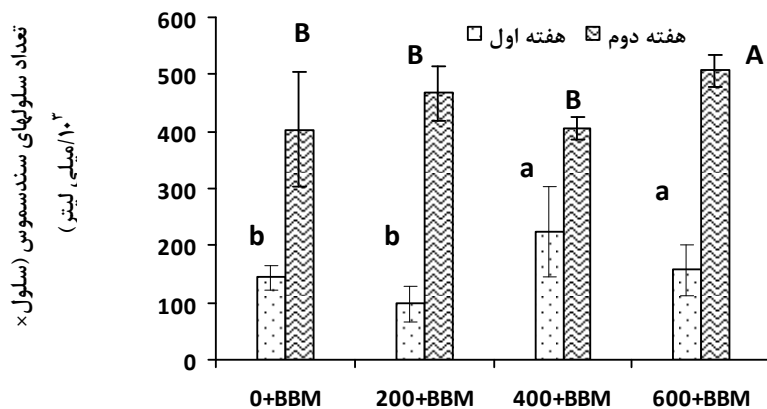
خالص سازی سندسموس: نتایج حاصل از شمارش تراکم جمعیت جلبک سندسموس (شکل ۱-الف)، سیانوباکتریها (شکل ۱-ب) و کل جمعیت (شکل ۱-ج) در طی هفته اول و دوم به تفکیک در تیمارهای مختلف در شکل ۱ ارائه شده است. نتایج نشان داد که تیمارهای مختلف از سختی محیط کشت، تاثیر معنی داری ($P < 0.05$) بر خالص شدن گونه سندسموس در مقابل سیانوباکتریها دارند. تعداد سلولهای سندسموس در هفته اول و دوم به ترتیب ۲۲۴-۱۴۴ و ۵۰۶/۷-۴۰۲/۷ هزار سلول در میلی لیتر در حالیکه تراکم سلولهای سیانوباکتریها در هفته اول و دوم به ترتیب ۷/۱-۱۷/۳ و ۵/۱-۳۲/۸ هزار سلول در میلی لیتر است (شکل ۱). بررسی و مقایسه روند افزایش سلولهای سندسموس و کاهش آن در سیانوباکتریها در تیمارهای مختلف سختی بر اساس درصد کل جمعیت برای هفته اول و هفته دوم در شکل ۲ ارائه شده است. نتایج نشان داد که در سختی‌های مختلف محیط کشت درصد سلولهای سیانوباکتر تفاوت معنی داری داشت ($P < 0.05$) در حالیکه بر تعداد سلولهای جلبک سندسموس تاثیر معنی داری مشاهده نگردید ($P > 0.05$).

افزایش سختی آب تاثیر قابل ملاحظه‌ای را بر کاهش سلولهای سیانوباکتریها در مقابل سندسموس داشت (شکل ۲). بالاترین درصد خلوص کشت سندسموس (۹۹٪) در

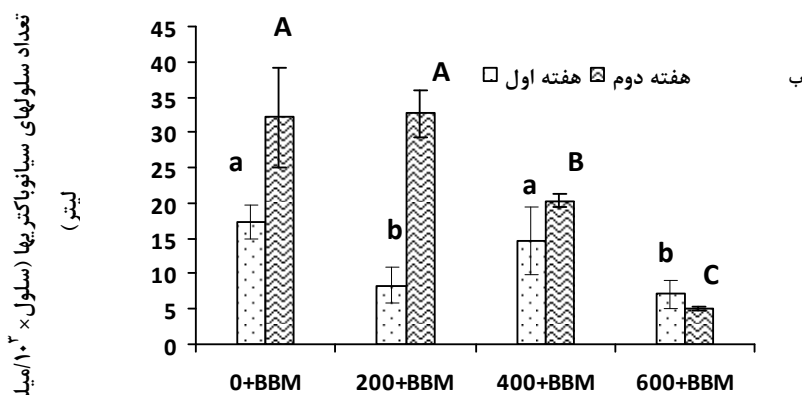
اعمال شرایط افتراقی و جداسازی جلبکها: به منظور ارزیابی میزان خلوص جلبک *S. quadricauda* از آلودگی سیانوباکتریایی، محیط کشت BBM با سطوح مختلف سختی شامل چهار سطح صفر (شاهد)، ۲۰۰، ۴۰۰ و ۶۰۰ میلی گرم بر لیتر کربنات کلسیم در نظر گرفته شد. ابتدا مقدار کافی محیط کشت BBM (جدول ۱) تهیه گردید و سپس مقادیر کربنات کلسیم مطابق غلظت تیمارهای مورد نظر در فلاسک‌های ۲۵۰ میلی لیتری دارای BBM اضافه شد. پس از به هم زدن، تمام واحدهای آزمایشی در ۶/۸ تنظیم گردید. تنظیم pH تمام تیمارها با هیدروکسیدپتاسیم ۰/۱ نرمال و اسیدکلریدریک ۰/۱ نرمال با استفاده از pH متر انجام شد. پس از انجام اتوکلاو و هم دما شدن با دمای آزمایشگاه، محلول ویتامین B12 به میزان یک میکروگرم در لیتر از محیط کشت به هر فلاسک با رعایت شرایط استریل اضافه گردید. پس از بهم زدن ملایم، به هر فلاسک از ذخیره جلبکی مشترک، ۲۰ میلی لیتر اضافه و در شرایط کشت شامل دمای آب ۲۴ درجه سانتی گراد و شدت نور ۶۰ میکرومول فوتون بر متر مربع بر ثانیه (اندازه گیری شده با شدت نور سنج مدل LI-COR LI-189) و ۱۲ ساعت روشنایی/۱۲ ساعت تاریکی قرار گرفت. آزمایش به صورت طرح کاملا تصادفی با چهار تیمار و سه تکرار به مدت ۱۴ روز انجام شد. این دوره کشت اجازه می داد تا در شرایط ایجاد شده جلبک ها حداقل دودوره تکثیر را طی نمایند و اطمینان حاصل شود که جلبک‌ها در شرایط تیماری ایجاد شده تولید مثل حاصل نموده اند (۱).

ارزیابی تعداد سلولها: تعداد سلولهای جلبکی و کنترل میزان آنها در دوره آزمایش، جلبک‌ها با استفاده از لام هماسایتومتری ($0.625 \text{ mm}^2 \times 0.2 \text{ mm}$) و میکروسکوپ اینورت (مدل Belgium Ceti) براساس روش Martinez و Chakroff (۱۹۷۵) (۲۰) پس از تثبیت نمونه‌ها با محلول لوگول ایدین (مقدار ۰/۱ میلی لیتر لوگول در ۳ میلی لیتر نمونه) شمارش گردیدند. با توجه به اینکه حذف (و

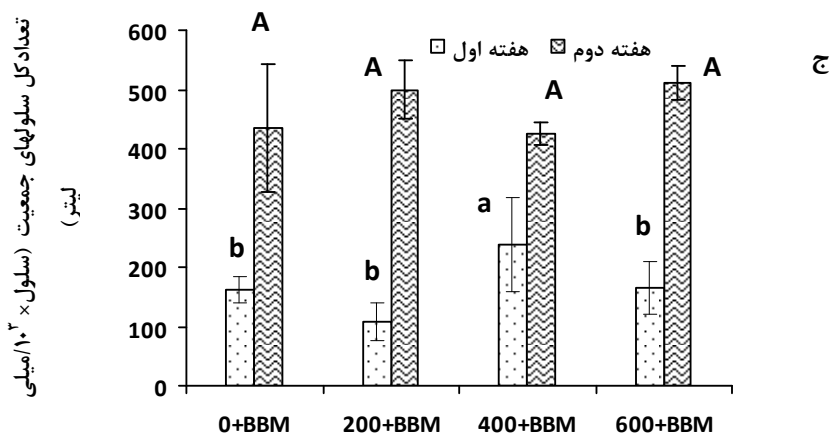
پایان هفته دوم) و کمترین میزان سیانوباکتریها (۱٪ در پایان هفته دوم) در تیمار $BBM+600$ بدست آمد (شکل ۲).



تیمارها (محیط کشت حاوی کربنات کلسیم برحسب میلی گرم در لیتر)



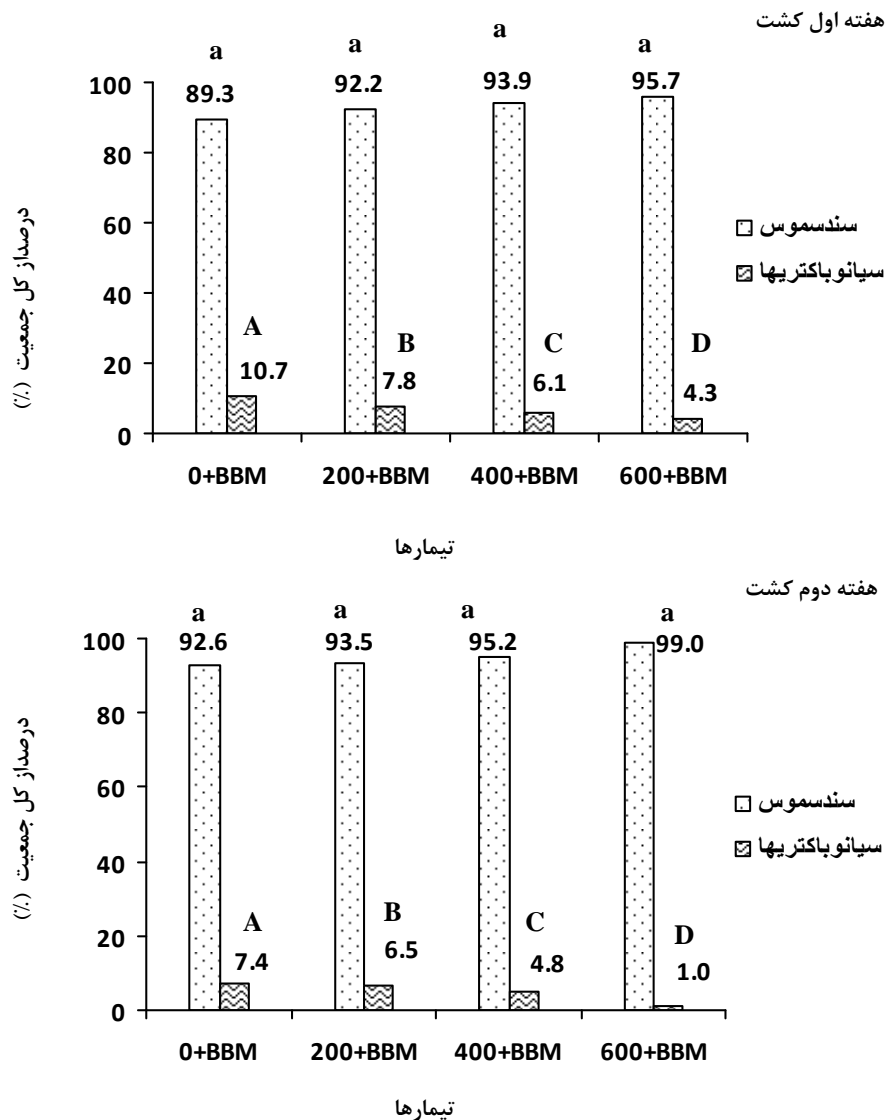
تیمارها (محیط کشت حاوی کربنات کلسیم برحسب میلی گرم در لیتر)



تیمارها (محیط کشت حاوی کربنات کلسیم برحسب میلی گرم در لیتر)

شکل ۱- تعداد سلول جلبک در تیمارهای مختلف از سختی محیط کشت در پایان هفته اول و دوم کشت. الف) جلبک سندسوموس، ب) سیانوباکتریها، ج) کل جمعیت (سندسوموس+سیانوباکتریها). مقادیر میانگین \pm خطای استاندارد بوده و علائم نامشابه در هر ستون برای هفته اول (حروف کوچک) و برای هفته دوم (حروف بزرگ) در تیمارهای مختلف از سختی با آزمون دانکن بیانگر عدم تفاوت معنی داری است. مقایسه هر تیمار در طی دو هفته آزمایش با آزمون تی

در سطح ۵ درصد انجام گردید.



شکل ۲- میانگین درصد جمعیت جلبک سندسموس و سیانوباکتریها در تیمارهای مختلف از سختی محیط کشت در پایان هفته اول و دوم کشت.

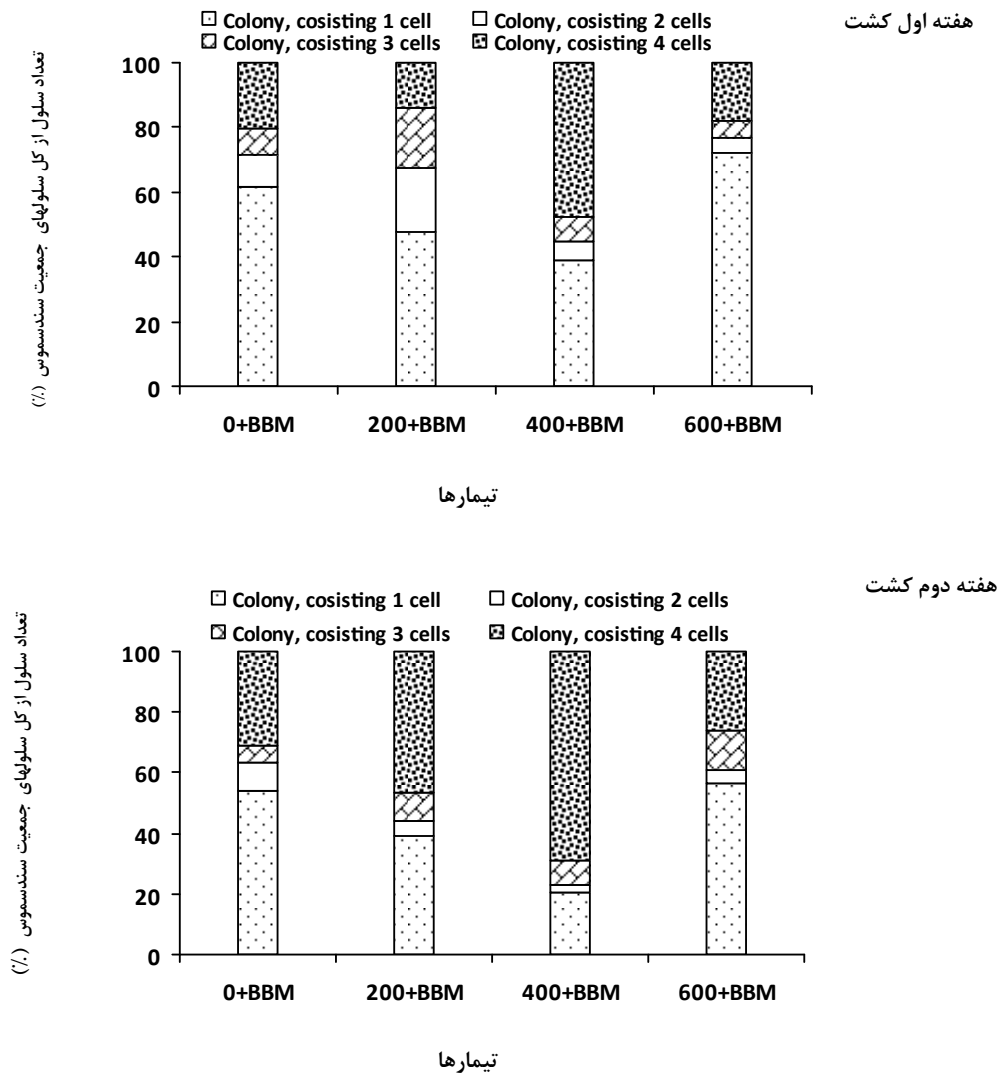
میانگین‌های دارای حروف مشابه از نظر آماری با آزمون دانکن در سطح ۵ درصد اختلاف معنی‌داری ندارند (حروف کوچک برای جلبک

سندسموس و حروف بزرگ برای سیانوباکتریها). مقایسه هر تیمار در طی دو هفته آزمایش با آزمون تی در سطح ۵ درصد انجام گردید.

باعث کاهش کلونی‌های تک سلولی در مقایسه با کلونی‌های چندسلولی (بیش از ۲ سلول) می‌شود. کلونی‌های چهار سلولی با افزایش سختی محیط کشت تا ۴۰۰ میلی گرم در لیتر افزایش داشت. در واقع، پاسخ سندسموس به افزایش سختی محیط کشت (تا ۴۰۰ میلی گرم در لیتر)

تشکیل کلونی یا اجتماعات چند سلولی در سندسموس: ترکیب انواع سلولها (بر اساس درصد از جمعیت کل) جلبک سندسموس (چهار گروه شامل کلونی‌های دارای ۱، ۲، ۳ و ۴ سلول) در تیمارهای مختلف از محیط کشت با سختی‌های مختلف در شکل ۳ ارائه شده است. نتایج نشان داد که افزایش سختی آب تا ۴۰۰ میلی گرم در لیتر

بصورت افزایش تعداد سلولها و تشکیل کلونی های چند سلولی ارزیابی گردید.



شکل ۳- میانگین درصد سلولهای مختلف از جمعیت جلبک سندسموس در تیمارهای مختلف از سختی محیط کشت در پایان هفته اول و دوم از دوره کشت.

بحث

ادامه حیات هستند و با خارج شدن از این محدوده به تدریج تعداد آنها کاهش می‌یابد. در رابطه با تأثیر سختی‌های مختلف محیط کشت بر عملکرد جلبک‌های تک سلولی و بخصوص جلبک *S. quadricauda* کمتر تحقیق صورت گرفته است (۲۷، ۳۱ و ۳۴). معمولاً، محیط کشت‌های باغلظت‌های متفاوت از ترکیبات کلسیم‌دار، تأثیرات

در این مطالعه جلبک سبز سندسموس رشد و سازگاری مناسبی در سختی‌های مختلف محیط کشت داشت و خلوص جمعیت آن در مقابل سیانوباکترهای ناخواسته افزایش قابل ملاحظه‌ای را نشان داد. بسیاری از جلبک‌های تک سلولی در محدوده مشخصی از سختی آب قادر به

در این پژوهش جمعیت سیانوباکتریها در سختی‌های مختلف محیط کشت کاهش معنی‌داری را نشان داد. اضافه نمودن کلسیم به محیط کشت هم بصورت کلرید کلسیم و هم بصورت کربنات کلسیم به شدت باعث کاهش رشد در سیانوباکتریها می‌شود (۷). این ممانعت از رشد می‌تواند ناشی از تاثیر کلسیم به لحاظ تعادل بارالکتریکی (۲۲)، افزایش میزان کدورت حاصل از کربنات کلسیم و رسوب نمودن کلسیم توام با حضور سایر ترکیبات از قبیل فسفر باشد (۲۳). کلسیم تاثیر بازدارنده بر متابولیسم دارد (۸). Neilan و Kellman در سال ۲۰۰۷ (۱۳) نشان دادند که کلسیم بازدارنده رشد است و میزان محتویات سم را در سلولهای سیانوباکتریها کاهش می‌دهد.

در این مطالعه انواع مختلفی از اجتماعات سلولی و تشکیل کلنی در جلبک *S. quadricauda* در محیط کشت BBM با سختی‌های مختلف مورد بررسی قرار گرفت. پاره‌ای از تغییرات در مورفولوژی یا آرایش‌های سلولی (تعداد سلولها در کلونی‌ها) در رابطه با پاسخ این گونه به عواملی نظیر سیستم‌های شکار- شکارچی گری صورت گرفته است که نشان از تغییر فنوتیپی جلبک‌ها در پاسخ به تغییرات شرایط محیطی به دلایل مختلفی مانند حفظ بقا می‌باشد (۲۵). بطور کلی، برخی از جلبک‌های آب شیرین در مورفولوژی، ویژگی‌های فیزیولوژیکی، ساختار ژنتیکی و ترکیب بیوشیمیایی خود انعطاف‌پذیر هستند. این ویژگی جلبک‌های پلانکتونی بطور قابل توجهی، تحت شرایط زیست محیطی مختلف در اکوسیستم‌های آبی می‌تواند متفاوت باشد. جلبک‌هایی مانند *Staurastrum* گاهی اوقات ممکن است شکل خاردار خود را از دست بدهند (۱۸). جلبک‌های سبز آبی مختلف، از جمله *aeruginosa* *Microcystis* پتانسیل برای تشکیل کلونی و ایجاد مسمومیت‌های شیمیایی را دارد. در سیستم‌هایی که با کمبود مواد غذایی مواجه است و نرخ رشد جلبک در آن آهسته است، این ویژگی‌ها از جلبک ممکن است یک مکانیسم‌های دفاعی در برابر چرای موجودات چراکننده

مختلفی بر عملکرد پرورشی جلبک‌ها به لحاظ تولید، رشد و زیست توده دارند. لذا غلظت‌های بسیار کم و یا زیاد کربنات کلسیم می‌تواند نقش ممانعت‌کننده بر عملکرد جلبک‌ها داشته باشد. برای مثال، Garg و Garg در سال ۲۰۰۲ (۱۲) گزارش دادند که سختی حدود ۶۳/۲-۳۱/۲ میلی‌گرم بر لیتر کلسیم برای اغلب جلبک‌ها مناسب است و بالاتر از آن کند کننده رشد خواهد بود. آنها بیان نمودند که گسترده بودن محدوده سختی می‌تواند به علت شرایط متفاوت محیطی مانند دما، pH، میزان هوادهی، میزان و شدت نور مورد استفاده، تفاوت در ترکیب شیمیایی محیط کشت مورد استفاده و همچنین تفاوت در گونه‌های جلبکی مورد آزمایش باشد. برای مثال، زمانی که تنها منبع تامین نیتروژن در رشد جلبک *Chlorella pyrenoidosa* نترات باشد، کلسیم و مس از مهمترین عناصر مورد نیاز است (۳۱). همچنین ممکن است که تأثیرات کلسیم بر رشد جلبک‌ها از طریق تأثیر آن بر محتوای فسفر قابل دسترس در آب‌ها باشد زیرا فسفر بصورت فسفات کلسیم محلول است اما افزایش میزان کلسیم در آب‌ها می‌تواند منجر به افزایش ته‌نشینی فسفات گردد که رشد جلبک‌ها را محدود مینماید (۱۰).

تعیین دامنه بهینه سختی محیط کشت زمینه را برای عملکرد مناسب جلبک‌های میکروسکوپی فراهم می‌نماید تا با رشد مناسب سایر مواد غذایی محیط کشت را جذب و مصرف نماید. در واقع، جلبک‌های سبز را می‌توان بطور مفید و سودمندی در تصفیه پساب‌ها بکار گرفت. پساب‌ها در واقع محیطی غنی از مواد مغذی و به عبارتی محیط کشت‌هایی هستند که عمدتاً تامین‌کننده نیتروژن و فسفات لازم برای رشد جلبک‌ها می‌باشند. Wu و Kow در سال ۲۰۱۰ (۳۴) بیان نمودند که تغییر در الگوی منابع فسفر و نیتروژن هماهنگ با زمان افزایش تراکم کلروفیت‌ها نبوده و نتیجه‌گیری کردند که تفاوت به دلیل سختی‌های گوناگون در منابع آبی است.

بود. یافته‌های این پژوهش نشان داد که کشت‌های جلبک سندسموس بوسیله افزایش سختی محیط کشت از آلودگی‌های سیانوباکتریایی خالص می‌شوند و همچنین جمعیت آن‌ها تمایل به تشکیل کلونی‌های چند سلولی پیدا نموده که زیست‌توده جلبکی را افزایش می‌دهد. با توجه به یافته‌های این پژوهش و لحاظ کردن سختی مطلوب برای رشد جلبک سندسموس می‌توان از آن در محیط‌های تصفیه فاضلاب‌ها (۲، ۱۹ و ۲۷) و پساب‌های کشاورزی و شهری (۹) و همچنین مزارع پرورش ماهی (۱) استفاده نمود. مطالعات بیشتر در خصوص رفتار جلبک‌های تک سلولی از قبیل جلبک سندسموس به عوامل مختلف زیستی و محیطی توصیه می‌شود.

تشکر و قدردانی

از معاونت پژوهشی دانشکده منابع طبیعی دانشگاه صنعتی اصفهان به لحاظ فراهم آوردن بودجه و امکان تحقیق سپاسگزاری می‌شود.

باشد (۱۴ و ۲۹). سایر مکانیسم‌های دفاعی از قبیل اندازه بزرگ، سختی دیواره سلولی، دفع مخاط و تولید سموم مزایای قابل توجهی است که در جلبک‌ها موجب کاهش تقاضای انرژی مصرفی می‌شود (۶، ۱۶، ۲۹ و ۳۰). از سوی دیگر، شواهد زیادی وجود دارد که نشان می‌دهد مواد شیمیایی آزاد شده توسط زئوپلانکتون‌ها می‌تواند باعث تشکیل کلونی در برخی فیتوپلانکتون‌های خاص مانند گونه‌های مختلف از جنس جلبک سندسموس شود (۲۸). برای مثال، مواد شیمیایی منتشر شده از دافنی (*Daphnia*) می‌تواند روی تشکیل کلونی در سندسموس (*Scenedesmus subspicatus*) موثر باشد (۱۵). چندین گونه از جلبک‌های سندسموس شناخته شده اند که متحمل تغییرات فنوتیپی در اندازه کلنی می‌شوند که به وسیله عامل‌های زیست محیطی کنترل می‌شوند (۲۸).

بطور کلی پاسخ سندسموس به افزایش سختی آب تا ۴۰۰ میلی گرم در لیتر با افزایش میزان سلول‌ها و تشکیل کلونی‌های چند سلولی همراه می‌باشد در حالیکه پاسخ سیانوباکتریها با کاهش قابل توجه در تعداد سلول‌ها همراه

منابع

- حیدری، ص.، فرهادیان، ا.، و محبوبی صوفیانی، ن. ۱۳۹۰. تولید زیست توده و حذف آمونیاک و نیتريت از پساب کارگاه پرورش ماهی بوسیله کشت جلبک سبز سندسموس. کوادریکوادا. مجله محیط‌شناسی. پائیز ۱۳۹۰، شماره ۵۹، صفحه ۲۸-۱۵.
- Abe, K., Imamaki, A., and Hirano, M. 2002. Removal of nitrate, nitrite, ammonium and phosphate ions from water by the aerial microalgae *Trentepohlia aurea*. Journal of Applied Phycology, 14: 129-134.
- Barsanti L. and Gualtieri P., 2006. Algae: Anatomy, Biochemistry, and Biotechnology, CRC Press, Taylor and Francis Group, 320 P.
- Bellinger, E.D., and Sigeo, D. 2010. Freshwater Algae: Identification and use as Bioindicators. John Wiley & Sons, Ltd., UK, 271 pp.
- Boyd, C.E. 1979. Water quality in warmwater fish ponds. Craftmaster Printers, Inc, Opelika, Alabama., 359 pp.
- Bronmark, C., and Hansson, L. A. 2000. Chemical communication in aquatic system: an introduction. Oikos, 88: 103-109.
- Carneiro, R. L., Pacheco, A. B. F., and de Oliveira e Azevedo, S.M.F. 2013. Growth and saxitoxin production by *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) correlate with water hardness. Marine Drugs 11: 2949-2963.
- Carneiro, R.L., Alipio, A.C.N., Bisch, P.M., Azevedo, S.M.F.O., Pacheco, A.B.F. 2011. The inhibitory effect of calcium on *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) metabolism. Brazilian Journal of Microbiology. 42: 1547-1559.
- De la Noue, J., and Proulx, D. 1988. Biological tertiary treatment of urban wastewaters with chitosan-immobilized *Phormidium*. Applied Microbiol Biotechnology, 29: 292-297.

10. Delince, G. 1992. The ecology of the fish pond ecosystem. Kluwer Academic Publishers. London, 230 pp.
11. Demirbas A. and Demirbas M.F., 2010. Algae energy: Algae as a new source of biodiesel. Springer, 199 pp.
12. Garg, J. and Garg, H. 2002. Nutrient loading and its consequences in a lake ecosystem. *Tropical Ecology* 43: 355-358.
13. Kellman, R.; Neilan, B.A. 2007. Biochemical characterization of paralytic shellfish toxin biosynthesis *in vitro*. *Journal of Phycology*. 43: 497-508.
14. Kyong, H., Jang, M. H., Joo, G. J., and Takamura, N. 2001. Growth and morphological changes in *Scenedesmus dimorphus* induced by substances released from grazer, *Daphnia magna* and *Moina macrocopa*. *Korean Journal of Limnology*, 34: 285-291.
15. Lampert, W., Rothhaupt, K.O., and von Elert, E. 1994. Chemical induction of colony formation in a green alga (*Scenedesmus acutus*) by grazers (*Daphnia*). *Limnology and Oceanography*, 39: 1543-1550.
16. Larsson, P., and Dodson, S. 1993. Chemicals communication in planktonic animals. *Archive de Hydrobiologia*, 129: 129-155.
17. Lavens, P. and Sorgeloos, P. (1996) Manual on the production and use of live food for aquaculture. FAO Fisheries Technical, 295 pp.
18. Lynch, M. 1980. *Aphanizomenon* blooms: Alternate control and cultivation by *Daphnia pulex*. *American Society of Limnology and Oceanography. Special Symposium*, 3: 299-304.
19. Martinez, M.E., Sanches, S., Jimenes, J.M., El Yousfi, F. and Munoz, L. 2000. Nitrogen and phosphorus removal from urban wastewater by the microalgae *Scenedesmus obliquus*. *Bioresource Technology*, 73: 263-272.
20. Martinez, M.R., Chakroff, C.L., Pantastico, J.F., 1975. Direct phytoplankton counting techniques using the haemocytometer. *Philippine Journal of Agriculture*. 55, 43-50.
21. Nichols, H.W. 1973. Growth media – freshwater. In: Stein, J. R. (Editor), *Handbook of Phycological Methods – Culture Methods and Growth Measurements*. Cambridge University Press, Cambridge, p. 7-24.
22. Pomati, F.; Rosseti, C.; Manarolla, G.; Burns, B.P.; Neilan, B.A. 2004. Interactions between intracellular Na⁺ levels and saxitoxin production in *Cylindrospermopsis raciborskii* T3. *Microbiology* 150: 455-461.
23. Reynolds, C.S. 2006. *Ecology of Phytoplankton: Ecology, Biodiversity and Conservation*; Cambridge University Press: New York, NY, USA, 2006; p. 535.
24. Reynolds, C.S., R.L. Oliver, and A.E. Walsby. 1987. Cyanobacterial dominance: The role of buoyancy regulation in dynamic lake environments. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research* 21: 379-390.
25. Sommer, U., Gliwicz, Z.M., Lampert, W. and Duncan, A. 1986. The PEG-model of seasonal succession of planktonic events in fresh waters. *Archiv de Hydrobiologia*, 106: 433-477.
26. SPSS, 2002. *Statistical Package of Social Science*, Version, 11.5. Chicago, IL, USA.
27. Tam, N.F.Y., and Wong, Y.S. (1989) Wastewater nutrient removal by *Chlorella pyrenoidosa* and *Scenedesmus* sp. *Environmental Pollution*, 58: 19-34.
28. Trainor, F.R. 1992. Cyclomorphosis in *Scenedesmus armatus* (Chlorophyta): An ordered sequence of ecomorph development. *Journal of Phycology*, 28: 553-558.
29. Van Donk, E., Lürling, M., Hessen, D.O., and Lokhorst, G.M. 1997. Altered cell morphology in nutrient-deficient phytoplankton and its impact on grazers. *Limnology and Oceanography*, 42: 357-364.
30. Verity, P.G. and Smetacek, V. 1996. Organism life-cycles, predation and the structure of marine pelagic ecosystems. *Marine Ecology Progress Series*, 130: 277-293.
31. Walker, J. B. 1953. Inorganic micronutrient requirements like calcium (or strontium), copper and molybdenum of *Chlorella*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. Vol. 46, pp. 1-11.
32. Walsby, A.E. 1994. Gas vesicles. *Microbiological Review*. 58: 94-144.
33. Wetzel, R.G., Likens, G.E. 1985. *Limnological Analysis*, 2nd ed.; Springer Verlag: New York, NY, USA, p. 391.
34. Wu, J. T. and Kow, L. C. 2010. Alteration of phytoplankton assemblages caused by changes in water hardness in Feitsui Reservoir, Taiwan. *Botanical Studies*. 51: 521-529.
35. Wurts, W.A. and Durborow, R.M. 1992. Interaction of pH, carbon dioxide, alkalinity and hardness in fish pond. *Southern Regional Aquaculture Center*. NO.464.

36. Zar, J.H. 1984. Biostatistical analysis, 2nd edition. Prentice Hall Inc., Englewood Cliffs,

New York, USA, 718 pp.

Effects of Hardness of Culture Medium on Purification and Colony Formation in Green Alga *Scenedesmus quadricauda*

Farhadian O. and Jafari O.

Natural Resources Dept., Isfahan University of Technology, Isfahan, I.R. of Iran

Abstract

In this study effect of different hardness of 0 (control), 200, 400, 600 mg CaCO₃/l of culture medium on purification and colony formation of green alga *Scenedesmus quadricauda* were investigated. Results showed that medium hardness had significant (P<0.05) effect on *S. quadricauda* purification. The cell density range were 144-224 and 402.7-506.7 cells×10³/ml for *S. quadricauda* and 7.1-173 and 5.1-32.8 cells×10³/ml for Cyanobacteria at 1st and 2nd week, respectively. In addition, BBM with different hardness had significant differences (P<0.05) in Cyanobacteria while not differences on *S. quadricauda* population. The Cyanobacteria cells were significantly (P<0.05) decreased at higher BBM hardness (400 and 600 mg/l as CaCO₃) and longer culture duration (two weeks). In addition, at higher BBM hardness the number of colony consisting of 1 cell decreased and multi-cell colonies (colony consisting of 2, 3 and 4 cells) increased; while Cyanobacteria response was significantly decreasing of cell density. Generally, in this study *S. quadricauda* cultures were purified from Cyanobacteria by increasing of culture medium hardness and also its population tends to make multi-cell colony formation that increased algal biomass.

Key words: Hardness, *Scenedesmus quadricauda*, Cyanobacteria, Culture Medium, Algal Purification, Colony Formation