

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

زهرة صیدانلو^{۱*}، علی گنجیان خناری^۲، سیدابراهیم احمدی^۳

^۱ مجتمع شیلاتی تکثیر و پرورش ماهیان خاویاری قره‌برون، ساری، ایران

^۲ گروه پژوهشی شیلات و آلاینده‌های آبی خزر، ساری، ایران

^۳ دانشکده علوم و فنون دریایی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۹۸/۸/۳؛ تاریخ پذیرش: ۹۹/۱/۲۵

چکیده

میکروجلبک سبز سندسموس (*Scenedesmus* sp.) ابتدا به وسیله تور پلانکتون‌گیر با چشمه تور ۲۰ 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 7×10^6 عدد در میلی‌لیتر تلقیح و در سیستم فایکولاب با دمای 25 ± 2 درجه سانتی‌گراد و شدت نور 3500 ± 350 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 ۴۰ 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 کشت‌های TMRL و Z-8+N در ۵ مرحله به‌ترتیب $1/47 \times 10^6 \pm 1/06 \times 10^6$ و $21/70 \times 10^6 \pm 1/39 \times 10^6$ عدد سلول در میلی‌لیتر بدست آمد. کلنی تک سلولی با میانگین ۵۳/۵ درصد و کلنی ۴ 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 ۰/۲۶ 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 ($P=0/009$) و TMRL ($P=0/027$) نشان داد ولی نتایج آزمون من-ویتی اختلاف آماری را در دو محیط کشت نشان نداد ($P=0/065$). 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؛ Z-8+N - TMRL؛ شرایط آزمایشگاهی

مقدمه

خود را از مواد آلی ساخته شده از میکروجلبک‌ها 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

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

*مسئول مکاتبه: seidanlou_z@yahoo.com

رنگدانه اصلی را در ماهیان و مهره‌داران تولید 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 در خصوص آبرزی پروری که اساس تولید را با توجه به عمل فتوسنتز در اکوسیستم‌های آبی ارزیابی می‌نماید، پرورش اقتصادی آبزیان بطور قابل ملاحظه- ای به تولید و استفاده از میکروجلبک‌ها به عنوان 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 گونه‌ای و پراکنش بالا به عنوان یکی از گروه‌های عمده جلبک‌ها محسوب می‌گردند (Bold و همکاران، ۱۹۸۵). میکروجلبک‌ها به لحاظ تغذیه ماهیان منجمله ماهی فیتوفاگ و زئوپلانکتون‌ها حایز اهمیت می‌باشند و همچنین در صنایع مختلف منجمله صنایع غذایی و دارویی، کود سبز (کود بیولوژیک) و بیودیزل (سوخت سبز) استفاده می‌گردند (گنجیان، ۱۳۸۹). صنعت پرورش آبزیان به خصوص 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 به خصوص 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 به راحتی می‌توانند به جای دانه سویا در پرورش کپور نقره‌ای به کار 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، ۱۹۶۸). 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، ۱۹۸۶). 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 محیط کشت‌های آب شور قادر

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 (ماکروالمنت‌هایی مانند کلر C، هیدروژن H، فسفر P، پتاسیم K، سولفور S، کلسیم Ca، آهن Fe، منیزیم 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 7×10^6 عدد سلول در میلی لیتر در آن‌ها تزریق شد و در یک اطاق کشت استریل (سیستم فایکولاب) با دمای 25 ± 2 درجه سانتی‌گراد و با شدت نور 350 ± 350 لوکس و پریود نوری توسط تایمر اتوماتیک به‌صورت تناوب (۱۲/۱۲) L/D 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 به هم 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 ۴۰ و لام نوبار (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

به رشد هستند مثل ساتو، گیلارد، TMRL. در 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، ۱۳۸۶). 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، ۲۰۰۶؛ 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.

Z-8+N به ترتیب برابر با $1/1 \times 10^6$ و $0/7 \times 10^6$ عدد سلول در میلی لیتر، 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 به صورت محسوسی بالاتر از محیط کشت TMRL بوده به نحوی که تعداد جلبک در محیط کشت Z-8+N، برابر $3/2 \times 10^6$ عدد سلول در میلی لیتر بوده است. همچنین ضریب تغییر در محیط کشت TMRL برابر $33/5$ درصد و در محیط کشت Z-8+N برابر $12/7$ درصد بود.

در سومین شمارش (روز ششم)، در محیط کشت TMRL، تعداد سلول های جلبکی $8/6 \times 10^6$ عدد سلول در میلی لیتر بوده در حالی که در محیط کشت Z-8+N، تعداد سلول ها به طور فزاینده ای افزایش یافته و برابر با $15/1 \times 10^6$ عدد سلول در میلی لیتر بوده است. ضریب تغییرات در دو محیط کشت TMRL و Z-8+N به ترتیب برابر با $28/9$ و $7/6$ درصد می باشد. اختلاف محسوس ضریب تغییر بین دو محیط کشت، نشان دهنده اختلاف بین تیمارها بوده و درصد ضریب تغییر هرچقدر بالاتر باشد نشان دهنده اختلاف آماری بیشتر در بین تیمارهاست. در چهارمین شمارش (روز هشتم)، تعداد سلول های محیط کشت TMRL و Z-8+N به ترتیب $8/3 \times 10^6$ و $35/5 \times 10^6$ عدد سلول در میلی لیتر بود. ضریب تغییر در دو محیط کشت Z-8+N و TMRL به ترتیب $9/6$ و $6/5$ درصد می باشد. در پنجمین شمارش (روز دهم) ضریب تغییرات در دو محیط کشت TMRL و Z-8+N به ترتیب برابر $32/3$ و $5/6$ درصد بود. تعداد سلول ها در دو محیط کشت TMRL و Z-8+N در پنجمین شمارش به ترتیب برابر با $9/1 \times 10^6$ و $50/8 \times 10^6$ عدد سلول در میلی لیتر بودند. همان طور که از نتایج

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

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

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

که $W2 =$ تعداد آخرین روز - $W1 =$ تعداد اولین روز - $T1 =$ اولین روز و $T2 =$ آخرین روز (مسهودی اصیل و همکاران، ۱۳۸۸).

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

$$K = \frac{\ln Nt - \ln N0}{t}$$

$K =$ نرخ رشد

$N0 =$ تعداد سلول های اولیه در زمان شروع آزمایش

$t =$ زمان (روزها)

$Nt =$ تعداد سلولها در زمان t

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

از آزمون های t تست، کروسکال -والیس و من -ویننی جهت تجزیه و تحلیل های آماری استفاده شد (خاتمی، ۱۳۸۲).

نتایج

میزان رشد و تراکم سلولی جلبک سبز سندسموس در محیط کشت های 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 نمونه ها انجام شد. در اولین شمارش (روز دوم)، تعداد سلول ها در محیط کشت های TMRL و

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 به میزان 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 به دست آمد.

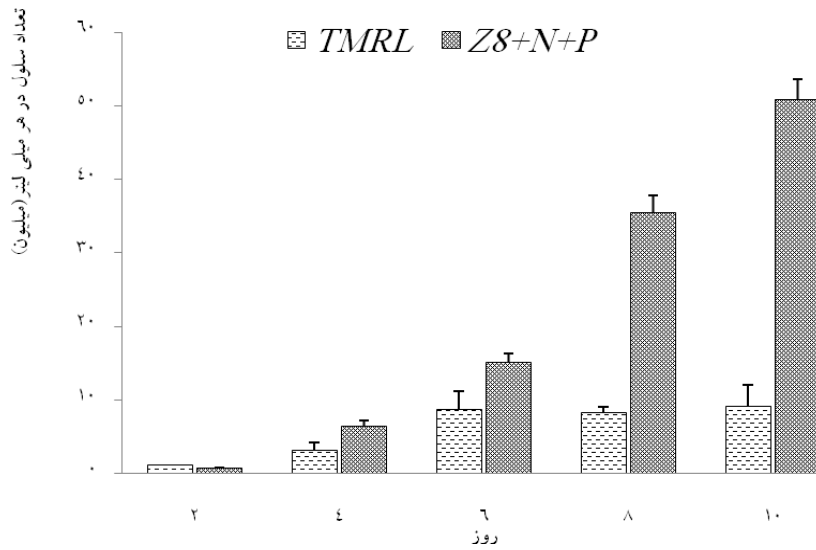
پیداست سرعت رشد میکروجلبک سندسموس در محیط کشت Z-8+N در آخرین روز شمارش، ۵ برابر محیط کشت TMRL بوده است. همچنین میانگین مجموع شمارش‌ها در محیط کشت TMRL برابر $۲/۲ \times ۱۰^۶$ و در محیط کشت Z-8+N برابر $۶/۱ \times ۱۰^۶$ بود. در نتیجه سرعت رشد میکروجلبک سندسموس

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

روز	انحراف معیار \pm میانگین (حداکثر - حداقل)		انحراف معیار \pm میانگین (حداکثر - حداقل)	
	Z-8+N	TMRL	Z-8+N	TMRL
۲	۷/۰	۵/۲	۷۴۲۰۰۰ \pm ۵۲۰۰۰ ۷۰۰۰۰۰-۸۰۰۰۰۰	۱۱۰۸۰۰۰ \pm ۵۸۰۰۰ ۱۰۷۵۰۰۰-۱۱۷۵۰۰۰
۴	۱۲/۷	۳۳/۵	۶۳۷۵۰۰۰ \pm ۸۱۳۰۰۰ ۵۵۷۵۰۰۰-۷۲۰۰۰۰۰	۳۲۲۵۰۰۰ \pm ۱۰۸۲۰۰۰ ۲۴۰۰۰۰۰-۴۴۵۰۰۰۰
۶	۷/۶	۲۸/۹	۱۵۱۶۷۰۰۰ \pm ۱۱۵۵۰۰۰ ۱۴۵۰۰۰۰۰-۱۶۵۰۰۰۰۰	۸۶۶۷۰۰۰ \pm ۲۵۰۴۰۰۰ ۶۲۵۰۰۰۰-۱۱۲۵۰۰۰۰
۸	۶/۵	۹/۶	۳۵۵۰۰۰۰۰ \pm ۲۲۹۱۰۰۰ ۳۳۵۰۰۰۰۰-۳۸۰۰۰۰۰۰	۸۳۳۳۰۰۰ \pm ۸۰۴۰۰۰ ۷۷۵۰۰۰۰-۹۲۵۰۰۰۰
۱۰	۵/۶	۳۲/۳	۵۰۸۳۳۰۰۰ \pm ۲۸۴۳۰۰۰ ۴۸۵۰۰۰۰۰-۵۴۰۰۰۰۰۰	۹۰۸۳۰۰۰ \pm ۲۹۳۰۰۰۰ ۵۷۵۰۰۰۰۰-۱۱۲۵۰۰۰۰
مجموع	۸۹/۶	۶۱/۲	۲۱۷۲۳۰۰۰ \pm ۱۹۴۵۴۰۰۰ ۷۰۰۰۰۰۰-۵۴۰۰۰۰۰۰	۶۰۸۳۰۰۰ \pm ۳۷۲۶۰۰۰ ۱۰۷۵۰۰۰۰-۱۱۲۵۰۰۰۰

برای محیط کشت‌های TMRL و Z-8+N به ترتیب از ۱/۱ میلیون و ۷۴/۰ 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).

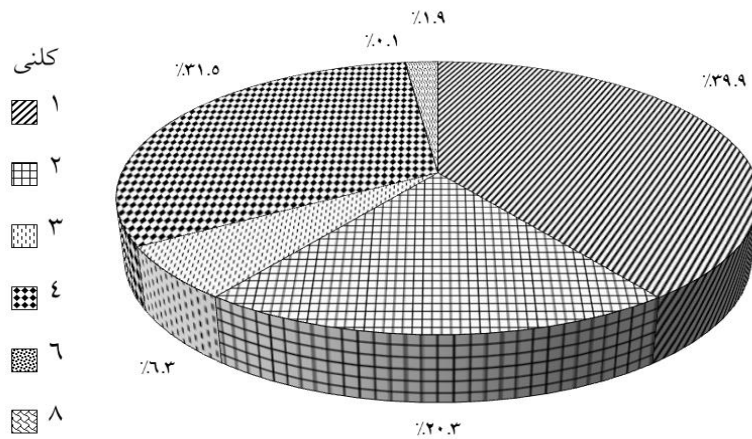
فراوانی کل میکروجلبک سندسموس در ۱۰ روز شمارش به تفکیک روزها برای محیط کشت‌های TMRL و Z-8+N در شکل ۱ آمده است. این شکل به نوعی نشان‌دهنده سرعت تکثیر جلبک در این محیط کشت‌ها می‌باشد، به طوری که تعداد سلول‌های جلبکی



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

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، ۸ سلولی و ۶ سلولی به ترتیب در رتبه‌های بعدی به ترتیب با تعداد ۶/۳، ۱/۹ و ۰/۱ درصد مشاهده شدند.

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 ۴ سلولی به تعداد ۵/۳۱ درصد

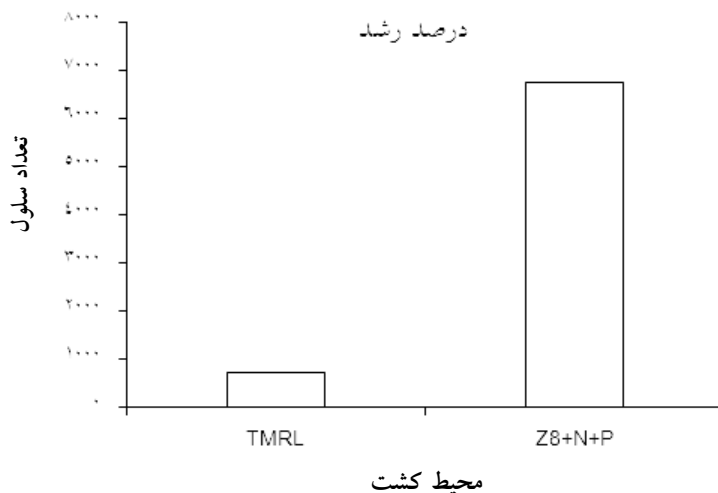


شکل ۲- میانگین فراوانی کلنی‌های میکروجلبک سندسموس در مجموع دو محیط کشت بر حسب درصد.

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

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

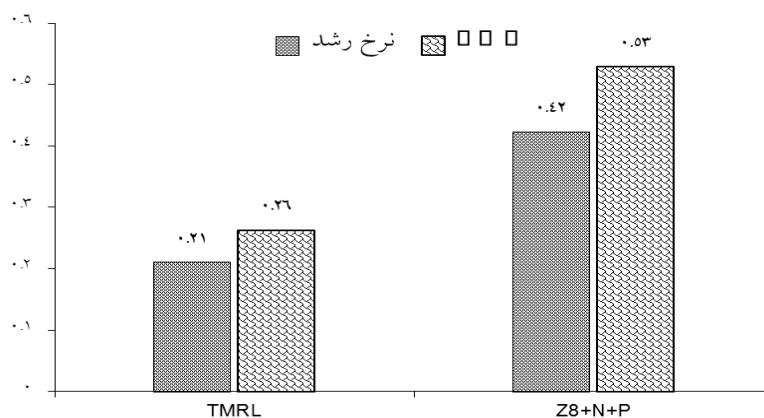
TMRL از اولین شمارش تا آخرین شمارش برابر با ۷۲۰ درصد می‌باشد. البته این مقیاس در فواصل شمارش‌های سوم تا چهارم به صورت منفی درآمد، اما درصد رشد در محیط کشت Z-8+N بسیار بالاتر از محیط کشت TMRL بوده و برابر ۶۷۵۰ درصد بوده است.



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

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 ۴ نتایج نرخ رشد و ضریب رشد ویژه میکروجلبک سندسموس در دو محیط کشت TMRL و Z-8+N به صورت ستونی نشان داده شده است.

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



شکل ۴- مقایسه نرخ رشد و ضریب رشد لحظه‌ای میکروجلبک سندسموس در دو محیط کشت TMRL و Z-8+N

سندسموس در محیط کشت‌های TMRL و Z-8+N بیانگر اختلاف معنی‌دار بین دو محیط کشت مذکور

نتایج حاصل از تحلیل‌های t تست به منظور مقایسه میانگین تعداد سلول‌های میکروجلبک

يابد، تغييرات قابل ملاحظه‌اي در رنگ محيط كشت به وجود آمده و به رنگ سبز پررنگ نزديك مي‌شود ولي در محيط TMRL وقتي به فاز ساكن رشد رسيد، تغييرات قابل مشاهده‌اي در رنگ محيط كشت پديد نمي‌آيد. يكي از عناصر بسيار با ارزشي كه در محيط Z-8+N باعث رشد سريع ميكروجلبك سندسموس شده است عنصر منيزيم است. منيزيم ماده تشكيل دهنده كلروفيل مي‌باشد. به‌طور قطعي نياز بيشتري پيگمان‌ها به اين عنصر وجود دارد. نيازي كه جلبك‌ها به منيزيم دارند بيش از نياز آن‌ها به كلسيم است، چون فقدان منيزيم مانع تقسيم سلولي مي‌شود (Round, 1975). منيزيم بخشي از كلروفيل a، ريبوزوم و كروموزوم است (Borowitzka, 1988). عناصر كبرن، اكسيژن، هيدروژن، نيتروژن، فسفر، پتاسيم، منيزيم، گوگرد و آهن عمده‌ترين عناصر شيميايي در رشد جلبك كلرلا و سندسموس هستند (Krauss, 1958). منيزيم همچنين در بسياري از واكنش‌هاي آنزيمي لازم است (Wyn و همكاران، 1983). ميزان اپتيمم منيزيم براي رشد جلبك‌ها در محيط Z-8+N، 0/1 ميلي‌گرم در ليتر است و بالاتر از آن نقش بازدارنده دارد (فلاحی و همكاران، 1385). همچنين طی تحقیقات مسعودی اصیل و همكاران در سال 1388 مقدار SGR برای جلبك نانوكلروپسيس در شوری 25ppt برابر 0/56 و در شوری 35ppt برابر 0/50 بود. اما در اين پروژه ميزان SGR برای جلبك سندسموس در محيط Z-8+N برابر 0/52 و برای محيط TMRL برابر 0/26 است. با مقايسه اين پارامترها نتيجه مي‌گيريم كه ميزان رشد و نرخ رشد جمعيت نسبت به جمعيت اوليه در محيط Z-8+N بالاتر است. اين اختلاف مي‌تواند ناشی از تركيبات موجود در محيط كشت Z-8+N بوده كه از نظر ماكروالمان‌ها و ميكروالمان‌ها غنی‌تر از محيط كشت TMRL می‌باشند.

می‌باشد (P=0/008). نتایج آزمون ناپارامتریک کروسکال-والیس اختلاف معنی‌داری را در محیط کشت‌های Z-8+N (P=0/009, X²=13/52) و TMRL (P=0/027, X²=10/95) نشان داد ولی آزمون من-ویتنی اختلاف معنی‌داری را بین دو محیط کشت نشان نداد (P> 0/065).

بحث

در طی تحقیقی كه معصومی و همكاران در سال 1386 بر روی رشد جلبك *Tetraselmis suecica* در محيط كشت‌های مختلف TMRL و با رژیم‌های نوری متفاوت انجام دادند به اين نتيجه رسيدند كه تفاوت آماری معنی‌داری در بین تیمارهای نوری مختلف وجود دارد و با افزایش نور رشد نیز افزایش می‌یابد. در تحقیق حاضر نرخ رشد ميكروجلبك سندسموس در محيط Z-8+N با شدت نور 3500 لوکس برابر 0/53 و محيط TMRL برابر 0/26 بوده است. اما در تحقیق معصومی و همكاران نرخ رشد ميكروجلبك تتراسالمیس در محيط كشت TMRL در نور 500 لوکس 0/43، نور 1500 لوکس 0/75 و در نور 2500 لوکس برابر 0/98 محاسبه شده است. می‌توان نتیجه گرفت كه علاوه بر نوع محيط كشت، شدت نور نیز در ميزان نرخ رشد جلبك تتراسالمیس تاثیر بسزایی دارد.

در تحقیقی كه توسط Knuckey و همكاران در سال 2002 انجام شد نرخ رشد گونه‌های دياتومه آب‌های استرالیا كه با روش‌های آگار، سانتریفیوژ و ميكروپیت جدا شدند، بین 0/55 تا 2/04 در روز به‌دست آمد كه نسبت به محيط TMRL بسیار بيشتري و نسبت به محيط Z-8+N تقريباً مشابه بوده است. البته جلبك سندسموس نرخ رشد كمتری نسبت به دياتومه‌ها دارا می‌باشد. در تحقیق حاضر مشاهده شد هر چه تعداد ميكروجلبك‌ها در روزهای مختلف افزایش می‌-

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 نیتрат و آمونیوم) در شرایط آزمایشگاهی انجام گردید. بالاترین تراکم سلول جلبکی $۳۲/۵ \times ۱۰^۵$ عدد سلول در میلی‌لیتر برای نیترات و $۲۵/۲ \times ۱۰^۵$ عدد سلول در میلی‌لیتر برای آمونیوم بود و در مطالعه حاضر بیشترین تراکم سلولی در محیط کشت Z+8+N و به‌میزان $۵۰/۸ \times ۱۰^۶$ و در محیط کشت TMRL به میزان $۹/۱ \times ۱۰^۶$ عدد سلول در میلی‌لیتر 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 می‌باشد. در محیط کشت Z+8+N تراکم سلولی از اولین روز تا آخرین روز شمارش رو به افزایش بود 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 به صورت منفی شود.

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 به صورت 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

تک سلولی و در اولین شمارش به میزان ۵۶ 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 نیترا و آمونیوم از ویژگی‌های جلبک سبز *Scenedesmus quadricauda* بود. در تحقیق حاضر نیز به علت 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 آبی پروری مخصوصاً 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 به صرفه نبود. نتایج حاصل از میزان رشد سلول نشان می‌دهد که محیط کشت Z-8+N نسبت به محیط کشت TMRL دارای برتری می‌باشد. در میکرو جلبک سندسموس نیز ممکن است به علت وجود یون آمونیوم در محیط کشت Z-8+N و این که 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 معنی دار می‌باشد.

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

علاوه بر تاثیرات منابع نیتروژن دار 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 نیترا، درصدی از سلول‌ها در جمعیت (حدود ۱۰-۵ درصد) به صورت سلول‌های ۴ تایی و به ندرت به صورت 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، ۶ 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 ۶ 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 ۶ سلولی بود. در محیط کشت Z-8+N بیشترین میانگین فراوانی کلنی طی ۱۰ روز شمارش مربوط به کلنی ۴ 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 ۶ سلولی و در اولین شمارش به میزان ۲ درصد بود. در محیط کشت Z-8+N بیشترین نسبت کلنی مربوط به

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 ۶۴، شماره ۱. صفحات ۲۹ تا ۴۰.
۲. خان‌محمدی، ا. ۱۳۸۸. کشت و پرورش میکروآلگ‌ها. دانشکده علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری. صفحات ۶۱۵-۶۱۸.
۳. فلاحی، م.، پیری، ح.، رمضان، 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.
۴. فلاحی، م.، عابدیان کناری، ع.، و احمدی‌فرد، ن. ۱۳۸۷. اثر غلظت‌های مختلف جلبک سبز *Chlorella sp.* بر رشد و ترکیب اسیدهای چرب روتیفر آب شیرین *Brachionus calyciflorus* 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.
۶. کیان مهر، ه. 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 ۶۱ تا ۷۲.
۹. مسعودی اصیل، ش.، و اسماعیلی فریدونی، ا. ۱۳۸۸. اثر سطوح مختلف شوری بر رشد میکرو جلبک نانو کلروپیسس. دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی ساری. صفحات ۵۲-۵۶.
۱۰. معصومی، ز.، یآوری، و.، کوچین، پ.، سواری، ا. ۱۳۸۶. بررسی تاثیر رژیم نوری بر رشد میکرو جلبک *Tetraselmis suecica* در محیط کشت‌های ویتامینه و فاقد ویتامین. مجله پژوهش و سازندگی، شماره ۷۴. 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 laboratory 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 2(2).
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.

The survey of Microalgae (*Scenedesmus* Sp.) growth within the different medium (TMRL and Z-8+N) culture in Indoor lab condition

Z. Seydanlou^{1*}, A. Ganjian Khanari², S.E. Ahmadi³

¹ Gharahboroun Fisheries Complex of Sturgeon Fish Culture, Sari, Iran

² Dept. of Fisheries and Sea Water Pollutants, Sari, Iran

³ Faculty of Marine Science and Technology, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Abstract

At first microalgae (*Scenedesmus* sp.) was collected by plankton net (20 microns), samples from Khazarabad area (This research was performed by Caspian research group of fisheries and water pollutants). Samples were transferred into laboratory, isolated and purification by Pipette Pasture method. After the medium culture was made, the stoke of above green algae with primary culture density (7×10^6 cells/ml) was inoculated to medium culture at 25 ± 2 temperature and 3500 ± 350 LUX light density. This experiment was carried out for the study of growth. In this experiment, it was taken account 2 treatments and 3 replicates. The observation microalga was carried out by light microscope (40X). The tool of counting was utilized by Hemcytometer slide (for five grade samples counting). In addition the number of colony was separately counted. The average counting of colony in medium culture (TMRL&Z-8+N) constitutes five stage which were obtained $6.06 \times 10^6 \pm 1.47 \times 10^6$ and $21.70 \times 10^6 \pm 1.39 \times 10^6$, respectively. The average of single-cell colony with 53.5% and for cell colonies with 39.7% have the most colony growth that was attributed to TMRL and Z-8+N, respectively. The growth rate and growth coefficient was specially measured. These indices in TMRL & Z-8+N were 0.52 and 0.26, respectively. For comparison, the growth value of above algae was used nonparametric Kroskal-wallis test for total counting, as it showed that there is significant difference from first to five counting in Z-8+N ($P=0.009$) and TMRL($P=0.027$). But the test of Mann-Whitney had no significant difference about 2 medium cultures ($P=0.065$). Generally, the comparison of 2 medium cultures was shown that the efficacy of Z-8+N medium culture was higher than TMRL medium culture for microalgae growth *Scenedesmus* in laboratory condition.

Keywords: *Scenedesmus*, TMRL, Z-8+N, Indoor culture.

*Corresponding author; Seidanlou_z@yahoo.com