

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

زهرة سیدانلو<sup>۱\*</sup>، علی گنجیان خناری<sup>۲</sup>، افشین قلیچی<sup>۳</sup> و سیدابراهیم احمدی<sup>۴</sup>

<sup>۱</sup> دانشجوی دوره دکتری تکثیر و پرورش آبزیان، واحد آژادشهر، دانشگاه آزاد اسلامی، آژادشهر، ایران

<sup>۲</sup> گروه پژوهشی شیلات و آلاینده‌های آبی خزر، ساری، ایران

<sup>۳</sup> گروه شیلات، واحد آژادشهر، دانشگاه آزاد اسلامی، آژادشهر، ایران

<sup>۴</sup> 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  $7 \times 10^6$  عدد در میلی‌لیتر تلقیح و در سیستم فایکولاب با دمای  $25 \pm 2$  درجه سانتی‌گراد و شدت نور  $3500 \pm 350$  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  $1/39 \times 10^6 \pm 1/70 \times 10^6$  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-ویتنی 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؛ TMRL - Z-8+N؛ شرایط آزمایشگاهی

### مقدمه

می‌دهند و تمام حلقه‌های بالاتر شبکه غذایی انرژی 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

میکروجلبک‌ها، گیاهان شناور یا به فیتوپلانکتون‌هایی اطلاق می‌گردد که غذای آغازین همه جانوران را در اکوسیستم‌های آبی تشکیل

\*مسئول مکاتبه: seidanlou\_z@yahoo.com

ضروری می‌باشند. همچنین میکروجلبک‌ها پیگمان یا 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 آبی‌پروری 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 به‌کار گرفته شوند (Venkataraman، ۱۹۸۵). آزمایش‌هایی با مقادیر مختلف پروتئین در مدت ۱۳۲ روز انجام شد و نشان داد که جلبک‌ها را به راحتی می‌توان در قسمتی از جیره غذایی ماهی جایگزین نمود (Venkataraman، ۱۹۸۵). تحقیقات پیرامون مواد غذایی مورد نیاز زئوپلانکتون‌ها از سال ۱۹۹۰ شروع شده است. این تحقیقات ابتدا در مورد گونه‌های جلبکی دریایی انجام گردید (Corner و همکاران، 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

### مواد و روش‌ها

میکروجلبک سبز سندسموس، ابتدا به وسیله 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  $7 \times 10^6$  عدد سلول در میلی لیتر در آن‌ها تزریق شد و در یک اطاق کشت استریل (سیستم فایکولاب) با دمای  $25 \pm 2$  درجه سانتی‌گراد و با شدت نور  $350 \pm 350$  لوکس و پریرود نوری توسط تایمر اتوماتیک به صورت 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 به وسیله 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 نئوبار (شمارش ۵ خانه و ۲ تکرار) شمارش انجام شد. علاوه بر تعداد سلول‌ها، از تعداد کلنی‌ها نیز به صورت مجزا شمارش به عمل آمد. داده‌ها با استفاده از نرم‌افزارهای Excel 2007 و SPSS 18 مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند.

مثل زایندر و برخی در محیط کشت‌های آب شور قادر به رشد هستند مثل ساتو، گیلارد، TMRL. در آزمایشگاه انتخاب محیط کشت، ابتدا باید توجیه اقتصادی داشته باشد از این رو باید به دنبال محیط کشتی باشیم که بتواند محدوده وسیعی از فیتوپلانکتون‌ها را پوشش دهد و برای جمیع فیتوپلانکتون‌های سبز-آبی و سبز کاربرد داشته باشد به همین 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 به وسیله جلبک‌ها تامین می‌شود. در حال حاضر، جلبک‌های تک سلولی به عنوان منبع سوخت حیاتی (Biofuel) و حتی منبع تولید و استخراج انواع آنتی‌بیوتیک‌ها نیز کاربردهای فراوانی یافته‌اند (Katricioğlu 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 به کار گرفته شده و به عنوان یک ماده غذایی در پرورش فیتوپلانکتون‌ها لحاظ می‌گردد، همچنین در محیط کشت فوق می‌توان از مواد مغذی مختلفی مثل کلرید آهن، نترات 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 به دست آوردن بالاترین تراکم سلولی در کمترین زمان ممکن بود.

شمارش از نمونه‌ها انجام شد. در اولين شمارش (روز دوم)، تعداد سلول‌ها در محيط كشت‌هاي TMRL و Z-8+N به ترتيب برابر با  $1/1 \times 10^6$  و  $0/7 \times 10^6$  عدد سلول در ميلي‌ليتر، در حالي كه ضريب تغييرات محيط كشت Z-8+N، ۷ درصد و در محيط كشت TMRL، ۵/۲ درصد بوده است. در دومين شمارش (روز چهارم)، ميزان رشد ميكروجلبك سندسموس در محيط كشت Z-8+N به صورت محسوسي بالاتر از محيط كشت TMRL بوده به نحوي كه تعداد جلبك در محيط كشت Z-8+N، برابر  $3/2 \times 10^6$  عدد سلول در ميلي‌ليتر بوده است. همچنين ضريب تغيير در محيط كشت TMRL برابر  $33/5$  درصد و در محيط كشت Z-8+N برابر  $12/7$  درصد بود.

در سومين شمارش (روز ششم)، در محيط كشت TMRL، تعداد سلول‌هاي جلبكي  $8/6 \times 10^6$  عدد سلول در ميلي‌ليتر بوده در حالي كه در محيط كشت Z-8+N، تعداد سلول‌ها به طور فزاينده‌اي افزايش يافته و برابر با  $15/1 \times 10^6$  عدد سلول در ميلي‌ليتر بوده است. ضريب تغييرات در دو محيط كشت TMRL و Z-8+N به ترتيب برابر با  $28/9$  و  $7/6$  درصد مي‌باشد. اختلاف محسوس ضريب تغيير بين دو محيط كشت، نشان‌دهنده اختلاف بين تيمارها بوده و درصد ضريب تغيير هرچقدر بالاتر باشد نشان‌دهنده اختلاف آماري بيشتري در بين تيمارهاست. در چهارمين شمارش (روز هشتم)، تعداد سلول‌هاي محيط كشت TMRL و Z-8+N به ترتيب  $8/3 \times 10^6$  و  $35/5 \times 10^6$  عدد سلول در ميلي‌ليتر بود. ضريب تغيير در دو محيط كشت Z-8+N و TMRL به ترتيب  $9/6$  و  $6/5$  درصد مي‌باشد. در پنجمين شمارش (روز دهم) ضريب تغييرات در دو محيط كشت TMRL و Z-8+N به ترتيب برابر  $32/3$  و  $5/6$  درصد بود. تعداد سلول‌ها در دو محيط كشت TMRL و Z-8+N در پنجمين

ميانگين، انحراف معيار و ضريب تغييرات: ميانگين، انحراف معيار، حداقل - حداكثر و ضريب تغييرات عددي ميكروجلبك سندسموس در ۱۰ روز شمارش در محيط كشت‌هاي TMRL و Z-8+N محاسبه گرديد تا با داده‌هاي موجود از نرخ رشد جلبك در محيط كشت‌هاي مذكور اطلاع حاصل گردد. ضريب رشد ويژه: براي محاسبه سرعت رشد (ضريب رشد ويژه) Specific Growth Rate (SGR) در روزهاي مختلف از فرمول زير استفاده مي‌كنيم:

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

كه  $W2 =$  تعداد آخرين روز -  $W1 =$  تعداد اولين روز -  $T1 =$  اولين روز و  $T2 =$  آخرين روز (مسعودي اصيل و همكاران، ۱۳۸۸).

نرخ رشد: بامشخص شدن مرحله نهايي، نرخ رشد با استفاده از فرمول زير محاسبه مي‌شود.

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

$K =$  نرخ رشد

$N0 =$  تعداد سلول‌هاي اوليه در زمان شروع آزمايش

$t =$  زمان (روزها)

$Nt =$  تعداد سلولها در زمان  $t$

درصد رشد: محاسبه درصدي افزايش تعداد سلول‌ها از اولين روز تا آخرين روز (فلاحي و همكاران، ۱۳۸۷).

از آزمون‌هاي  $t$  تست، كروسكال - واليس و من - ويتني جهت تجزيه و تحليل‌هاي آماري استفاده شد (خاتمي، ۱۳۸۲).

## نتايج

ميزان رشد و تراكم سلولي جلبك سبز سندسموس در محيط كشت‌هاي TMRL و Z-8+N ظرف مدت ۱۰ روز در شرايط آزمايشگاهي مورد بررسي قرار گرفت. هر دو روز يك بار شمارش از دو محيط كشت صورت گرفت و در مجموع ۵ بار

بود. در نتیجه سرعت رشد میکروجلبک سندسموس در محیط کشت Z-8+N بسیار بیشتر از محیط کشت TMRL بوده و در صورت ادامه شمارش میکروجلبک در محیط کشت Z-8+N، رشد 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.

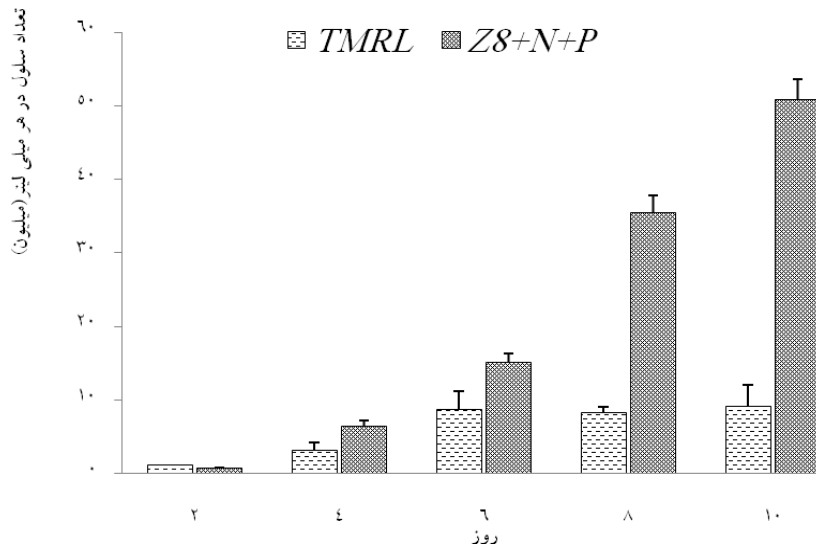
شمارش به ترتیب برابر با  $9/1 \times 10^6$  و  $50/8 \times 10^6$  عدد سلول در میلی‌لیتر بودند. همان‌طور که از نتایج پیداست سرعت رشد میکروجلبک سندسموس در محیط کشت Z-8+N در آخرین روز شمارش، ۵ برابر محیط کشت TMRL بوده است. همچنین میانگین مجموع شمارش‌ها در محیط کشت TMRL برابر  $2/2 \times 10^6$  و در محیط کشت Z-8+N برابر  $6/1 \times 10^6$

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

ضریب تغییرات (C.V %)		انحراف معیار $\pm$ میانگین (حداکثر - حداقل)		روز
Z-8+N	TMRL	Z-8+N	TMRL	
۷/۰	۵/۲	$742000 \pm 52000$	$1108000 \pm 58000$	۲
		$700000 - 800000$	$1075000 - 1175000$	
۱۲/۷	۳۳/۵	$6375000 \pm 813000$	$3225000 \pm 1082000$	۴
		$5575000 - 7200000$	$2400000 - 4450000$	
۷/۶	۲۸/۹	$15167000 \pm 1155000$	$8667000 \pm 2504000$	۶
		$14500000 - 16500000$	$6250000 - 11250000$	
۶/۵	۹/۶	$35500000 \pm 2291000$	$8333000 \pm 804000$	۸
		$33500000 - 38000000$	$7750000 - 9250000$	
۵/۶	۳۲/۳	$50833000 \pm 2843000$	$9083000 \pm 2930000$	۱۰
		$48500000 - 54000000$	$5750000 - 11250000$	
۸۹/۶	۶۱/۲	$21723000 \pm 19454000$	$6083000 \pm 3726000$	مجموع
		$700000 - 54000000$	$1075000 - 11250000$	

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).

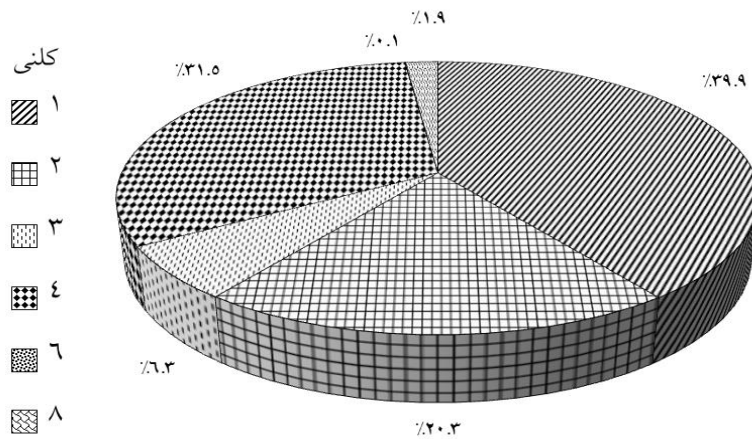
فراوانی کل میکروجلبک سندسموس در ۱۰ روز شمارش به تفکیک روزها برای محیط کشت‌های TMRL و Z-8+N در شکل ۱ آمده است. این شکل به نوعی نشان‌دهنده سرعت تکثیر جلبک در این محیط کشت‌ها می‌باشد، به طوری که تعداد سلول‌های جلبکی



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

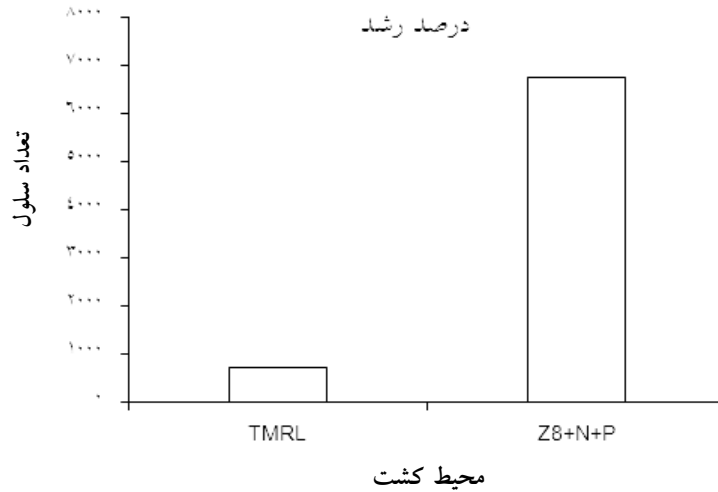


شکل ۲- میانگین فراوانی کلنی‌های میکروجلبک سندسموس در مجموع دو محیط کشت بر حسب درصد.

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

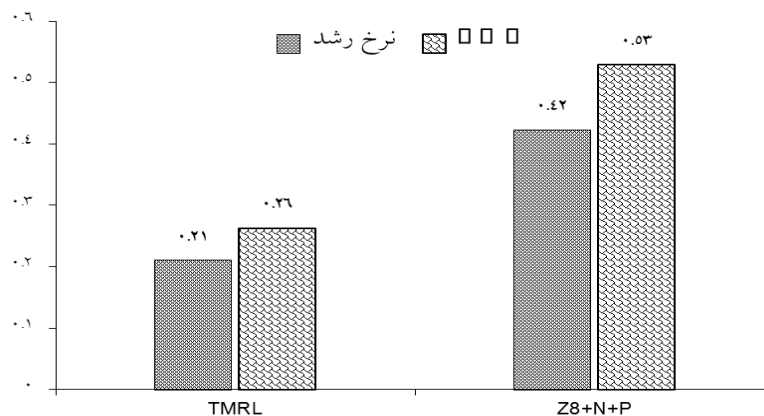
TMRL از اولین شمارش تا آخرین شمارش برابر با ۷۲۰ درصد می‌باشد. البته این مقیاس در فواصل شمارش‌های سوم تا چهارم به صورت منفی درآمد، اما درصد رشد در محیط کشت Z-8+N بسیار بالاتر از محیط کشت TMRL بوده و برابر ۶۷۵۰ درصد بوده است.



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

می باشد ( $P=0/008$ ). نتایج آزمون ناپارامتریک کروسکال-والیس اختلاف معنی داری را در محیط کشت‌های Z-8+N ( $X^2=13/52$ ,  $P=0/009$ ) و TMRL ( $X^2=10/95$ ,  $P=0/027$ ) نشان داد ولی آزمون من-ویتنی اختلاف معنی داری را بین دو محیط کشت نشان نداد ( $P> 0/065$ ).

### بحث

در طی تحقیقی که معصومی و همکاران در سال ۱۳۸۶ بر روی رشد جلبک *Tetraselmis suecica* در محیط کشت‌های مختلف TMRL و با رژیم‌های نوری متفاوت انجام دادند به این نتیجه رسیدند که تفاوت آماری معنی داری در بین تیمارهای نوری مختلف وجود دارد و با افزایش نور رشد نیز افزایش می یابد. در تحقیق حاضر نرخ رشد میکرو جلبک سندسموس در محیط Z-8+N با شدت نور ۳۵۰۰ لوکس برابر ۰/۵۳ و محیط TMRL برابر ۰/۲۶ بوده است. اما در تحقیق معصومی و همکاران نرخ رشد میکرو جلبک تتراسالمیس در محیط کشت TMRL در نور ۵۰۰ لوکس ۰/۴۳، نور ۱۵۰۰ لوکس ۰/۷۵ و در نور ۲۵۰۰ لوکس برابر ۰/۹۸ محاسبه شده است. می توان نتیجه گرفت که علاوه بر نوع محیط کشت، شدت نور نیز در میزان نرخ رشد جلبک تتراسالمیس تاثیر بسزایی دارد.

در تحقیقی که توسط Knuckey و همکاران در سال ۲۰۰۲ انجام شد نرخ رشد گونه‌های دیاتومه آب‌های استرالیا که با روش‌های آگار، سانتریفیوژ و میکروبییت جدا شدند، بین ۰/۵۵ تا ۲/۰۴ در روز به دست آمد که نسبت به محیط TMRL بسیار بیشتر و نسبت به محیط Z-8+N تقریباً مشابه بوده است. البته جلبک سندسموس نرخ رشد کمتری نسبت به دیاتومه ها دارا می باشد. در تحقیق حاضر مشاهده شد هر چه تعداد میکرو جلبک‌ها در روزهای مختلف افزایش می -

یابد، تغییرات قابل ملاحظه‌ای در رنگ محیط کشت به وجود آمده و به رنگ سبز پررنگ نزدیک می شود ولی در محیط TMRL وقتی به فاز ساکن رشد رسید، تغییرات قابل مشاهده‌ای در رنگ محیط کشت پدید نمی آید. یکی از عناصر بسیار با ارزشی که در محیط Z-8+N باعث رشد سریع میکرو جلبک سندسموس شده است عنصر منیزیم است. منیزیم ماده تشکیل دهنده کلروفیل می باشد. به طور قطعی نیاز بیشتر پیگمان‌ها به این عنصر وجود دارد. نیازی که جلبک‌ها به منیزیم دارند بیش از نیاز آن‌ها به کلسیم است، چون فقدان منیزیم مانع تقسیم سلولی می شود (Round, ۱۹۷۵). منیزیم بخشی از کلروفیل a، ریبوزوم و کروموزوم است (Borowitzka, ۱۹۸۸). عناصر کربن، اکسیژن، هیدروژن، نیتروژن، فسفر، پتاسیم، منیزیم، گوگرد و آهن عمده ترین عناصر شیمیایی در رشد جلبک کلرلا و سندسموس هستند (Krauss و ۱۹۵۸). منیزیم همچنین در بسیاری از واکنش‌های آنزیمی لازم است (Wyn و همکاران، ۱۹۸۳). میزان اپتیمم منیزیم برای رشد جلبک‌ها در محیط Z-8+N، ۰/۱ میلی گرم در لیتر است و بالاتر از آن نقش بازدارنده دارد (فلاحی و همکاران، ۱۳۸۵).

همچنین طی تحقیقات مسعودی اصیل و همکاران در سال ۱۳۸۸ مقدار SGR برای جلبک نانوکلوپسیس در شوری ۲۵ppt برابر ۰/۵۶ و در شوری ۳۵ppt برابر ۰/۵۰ بود. اما در این پروژه میزان SGR برای جلبک سندسموس در محیط Z-8+N برابر ۰/۵۲ و برای محیط TMRL برابر ۰/۲۶ است. با مقایسه این پارامترها نتیجه می گیریم که میزان رشد و نرخ رشد جمعیت نسبت به جمعیت اولیه در محیط Z-8+N بالاتر است. این اختلاف می تواند ناشی از ترکیبات موجود در محیط کشت Z-8+N بوده که از نظر ماکروالمان‌ها و میکروالمان‌ها غنی تر از محیط کشت TMRL می باشند.



کشت برای رشد جلبک سبز *Scenedesmus quadricauda* بررسی کردند. پرورش این گونه در محیط کشت BBM (Bold Basals Medium) در ۷ تیمار (۲/۹، ۱۵، ۵۰، ۲۵، ۷۵، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌مولار نیترات و آمونیوم) در شرایط آزمایشگاهی انجام گردید. بالاترین تراکم سلول جلبکی  $۳۲/۵ \times ۱۰^۵$  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 این‌که این یون در محیط کشت TMRL وجود ندارد باعث برتری میزان رشد و تراکم سلولی محیط کشت Z-8+N نسبت به محیط کشت TMRL شده باشد. آزمون کروسکال-والیس نیز نشان داد که در هر دو محیط کشت سرعت رشد لحظه‌ای کمتر از ۰/۰۵ بوده و معنی‌دار می‌باشد.

### 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 نیتروژن‌دار بر رشد و فیزیولوژی جلبک‌ها استفاده از آنها می‌تواند بر مورفولوژی و اندازه جلبک‌ها تاثیرات قابل ملاحظه‌ای داشته باشد. در پژوهش انجام شده توسط حیدری و همکاران (۱۳۹۰)، در زمان شمارش تعداد سلول‌های جلبک در سندسموس در تیمارهای مختلف از 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.، یاور، و.، کوچن، 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. Bielecki (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<sup>1\*</sup>, A. Ganjian Khanari<sup>2</sup>, A. Ghelichi<sup>3</sup> and S.E. Ahmadi<sup>4</sup>**

<sup>1</sup> Ph.D student in Aquaculture, Azadshahr Branch, Islamic Azad University, Azadshahr, Iran

<sup>2</sup> Dept. of Fisheries and Sea Water Pollutants, Sari, Iran

<sup>3</sup> Dept. of Fisheries, Azadshahr Branch, Islamic Azad University, Azadshahr, Iran

<sup>4</sup> 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 ( $7 \times 10^6$  cells/ml) was inoculated to medium culture at  $25 \pm 2$  temperature and  $3500 \pm 350$  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