در
امور دام و آبزیان شماره ۷۴، بهار ۱۳۸۶
پژوهش و سازندگی

بررسی تاثیر رژیم نوری بر رشد میکروجلبک *Tetraselmis suecica* در محیط کشت‌های ویتامینه و فاقد ویتامین

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

تاریخ دریافت: آبان ماه ۱۳۸۳ تاریخ پذیرش: بهمن ماه ۱۳۸۴

Email: Zmasoomi@yahoo.com

چکیده

تأمین محیط کشت مغذی جهت تغذیه میکروجلبک‌ها با هزینه بسیار زیاد همراه است. در این تحقیق اثر سه محیط کشت در سه نور مختلف بر رشد میکروجلبک *Tetraselmis suecica* بررسی شده است. ۹ تیمار هر کدام با سه تکرار شامل۱- محیط کشت TMRL ۲- محیط کشت TMRL و ویتامین‌های موجود در محیط کشت گیلارد ۳- TMRL (TV_1) و ویتامین‌های گروه B (TV_2) و هر کدام درمعرض شدت‌های نوری ۲۵۰۰ lux، ۱۵۰۰، ۵۰۰ قرارگرفتند. کلیه تیمارها دردمای ۲±۴۲ درجه سانتیگراد و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی با پمپ هوادهی شدند. با توجه به نتایج آنالیز واریانس مشخص شده که تفاوت آماری معنی‌داری در بین تیمارهای نوری مختلف وجود دارد و با افزایش نور، رشد نیز افزایش می‌یابد. همچنین وجود اختلاف معنی‌دار در بین محیط کشت‌های مختلف در نور ۱۵۰۰ lux و ۲۵۰۰ lux نشان دهنده تأثیر ویتامین‌ها در این شرایط نوری می‌باشد. به طور کلی بین محیط کشت‌های ویتامینه و محیط کشت بدون ویتامین اختلاف آماری معنی‌داری وجود دارد در حالی‌که بین دو محیط کشت ویتامینه اختلاف آماری معنی‌داری وجود ندارد. لذا توصیه می‌شود با توجه به هزینه کمتر، محیط کشت TMRL و ویتامین‌های گروه B جایگزین محیط کشت TMRL و ویتامین‌های Guillard شود.

کلمات کلیدی: ***Tetrasemis suecica*، نور، محیط کشت، ویتامین، رشد**

Pajouhesh & Sazandegi No 74 pp: 130-139

The effects of light on grow the of *Tetraselmis suecica* in vitamin and non vitamin culture mediums.

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

One of the major draw backs in the live food industry is the high cost of culture medium. In the present research project effect of three types of culture medium in three different ranges of light were studied on growth of *Tetraselmis suecica*. The experimental set upof the project included nine treatments in triplicate of three different culture medium which were studied in three different ranges of light 500,1500,2500 lux. The result obtained showed a significant variation between different treatments of light and that growth has a direct relation with ligth intensity. On the other hand the significant difference was recorded for the culture medium treatments and the results indicates that vitamins have a significant role in the quality of the culture medium. Howevere no significant difference was observed between the usage of Guillard medium vitamins and group B- vitamins.

Keywords: Tetraselmis suecica, Ligt, Culture medium, Vitamin, Growth

مقدمه

در قرن بیستم صید آبزیان از ۴ میلیون تن در سال ۱۹۰۰ میلادی تقریباً به ۱۰۰ میلیون تن در ۱۹۹۵ میلادی رسید که در همین زمان جمعیت جهان از حدود ۱/۶ میلیارد نفر به ۶ میلیارد نفر بالغ گردید .تخمین زده می‌شود که حدود ۶۹٪ از آبزیانی که مصرف خوارکی دارند اگر بیش از میزان فعلی صید شوند نسلشان در معرض انقراض قرار خواهد گرفت (۳). در این میان ظرفیت صنعت صید و صیادی به حداکثر ظرفیت تولید رسیده و پاسخگوی تقاضای جمعیت رو به افزایش جهانی نمی‌باشد. صاحب‌نظران علوم بهره‌برداری از ذخایر آبزی به این نتیجه رسیده‌اند که تنها راه افزایش تولیدات شیلاتی و توسعه پایدار صنعت تکثیر و پرورش آبزیان می‌باشد (۸). امروزه میکروجلبک‌ها در صنایع آبزی پروری جهت پرورش کلیه مراحل لاروی نرم‌تنان، شکم‌پایان، میگوها، ماهی‌ها و زئوپلانکتون‌ها استفاده می‌شود. تغذیه مناسب و تأمین نیازهای غذایی آبزیان نقش اساسی را در دستیابی برنامه‌های تولید انبوه بچه ماهی و میگو و افزایش بازدهی آن بر عهده دارد. 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 بسیار زیادی برخوردار است، زیرا موفقیت در این مرحله رشد را سریع‌تر، سلامت را بهتر و درصد بقاء بیشتر بچه ماهیان را در مراحل بعدی پرورش تضمین می‌کند(۵).

از آنجا که تحرک پذیری، میزان بازماندگی و رشد اکثر آبزیان در دوران لاروی به تامین غذاهای زنده، صد درصد به اثبات رسیده است، لذا شناخت و تهیه این نوع غذاها از طریق تکثیر و پرورش آنها در کارگاه‌های تکثیر و پرورش واجد اهمیت است. جنس تتراسلمیس یکی از جلبک‌هایی است که در آبزی پروری به طور وسیعی در جهان به دلیل توانایی رشد در محدودهٔ وسیعی از شرایط فیزیکی و شیمیایی محیط جهت تغذیه موجودات گیاهخوار دریایی، استفاده می‌شود(۱۶). میکروجلبک *Tetraselmis suecica* به عنوان گونه‌ای که توانایی تحمل شوری در محدودهٔ وسیعی را دارد شناخته شده است (۱۰).

از *Tetraselmis sp* جهت تغذیه پست لارو میگوی خانواده Penaeidae، لارو و همچنین پست لارو نرمتنان دوکفه‌ای، لارو ابالون، لارو روتیفر و لارو آرتمیا به‌کار می‌رود (۱۴). در تحقیقی که توسط تمجیدی در سال ۱۳۸۱ صورت گرفت این جلبک دارای مواد ضد باکتریایی است که از رشد باکتری بیماری‌زای *Vibrio harveyi* جلوگیری می‌کند(۲). *Tetrasemis suecica* دارای ۲۹/۴٪ اسید پالمتیک از کل اسیدهای چرب می‌باشد. همچنین دارای مقادیر قابل توجهی اسید اولئیک، لینولئیک اسید واکتادکاتترالنولئیک می‌باشد (۹). ویتامین‌ها در میان فاکتورهای آلی غذایی برای ادامه رشد گونه‌های فیتوپلانکتونی مورد نیاز می‌باشند. از این ویتامین‌ها سیانوکوبالامین (B_{12})، Thiamin وBiotin را می‌توان نام برد. بعضی از فیتوپلانکتونها کاملاً به منابع خارجی ویتامین‌ها وابسته می‌باشند در حالیکه بقیه قادر به ساختن ویتامین هستند (۱). این ویتامینها به مقدار بسیار کم mol/l 10^{-10} – 10^{-12} به عنوان کوفاکتور برای استفاده ارگانیسم‌هایی که صرفاً رشد اتوتروفیک دارند مورد استفاده قرار می‌گیرد. ویتامین B_{12} شامل یک ساختمان شبه پورفیرین با یک اتم در مرکز است که به چهار حلقه پیرول متصل شده است. ویتامین B_{12} در سلولها به طور عمده‌ای به شکل کوآنزیم است (۱۷). به نظر می‌رسد ویتامین B_{12}، بیشترمورد نیاز جلبک‌های فتوسنتز کننده‌ای است که قادر نیستند ذرات مواد آلی را خود بسازند. تجربیات آزمایشگاهی نشان می‌دهند که بعضی از دیاتومه‌ها در برخی از مقاطع زندگی، احتیاج بیشتری به B_{12} دارند. به عنوان مثال هنگام تشکیل Aouxospore (۱). از دیگر ویتامین‌ها تیامین را می‌توان نام برد که شامل پیرودوکسین و تیازول با یک پل CH_2 است. نیاز به تیامین در Haptophyceae و همچنین در برخی از جلبک‌های سبز درحقیقت برای نیاز به پیریمیدین است(۱۷).

باتوجه به هزینه بالای تولید محیط کشت، می‌توان تغییراتی را در نوع محیط کشت مورد استفاده میکروجلبک‌ها انجام داد که علاوه بر کم کردن هزینه‌های تهیه محیط کشت، راندمان تولید را نیز افزایش داد. علاوه بر این، زمان رسیدن به تراکم مورد نیاز جهت اضافه نمودن کشت جلبکی

به کشت‌های زئوپلانکتون‌ها و یا لاروها، در صنعت غذای زنده از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. زیرا در برخی مواقع بر اثر عدم تولید به موقع میکروجلبک، زئوپلانکتونی که جهت تغذیه لارو و ماهی مورد استفاده قرار می‌گیرد(به عنوان مثال روتیفر) پوست اندازی نموده که بدین ترتیب در این مرحله جهت تغذیه لارو آبزیان قابل استفاده نبوده و یا دارای کیفیت مناسبی نمی‌باشد. لذا بررسی شرایط بهینه در این زمینه جهت افزایش تولید ضروری به نظر می‌رسد. در این تحقیق سعی شده است تا با جایگزین نمودن محیط کشتهای مغذی و در عین حال نیز ارزان قیمت، علاوه بر افزایش تولید، هزینه‌های ناشی از تهیه محیط کشت‌ها را تا میزان قابل ملاحظه‌ای کمتر کرد.

مواد و روش‌ها

جهت بررسی اثرات نور نرخ رشد میکروجلبک *Tetrasemis suecica* درسه شدت نوری و سه محیط کشت در نظر گرفته شد. تیمارهای نوری شامل مقادیر lux ۲۵۶۷، ۱۵۲۲، ۵۱۱ (به طور تقریب lux ۲۵۰۰، ۱۵۰۰، ۵۰۰) می‌باشد . در هر تیمار نوری نیز سه محیط کشت ، ۱- محیط کشت TMRL ۲- محیط کشت TMRL و ویتامین‌های موجود در محیط کشت گیلارد (TV_1) ۳ محیط کشت TMRL و ویتامین‌های گروه B (TV_2) مورد آزمایش قرار گرفتند. تلقیح نمونه‌ها در محیط کاملاً استریل و به نسبت ٪۱۰ استوک جلبکی در ٪۹۰ محیط کشت انجام گردید. کلیه تیمارها دردمای ۲±۲۴ درجه سانتی‌گراد و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی به وسیله پمپ آکواریومی HAILEA مدل Aco-۲۲۰۵ هوادهی شدند. برای هر تیمار سه تکرار در نظر گرفته شد که در شرایط نوری مختلف در قفسه‌ها به طور تصادفی و پراکنده قرار گرفتند.

مقدار و شکل ویتامین‌های مورد استفاده

جهت تعیین تاثیر ویتامین‌ها بر رشد میکرو جلبک *Tetraselmis suecica* از محیط کشت TMRL (محیط کشت نسبتاً ساده) استفاده شد. به این محیط کشت دو محلول ویتامینه اضافه گردید ۱- ویتامین‌های مورد استفاده در محیط کشت گیلارد (TV_1) ۲- ویتامین‌های گروه B (TV_2) ویتامین‌های مورد استفاده در استوک محلول اولیهٔ ویتامین‌های گیلارد TV_1 ، ۲۰ گرم تیامین، ۰/۱ گرم بیوتین و ۰/۱ گرم B_{12} می‌باشد که این مقادیر را در یک لیتر آب مقطر حل کرده، سپس ۵ میلی‌لیتر از این اتوک اولیه به ۱ لیتر آب مقطر اضافه می‌شود(استوک ثانویه). سپس به هر لیتر محیط کشت ۱ میلی لیتر از استوک ثانویهٔ ویتامینه اضافه می‌شود(۱۴). از آنجا که تهیه ویتامین‌های مورد استفاده درمحیط کشت گیلارد نیز با صرف هزینه زیادی همراه است لذا جهت کاهش هزینه‌ها از ویتامین‌های موجود در داروخانه استفاده شد. ویتامین‌های گروه B به سه شکل قرص، شربت و آمپول در داروخانه‌ها وجود دارند. طبق تحقیقات به عمل آمده مشخص گردید که این ویتامین‌ها به شکل قرص و شربت حاوی مقادیر ذیل می‌باشند. این مقادیر در یک قرص B complex و در هر ۵ میلی‌لیتر شربت B complex موجود می‌باشند.

Thiamin ۵mg

B_2 Rhiboflavin ۲mg

B_6 Pyrodoxin ۲mg

B_3 Nicotinamid ۲۰mg

مقادیرذیل در یک آمپول B complex وجود دارند.

B_1 Thiamin ۱۰mg

B_2 Rhiboflavin ۴mg

B_6 Pyrodoxin ۴mg

B_3 Nicotinamid ۴۰mg

B_{12} ۸mμg

همانگونه که مشاهده میگردد مقادیر ویتامین‌ها در ۱ میلی‌لیتر آمپول B complex دو برابر ویتامین‌های موجود در هر قرص و هر ۵cc شربت می‌باشند. از طرفی آمپول B complex علاوه بر ویتامین‌های B_6، B_3، B_2، B_1 دارای ویتامین B_{12} نیز می‌باشد که قرص و شربت فاقد این ویتامین‌ها می‌باشند زیرا قابلیت تبدیل این ویتامین به شکل قرص موجود نمی‌باشد. از طرف دیگر در شربت B complex نیز علاوه بر ویتامین‌های فوق‌الذکر مقداری مواد قندی دیگر نیز افزوده شده است. این مواد رشد تیمارهای مورد آزمایش را نیز تحت تأثیر قرار می‌دهد. لذا با توجه به مقادیر ویتامین‌های خانواده B complex و نیز لزوم استفاده از منابع عاری از هر گونه مواد قندی و یا پروتئینی دیگر در تیمارهای مورد استفاده، از یک آمپول B complex و نیز یک آمپول ویتامین B_{12}استفاده گردید(۶).

در محلول ویتامینه دوم(TV_2) ۱ آمپول B complex که شامل ۲ میلی‌لیتر محلول ویتامینه است همراه با ۱ آمپول B_{12} که شامل ۱ میلی‌لیتر محلول ویتامینه است به ۱ لیتر آب مقطر اضافه می‌شود. سپس ۱ میلی‌لیتر از این استوک ویتامینه، به ۱ لیتر محیط کشت مورد استفاده اضافه می‌گردد.

شمارش، نرخ رشد و تجزیه تحلیل آماری

شمارش به وسیله لام هموسیتومتر روزانه با سه تکرار انجام شد(۱۱). همچنین با مشخص شدن مرحله نمایی[1]، نرخ رشد[2] با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد.

$$K= \ln N_t - \ln N_0 / t$$

نرخ رشد = K

شروع آزمایش تعداد سلول‌های اولیه در زمان=N_o

(روزها) زمان= T

تعداد سلولها در زمان Nt= t

بر روی کلیه اطلاعات حاصل از اندازه‌گیریهای مختلف محاسبات آماری لازم با استفاده از برنامه‌های نرم افزاری EXCEL و SPSS انجام شد. برای رسم جداول از نرم افزار Word و برای رسم نمودارها از نرم افزار EXCEL استفاده گردید. جهت آنالیز آماری داده‌های مربوط به فاکتورهای بیولوژیکی و فیزیکوشیمیایی از آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) استفاده شد. برای پی بردن به این نکته که تفاوت آماری موجود در بین کدام دسته از گروه‌های مورد مطالعه می‌باشد از آزمون دنباله‌ای در هنگام تحلیل واریانس استفاده می‌شود از جمله این آزمون‌ها، آزمون LSD (Least Significant Difference) یا کمترین اختلاف معنی‌دار می‌باشد که در زمانی که تعداد نمونه‌ها نسبتاً محدود (۴۰-۲۰) میباشند کاربرد فراوانی دارند. لذا برای مقایسه و بررسی فاکتورهای بیولوژیکی و فیزیکوشیمیایی از آزمون

جدول ۱ : مقایسه حداکثر میزان تراکم سلولی Cell/ml در تیمارهای مختلف و مقایسه زمان رسیدن به حداکثر تراکم سلولی Cell/ml.

روز	تراکم Cell/ml	نور lux	محیط کشت	شرایط تیمار
۱۵	۴۲۱×۱۰^{۴}	۵۰۰	TMRL	۱
۱۳	۵۳۷/۵×۱۰^{۴}	۵۰۰	$TV_{۱}$	۲
۱۴	۵۰۴×۱۰^{۴}	۵۰۰	$TV_{۲}$	۳
۷	۳۴۰×۱۰^{۴}	۱۵۰۰	TMRL	۴
۸	۶۸۰×۱۰^{۴}	۱۵۰۰	$TV_{۱}$	۵
۹	۶۷۰×۱۰^{۴}	۱۵۰۰	$TV_{۲}$	۶
۹	۶۷۸×۱۰^{۴}	۲۵۰۰	TMRL	۷
۷	۱۱۰۸×۱۰^{۴}	۲۵۰۰	$TV_{۱}$	۸
۷	۹۸۷/۶×۱۰^{۴}	۲۵۰۰	$TV_{۲}$	۹

$TV_{۱}$: محیطکشت TMRL و ویتامین‌های گیلارد TV۲: محیط کشت TMRLو ویتامین‌های گروه B

LSD استفاده گردید.

نتایج

چنانچه در جدول ۱ مشاهده می‌شود با افزایش شدت نور زمان رسیدن به حداکثر تراکم کاهش می‌یابد. با توجه به مقایسه محیط کشت‌های مختلف در شدت نورهای یکسان به نظر می‌رسد که زمان رسیدن به حداکثر ظرفیت محیط(اتمام فاز رشد نهایی) از رابطه خاصی در محیط کشت‌های ذکر شده پیروی نمی‌کند. همچنین تراکم سلولی نیز با افزایش شدت نور، به طور محسوسی افزایش می‌یابد. کمترین تراکم سلولی در محیط کشت TMRL در نور cell/ml ۱۵۰۰lux) (۳۴۰×۱۰^{۴} و بیشترین تراکم سلولی cell/ml ۱۱۰۸×۱۰^{۴}و بیشترین نرخ رشد و $d^{-۱}$ ۱/۲۱ در تیمار محیط کشت TMRL و ویتامین‌های گیلارد و در نور lux ۲۵۰۰ بوده است . آنالیز واریانس یک طرفه در مقایسه تراکم سلولی در محیط کشت‌های مختلف در نور lux ۵۰۰ نشان میدهد که تفاوت آماری معنی‌داری بین محیط کشت‌های ذکر شده مشاهده نمی‌شود. در حقیقت ویتامین در این شرایط تأثیری را بر رشد اعمال نمی‌کند درحالیکه در نور lux ۱۵۰۰ و lux ۲۵۰۰ بین محیط کشت‌های مختلف اختلاف آماری معنی‌داری وجود دارد. با استفاده از آزمون LSD مشاهده می‌شود در تیمارهای نوری مذکور بین محیط کشت TMRL (T) و TMRL و ویتامین‌های گیلارد ($TV_{۱}$) ، همچنین بین محیط کشت‌های TMRL (T) و محیط کشت TMRL ویتامین‌های گروه B ($TV_{۲}$) اختلاف آماری معنی‌داری وجود دارد. در حالی‌که بین محیط کشت‌های TMRL و ویتامین‌های گیلارد ($TV_{۱}$) همچنین TMRL و ویتامین‌های گروه B ($TV_{۲}$) اختلاف آماری معنی‌داری‌وجودندارد(جداول ۳-۲).

به طور کلی تأثیر محیط کشت‌های مختلف بر رشد میکروجلبک تتراسلمیس در جدول شماره ۴ ارائه شده است. چنانچه مشاهده می‌شود بین محیط کشت بدون ویتامین و دو محیط کشت ویتامینه تفاوت معنی‌داری وجود دارد در حالی‌که بین دو محیط کشت ویتامینه تفاوت آماری معنی‌داری مشاهده نمی‌شود. رشد میکروجلبک در محیط کشت‌های مختلف در تیمارهای نوری lux ۲۵۰۰، ۱۵۰۰ ، ۵۰۰ در نمودارهای ۳-۱ نشان داده شده است. نتایج آنالیز واریانس یکطرفه میانگین تراکم سلولی در نورهای مختلف(جدول ۵) نشان می‌دهد که بین کلیه تیمارهای مذکور اختلاف آماری معنی‌داری وجود دارد. در حقیقت افزایش نور باعث افزایش رشد جلبک تتراسلمیس می‌شود.

در جداول ۶، ۷ و ۸ اثر شدت‌های نوری مختلف هر یک ازآنها در محیط کشتها ارائه شده است. نمودارهای ۶-۴ نیز تفاوت تیمارهای نوری را در هر یک از محیط کشتها نشان می‌دهد. (در کلیه نمودارها log تراکم سلولی محاسبه شده است). در جدول۹ نیز نرخ رشد این میکروجلبک در کلیه تیمارهای مذکور ارائه شده است.

بحث

زمان حداکثر رشد

با مقایسه زمان رسیدن به حداکثر تراکم در محیط کشت‌های مختلف در شرایط نوری یکسان وجود این محیط کشت‌ها تاثیری در زمان حداکثر رشد ندارد. پس می‌توان اینگونه استنباط نمود که ویتامین‌های مورد استفاده در محیط کشت گیلارد و ویتامین گروه B به تنهایی تاثیر معنی‌دار ثابتی را بر زمان حداکثر تراکم ندارند، و در حقیقت رابطه خاصی بین محیط کشت‌ها و زمان رسیدن به حداکثر رشد در شرایط مذکور مشاهده نمی گردد.

مقایسه شدت تابش نورهای مختلف در محیط کشت TMRL (بدون ویتامین)

تحلیل واریانس شدت تابش نورهای مختلف در محیط بدون ویتامین نشان می‌دهد که اختلاف معنی‌داری بین نورهای lux ۱۵۰۰-۵۰۰ مشاهده نمی‌شود و در این شرایط افزایش نور(به میزان lux ۱۰۰۰) بر تراکم سلولی تأثیری نداشته است. در حالیکه بین تیمارهای نوری lux ۲۵۰۰-۵۰۰ و همچنین lux ۲۵۰۰-۱۵۰۰ اختلاف آماری معنی‌داری وجود دارد. چنانچه مشاهده می‌شود افزایش شدت نور از lux ۱۵۰۰ به lux ۲۵۰۰ (یعنی به میزان lux ۱۰۰۰) باعث تاثیر قابل توجهی بر رشد می‌شود.

در این تیمارها اگر چه اختلاف شدت نور بین lux ۱۵۰۰-۵۰۰ و همچنین بین شدت‌های نوری lux ۲۰۰۰-۱۵۰۰، یک اندازه (۱۰۰۰lux)

جدول ۲: آزمون دنباله‌ای LSD بین میانگین تراکم سلولی در محیط کشتهای مختلف با نور ۱۵۰۰lux

حالت (۱)	حالت (۲)	تفاوت میانگین بین دو حالت	سطح معنی‌داری
T	TV_1	-۱۹۰/۱۲*	۰/۰۰۱
	TV_2	-۱۵۷/۶۱*	۰/۰۰۵
TV_1	T	۱۹۰/۱۲*	۰/۰۰۱
	TV_2	۳۲/۵	۰/۵۵۳
TV_2	T	۱۳۷/۶۱*	۰/۰۰۵
	TV_1	-۳۲/۵۰	۰/۵۵۳

* : تفاوت میانگین در سطح ۰/۰۵ معنی‌دار است.

جدول۳: آزمون دنباله‌ای LSD بین میانگین تراکم سلولی در محیط کشتهای مختلف با نور ۲۵۰۰lux

حالت (۱)	حالت (۲)	تفاوت میانگین بین دو حالت	سطح معنی‌داری
T	TV_1	-۲۹۴/۴*	۰/۰۰۱
	TV_2	-۲۲۴/۷۶*	۰/۰۰۸
TV_1	T	۲۹۴/۴*	۰/۰۰۱
	TV_2	۶۹/۶۶	۰/۳۹۶
TV_2	T	۲۲۴/۷۶*	۰/۰۰۸
	TV_1	-۶۹/۶۶	۰/۳۹۶

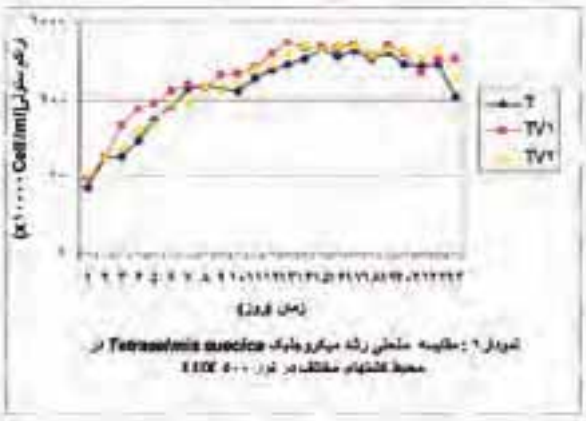
* : تفاوت میانگین در سطح ۰/۰۵ معنی‌دار است.

جدول ۴: آزمون دنباله‌ای LSD برای میانگین تراکم سلولی در محیط کشتهای مختلف

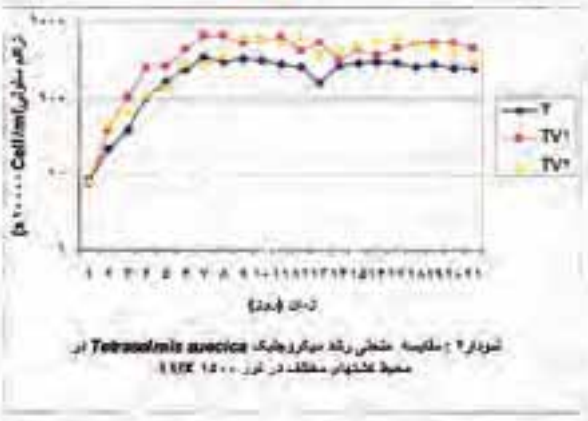
(T: محیط کشت TMRL،و TV۱: محیط کشت TMRL و ویتامین‌های گیلارد، TV۲: محیط کشت TMRL و ویتامین گروه B)

حالت (۱)	حالت (۲)	تفاوت میانگین بین دو حالت	سطح معنی‌داری
T	TV_1	-۹۷/۶۹*	۰/۰۰۱
	TV_2	-۷۴/۰۱*	۰/۰۰۹
TV_1	T	۹۷/۶۹*	۰/۰۰۱
	TV_2	۲۳/۶۸	۰/۴۰۰
TV_2	T	۷۴/۰۱*	۰/۰۰۹
	TV_1	-۲۳/۶۸	۰/۴۰۰

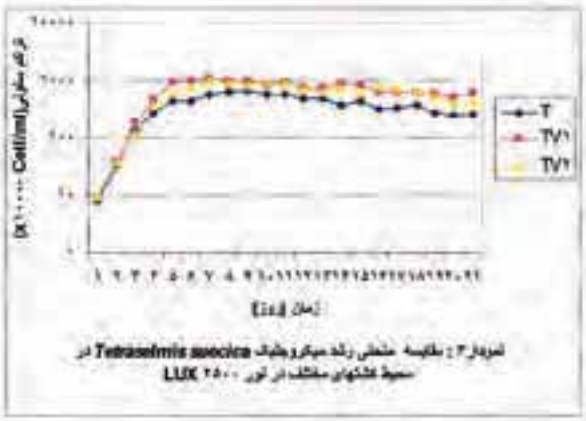
* : تفاوت میانگین در سطح ۰/۰۵ معنی‌دار است.



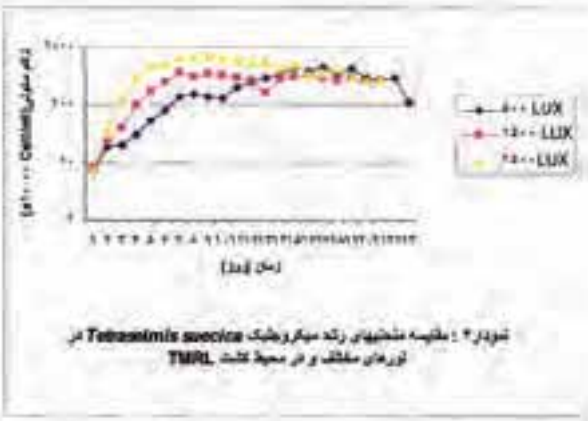
نمودار ۲ : مقایسه منحنی رشد میکروجلبک **Tetraselmis suecica** در محیط کشتهای مختلف در نور ۵۰۰ LUX



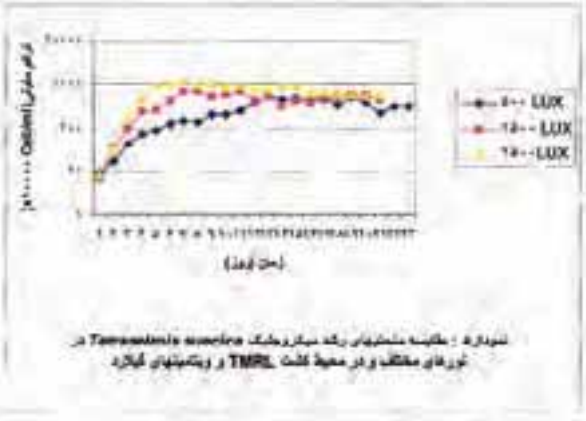
نمودار ۲ : مقایسه منحنی رشد میکروجلبک **Tetraselmis suecica** در محیط کشتهای مختلف در نور ۱۵۰۰ LUX



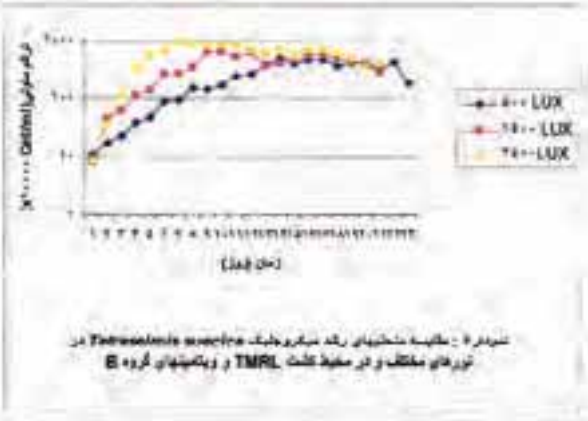
نمودار ۳ : مقایسه منحنی رشد میکروجلبک **Tetraselmis suecica** در محیط کشتهای مختلف در نور ۲۵۰۰ LUX



نمودار ۴ : مقایسه منحنیهای رشد میکروجلبک **Tetraselmis suecica** در نورهای مختلف و در محیط کشت TMRL



نمودار ۵ : مقایسه منحنیهای رشد میکروجلبک **Tetraselmis suecica** در نورهای مختلف و در محیط کشت TMRL و ویتامینهای گیلارد



نمودار ۶ : مقایسه منحنیهای رشد میکروجلبک **Tetraselmis suecica** در نورهای مختلف و در محیط کشت TMRL و ویتامینهای گروه B

جدول ۵ : آزمون دنباله‌ای LSD بین میانگین تراکم سلولی در نورهای مختلف

مقایسه چند متغیر وابسته : تراکم

حالت (۱)	حالت (۲)	تفاوت میانگین بین دو حالت	سطح معنی‌داری
نور ۵۰۰	۱۵۰۰	-۹۵/۶۳*	۰/۰۱۳
	۲۵۰۰	-۳۱۵/۳۶*	۰/۰۰۰
نور ۱۵۰۰	۵۰۰	۹۵/۰۵*	۰/۰۱۳
	۲۵۰۰	۲۱۹/۷۱*	۰/۰۰۰
نور ۲۵۰۰	۵۰۰	۳۱۵/۶۳*	۰/۰۰۰
	۱۵۰۰	۲۱۹/۷۱*	۰/۰۰۰

تفاوت میانگین در سطح ۰/۰۵ معنی‌دار است.

جدول ۶: آزمون دنباله‌ای LSD بین تراکم سلولی در نورهای مختلف در محیط کشت بدون ویتامین (T)

حالت (۱)	حالت (۲)	تفاوت میانگین بین دو حالت	سطح معنی‌داری
۵۰۰	۱۵۰۰	-۲۰/۷۸	۰/۶۳
	۲۵۰۰	-۱۸۳/ ۳۵*	۰/۰۰۰
۱۵۰۰	۵۰۰	۲۰/۷۸	۰/۶۳
	۲۵۰۰	-۱۶۲/۵۶*	۰/۰۰۱
۲۵۰۰	۵۰۰	۱۸۳/۳۵*	۰/۰۰۰
	۱۵۰۰	۱۶۲/۵۶*	۰/۰۰۱

* : تفاوت میانگین در سطح ۰/۰۵ معنی‌دار است.

جدول۷: آزمون دنباله‌ای LSD بین تراکم سلولی در نورهای مختلف در محیط کشت TMRL و ویتامین گیلارد (TV_1)

حالت (۱)	حالت (۲)	تفاوت میانگین بین دو حالت	سطح معنی‌داری
۵۰۰	۱۵۰۰	-۱۴۲/۳۸*	۰/۰۴۴
	۲۵۰۰	-۴۰۹/۲۴*	۰/۰۰۰
۱۵۰۰	۵۰۰	۱۴۲/۳۸*	۰/۰۴۴
	۲۵۰۰	-۲۶۶/۸۶*	۰/۰۰۰
۲۵۰۰	۵۰۰	۴۰۹/۲۴*	۰/۰۰۰
	۱۵۰۰	۲۶۶/۸۶*	۰/۰۰۰

*: تفاوت میانگین در سطح ۰/۰۵ معنی‌دار است.

جدول۸: آزمون دنبالهای LSD بین تراکم سلولی در نورهای مختلف در محیط کشت TMRL و ویتامین‌های گروه B(TV_2)

حالت (۱)	حالت (۲)	تفاوت میانگین بین دو حالت	سطح معنی‌داری
۵۰۰	۱۵۰۰	-۱۲۳/۷۸	۰/۰۷۸
	۲۵۰۰	-۳۵۳/۴۹*	۰/۰۰۰
۱۵۰۰	۵۰۰	-۱۲۳/۷۸	۰/۰۷۸
	۲۵۰۰	-۲۲۹/۷۱*	۰/۰۰۲
۲۵۰۰	۵۰۰	-۳۵۳/۴۹*	۰/۰۰۰
	۱۵۰۰	-۲۲۹/۷۱*	۰/۰۰۲

* : تفاوت میانگین در سطح ۰/۰۵ معنی‌دار است.

جدول ۹: نرخ رشد میکروجلبک *Tetraselmis suecica* تا روز رسیدن به حداکثر تراکم (μday^{-1})

TV_1			TV_1			TMRL		
۲۵۰۰	۱۵۰۰	۵۰۰	۲۵۰۰	۱۵۰۰	۵۰۰	۲۵۰۰	۱۵۰۰	۵۰۰
۱/۱۰	۰/۸۴	۰/۳۷	۱/۲۱	۱/۰۳	۰/۴۸	۰/۹۸	۰/۷۵	۰/۴۳

است ولی نتایج متفاوتی را در بردارد. به نظر می‌رسد در اینجا شدت نور تاثیر به سزایی بر تراکم سلولی دارد. به عبارت دیگر شدت نور مورد نیاز، برای افزایش رشد و افزایش چشمگیر تراکم سلولی، شدت نور بیشتری می‌باشد.

مقایسه شدت تابش نورهای مختلف درمحیط کشت TMRL و ویتامین‌های گیلارد

در تحلیل واریانس شدت تابش نورهای مختلف در محیط کشت TMRL و ویتامین‌های گیلارد مشاهده می‌شود که بین سه نوع تیمار نوری اختلاف آماری معنی‌داری وجود دارد($P=۰/۰۰۰$). چنانچه مشاهده می‌شود در محیط کشت دارای ویتامین گیلارد ، نور در هر گروه نوری بر تراکم سلولی نقش مثبت داشته است و با افزایش شدت نور تراکم سلولی بیشتر می‌شود (سطح معنی‌داری از ۰/۰۴۴ در بین گروه نوری ۱۵۰۰ lux-۵۰۰ به ۰/۰۰۶ به دو گروه نوری دیگر رسیده است). از مقایسه نتایج تیمارهای TMRL بدون ویتامین و با ویتامین‌های محیط کشت گیلارد می‌توان نتیجه گرفت که حضور ویتامین‌های گیلارد در محیط کشت می‌تواند اثر نور را بر تراکم سلولی مضاعف نماید.

مقایسه شدت تابش نورهای مختلف در محیط کشت TMRL و ویتامین گروه B

تحلیل واریانس شدت تابش نورهای مختلف در محیط کشت دارای ویتامین‌های B و در حالت هوادهی نشان می‌دهد که در تیمارهای نوری ۱۵۰۰-۵۰۰ lux اختلاف معنی‌داری مشاهده نمی‌شود در حالیکه بین تیمارهای نوری ۲۵۰۰-۵۰۰ lux و همچنین ۲۵۰۰-۱۵۰۰ lux اختلاف معنی‌دار است.

در مقایسه نتایج تیمار TMRL (بدون ویتامین) و تیمار TMRL و ویتامین‌های گروه B مشخص می‌شود هر دو گروه مذکور در تیمارهای نوری ۱۵۰۰-۵۰۰ lux دارای اختلاف نمی‌باشند یعنی تراکم سلولی در این شدت نوری تحت تاثیر عامل نور نبوده است در حالی‌که در هر دو گروه در مقایسه بین تیمارهای نوری ۲۵۰۰-۵۰۰ lux و همچنین ۲۵۰۰-۱۵۰۰، نور بر تراکم سلولی تاثیر داشته است. در مقایسه تیمار محیط کشت TMRL و ویتامین‌های گروه B با تیمار TMRL و ویتامین‌های گیلارد معین می‌شود که اثر ویتامین گیلارد در نور کم بیش از ویتامین‌های گروه B می‌باشد. (در محیط کشت دارای ویتامین گیلارد در بین دو تیمار نوری ۱۵۰۰و۵۰۰ lux اختلاف معنی‌داری وجود دارد).

در این تحقیق مشاهده شد، هنگامی که منحنی رشد به فاز ساکن می‌رسد تغییرات قابل مشاهده‌ای در رنگ محیط کشت پدید میآید که از سبز پررنگ به سبز کمرنگ تغییر می‌کند. دلیل این امر احتمالاً بر اثر وجود استرس‌های محیطی مانند افزایش تراکم و یا استرس اکسیدانها است. استرس اکسیدان‌ها با افزایش تراکم سلولی زیاد می‌شوند که احتمالاً به دلیل تخلیه محیط کشت است. در این حالت میزان رنگیزه‌ها در سلول (به جز Diatoxanthin) با افزایش تراکم سلولی کاهش می‌یابد. (۱۵). افزایش شدت نور و افزایش pH در نتیجه افزایش فتوسنتز است. در محیط های دریایی، استرس اکسیدان‌ها، اغلب به دلیل عوامل دیگری علاوه بر نور ایجاد می‌شود.

رشد هر جلبک در محیط بسته با افزایش تخلیه مواد مغذی، افزایش pH به وسیله جذب کربن و کاهش سطح CO_2 و افزایش تجمع متابولیت‌های سلولی همراه می‌باشد. استرس مواد مغذی (P،N) باعث به وجود آمدن استرس اکسیدان‌ها می‌شود و همچنین محدودیت

کربن باعث تولید یون‌های اکسیدان در اطراف فتوسیستمI می‌شود (۷).کلیه عوامل ذکر شده می‌تواند دلیلی بر تغییر رنگ محیط کشت‌ها بر اثر وجود اکسیداتیوها باشد.

تأثیر شدت نور (wm^{-2} ۲۲۱۸-۱۵) بر رشد و ترکیب شیمیایی میکروجلبک *Isochrysis galbana* و *Tetaslmmis sp* تحت شرایط کنترل شده آزمایشگاهی توسط Grima و همکاران در سال ۱۹۹۴ مورد مطالعه قرار گرفت. حداکثر نرخ رشد *Isochh rysis* h^{-1} ۰/۳۲ و Tetraselmis h^{-1} ۰/۴۹ بوده است. میزان نور اشباع برای هردوگونه بین wm^{-2} ۱۰۰-۸۰ می‌باشد (۱۳).

منحنی رشد

در این تحقیق ملاحظه می‌شود که در منحنی‌های رشد (منحنی ۶-۱) فاز تأخیر[3] درهیچ یک از آنها مشاهده نمی‌شود. زیرا اگر سلول‌های والدینی (سلول‌های تلقیح شده) در مرحله فازنمایی باشند، فاز تأخیری در کشت جدید مشاهده نمی‌شود. در حالیکه با وارد نمودن سلول‌هایی که در مرحله سکون رشد می‌باشند فاز تأخیر در کشت جدید طولانی می‌گردد (۴). گاهی یک یا دو مرحله از رشد آنقدر کوتاه است که تشخیص آن به زحمت صورت می‌گیرد. اگر تعداد زیادی از سلول‌هایی که به محیط کشت تلقیح می‌شوند، قابلیت رشد نداشته باشند ممکن است در تکثیر سلول تأخیر مشاهده گردد. این تاخیر تا زمانی که تعداد سلول‌های قادر به تقسیم، به تعداد قابل مقایسه با کل سلول‌های تلقیح شده برسند، ادامه می‌یابد. ممکن است اکثر سلول‌های تلقیح شده قدرت حیاتی داشته باشند اما نتوانند در شرایط جدید بلافاصله تقسیم شوند. به خصوص اگر کشت اولیه (کشت مادر) کهنه شده باشد. و یا ممکن است آنزیم‌ها غیرفعال باشند و غلظت متابولیت‌های مورد نیاز سلول، کاهش یافته باشد. در نتیجه از آغاز رشد فعال یک دوره برای تشکیل مجدد مواد مورد نیاز سلول، ضروری می‌باشد.

چنانچه در نمودارها مشخص است افزایش ویتامین تاثیر کاملاً مشهودی بر رشد *Tetraselmis suecica* دارد. با افزایش نور نیز درمحیط کشت دارای ویتامین و بدون ویتامین رشد چشمگیری مشاهده می‌شود.

در این تیمارها با افزایش نور، سرعت فتوسنتز نیز افزایش می‌یابد و باعث افزایش رشد شده و سریع‌تر به میزان حداکثر مقدار خود می‌رسد. بنابر نظر Gopinthan مقدار زیاد نور نیز باعث می‌شود تا کشت زودتر به مرحله رشد کند[4] برسد (۱۱). افزایش نور ، باعث کاهش مدت زمان رسیدن به فاز ساکن[5] می‌شود و همچنین افزایش تراکم سلولی و نرخ رشد را سبب می‌شود. نور باعث افزایش عملکرد ویتامین‌ها می‌شود. چنانچه درجدول ۵ مشاهده می‌شود به طور کلی افزایش نور باعث افزایش رشد و افزایش تراکم قابل ملاحظه‌ای در تراکم *Tetraselmis suecica* می‌شود. درآزمایشی که توسط You انجام شده میزان رشد در جلبک *Porphyridium cruentum* نیز با افزایش شدت نور افزایش می‌یابد(۱۸).

باتوجه به اثر افزایش نرخ رشد جلبک *Tetraselmis suecica* با وجود ویتامین‌های گروه B، مشخص می‌شود که وجود ویتامین‌های گروه B باعث افزایش رشد می‌شود.

بعضی از گونه‌های کلامیدوموناس به یک نوع یا بیشتر ویتامینB نیاز دارند. علاوه بر این گونه‌ها، کلونی‌های رده ولوکس نیز حداقل به یک نوع ویتامینB نیاز دارند (۱۲). به طور کلی ویتامین‌ها سبب افزایش رشد می‌شوند و با مقایسه اثر ویتامین‌های محیط کشت گیلارد و ویتامین‌های گروه B مشاهده می‌شود که این ویتامین‌ها دارای اثرات مشابهی بر رشد جلبک *Tetraselmis suecica* هستند.

قابل توجه اینکه، تهیه ویتامین‌های محیط کشت گیلارد هزینه بسیار زیادی در بر دارد. به عنوان مثال ۱۰۰ میلی گرم بیوتین ۲۴۰۰۰۰ ریال، ۲۵ گرم تیامین ۳۵۰۰۰۰ ریال و ۱ گرم B ۱۲ ۳۵۰۰۰۰ ریال قیمت دارد. از آنجا که ۲۰ گرم تیامین، ۰/۱ گرم بیوتین و ۰/۱ گرم B_{12} جهت تولید ویتامین‌های گیلارد برای ۲۰۰ تن لازم است لذا ۵۵۵۰۰۰ ریال برای اضافه کردن ویتامین‌های محیط کشت گیلارد هزینه صرف می‌شود. از طرفی خرید هر آمپول B_{12} و B complex ۳۵۰ ریال هزینه دارد. یعنی برای هر تن ۷۰۰ ریال و برای ۲۰۰ تن ۱۴۰۰۰۰ ریال. باید توجه داشت که در فصل کشت ۲۰۰ تن کشت جلبک برای مصرف ۳ روز است در حقیقت هر روز ۱۸۵۰۰۰ ریال تهیه ویتامین‌های گیلارد هزینه در بر دارد در حالی‌که استفاده از آمپول ۴۶۶۰۰ ریال. یعنی روزانه ۱۳۸۴۶۰ ریال صرفه جویی می‌شود که در ماه مبلغی برابر با ۴۱۵۲۰۰۰ ر یال باعث صرفه جویی در هزینه‌ها می‌شود که مبلغ بسیار بالایی است.

نظر به اثرات مثبت ویتامین‌های مذکور بر رشد تتراسلمین می‌توان با توجه به اختلاف از آنها در محیط کشت‌های ساده و ارزان قیمت مانند TMRL استفاده نمود. همچنین قیمت ویتامین‌های محیط کشت گیلاردو ویتامین‌های گروه B و کارایی یکسان آنها بر روی رشد، توصیه می شود از ویتامین گروه B به جای ویتامین‌های محیط کشت گیلارد جهت اضافه نمودن به محیط کشت TMPL استفاده شود.

تشکر و قدردانی

در پایان از سرکار خانم دکتر فروغ پاپهن، همچنین جناب آقای مهندس منصور غنیان و کلیه کسانی که به نحوی در انجام این تحقیق یاری نمودند سپاسگزاریم. همچنین از همکاری بی‌دریغ آقای سیدجواد حسینی، کارشناس ارشد تکثیر و پرورش غذای زنده مرکز تحقیقات شیلات بندر امام و سرکار خانم الهام آزاد داور که نهایت همکاری را در انجام این تحقیق داشته‌اند صمیمانه سپاسگزاریم.

پاورقی‌ها

1- Exponential phase
2- Growth rate
3- Lag Phase
4- Declining Phase
5- Stationary Phase

منابع مورد استفاده

۱ - ا. دی . بونی ، ترجمهٔ رحیمی بشر، محمدرضا. ۱۳۷۹؛ فیتوپلانکتون . انتشارات شهر سبز. ۲۱۸ صفحه.

۲ - تمجیدی، بهروز، ۱۳۸۱؛ استفاده از جلبک سبز تتراسلمیس سوسیکا در پیشگیری از رشد باکتری بیماری‌زای گونه *Vibio haveyi* در شرایط آزمایشگاهی. گزارش نهایی طرح تحقیقاتی مؤسسه تحقیقات شیلات . ۳۴ صفحه.

۳ - زارعی، ماندانا. ۱۳۸۱؛ بررسی اثرات برخی غذاهای موجود بر روی رشد پست

لارو میگوی سفید هندی *Penaeus indicus*، پایان نامه کارشناسی ارشد، ۹۰ صفحه.

۴ - سعادتمند، سارا. ۱۳۷۶؛ بررسی تأثیر شوری و شدت نور بر برخی از ترکیبات شیمیایی جلبک سبز (*Dunaliella salina*). پایان نامه کارشناسی ارشد. ۱۳۸ صفحه.

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

۶ - معصومی زاده، سیده زهرا. ۱۳۸۳؛ بررسی روند رشد برخی فیتوپلانکتون‌های بومی استان خوزستان در شرایط آزمایشگاهی، پایان‌نامه کارشناسی ارشد، ۲۵۰ صفحه.

7 -Asada, K., 1999; The water - water cycle in chloroplasts: Scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. Ann. Rev. Plant physiol. Plant Mol. Biol. 50: 601-639.

8 -Beveridge M.C.M., Rossl L.G., Stewart J. A. 1996; The development of mariculture and it,s implication for biodiversity, in: Marine biodiversity, pattern and processes Eds R.F. G. Ormond & J. Gage, Cambridge University Press .

9 -De-Roeck- Holtzhauer, Y., Claire, C. Bresdin, F., Amicel, L and Derrien, A. 1993; Vitamin free amio acid and fatty acid composition of some marine plankton microalgae used in aquaculture . BAT. MAR. Vol. 36, No: 4: 321-325.

10 - Fabregas Jaime, Ferron Lucia, Gamallo Yolanda Estella vecino, otero Aan and Herrero concepcion. 1994; Improvement of growth rate and cell productivity by aeration rate in cultures of the marine microalga *Dunaliella tertiolecta*. Bioresource technology. 45: 107-111.

11 -Gopinathan C. P., 1993; Micro- algal culture in: Live feed, Anasware printing & publishing Co.

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

13 -Grima M. E., Camacho. G. F. Perez sanchez & Sanchez Garcia. J. L. 1994; Biochemical productivity and fatty acid profiles of *lsochrysis galbana* parke and tetraselmis sp. as a function of incident light intensity. Process Biochemistry 29: 119-126.

14 - Lavens, P. and Sorgeloose P. 1996; Manual on production and use of life food for aqua culture. Lab of Aqua culture and Artemia Research center university of Ghent Bel gium pahlished by F.A.O. pp.

15 -Pinto. E., Nieuwerburgh. L. V., Barros. M. P. D., Pedersen M., Colepicolo. P. and Snoeijs. P. 2003; Density - dependeed patterns of thiamine and pigment production in the diatom *Nitzschia microcephala*. Phytochemistry 63: 125-163.

16 -Sergio O. Lourenco, Ursula M. Lanfer Marquez, Jorge Mancini-Filho, Elisabete Barbarino, Elizabeth Aidar 1997; Changes in biochemical profile of tetraselmis gracilis I. Comparison of two culture media Aquaculture 148: 153-168.

17 -Sournia, A. 1978; Phyto Plankton manual. Publ. Parise Unisco. 337 p.

18 -You. Tao, Barnett. S. M. 2004; Effect of light quality on production of extra cellular polysaccarides and growth rate of *Prophyridium cruentum*. Biochemical Engineering Journal. 19: 251-258.