

مطالعه جداسازی و کشت گونه‌های بومی فیتوپلانکتونی از دهانه رودخانه‌های اروند و بهمنشیر

• سیده زهرا معصومی‌زاده،

دانشگاه آزاد اسلامی واحد اهواز، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، گروه شیلات

• وحید یآوری و • پریتا کوچنین،

دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، دانشکده علوم دریایی، گروه شیلات

• احمد سواری،

دانشگاه علوم و فنون دریای خرمشهر، دانشکده علوم دریایی، گروه بیولوژی

تاریخ دریافت: دی ماه ۱۳۸۳ تاریخ پذیرش: مهر ماه ۱۳۸۴

Email: Zmasoomi@yahoo.com

چکیده

بسیاری از گونه‌های فیتوپلانکتونی در صنایع مختلف، اهمیت و کاربرد فراوان دارند. تهیه مواد مغذی جهت کشت آنها از یک طرف و واردات گونه‌های میکرو جلبکی از طرف دیگر همراه با صرف هزینه زیاد می‌باشد. علاوه بر این، گونه‌های وارداتی به دلیل عدم سازگاری با شرایط محیطی منطقه، دارای کارایی بالا نمی‌باشند. لذا جداسازی گونه‌های بومی جهت افزایش راندمان رشد از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. نمونه برداری این تحقیق، از دهانه اروند و دهانه بهمنشیر انجام شد. جداسازی نمونه‌های فیتوپلانکتونی با استفاده از روش‌های رقیق‌سازی، پلیت آگار، سانتریفوژ - نورگرایی همچنین با استفاده از تغییر فاکتورهای فیزیکی مانند نور و شوری انجام شد. با توجه به روش‌های مختلف جداسازی نتیجه می‌شود که در نور کم دیاتومه‌ها غالب می‌شوند و با افزایش نور امکان جداسازی گونه‌های بیشتری موجود می‌باشد. به طور کلی محیط کشت TMRL یک محیط کشت عمومی برای جداسازی انواع فیتوپلانکتونها است. همچنین می‌توان از محیط کشت Guillard جهت جداسازی دیاتومه‌ها استفاده نمود و در محیط کشت Conway امکان رشد میکرو جلبک‌های سبز بیشتر است. در این تحقیق ۱۵ گونه فیتوپلانکتونی جداسازی شد.

کلمات کلیدی: جداسازی، نور، شوری، محیط کشت، فیتوپلانکتون، اروند رود، بهمنشیر

Pajouhesh & Sazandegi No 73 pp: 147-154

Isolation of native species of phytoplankton from Arvand and Bahmanshir rivers

By: Masoumi Zadeh ,S,Z. Fisheries Department, Azad university. Ahvaz

Yavari, V. Kochanian, P. Members of Scientific Board of Fisheries Department, Khoramshahr university. Iran

Savari, A. Member of Scientific Board of Biology Department, Khoramshahr university. Iran

The important role of phytoplankton in aquaculture and other industries is well documented. The recent research and experiences shows that use of native species compared to imported one could be highly advantageous. Taking into consideration the above facts and following standard techniques number of native species were isolated. The results obtained indicate that intensity of light can have important role in isolation of different groups of phytoplankton. While TMRL proved to be a suitable culture medium for isolation all the groups of phytoplanktons, Guillard and Conway culture medium were particularly more suitable for isolation of diatoms and chlorophyta, respectively.

Key words: Light, Isolation, Salinity, Culture medium, Phytoplankton, Arvand, Bahmanshir

مقدمه

را به میزان زیادی تولید می‌کند، شناخته شده است. این گونه به عنوان یک منبع با پتانسیل بالایی از اسید چرب EPA (۵۷۳:۲۰) که برای محافظت در برابر بسیاری از بیماری‌ها مورد مصرف انسان قرار می‌گیرد از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است (۱۴).

مقدار پروتئین در میکرو جلبک *Chlorella vulgaris* و ۵۱-۵۸٪ وزن خشک می‌باشد. همچنین میکرو جلبک کلامیدوموناس دارای بیش از ۲۰۰ پلی‌پپتید است و میزان پروتئین در گونه *Chlamydomonas reinhardtii* ۴۸٪ وزن خشک آن می‌باشد. از کلامیدوموناس جهت انجام تحقیقات آزمایشگاهی مانند انجام پروژه‌های ژنتیکی استفاده می‌شود که با کشف رنجی از مواد شیمیایی فعال بیولوژیکی، افق جدیدی در جهت عملکردهای اقتصادی پدیدار می‌شود (۱۳). از لارو *Chlamydomonas* برای تغذیه لارو و پست‌لارو نرم‌تنان دو کفه‌ای، زئوپلانکتون‌های آب شیرین، روتیفرهای دریایی و آرتمیا استفاده می‌شود. همچنین از *Nitzschia* و *Cyclotella* نیز جهت تغذیه لارو آرتمیا می‌توان استفاده کرد (۱۱). برخی از میکرو جلبک‌ها جهت آبی‌پروری و همچنین به عنوان منبع مهمی جهت تولیدات در صنایع دارویی، غذایی، بهداشتی و آرایشی استفاده می‌شوند که لزوم تحقیقات بیشتر بر این ارگانیسرها بیش از پیش آشکار می‌شود.

Chroomonas placoidea اولین گونه فیتوپلانکتون می‌باشد که در سال ۱۹۵۹ توسط Butcher از استخرهای انگلستان جدا گردید (۹). گونه‌های میکرو جلبکی مورد استفاده در صنعت آبی‌پروری اکثراً از خارج کشور وارد می‌شوند که هزینه زیادی صرف واردات آنها می‌شود. از طرفی این گونه‌ها توانایی تحمل شرایط آب و هوایی منطقه را ندارند. جداسازی فیتوپلانکتون‌ها در کشور ما از سابقه طولانی برخوردار نیست و در حال حاضر اکثر گونه‌های مورد استفاده از خارج کشور وارد می‌شوند. در طی گزارشی اولین بار در سال ۱۳۷۴ از آبهای پوشهر میکرو جلبک *Skeletonema* توسط عربی‌نژاد جدا گردید که از روش محیط کشت آگار، میکروبیوت و کشت مداوم جهت جداسازی استفاده نمود. (تحقیق جداسازی گونه‌های بومی فیتوپلانکتونی از دانه ارون‌درد و بهم‌نشیر در جهت کاهش هزینه واردات و افزایش راندمان در صنعت غذایی زنده انجام شده است). با توجه به نوسانات شوری در دهانه

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 سریع تر، سلامت را بهتر و درصد بقاء بیشتر بچه ماهیان را در مراحل بعدی پرورش تضمین می‌کند (۲). گونه‌های مختلفی از میکرو جلبک‌ها شناخته شده‌اند که به عنوان یک منبع غذایی ضروری برای پرورش کلیه مراحل لاروی دو کفه‌ای‌ها و نرم‌تنان دریایی (کلم، اویستر، اسکالوپ) و مراحل پست لارو برخی از شکم‌پایان (مانند ابالون) و همچنین مراحل لاروی برخی گونه‌های ماهی، میگوهای خانواده پنیید و پلانکتون‌های جانوری می‌باشند (۷). در آبی‌پروری، کشت فیتوپلانکتون‌ها که مقدار زیادی استرول‌های قابل متابولیز و اسیدهای چرب ضروری دارند اهمیت زیاد داشته و باعث رشد سریع سخت پوستان و نرم‌تنان می‌شوند (۱۵).

میزان پروتئین زیاد انواع گونه‌های میکرو جلبکی یکی از دلایلی است که این ارگانیسرها، به عنوان منبع پروتئین در نظر گرفته می‌شوند. علاوه بر پروتئین، میکرو جلبک‌ها دارای ترکیبات دیگری مانند کربوهیدرات فیبر و... هستند. کربوهیدرات‌های جلبک‌ها به شکل نشاسته، سلولز، قندها و دیگر پلی‌ساکاریدها می‌باشند. چربی‌ها و اسیدهای چرب در تمام سلول‌های گیاهی وجود دارند. آنها به عنوان ترکیبات غشاء، تولیدات ذخیره‌ای، متابولیت‌ها و منبع انرژی عمل می‌کنند. میانگین چربی بین ۱ تا ۴۰٪ متفاوت است و تحت شرایط معینی می‌تواند تا ۸۵٪ وزن خشک آنها را شامل گردد (۱۳). *Nannochloropsis*, *Chlorella*, *Chlamydomona*, *Nitzschia* و *Cyclotella* از جنس‌های مهم فیتوپلانکتونی مهم در آبی‌پروری به شمار می‌آیند. *Nannochloropsis* حاوی میزان زیادی اسیدهای چرب غیر اشباع (Eicosapentaenoic acid) می‌باشد و به عنوان یک غذای مناسب در صنایع آبی‌پروری مورد استفاده قرار می‌گیرد (۷). به دلیل ارزش غذایی، تناسب ترکیب شیمیایی، *Nannochloropsis* به صورت یک غذای بسیار مناسب برای تغذیه روتیفر مزارع پرورش ماهی معرفی شده است. همچنین به عنوان یک منبع رنگیزه‌ای ارزشمند که رنگیزه‌های متفاوتی مانند کلروفیل، *Canthaxanthin a*, *Zeaxanthin* و *Astaxanthin*

در معرض نور قرار می‌گیرند. پس از مدتی تراکم فیتوپلانکتون‌ها در بالای لوله زیاد شده که به وسیله یک پمپ استریل مقداری از آن به لوله حاوی محیط کشت انتقال یافته و در معرض شرایط مناسب جهت رشد قرار می‌گیرد (۳).

نتایج

فاکتورهای فیزیکی شیمیایی اندازه‌گیری شده در دهانه بهمنشیر شامل شوری ppt ۱۱/۰۴، اکسیژن محلول ۷/۵۳ میلی گرم در لیتر، pH=۷/۶، دما ۱۵/۹۹ درجه سانتیگراد و در دهانه ارون، شوری ppt ۱/۲، دما ۱۵/۴ درجه سانتیگراد، pH=۷/۹، و اکسیژن محلول ۸/۵ میلی گرم در لیتر بوده است.

الف- جداسازی نمونه‌های جمع‌آوری شده در محیط کشت‌های مختلف در دهانه بهمنشیر با استفاده از روش رقیق سازی

در محیط کشت گیلارد میکروجلبک *Cyclotella sp* جدا شد. در این محیط کشت جلبک *Melosira sp* نیز در برخی از ظروف کشت غالبیت داشت ولی پس از مدتی از بین رفت. در محیط کشت TMRL نیز گونه *Lynghya lemnetica* غالبیت داشت، درحالی که در محیط کشت Conway رشد چشمگیری صورت نگرفت.

ب- استفاده از روش پلیت-آگار

در جداسازی فیتوپلانکتون‌ها از روش جداسازی پلیت-آگار استفاده شد که در این روش سه محیط کشت Conway، Guillard و TMRL با شوری ppt ۲۵ تهیه شد که در نور lux ۲۵۰۰ قرار گرفتند و نمونه‌های جمع‌آوری شده از مصب بر روی این محیط کشت‌های جامد تلقیح شدند. در کلیه محیط کشت‌ها، کلونی‌های باکتریایی مشاهده شد و در هیچ یک از آنها نمونه فیتوپلانکتونی رشد نکرد.

ب- جداسازی نمونه‌های جمع‌آوری شده از دهانه ارون در محیط کشت، شوری و نورهای مختلف با استفاده از روش رقیق سازی

در lux ۲۵۰۰ محیط کشت TMRL و در شوری ppt ۵ نیز *Nannochloropsis oculata* غالبیت یافت ولی به دلیل وجود زئوپلانکتون از جداسازی آن صرف‌نظر گردید. دیاتومه *Nitzschia sp* نیز از شوری ppt ۱۵ جدا سازی شد که در کشت مجدد خالص سازی صورت گرفت. در بعضی از لوله‌های آزمایش زئوپلانکتون‌هایی مانند *Coleps* مشاهده شد که به نظر می‌رسد با تغذیه خود رشد فیتوپلانکتون‌ها را تحت تأثیر قرار داده بودند. نمونه‌ها در محیط کشت TMRL با شوری‌های ppt ۲۵ و ۱۵، و در شدت نور lux ۱۵۰۰ قرار گرفتند. میکروجلبک‌های *Ankistrodesmus sp* و *Chlorella sp* از شوری ppt ۵ جدا شدند که به وسیله کشت مجدد خالص سازی صورت گرفت. این گونه‌ها به ترتیب در شوری ۱۵ و سپس ppt ۲۵ کشت داده شدند. جلبک سبز-آبی *Oscillatoria thiebauti* نیز توسط روش رقیق سازی در شوری ppt ۱۵ جداسازی شد. زمان رشد

رودخانه‌ها با نمونه‌برداری از این محل امکان جداسازی گونه‌هایی با تحمل رنج وسیع شوری فراهم می‌شود و می‌توان از گونه‌های سازگار با تغییرات شوری نیز جهت کشت در دامنه شوری‌های مختلف می‌توان بهره‌بردار بود.

مواد و روش‌ها

نظر به اینکه تغییر در عوامل فیزیکی مانند نور، شوری و دما می‌تواند در رشد یک گونه و بالتبع غالبیت یک گونه نسبت به گونه‌های دیگر اثر داشته باشد لذا در این قسمت از دو فاکتور نور و شوری در جداسازی فیتوپلانکتون‌ها استفاده شد.

الف) نور: معمولاً در آزمایشگاه‌های غذای زنده از ۲ لامپ مهتابی ۲۵۰ وات و یا از ۲، ۱ و حد اکثر ۳ لامپ مهتابی ۵۰۰ وات استفاده می‌شود. جهت جداسازی با هدف تعیین مقدار نور مناسب، از محیط کشت‌های TMRL، Conway و Guillard استفاده شد که این محیط کشت‌ها تحت تیمارهای نوری مختلف با میانگین شدت‌های نوری lux ۵۱۱ (دو لامپ مهتابی ۲۵۰ وات)، lux ۱۵۲۲ (یک لامپ مهتابی ۵۰۰ وات)، lux ۲۵۶۷ (سه لامپ مهتابی ۵۰۰ وات) قرار گرفتند که به طور تقریب lux ۲۵۰۰، ۱۵۰۰، ۵۰۰ در نظر گرفته شد. جهت اندازه‌گیری شدت نور از دستگاه نور سنج Phywe cg مدل ۲۸۷۷/۳۴۰۰۰۰ ساخت کشور آلمان با دقت ۱ lux استفاده گردید. در تیمارهای مختلف نوری جهت جداسازی فیتوپلانکتون‌ها از روش‌های رقیق سازی و محیط کشت جامد آگار استفاده گردید.

ب) شوری: با توجه به اینکه محل نمونه برداری‌ها مصب رودخانه می‌باشد و مصب نیز با نوسانات شوری مواجه است لذا از تغییرات شوری جهت جداسازی نیز استفاده شده است. سه محیط کشت Guillard (۶)، TMRL (۶)، Conway (۱۱)، در شوری‌های ppt ۵، ۱۵، ۲۵ تهیه شدند. جهت جداسازی فیتوپلانکتون‌ها از روش‌های رقیق سازی و محیط کشت جامد آگار در محیط کشت‌هایی با شوری‌های مختلف یاد شده استفاده شد.

شناسایی فیتوپلانکتون‌ها با استفاده از کلیدهای شناسایی (۵، ۸، ۱۲)، و با میکروسکوپ نوری Olympus مدل CH ۴۰ و میکروسکوپ اینورت Olympus مدل IX ۷۰ انجام شد. نمونه برداری در تاریخ ۸۲/۱۱/۱۶ از دهانه بهمنشیر به وسیله فیلتر کردن آب با استفاده از پمپ لنج و تورهای ۳۰ و ۶۰ میکرون و در تاریخ ۸۲/۱۲/۱۴ از دهانه ارون با کشیدن تور ۳۰ میکرون در سطح آب انجام شد. جهت جداسازی از سه روش رقیق سازی (۶)، پلیت آگار (۱۱) و روش سانتریفوژ-نورگرای استفاده گردید.

روش سانتریفوژ - نورگرای

این روش، جهت جداسازی گونه‌های متحرک کاربرد فراوان دارد. در این روش ۱ میلی‌لیتر از نمونه فیتوپلانکتون، با حدود ۵ میلی‌لیتر محیط کشت Guillard در سانتریفوژ به مدت ۳۰ دقیقه با سرعت rpm ۱۰۰۰ قرار داده می‌شود. سپس با یک فویل آلومینیوم اطراف لوله سانتریفوژ طوری باید پوشانده شود که قسمت کمی از محیط کشت در بالای ظرف در معرض نور قرار گیرد. سپس این لوله‌های آزمایش

فیتوپلانکتون‌ها در این محیط کشت بین ۲۳-۱۴ روز در رقت‌های مختلف به طول انجامیده است.

۱-۲- محیط کشت Conway

از محیط کشت‌هایی که در معرض نور lux ۲۵۰۰ قرار گرفتند سه گونه *Chlorella vulgaris* در شوری ppt ۵ و *Hallochlorocuccum* sp و *Amphiprora* sp در شوری ppt ۱۵ جداسازی شدند. در محیط کشت Conway در شدت نور lux ۱۵۰۰ و در شوری ppt ۵ میکروجلبک *Chlorella vulgaris* جدا گردید. سپس نمونه‌های جدا شده در شوری‌های ppt ۲۵ و ۱۵ کشت داده شدند. زمان رشد فیتوپلانکتون‌ها در این محیط کشت بین ۵۵-۳۰ روز در رقت‌های مختلف بوده است.

۱-۳- محیط کشت Guillard

رشد دیاتومه‌ها نسبت به دیگر گروه‌ها در این محیط کشت بیشتر است. در شوری ppt ۱۵ و نور lux ۱۵۰۰ گونه *Nannochloropsis oculata* جدا شد و در نور lux ۲۵۰۰ در شوری ppt ۵ نیز همین گونه غالبیت داشت. در بعضی لوله‌ها در شوری ppt ۱۵ و ۵ نیز میکروجلبک *Oocystis* sp دارای تراکم قابل ملاحظه‌ای بود. در شوری ppt ۲۵ و در شدت نور lux ۱۵۰۰ تراکم *Cyclotella* sp بیش از دیگر گونه‌ها بوده و به روش کشت مجدد، خالص گردید. زمان رشد فیتوپلانکتون‌ها در این محیط کشت بین ۱۴-۵ روز بوده است.

با استفاده از روش پلیت آگار

از محیط کشت جامد آگار-آگار نیز جهت جداسازی استفاده گردید که به طور جداگانه مواد مغذی سه محیط کشت Conway، Guillard و TMRL اضافه شد. هر یک از محیط کشت‌ها در سه شوری ppt ۱۵، ۲۵ و ۵ تهیه شده که پس از تلقیح این محیط کشت‌ها در سه نور متفاوت قرار گرفتند.

۱-۲- نور lux ۲۵۰۰

در نور lux ۲۵۰۰ در محیط کشت Guillard با شوری ppt ۲۵ کلونی‌های قهوه‌ای رنگ برآقی مشاهده گردید که طبق مشاهدات انجام شده این نمونه از جنس *Diatoma* بوده که این کلونی‌ها به محیط کشت مایع گیلارد با شوری ppt ۵ نیز ریشه‌های طولانی سبز رنگی مشاهده شد که با توجه به مشاهدات میکروسکوپی مربوط به جنس *Oscillatoria* می‌باشد.

همچنین در محیط کشت TMRL با شوری ppt ۵ نیز لکه‌های سبزرنگ میکروجلبک *Chlorella* مشاهده شد که در بین کلونی‌های سفید رنگ موکوسی باکتریایی قرار داشتند.

در محیط کشت Conway با شوری ppt ۵، لکه‌های سبز رنگ میکروجلبک *Schroederella* sp مشاهده شد که پس از مشاهدات میکروسکوپی و با اطمینان از خالص بودن کلونی‌ها به محیط کشت گیلارد با شوری ppt ۱۵ و سپس ppt ۲۵ انتقال داده شد و به شکل خالص تهیه گردید. در محیط کشت‌های Conway با شوری ppt ۲۵ و ۱۵ همچنین محیط کشت‌های گیلارد با شوری ppt ۱۵ و TMRL با شوری ppt ۱۵، لکه‌های سفید موکوسی و لکه‌های مات بیرنگ و حاشیه دار، همچنین لکه‌های

زرد، صورتی و سبزرنگ مشاهده شد. بر روی محیط کشت TMRL با شوری ppt ۲۵ علاوه بر کلونی‌های یاد شده رشته‌های سیاه رنگ کپک نیز مشاهده شد. بدین ترتیب در محیط کشت‌های ذکر شده فقط کلونی‌های باکتریایی و قارچ رشد نمودند.

۲-۲- نور lux ۱۵۰۰

در نور lux ۱۵۰۰ در محیط کشت Conway با شوری ppt ۵، کلونی‌های قهوه‌ای رنگ *Nitzschia* مشاهده شد که به محیط کشت گیلارد با شوری ppt ۲۵ و ۱۵ انتقال یافت و به صورت خالص کشت داده شد. در محیط کشت TMRL با شوری ppt ۵ نیز لکه‌های قهوه‌ای دیگر از گروه دیاتومه مشاهده شد که به دلیل مجاورت با کلونی‌های میکروبی از جداسازی آنها صرف نظر گردید.

در محیط کشت‌های گیلارد، با شوری ppt ۱۵، ۲۵ و ۵ محیط کشت Conway با شوری ppt ۲۵ و ۱۵، محیط کشت TMRL با شوری ppt ۲۵، ۱۵ و ۵ نیز کلونی‌های زرد، سفید رنگ با رگه‌های زرد رنگ، همچنین کلونی‌های سبز و صورتی مشاهده گردید. در محیط کشت‌های Guillard با شوری ppt ۱۵ و Conway با شوری ppt ۲۵ علاوه بر کلونی‌های باکتریایی یک نوع قارچ سیاه‌رنگ مشاهده شد و نمونه فیتوپلانکتونی بر روی این محیط کشت‌ها رشد نکرد.

۲-۳- نور lux ۵۰۰

در نور lux ۵۰۰ نیز فقط در محیط کشت گیلارد با شوری ppt ۵ ریشه‌های سبز رنگ *Oscillatoria* و لکه‌های قهوه‌ای مربوط به گروه دیاتومه‌ها مشاهده شد که بر روی این کلونی‌های باکتر رشد کرده بودند و لذا از جداسازی آنها خودداری گردید. در کلیه محیط کشت‌های دیگر با شوری‌های متفاوت، کلونی‌های صورتی، سفید و زرد مشاهده گردید. در محیط کشت TMRL با شوری ppt ۲۵ کپک‌های سبز و سیاه رنگ مشاهده شد. زمان رشد کلونی‌های جلبکی بین ۷ الی ۲۵ روز در محیط کشت‌های مختلف و در نورهای متفاوت به طول انجامید.

در این پروژه طی نمونه برداری‌های انجام شده به روش‌های سانتریفوژ - نورگرای، رقیق سازی و محیط کشت آگار نمونه‌های فیتوپلانکتونی ذکر شده در جدول ۱ جداسازی شده‌اند.

بحث

اکنون کشت تجاری میکروجلبک‌ها بیش از ۳۰ سال است که با گونه‌های میکروجلبکی مهمی مانند *Spirulina* و *Chlorella* برای غذای سالم^۱ و *Dunaliella salina* برای بتاکاروتن و همچنین *Haematococcus* برای آستاگزانتین و چندین گونه دیگر برای آبی پروری انجام می‌شود (۴).

در تحقیقی که توسط Knuckey و همکاران در سال ۲۰۰۲ انجام شد نژادهای دیاتومه جدیدی از آبهای استرالیا جدا شده و پتانسیل آنها به عنوان گونه‌هایی که ارزش آبی پروری دارند بر اساس اندازه، میزان تقسیم و ترکیب شیمیایی مورد بررسی قرار گرفت. این گونه‌ها به روش آگار، سانتریفوژ و میکروپیپت جدا شدند و نرخ رشد آنها بین $0.55/d^{-1}$ تا $2/0.4 d^{-1}$ در روز بوده است (۱۰).

جدول ۱: نتایج حاصل از جداسازی فیتوپلانکتون‌ها

گروه	نمونه جدا شده	روش جداسازی			نور			شوری			محیط کشت			محل نمونه برداری	
		سانتریفوژ نورگرایی	محیط کشت جامد آگار	رقیق سازی	×lux ۵۰۰	×lux ۱۵۰۰	×lux ۲۵۰۰	×ppt ۵	×ppt ۱۵	×ppt ۲۵	TMRL	Conway	Guillard	دهانه بهمنشیر	دهانه ارونند
Eustigmatophycean	<i>Nannochloropsis oculata</i>			√		√			√				√		√
				√			√	√					√		√
Chlorophycean	<i>Chlorella vulgaris</i>			√		√		√				√			√
				√			√	√				√			√
Diatoms	<i>Cyclotella sp</i>			√			√			√			√	√	
				√		√				√			√		√
Cyanobacteria	<i>Lyngbya lemnetica</i>			√			√			√	√			√	
Cyanobacteria	<i>Osilatoria thiebauti</i>			√		√		√		√	√				√
Chlorophycean	<i>Chlorella sp</i>			√		√		√			√				√
Chlorophycean	<i>Ankistrodesmus sp</i>			√		√		√			√				√
Diatoms	<i>Nitzschia sp</i>			√			√		√		√				√
Chlorophycean	<i>Oocystis sp</i>			√			√	√					√		√
Diatoms	<i>Amphiprora sp</i>			√			√		√			√			√
Chlorophycean	<i>Hallochlorocucum sp</i>			√			√		√			√			√
Chlorophycean	<i>Chlamydomonas sp</i>	√					√			√			√		√
Diatoms	<i>Diatoma sp</i>		√				√			√			√		√
Chlorophycean	<i>Schroederella sp</i>		√				√	√				√			√
Diatoms	<i>Nitzschia sp</i>		√			√		√					√		√

جداسازی نمونه‌های جمع‌آوری شده در محیط کشت‌ها، نورها و شوری‌های مختلف در ایستگاه‌های نمونه برداری شده محیط کشت TMRL

با استفاده از روش رقیق سازی، در شوری ppt ۵ و در نور lux ۲۵۰۰، گونه ۲، Cyanobacteria، گونه ۸، Chlorophycean، گونه ۳، Diatoms و گونه ۱، Eustigmatophycean و در نور lux ۱۵۰۰، گونه ۱، Cyanobacteria، گونه ۳ و گونه ۱۵ در نور lux ۲۵۰۰، گونه ۱، Cyanobacteria، گونه ۳، Chlorophycean، گونه ۴، Diatoms در لوله‌های رقیق سازی مشاهده شد. در حالی که در نور lux ۱۵۰۰، گونه ۱، Cyanobacteria، گونه ۱، Chlorophycean، گونه ۲، Diatoms مشاهده گردید. در شوری ppt ۲۵ و در نور lux ۲۵۰۰، گونه ۷، Chlorophycean، گونه ۴، Diatoms وجود داشت در صورتی که در نور lux ۱۵۰۰، گونه ۱، Cyanobacteria، گونه ۳، Diatoms، گونه ۱، Eustigmatophycean مشاهده شد. با توجه به نتایج حاصله مشخص می‌شود که تنوع گونه‌ای در نور lux ۲۵۰۰ در محیط کشت TMRL بیشتر از نور lux ۱۵۰۰ در همین محیط کشت می‌باشد. چنین به نظر می‌رسد که افزایش نور باعث رشد تعداد بیشتری از گونه‌ها می‌شود که اکثراً نیز جلبک‌های سبز می‌باشند. در این محیط کشت دو گونه از جلبک‌های سبز، گونه ۱ از جلبک‌های قهوه‌ای، گونه ۱ از جلبک‌های سبز-آبی و همچنین دو گونه از جلبک‌های Eustigmatophycean جدا شده است. پس با توجه به نتایج، محیط کشت TMRL یک محیط کشت عمومی جهت رشد فیتوپلانکتون‌ها می‌باشد.

محیط کشت Conway

در روش رقیق سازی، در شوری ppt ۵ و در نور lux ۲۵۰۰، گونه ۲، Cyanobacteria، گونه ۱، Diatoms، گونه ۱، Eustigmatophycean و در نور lux ۱۵۰۰، گونه ۱، Chlorophycean، گونه ۲، Diatoms مشاهده شد. در شوری ppt ۱۵، در نور lux ۲۵۰۰، گونه ۲، Cyanobacteria، گونه ۲، Chlorophycean، گونه ۱، Diatoms، گونه ۱، Eustigmatophycean وجود داشت. در شوری ppt ۲۵ و در نور lux ۲۵۰۰، گونه ۲، Chlorophycean، گونه ۱، Diatoms و در نور lux ۱۵۰۰، گونه ۲، Chlorophycean، گونه ۱، Diatoms مشاهده گردید. با توجه به نتایج مشاهده می‌شود تنوع گونه‌ای در هر دو نور lux ۲۵۰۰ و lux ۱۵۰۰ در محیط کشت Conway تقریباً یکسان است. در نور lux ۱۵۰۰ یک گونه (*Chlorella vulgaris*) و در نور lux ۲۵۰۰ سه گونه (*Chlorella vulgaris*، *Hallochlorococcus sp* و *Amphiprora sp*) جدا شده‌اند. به نظر می‌رسد افزایش نور سبب مهیا شدن محیط مناسب‌تری جهت رشد بیشتر فیتوپلانکتون‌ها خصوصاً میکروجلبک‌های سبز در این محیط کشت می‌شود.

محیط کشت Guillard

در روش رقیق سازی، در شوری ppt ۵ و در نور lux ۲۵۰۰، گونه ۱، Cyanobacteria، گونه ۲، Chlorophycean، گونه ۴، Diatoms، گونه ۱، Eustigmatophycean مشاهده شد در حالی که در نور lux ۱۵۰۰، گونه ۱، Cyanobacteria، گونه ۳، Chlorophycean و گونه ۹، Diatoms رشد

نمود. در شوری ppt ۱۵ و در نور lux ۲۵۰۰، گونه ۱، Cyanobacteria، گونه ۲، Chlorophycean، گونه ۷، Diatoms دیده شد در حالی که در نور ppt ۱۵۰۰، گونه ۱، Cyanobacteria، گونه ۴، Diatoms، گونه ۱، Eustigmatophycean دیده شد. در شوری ppt ۲۵ و در نور lux ۲۵۰۰، گونه ۱، Chlorophycean و گونه ۴، Diatoms و در نور lux ۱۵۰۰ نیز گونه ۱، Chlorophycean و گونه ۴، Diatoms مشاهده شد. نتایج نشان می‌دهد که رشد و تنوع دیاتومه‌ها در محیط کشت گیلارد نسبت به سایر محیط کشت‌ها بیشتر است. در مقایسه بین نورهای lux ۲۵۰۰ و lux ۱۵۰۰ در محیط کشت گیلارد مشاهده می‌شود که در نور کم امکان رشد دیاتومه‌ها بیشتر فراهم می‌شود. همچنین با توجه به آزمایشات مکرر که جهت جداسازی و خالص سازی *Chlamydomonas* از یک دیاتومه که با روش سانتریفوژ-نورگرایی و در نورهای مختلف (lux ۲۵۰۰، ۱۵۰۰، ۵۰۰) انجام شد مشاهده می‌شود که در نور زیاد امکان رشد جلبک‌های سبز بیشتر بوده در حالی که دیاتومه‌ها اکثراً در نور کمتری غالب می‌شوند (۳).

سلول‌های *Chlamydomonas* به طور مشخصی دارای خاصیت نورگرایی هستند و به طرف نور حرکت می‌کنند اگرچه از شدت نور زیاد نیز دوری می‌کنند. رفتار نورگرایی به دلیل وجود گیرنده‌های نوری شبه رودو پسین است که در غشای سلولی آنها قرار دارند و درست در بالای لکه چشمی هستند. فیتوپلانکتون‌های مختلف با سطوح نوری ایتیمم متفاوت سازش می‌یابند. کارایی فتوسنتز دیاتومه‌ها به طور ویژه‌ای در سطوح نوری کم افزایش یافته و سبب غالبیت آنها می‌شود (۷).

در جداسازی فیتوپلانکتون‌ها از دهانه بهم‌نشیر در محیط کشت گیلارد، دو دیاتومه نسبت به دیگر گروه‌ها غالبیت داشته‌اند (*Melosira* و *Cyclotella*). از نمونه‌های جمع‌آوری شده از اروند که در این محیط کشت گیلارد کشت شده و در یخچال نگهداری می‌شدند نیز غالبیت دیاتومه‌ها چشمگیر بود که بیانگر این نتیجه است که محیط کشت گیلارد برای رشد دیاتومه‌ها مناسب‌تر است. نتایج حاصل از تحقیق عربی نژاد ۱۳۷۴ نشان می‌دهد که دیاتومه‌های اسکلتونما و کیتوسروس در محیط کشت گیلارد رشد بهتری دارند (۱).

در جداسازی با استفاده از روش پلیت - آگار، مشاهده می‌شود که در نور lux ۲۵۰۰ چهار نمونه فیتوپلانکتون رشد نموده است در حالی که در نور lux ۱۵۰۰ دو نمونه فیتوپلانکتون و در نور lux ۵۰۰ فقط یک نمونه فیتوپلانکتون رشد کرده است که از این تعداد ۲ گونه در نور lux ۲۵۰۰ و ۱ گونه در نور lux ۱۵۰۰ جداسازی شد. این نتایج مشخص می‌کنند که افزایش نور سبب رشد تعداد بیشتری از نمونه‌های فیتوپلانکتونی شده و امکان جداسازی تعداد بیشتری از نمونه‌ها را فراهم می‌کند.

با توجه به روش‌های مختلف جداسازی پیشنهاد می‌شود جهت جداسازی فیتوپلانکتون‌های متحرک از روش سانتریفوژ- نورگرایی استفاده شود. همچنین جهت افزایش احتمال مشاهده گونه‌های بیشتر فیتوپلانکتونی از روش رقیق سازی استفاده شود. ضمناً به دلیل رشد تک کلونی‌ها بر محیط کشت آگار خالص سازی یک گونه با استفاده از روش پلیت- آگار با سهولت بیشتری امکان پذیر است.

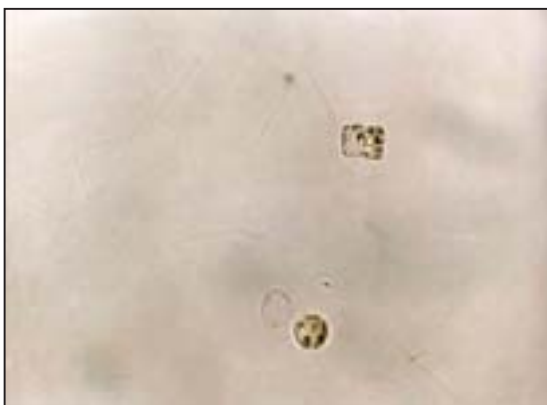
به طور کلی با توجه به نتایج حاصل از جداسازی و نظر به اینکه در نور کم علاوه بر کاهش تنوع، تعداد کمتری از گونه‌های فیتوپلانکتونی توانایی رشد را دارند لذا بهتر است که از شدت نور زیاد (بیش از lux ۱۵۰۰)



تصویر ۲: *Chlorella sp.*
بزرگنمایی عدسی $\times 10$



تصویر ۳: *Chlorella vulgaris*
بزرگنمایی عدسی $\times 40$



تصویر ۴: *Cyclotella sp.*
بزرگنمایی عدسی $\times 40$

استفاده شود. همچنین افزایش نور (حدود ۲۵۰۰ lux) سبب رشد بیشتر فیتوپلانکتونها مخصوصاً جلبک‌های سبز شده و امکان جداسازی آنها بهتر فراهم می‌شود. در نور کم دیاتومه‌ها غالب می‌شوند و با افزایش نور امکان جداسازی گونه‌های بیشتری موجود می‌باشد.

ضمناً پیشنهاد می‌شود که جهت جداسازی گونه‌های فیتوپلانکتونی با تنوع گونه‌ای، از محیط کشت TMRL استفاده شود زیرا یک محیط کشت عمومی جهت رشد محسوب می‌شود. همچنین جهت جداسازی دیاتومه‌ها محیط کشت گیلارد مناسب‌تر است و میکروجلبک‌های سبز در محیط کشت Conway رشد بهتری دارند.

از میان ۱۵ گونه جداسازی شده، *Nannochloropsis oculata* (تصویر ۱)، *Chlorella sp.* (تصویر ۲)، *Chlorella vulgaris* (تصویر ۳) و *Chlamydomonas sp.* علاوه بر صنعت آبی پروری، در صنایع غذایی، دارویی، بهداشتی و در تحقیقات اهمیت زیادی دارند. از *Cyclotella* (تصویر ۴) و *Nitzschia sp.* (تصویر ۵) نیز می‌توان در صنایع آبی پروری استفاده نمود. با توجه به انواع میکروجلبک‌های جداسازی شده و کاربرد آنها، می‌توان از آنها در صنایع مختلف مانند صنعت آبی پروری، داروسازی، مواد غذایی و ... استفاده کرد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از همکاری و راهنمایی‌های سودمند خانم مهندس سیمین دهقان عضو هیات علمی و رئیس بخش اکولوژی مرکز تحقیقات آبی پروری جنوب کشور در این تحقیق صمیمانه قدردانی و سپاسگزاری می‌شود. از راهنمایی‌های مفید سرکار خانم دکتر فروغ پاپهن عضو هیات علمی دانشگاه شهید چمران اهواز همچنین از همکاری خانم مهندس نسرين سخايي و آقای مهندس بابک دوست شناس اعضای هیات علمی دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر نیز تشکر و قدردانی می‌نمایم. از آقای مهندس علی قوام‌پور کارشناس ارشد تکثیر و پرورش شیلات استان خوزستان جهت ارائه راهنمایی‌ها و نظرات سودمندشان و همکاری بی دریغ و مؤثر آقای مهندس سید جواد حسینی کارشناس ارشد تکثیر و پرورش غذای زنده مرکز تحقیقات شیلات بندر امام کمال تشکر را داریم. از نظرات و



تصویر ۱: *Nannochloropsis oculata*

- 313-321.
- 5- Edmondson.W.T.,1959; Fresh water biology. John Wiley & Sons, INC,1248pp
- 6- Gopinathan C. P., 1993; Hand book on aquafarming live feed. Publ: The Marin Products Expiry Development Authority. 61pp
- 7- Graham, Linda E. and Wilcox, Lee W., 2000; Algae. Publ. Prentice hall. 640 pp.
- 8- I.F.F.C.,1980; Illustration of fresh water plankton China (training course) 168 pp.
- 9- Jeffrey, S. W., Black burn, S., 1990; CSIRO culture collection of Micro-algae. Species list, 11 pp.
- 10- Knuckey, R. M., Brown, M. R., Barrett, S.M., 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.
- 11- Lavens, P and Sorgeloos P., 1996; Manual on production and use of life food for aquaculture. Lab of Aquaculture and Artemia Research center university of Ghent Belgium pahlshed by F.A.O, 438 pp.
- 12- Mitsuo Chihara & Masaaki Murano., 1997; An Illustrated Guide to Marine Plankton in Japan, publ: Tokai university press, 1573 pp.
- 13- Richmond, Amos., 2004; Hand book of microalgal culture: Biotechnology and Applied phycology. Publ: Blackwell publishing, 566 pp.
- 14- Rocha, J. M. S., Garcia. J. E. C., Henriques. M. H. F., 2003; Growth aspects of the marine microalga *Nannochlorosis gaditana*. Biomolecular Engineering, 20: 237-242.
- 15- Shannon L. MeseckT, Jennifer H. Alix, Gary H. Wikfors., 2005; Photoperiod and light intensity effects on growth and utilization of nutrients by the aquaculture feed microalga, *Tetraselmis chui* (PLY429). Aquaculture, 246: 393-404.



تصویر ۵ : Nitzschia sp

بزرگنمایی عدسی $\times 10$

پیشنهادات خانم مهندس ماندانا زارعی در این تحقیق سپاسگزاریم.

پاورقی

1-Food Health

منابع مورد استفاده

- ۱ - عربی نژاد، عبدالحلیم سیامر. ۱۳۷۴؛ گزارش نهایی پروژه جداسازی فیتوپلانکتون اسکلتونما از آبهای خلیج فارس بوشهر. انتشارات مرکز تحقیقات شیلات، ۳۴ صفحه.
- ۲ - مخدومی، نورمحمد؛ ۱۳۷۹؛ بررسی و شناسایی منابع آرتمیا در برکه های آب شور منطقه گنبد. مجله علمی شیلات ایران. شماره ۲. ص ۶۱-۷۲.
- ۳ - معصومی‌زاده، سیده زهرا؛ ۱۳۸۳؛ بررسی روند رشد برخی فیتوپلانکتون های بومی استان خوزستان در شرایط آزمایشگاهی، پایان نامه کارشناسی ارشد، ۲۵۰ صفحه.
- 4- Borowitzka. M.A., 1999; Commercial production of microalgae: Ponds, tanks, tubes and fermenters. Journal of biotechnology. 70:

