

## بررسی تراکم سلولی و میزان کلروفیل ریز جلبک *Nannochloropsis oculata* در شوری و محیط کشت های مختلف

### چکیده

ریز جلبک *Nannochloropsis oculata* از جلبک های تک سلولی دریایی متعلق به شاخه ی Chlorophyta و زیر شاخه Eustigmatophyceae می باشد که در این تحقیق طی ۱۴ روز کشت، رشد آن در چهار محیط کشت (کانوی، گیلارد N<sub>8</sub> و TMRL) و سه درجه شوری متفاوت (۲۵ و ۳۰ و ۳۵ قسمت در هزار) در محیط آزمایشگاه (دمای ۲۵ درجه سانتی گراد، PH = ۷، شدت نور ۲۵۰۰ لوکس و دوره نوری ۱۸ ساعت روشنایی و ۶ ساعت تاریکی و همچنین هوادهی با استفاده از پمپ آکواریم به صورت شبانه روزی) مورد بررسی قرار گرفت. میزان رشد این ریز جلبک و اندازه گیری تراکم سلولی با دو روش، شمارش با لام نئوبار و سنجش کلروفیل با روش اسپکتروفتومتری مورد مطالعه قرار گرفت. بر طبق نتایج بدست آمده اختلاف معنی داری بین تیمارهای محیط کشت و شوری های متفاوت وجود داشت ( $P < 0.05$ ). محیط کشت کانوی با شوری ۲۵ قسمت در هزار از نظر افزایش تراکم و با شوری ۲۰ قسمت در هزار از نظر میزان کلروفیل a در رتبه اول، محیط کشت گیلارد با شوری ۲۰ قسمت در هزار از نظر افزایش تراکم و کلروفیل a در رتبه دوم، محیط کشت TMRL با شوری ۲۵ قسمت در هزار از نظر افزایش تراکم و کلروفیل a در رتبه سوم و محیط کشت N<sub>8</sub> با شوری ۲۵ قسمت در هزار از نظر افزایش تراکم و با شوری ۲۰ قسمت در هزار از نظر میزان کلروفیل a در رتبه چهارم قرار می گیرند. تغییر در مواد اولیه محیط کشت ها باعث تغییر در میزان رشد و کلروفیل می شود.

**کلمات کلیدی:** ریز جلبک، *Nannochloropsis oculata*، محیط کشت، رشد، شوری، کلروفیل a.

### مهمسا نقیبی<sup>۱</sup>

### منصوره قانعی<sup>۲</sup>

### سریده زهرا معصومی زاده<sup>۳</sup>

۱. دانشگاه آزاد اسلام ی واحد اهواز، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه شریلات، اهواز، ایران  
۲، ۳. دانشگاه آزاد اسلام ی واحد اهواز، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، استاد یار گروه شریلات، اهواز، ایران

### \*مسئول مکاتبات:

Mahsnaghibi@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۱/۲۸

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۲/۱۰

کد مقاله: ۱۳۹۳۰۲۰۱۹۴

### مقدمه

ریز جلبک *Nannochloropsis oculata* یکی از جلبک های تک سلولی دریایی است که به شاخه ی Chlorophyta و زیر شاخه Eustigmatophyceae تعلق دارد. جلبک نانوکلوپسپس به دلیل دارا بودن اسیدهای چرب غیر اشباع و میزان بالای پروتئین درآبزی پروری از اهمیت بالایی برخوردار است. ارزش غذایی زیاد از جمله محتوای بالای ایکوزاپنتانوئیک اسید (EPA) و همچنین نقش موثر این جلبک به عنوان جایگزین اسیدهای چرب غیر اشباع چندانگانه (PUFA) اهمیت آن را در تغذیه ی لاروماهیان دریایی بارز می سازد. از گونه ی جلبکی *N. oculata* به صورت مستقیم و به منظور تغذیه ی روتیفرهای آب شور با نام علمی *Brachionus plicatilis* در پرورش

سیم قرمز *Pagrus major* کفال ماهیان *Mugilidae*، خامه ماهی *Chanos chanos* و سرخوماهیان (*Lutjanidae*) در مراکز تکثیر آب های شور بیشتر مناطق جهان از سال ۱۹۸۰ تاکنون استفاده می شود. غالباً این جلبک ها با گونه های دیگری از جلبک ها نظیر *Monochrysis sp.* و *Isochrysis galbana* در مراحل اولیه ی پرورش لاروهای ماهیان دریایی برای تغذیه و غنی سازی روتیفرها و همچنین به وجود آوردن آب سبز در مخازن هچری استفاده می شود و به عنوان یکی از تولیدات فتواتوتروفیک ایده آل محسوب می شود که در افزایش سطح EPA در شبکه غذایی موثر است (صلواتیان و همکاران، ۱۳۸۵).

جلبک ها علاوه بر عوامل فیزیکی (نور، درجه حرارت، هوا دهی و ...)، برای انجام فعالیقای حیاتی به محیط کشت نیاز دارند. محیط کشت یا ماده غذایی شامل عناصر ماکروالمان و میکروالمان بوده که عناصر ماکروالمان شامل عناصری نظیر فسفر، کلسیم، منیزیم، سیلیس، پتاسیم و غیره است؛ در حالی که عناصر میکروالمان شامل عناصر آهن، مولیبدن، منگنز، مس، کبالت، وانادیم و غیره می باشد، این مواد در قالب فرمول های محیط کشت برای رشد جلبک ها طراحی می شود. بنابراین، با اضافه کردن محلول های غذایی و کودهای آماده یا کودهای شیمیایی این مواد برای جلبک ها تهیه می شود تا بتوانند رشد و افزایش تراکم سلولی را در محیط کشت های خاص داشته باشند. مواد ذکر شده برای رشد جلبک ها ضروری است و معمولاً در پیکره جلبک ها نقش مهمی دارند؛ به عنوان مثال در ساختمان RNA و DNA در اسکلت سازی، تامین انرژی به صورت ATP، در ساختمان پروتئین و اسیدهای آمینه در دیواره سلولی جلبک ها و همچنین سایر فواید در جلبک ها موثرند (صلواتیان و همکاران، ۱۳۸۵).

صلواتیان و همکاران (۱۳۸۵) رشد و زی توده جلبک *N. oculata* در محیط کشت های مختلف را مورد ارزیابی قرار دادند در حالی که قادری اردکانی و همکاران (۱۳۸۹) تاثیر شوری و دما بر رشد این ریز جلبک را بررسی کردند. Banerjee و همکاران (۲۰۱۱) رشد و ترکیبات تقریبی جلبک *Nannochloropsis oculata* را در شرایط کشت بیرون بررسی کردند. قزلباش و همکاران (۱۳۸۸) اثر شوری را بر رشد جلبک *Nannochloropsis sp* در محیط کشت والته جهت خالص سازی بررسی کردند. Na و همکاران (۲۰۱۲) اثرات شوری را بر رشد، ترکیب شیمیایی و تولید چربی جلبک *Nannochloropsis oculata* بررسی کردند. با توجه به اینکه اکثر هزینه های کشت ریز جلبک ها متعلق به محیط کشت اختصاصی آنها می باشد، هدف از اجرای این تحقیق بررسی همزمان محیط کشت و شوری بر تراکم سلولی و میزان کلروفیل بود تا امکان کشت و تولید انبوه جلبک دریایی نانوکروپسیس در شرایط منطقه ای با معرفی بهترین محیط کشت و درجه ی شوری حاصل گردد تا ضمن صرفه ی اقتصادی بتواند بالاترین میزان تولید جلبکی را تامین کند.

## مواد و روش ها

ریز جلبک *Nannochloropsis oculata* در ۴ محیط کشت (کانوی، گیلارد، N<sub>8</sub> و TMRL) و سه درجه شوری (۲۰ و ۲۵ و ۳۰ قسمت در هزار) با ۳ تکرار در نمونه برداری به مدت ۱۴ روز و به میزان ۵۰ سی سی از بذر ریز جلبک با میانگین تراکم  $26 \times 10^6$  سلول در میلی لیتر و ۴۵۰ سی سی از محیط کشت در ارلن مایر به حجم ۵۰۰ سی سی تحت شرایط زیستی یکسان (دمای ۲۵ درجه سانتی گراد، PH = ۷ و شدت نوری ۲۵۰۰ لوکس و دوره نوری ۱۸ ساعت روشنایی و ۶ ساعت تاریکی و هوادهی مداوم با استفاده از پمپ اکواریوم) در شرایط آزمایشگاهی کشت داده شد. در این تحقیق روزانه شوری با شوری سنج ATAGO ساخت کشور ژاپن، pH با pH سنج Hach-sension1 ساخت آمریکا با دقت ۰/۰۱، دما توسط دماسنج جیوه ای استفاده گردید همچنین جهت تنظیم زمان روشنایی به تاریکی از زمان سنج Theben ساخت آلمان با دقت ۱۵ دقیقه و برای تنظیم نور از دستگاه نورسنج Phywe CG 2877/3400000 ساخت کشور آلمان استفاده شد و تراکم سلولی با لام هموسیستم تر و اسپکتروفتومتری اندازه گیری شد. همچنین میزان کلروفیل a با سنجش غلظت محیط کشت با دستگاه اسپکتروفتومتر سنجش و با فرموله مربوطه محاسبه شد.

## تعیین تراکم سلولی ریز جلبک *Nannochloropsis oculata*

### الف-روش شمارش مستقیم با استفاده از لام

بررسی رشد ریز جلبک *N. oculata* طی مدت کشت، روزانه شمارش سلولی با استفاده از لام هموسیتومتر طبق فرمول زیر انجام می‌شد. تعداد کل سلولها در ۲۵ مربع = تعداد سلول در ۵ مربع  $\times 5$ .

تعداد کل سلولها در ۱ میلی لیتر از محیط کشت =  $10^4 \times$  تعداد کل سلولها در ۲۵ مربع (Haran, 1992)

### ب - روش محاسبه ریز سنجی زیست توده ریز جلبک *Nannochloropsis oculata*

بررسی رشد ریز جلبک *N. oculata* طی مدت کشت، تراکم سلولی (نشان دهنده ی تعیین میزان رشد) روزانه با استفاده از اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۴۰ نانومتر اندازه گیری شد (Henriques, 2007).

### اندازه گیری میزان کلروفیل (a)

بای اندازه گیری میزان کلروفیل a طی مدت کشت، روزانه ۱۰ میلی لیتر از جلبک برداشته و تراکم سلولی در هر میلی لیتر بدست آورده شد جلبک برداشته شده با سانتریفیوژ ۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه تغلیظ گردید. مایع اضافی خارج و ۱۰ میلی لیتر محلول استون ۹۰ درصد اشباع به مواد باقیمانده افزوده شد. مرحله ۲ را مجدداً تکرار کرده، یک نمونه دارای استون خالص در اسپکتروفتومتر (UV-Visible Varian, Cary 50 scan) قرار داده شد و میزان جذب دستگاه برای نمونه شفاف صفر (تنظیم) گردید. نمونه‌ی خالی را برداشته و نمونه‌ی حاوی کلروفیل a در اسپکتروفتومتر قرار گرفت و میزان جذب در طول موج های ۶۴۴، ۶۴۷ و ۶۳۰ نانومتر در دستگاه اسپکتروفتومتر مدل (UV-Visible Varian, Cary 50 scan) قرائت کرده و در فرمول زیر قرار داده و میزان کلروفیل را محاسبه شد (Toyub et al., 2011).

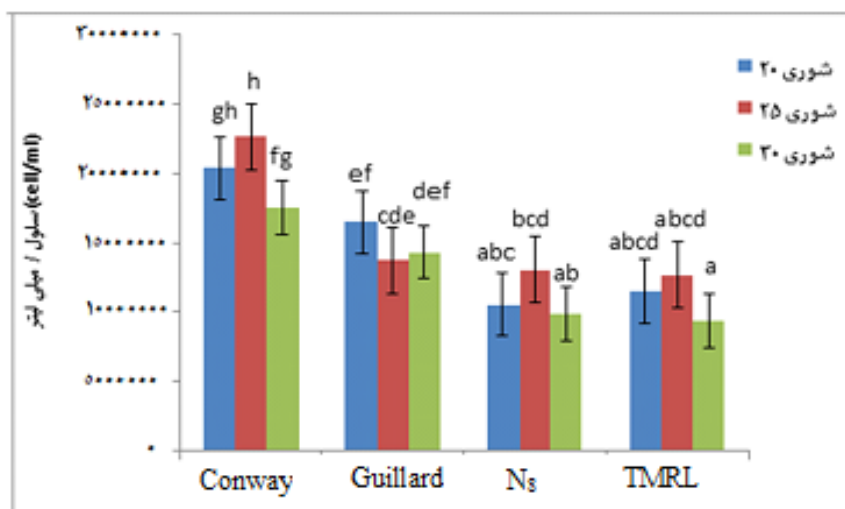
$$\text{Chlorophyll a } (\mu\text{g/l}) = 11/85 (\text{OD}_{664}) - 1/54 (\text{OD}_{647}) - 0/08 (\text{OD}_{630})$$

### تجزیه و تحلیل اطلاعات

نتایج بدست آمده با استفاده از برنامه‌های نرم افزاری EXCELL و SPSS انجام شد. نرمال بودن داده‌ها با آنالیز کولموگراف - اسمیرنف در تیمارهای مختلف و اختلاف بین تیمارها با آنالیز واریانس یکطرفه و تست دانکن بررسی شد.

### نتایج

تراکم سلولی ریز جلبک *N. oculata* با استفاده از لام نئوبار در مدت ۱۴ روز دوره کشت، در شکل ۱ نشان داده شده است.



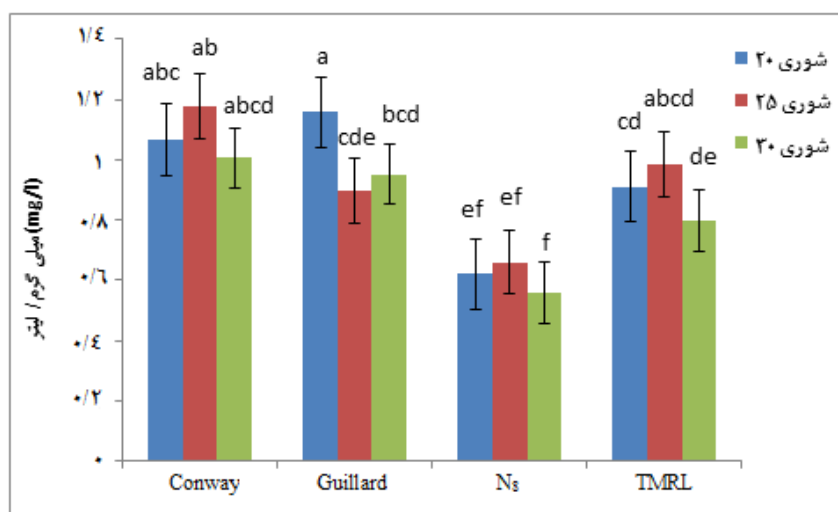
### شکل ۱: مقایسه تیمارها در خصوص شمارش سلولی در محیط کشت و شوری متفاوت.

(حروف غیر همنام نشان دهنده تفاوت معنی دار نسبت به هم در سطح ۰/۰۵ می باشد)

در خصوص شمارش سلولی نتایج حاصله نشان می دهد که بین تیمارها با محیط کشت و شوری متفاوت اختلاف معنی داری وجود دارد ( $P < 0/05$ ). در محیط کشت TMRL بین تیمارهای با شوری ۲۰ و ۲۵ اختلاف معنی داری وجود ندارد. بر طبق نتایج بدست آمده محیط کشت کانوی با شوری ۲۵ قسمت در هزار با میانگین تعداد  $22 \times 10^6$  سلول در میلی لیتر بیشترین میزان رشد را پس از آن گیلارد با درجه شوری ۲۰ قسمت در هزار و با میانگین تعداد  $16 \times 10^6$  سلول در میلی لیتر در رتبه دوم و محیط کشت  $N_8$  با درجه شوری ۲۵ قسمت در هزار و با میانگین تعداد  $13 \times 10^6$  سلول در میلی لیتر در رتبه سوم و محیط کشت TMRL با درجه شوری ۲۵ قسمت در هزار و با میانگین تعداد  $12 \times 10^6$  سلول در میلی لیتر در رتبه چهارم قرار می گیرند.

### نتایج تراکم سلولی روزانه ریز جلبک *Nannochloropsis oculata*

نتایج تعیین تراکم سلولی ریز جلبک *N. oculata* با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در شکل ۲ نشان داده شده است.



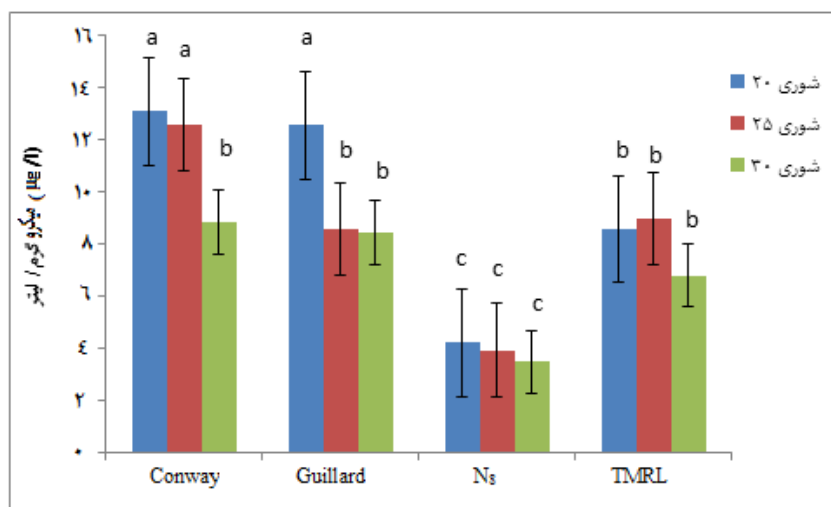
### شکل ۲: مقایسه تیمارها در خصوص تراکم سلولی در محیط کشت و شوری متفاوت.

(حروف غیر همنام نشان دهنده تفاوت معنی دار نسبت به هم در سطح ۰/۰۵ می باشد)

در خصوص تراکم سلولی نتایج نشان می دهد که اختلاف معنی داری بین تیمارها با محیط کشت و شوری متفاوت وجود دارد ( $P < 0/05$ ). بین تیمار کانوی با شوری ۳۰ قسمت در هزار با تیمار TMRL با شوری ۲۵ قسمت در هزار تفاوت معنی داری وجود ندارد ( $P < 0/05$ ). همچنین بین تیمار  $N_8$  با شوری ۲۰ و ۲۵ قسمت در هزار اختلاف معنی داری وجود ندارد ( $P < 0/05$ ). طبق نتایج بدست آمده، محیط کشت کانوی با درجه شوری ۲۵ قسمت در هزار و با میانگین  $1/177$  میلی گرم بر لیتر در رتبه اول و گیلارد با درجه شوری ۲۰ قسمت در هزار و با میانگین  $1/156$  میلی گرم بر لیتر در رتبه دوم پس از آن محیط کشت TMRL با درجه شوری ۲۵ قسمت در هزار و با میانگین  $0/984$  میلی گرم بر لیتر در رتبه سوم و محیط کشت  $N_8$  با درجه شوری ۲۵ قسمت در هزار و با میانگین  $0/659$  میلی گرم بر لیتر در رتبه چهارم قرار می گیرد.

### نتایج میزان کلروفیل a ریز جلبک *Nannochloropsis oculata*

نتایج حاصل از اندازه گیری میزان کلروفیل a ریز جلبک نانوکلوپسیس در شکل ۳ نشان داده شد.



شکل ۳: مقایسه تیمارها در خصوص میزان کلروفیل a در محیط کشت و شوری متفاوت.

(حروف غیر همنام نشان دهنده تفاوت معنی دار نسبت به هم در سطح ۰/۰۵ می باشد)

در خصوص اندازه گیری میزان کلروفیل a در بین تیمارها با محیط کشت و شوری متفاوت اختلاف معنی داری در سه سطح a, b, c وجود دارد ( $P < 0.05$ ). کلروفیل a در محیط کشت کانوی با شوری ۲۰، ۲۵ و گیلارد با شوری ۲۰ اختلاف آماری معنی داری ندارند (سطح a و  $P < 0.05$ ). کلروفیل a بین تیمار کانوی با شوری ۳۰ و گیلارد با شوری ۲۵ و ۳۰ و TMRL با شوری ۲۰ و ۲۵ و ۳۰ اختلاف معنی دار نیست (سطح b و  $P < 0.05$ ). کلروفیل a بین تیمارهای N<sub>8</sub> با شوری های ۲۰ و ۲۵ و ۳۰ اختلاف معنی دار نیست (سطح c و  $P < 0.05$ ). کلروفیل a بین تیمارهای N<sub>8</sub> با شوری ۲۰ و ۲۵ و ۳۰ و تیمارهای کانوی با شوری ۲۰ و ۲۵ و گیلارد با شوری ۲۰ معنی دار است ( $P < 0.05$ ). و همچنین با تیمارهای کانوی با شوری ۳۰ و گیلارد با شوری ۲۵ و ۳۰ و TMRL با شوری ۲۰ و ۲۵ و ۳۰ppt اختلاف معنی دار ی وجود ندارد ( $P < 0.05$ ).

در بین تیمارها محیط کشت کانوی با شوری ۲۰ قسمت در هزار و با میانگین ۱۳/۰۸ میکرو گرم بر لیتر در رتبه اول و محیط کشت گیلارد با شوری ۲۰ قسمت در هزار و با میانگین ۱۲/۵۵ میکرو گرم بر لیتر در رتبه دوم و محیط کشت TMRL با شوری ۲۵ قسمت در هزار و با میانگین ۸/۹۶ میکرو گرم بر لیتر در رتبه سوم و محیط کشت N<sub>8</sub> با شوری ۲۰ قسمت در هزار و با میانگین ۴/۲۱ میکرو گرم بر لیتر در رتبه چهارم قرار می گیرند.

### بحث و نتیجه گیری

معمول ترین نوع کشت در شرایط آزمایشگاهی این است که حجم معینی از محیط کشت شامل مواد غذایی آلی و معدنی مورد نیاز تهیه گردد و تعداد نسبتاً کمی از جلبک به آن تلقیح شده و سپس تحت شرایط ثابت نور، دما و هوادهی قرار گیرد. ضمناً کوتاهی دوره رشد و مصرف مواد کم هزینه در ساخت محیط کشت، تولید ریز جلبک ها را اقتصادی تر می نماید (قزلباش و همکاران، ۱۳۸۸). با توجه به اینکه هدف مطالعه حاضر انتخاب بهترین محیط کشت و شوری مناسب برای نانوکروپسیس بوده است، با ثابت نگه داشتن سایر متغیرهای کشت دو فاکتور مذکور با ارزیابی رشد به دو روش سنجش تراکم سلولی و میزان کلروفیل مورد بررسی قرار گرفت.

صلواتیان و همکاران (۱۳۸۵) رشد و توده زنده نانوکروپسیس را در محیط های کشت مختلف از جمله کانوی، میگوپلس، ساتو و تی ام آر ال بررسی کردند و نتیجه گرفتند که محیط کشت کانوی با میانگین تعداد  $59 \times 10^6$  سلول در ۱ میلی لیتر بهترین محیط کشت برای تولید

انبوه در شرایط آزمایشگاهی می باشد که در تحقیق حاضر نیز محیط کشت کانوی با  $10^6 \times 22$  بهترین محیط کشت برای رشد در شرایط آزمایشگاهی می باشد.

Banerjee و همکاران (۲۰۱۱) رشد و ترکیبات تقریبی جلبک *Nannochloropsis oculata* را در محیط کشت کانوی با شوری ۳۰ ppt و  $pH=8$  در شرایط بیرونی در سایه با دمای ۲۴ تا ۳۶ درجه سانتیگراد و شدت نور ۱۴۰ میکرومول در مترمربع بر ثانیه و شرایط آزمایشگاهی در دمای ۲۰ درجه سانتیگراد و شدت نور ۱۵۰ میکرومول در مترمربع بر ثانیه بررسی کردند، نتایج نشان داد که رشد در محیط بیرون بیشتر و سریعتر و به میزان  $11 \times 10^6$  سلول در میلی لیتر بود که در تحقیق حاضر باتوجه به اینکه در شرایط آزمایشگاهی و در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد انجام شد میزان رشد در محیط کشت کانوی با شوری ۳۰ ppt به  $17 \times 10^6$  سلول در میلی لیتر رسید که در نتیجه بازده بهتری نسبت به تحقیق فوق داشته است.

بررسی اثر شوری و محیط کشت بر تراکم این ریزجلبک نشان داد که بیشترین تراکم محاسبه شده به دو روش (شمارش با لام و استفاده از روش اسپکتوفتومتری) در سه محیط کشت TMRL, Conway, N<sub>8</sub> ۲۵ ppt بوده است. زیرا فشار اسمزی ناشی از این شوری برای این جلبک مناسبترین بوده و در نتیجه بیشترین رشد را دارد، در صورتی که با کاهش شوری (۲۰ ppt) و یا با افزایش آن (۳۰ ppt) این ریزجلبک تحت استرس ناشی از شوری قرار میگیرد و رشد کاهش می یابد. همچنین در تحقیق قزلپاش و همکاران (۱۳۸۸) اثر سه شوری ۲۵، ۳۵، ۴۵ ppt بر رشد جلبک *Nannochloropsis sp* در محیط کشت والته جهت خالص سازی بررسی شد که نشان داد بیشترین رشد این جلبک در شوری ۲۵ ppt بوده است و با افزایش شوری رشد کاهش می یابد و لذا با این تحقیق همخوانی دارد. در این تحقیق در محیط کشت Guillard بیشترین رشد در دو روش، در شوری ۲۰ ppt بوده است در حالی که در دیگر محیط کشت ها در شوری ۲۵ ppt بوده است. بررسی مواد اولیه محیط کشت نشان می دهد که بین مواد محیط کشت ها اختلاف وجود دارد مثلاً محیط کشت گیلارد دارای موادی است که در بقیه محیط کشت ها وجود ندارد. این مواد شامل ویتامین B<sub>6</sub> و سیلیکات سدیم می باشد که در محیط کشت های دیگر وجود ندارد. از آنجا که سیلیکات در ساختمان نانوکلوپسیس وجود ندارد و مورد نیاز نیست شاید وجود ویتامین B<sub>6</sub> در این محیط کشت باعث شده تا این جلبک در شوری کمتر نیز رشد بهتری داشته باشد و برای آن مناسب باشد. چنانچه با بررسی تراکم به روش اسپکتوفتومتری اختلاف معنی داری بین تیمارهای ۲۰ ppt با بقیه تیمارها مشاهده میشود و در این شوری بیشترین رشد مشاهده میشود. لذا در صورتی که برای غذاهای به آبیاری که در شوری ۲۰ ppt نگهداری می شود بهتر است از محیط کشت گیلارد استفاده کرد زیرا این ریزجلبک رشد بیشتری در این شوری و محیط کشت دارد.

در بررسی اثر شوری و محیط کشت بر میزان کلروفیل در نمودار ۳ مشاهده می شود که بین محیط کشت ها و شوری ها اختلاف معنی داری در سه سطح a, b, c وجود دارد ( $p < 0.05$ ). بیشترین میزان کلروفیل در محیط کشت کانوی شوری ۲۵ و ۳۰ ppt و محیط کشت گیلارد در شوری ۲۰ ppt (سطح a) بوده است که در این تیمارها اختلاف معنی داری وجود ندارد. در این سطح به دلیل اینکه محیط کشت کانوی و گیلارد دارای ویتامین هستند (کانوی: B<sub>1</sub>, B<sub>12</sub> و گیلارد: B<sub>1</sub>, B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub>) و دیگر محیط کشت ها (TMRL, N<sub>8</sub>) فاقد ویتامین هستند لذا احتمالاً به دلیل وجود ویتامین میزان کلروفیل نیز بیشتر بوده است. در سطح b که مربوط به محیط کشت TMRL و در سه شوری، محیط کشت گیلارد شوری ۳۰ و ۲۵ و همچنین محیط کشت کانوی با شوری ۳۰ ppt می باشد از نظر آماری اختلاف معنی داری با یکدیگر ندارند. در این سطح اگرچه محیط کشت های گیلارد و کانوی دارای ویتامین هستند ولی از نظر میزان کلروفیل با محیط کشت TMRL در سه شوری تفاوت ندارند در واقع این نتیجه نشان می دهد که ویتامین بر میزان کلروفیل در شوری بالا (۳۰ و ۲۵ ppt) بی تاثیر بوده است. سطح c مربوط به محیط کشت N<sub>8</sub> با سه شوری می باشد که با سطح a و b اختلاف معنی داری دارد. به دلیل وجود ویتامین ها و مولیبدات در محیط کشت های گیلارد و کانوی در مقایسه با محیط کشت N<sub>8</sub>، بالا بودن میزان کلروفیل در این محیط کشت ها قابل توجیه است در حالی که در سطح b، محیط کشت TMRL وجود دارد که میزان کلروفیل بالاتری نسبت به محیط کشت N<sub>8</sub> دارد ولی دارای ویتامین نیست. در بررسی مواد اولیه محیط کشت های TMRL و N<sub>8</sub> مشخص می شود اگرچه هر دو محیط بدون ویتامین



هستند و حتی محیط  $N_8$  دارای برخی عناصر کمیاب است که در محیط TMRL وجود ندارد ولی میزان مواد اصلی مانند نیترات، فسفات و آهن محیط کشت TMRL بسیار بیشتر از محیط کشت  $N_8$  است لذا احتمالاً به دلیل غلظت بالای مواد اصلی، میزان کلروفیل TMRL بیشتر از  $N_8$  بوده است. در این بررسی بیشترین میزان کلروفیل در سه محیط کشت (کانوی، گیلارد و  $N_8$ ) در شوری ۲۰ ppt بوده است و فقط در محیط کشت TMRL در شوری ۲۵ ppt بیشترین کلروفیل مشاهده شده است. این مطلب نشان می‌دهد که افزایش شوری و استرس ناشی از آن می‌تواند باعث کاهش میزان کلروفیل شود. Na و همکاران (۲۰۱۲) اثرات ۵ سطح شوری (۰ تا ۱۹) را بر رشد، ترکیب شیمیایی و تولید چربی جلبک *Nannochloropsis oculata* در شرایط کنترل شده در مدت ۱۹ روز بررسی کردند. نتایج نشان داد که زی توده خشک در شوری ۲۵٪ در روز دهم بیشترین میزان بوده است. همچنین بیشترین کلروفیل a در همین شوری و به میزان  $26/47 \text{ mg/g}^{-1}$  بوده است.

چنانچه مشاهده می‌شود بیشترین تراکم و بیشترین میزان کلروفیل مربوط به محیط کشت کانوی است. در بررسی مواد محیط کشت ها مشاهده می‌شود که این محیط کشت دارای اسید بوریک و مولیبدات آمونیوم است که در دیگر محیط کشت‌ها وجود ندارد. بور برای رشد جلبک‌ها یک عنصر ضروری است که شکل غالب آن در آب، اسید بوریک است. بور قابلیت تجمع در گیاهان را دارد (WHO., 1980) این عنصر را می‌توان به عنوان کود به محیط کشت اضافه کرد که باعث جذب بیشتر نیترات در محیط می‌شود. همچنین می‌تواند به طور مستقیم در متابولیسم کلسیم، فسفر و منیزیم تأثیر گذارد. از طرف دیگر محیط کشت کانوی دارای دو منبع نیتروژنی است که شامل مولیبدات آمونیوم و نیترات پتاسیم است که یون آمونیوم و یون نیترات مورد نیاز ریزجلبک را تأمین می‌کنند.

میزان نیتروژن ریز جلبک‌ها از ۱٪ تا بیش از ۱۰٪ وزن خشک متغیر است. میزان نیتروژن نه فقط در بین گروه‌های مختلف متفاوت است (به عنوان مثال در دیاتومه‌ها کمتر می‌باشد) بلکه در خصوص گونه‌ها نیز بستگی به میزان ذخیره و قابلیت در دسترس بودن دارد. نیتروژن اکثراً به شکل نیترات ( $NO_3^-$ ) مورد استفاده قرار می‌گیرد اما اغلب از آمونیوم ( $NH_4^+$ ) و اوره نیز استفاده می‌شود. ترکیبات آلی نیتروژنی متنوعی توسط جلبک‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد و تعدادی از آنها فقط می‌توانند به عنوان منبع نیتروژنی باشند. نیتروژن آمونیوم اغلب به عنوان یک منبع نیتروژن برای میکروارگانیسم‌ها ترجیح داده می‌شود (معصومی زاده، ۱۳۸۳). گیاهان منبع آمونیومی را راحت‌تر از منابع نیتراته جذب می‌کنند و در پدیده فتوستتس در درجه اول منبع آمونیومی و در صورت فقدان از منبع نیتراته استفاده می‌کنند (صلواتیان، ۱۳۸۵). تخمین زده می‌شود که نیترات و آمونیوم در ارتباط با pH محیط کشت مؤثر باشند. هنگامی که نیتروژن آمونیوم به عنوان تنها منبع نیتروژن مورد استفاده قرار می‌گیرد pH در طول رشد در نتیجه رها ساختن یون  $H^+$  کاهش می‌یابد. افزایش pH زمانی اتفاق می‌افتد که نیترات به عنوان تنها منبع نیتروژن مورد استفاده قرار می‌گیرد (Richmond, 2004). لذا در محیط کشت‌های دیگر که فقط از نیترات به عنوان منبع نیتروژنی استفاده شده است احتمالاً به دلیل کاهش pH و لذا اسیدی شدن محیط در رشد میکروجلبک‌ها اثر منفی داشته و به عنوان یک عامل محدود کننده می‌باشد.

بیوتین ( $B_6$ ) و تیامین ( $B_1$ ) و  $B_{12}$  در مسیرهای متابولیکی که در تمام ارگانیسم‌ها وجود دارند و به عنوان کوفاکتور مورد استفاده قرار می‌گیرند. در گیاهان عالی‌تر این دو ویتامین توسط سلول‌ها سنتز می‌شوند (Sournia., 1987). از آنجا که فقط محیط کشت کانوی و گیلارد دارای ویتامین هستند لذا نیازهای رشد ریزجلبک را به خوبی تأمین کرده و رشد و میزان کلروفیل در این محیط کشت‌ها بیش از محیط کشت‌های TMRL و  $N_8$  است.

بطور کلی در کشت ریز جلبک‌ها تغییر در عوامل فیزیکی و شیمیایی، زمان برداشت و نحوه فراوری روی ترکیبات شیمیایی تأثیر گذار است. با توجه به اینکه در تحقیق حاضر از محیط کشت‌های مختلف در شوری‌های متفاوت استفاده گردید نتایج نشان دادند که محیط کشت کانوی با شوری ۲۵ قسمت در هزار از نظر افزایش تراکم سلولی و با شوری ۲۰ قسمت در هزار از نظر میزان کلروفیل a بیشترین بازده را در بین محیط کشت‌های دیگر نشان داد که بر این اساس می‌توان چنین نتیجه‌گیری نمود که درجه شوری به طور مستقل می‌تواند بر تراکم

سلولی و میزان کلروفیل a تاثیر گذار باشد. همچنین وجود تفاوت در مواد تشکیل دهنده محیط کشت ها نیز سبب تغییرات در رشد می شود. لذا با توجه به هدف کشت می توان از محیط کشت کانوی با شوری ppt ۲۵ یا گیلارد با شوری ppt ۲۰ استفاده نمود. مثلاً برای غذادهی به آبزیانی که در شوری ppt ۲۰ سازش یافته اند از محیط کشت گیلارد استفاده شود.

## منابع

- صلواتیان، م. آذری تاکامی، ق. کیوان، ا. وهابزاده رودسری، ح. رجبی نژاد، ر.، ۱۳۸۵. ارزیابی رشد و زی توده جلبک *Nannochloropsis oculata* در محیط کشتهای مختلف. مجله علوم دریایی ایران، دوره پنجم، شماره ۱ و ۲، ۴۳-۲۵۳
- قادری اردکانی ف.، قائی م.، رومیانی ل.، ۱۳۸۹. بررسی شوری و دما بر رشد ریز جلبک *Nannochloropsis oculata* در محیط کشت های مختلف، شانزدهمین همایش ملی و اولین همایش بین المللی زیست شناسی ایران، دانشگاه فردوسی مشهد.
- قزلباش، ف. فربودنیا، ط. آق، ن.، ۱۳۸۸. خالص سازی جلبکهای تک سلول *Nannochloropsis sp.* و *Isochrysis sp.* با استفاده از غلظتهای مختلف نمک و شدتهای روشنایی مختلف، مجله زیست شناسی ایران، دوره ۲۲، شماره ۱، ۹۵-۱۰۲
- معصومی زاده، س. ز.، ۱۳۸۳. بررسی روند رشد برخی فیتوپلانکتونهای بومی استان خوزستان در شرایط آزمایشگاهی، پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، دانشکده علوم دریایی، ۳۵۰.
- Banerjee, S., Hew, W. E., Khatoon, K. and Shariff, M., 2011, Growth and proximate composition of tropical marin *Chaetoceros calcitrans* and *Nannochloropsis oculata* cultured out door and under laboratory conditions, DOI: 10.5897/AJB10.1748.
- Haran M. P., 1992, Monual on shrimp hatchery operation and management (*Penaeus monodon*). Publ: TASPAC. 114pp
- Henriques, M., Silva A. and Rocha J., 2007, Extraction and quantification of pigments from a marine microalga: a simple and reproducible method.
- Na, G., Qiang, L., Gang L., Yehui T., Liangmin, H. and Junda, L., 2012. Effect of salinity on growth, biochemical composition, and lipid productivity of *Nannochloropsis oculata* CS 179. Engineering in Life Sciences, vol: 12, Issue 6, 631-637
- Richmond, A., 2004, Hand book of microalgal culture: Biotechnology and Applied phycology blackwell publishing. 566pp
- Sournia, A., 1978. Phytoplakton manual. Publ: Parise Unisco. 337p
- Toyub, M., Uddin M., Miah M. and Habib M., 2011. Growth Performance and Nutritional Analysis of *Spirulina platensis* in Different Concentrations of Papaya Skin Powder Media, Bangladesh J. Sci. Ind. Res. 46(3), 333-338, 2011.
- WHO Technical Report Series No. 647; 1980. (Recommended health-based limits in occupational exposure to heavy metals)