تاثیرات سختی محیط کشت بر خالص سازی و تشکیل کلونی در جلبک سبز *Scenedesmus quadricauda*

امیدوار فرهادیان* و امید جعفری

اصفهان، دانشگاه صنعتی اصفهان ، دانشکده منابع طبیعی، گروه شیلات

تاریخ دریافت: ۹۲/۷/۶ تاریخ پذیرش: ۹۳/۵/۱۶

چکیده

در این تحقیق تاثیرات محیط کشت با سختی های مختلف صفر (شاهد)، ۲۰۰، ۴۰۰ و ۶۰۰ میلی گرم بر لیتر از کربنات کلسیم بر خالص سازی و تشکیل کلونی در کشت های جلبک سبز سندسموس(*Scenedesmus quadricauda*) آلوده شده با سیانوباکتریها بررسی گردید. نتایج نشان داد که سختی محیط کشت تاثیر معنی داری(P<۰/۰۵)برخالص سازی جلبک سندسموس دارد. دامنه تراکم سلولی در هفته اول و دوم به ترتیب ۲۲۴-۱۴۴ و ۵۰۶/۷-۴۰۲/۷ هزار سلول در میلی لیتر برای سندسموس و برای سیانوباکتریها به ترتیب ۱۷/۳-۷/۱ و ۳۲/۸-۵/۱ هزار سلول در میلی لیتر بدست آمد. علاوه بر این، سختی های مختلف محیط کشت BBM بر جمعیت سیانوباکتر تفاوت معنی داری داشت (P<۰/۰۵) در حالیکه بر سلولهای سندسموس تفاوت معنی داری مشاهده نگردید(P>۰/۰۵). درمحیط کشت BBM با سختی بالاتر (۴۰۰ و ۶۰۰ میلی گرم در لیتر از کربنات کلسیم) و دوره پرورش طولانی تر (دوهفته) سلولهای سیانوباکتریها بطور معنی داری کاهش نشان دادند (P<۰/۰۵). علاوه بر این، در سختی بالای محیط کشت، تعدادکلونی های تک سلولی کاهش و تعداد کلونی های چندسلولی افزایش داشت در حالیکه پاسخ سیانوباکتریها با کاهش قابل توجه در تعداد سلولها همراه بود. بطورکلی در این تحقیق، کشت های جلبک سندسموس بوسیله افزایش سختی محیط کشت از آلودگی های سیانوباکتریایی خالص شده و همچنین جمعیت آن تمایل به تشکیل کلونی های چند سلولی پیدا نموده که زیست توده جلبکی را افزایش می دهد.

واژه های کلیدی: سختی آب، محیط کشت BBM ، خالص سازی جلبکی، جلبک سندسموس ، سیانوباکتریها، تشکیل کلونی

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۳۱۳۳۹۱۳۵۶۴ ، پست الکترونیکی: omfarhad@cc.iut.ac.ir

مقدمه

کاربردهای متنوع و شگفت انگیز جلبک‌ها در تغذیه، پزشکی و خواص درمانی، پرورش آبزیان، کاغذ سازی، تکنولوژی‌های نوین محیط زیست و تصفیه خانه‌های آب به عنوان جاذب‌های زیستی باعث شده تا جلبک‌ها بیش از گذشته مورد توجه و مطالعه قرار گیرند. این موجودات، تولید کنندگان اولیه غالب در اکثر محیط‌های آبی هستند و قسمت اعظم انرژی را برای بسیاری از شبکه‌های غذایی آب فراهم می‌کنند. وجود اسیدهای چرب، اسیدهای آمینه ، ویتامین‌ها، کارتنوییدها و مواد مغذی مورد نیاز لاروها در جلبک‌ها بر اهمیت استفاده از آن‌ها می‌افزاید (۳). علاوه بر این، امروزه زیست توده جلبکی می تواند اساسا بعنوان غذای دام و آبزیان پرورشی، و بعنوان کودهای زیستی استفاده گردد. از زیست توده جلبکی می توان در طی فرایندهای مختلف تولید انرژی استفاده نمود که نشان دهنده اهمیت روز افزون در تولید سوخت زیستی (Biodiesel) متکی بر زیست توده جلبکی است (۱۱).

بطور کلی تولید جلبک های میکروسکوپی نیازمند شرایط فیزیکوشیمیایی ویژه ای می باشد. اگرچه بسیاری از جلبک ها نیازهای اختصاصی دارند اما ۹۹/۹ درصد از تولید زیست توده جلبکی به قابلیت دسترسی ۶ عنصر عمده

کربن، اکسیژن، هیدروژن، نیتروژن، سولفور و فسفر بستگی دارد. کربن و نیتروژن نقش بسیار مهمی در چرخه رشد جلبک ها و تولیدزیست توده دارند(۴). همچنین نقش و عملکرد سایر عناصر مانند کلسیم، منیزیم، آهن، مس، منگنز و روی برای فعالیت های فتوسنتزی در جلبک های میکروسکوپی بسیار حائز اهمیت است (۳).

علاوه بر تامین شرایط محیطی و عناصر مورد نیاز رشد، جداسازی و خالص سازی جلبک های میکروسکوپی از سایر گونه هاو انواع موجود در جامعه فیتوپلانکتونی و به منظور پایه گذاری کشت های خالص تک گونه ای، از اهمیت کاربردی بالایی برخوردار است. بنابراین، بهبود تکنیک های مرسوم خالص سازی همواره از موضوعات تحقیقی است. جداسازی و خالص سازی جلبک های میکروسکوپی از سایر گونه هابخصوص جداسازی جلبک های سبز-آبی با تکنیک هایی از قبیل مشاهده و جمع آوری سلولها در زیر میکروسکوپ و کشت آنها با استفاده از محیط کشت جامد از قبیل آگار-آگار و یا محیط کشت مایع از قبیل BBM بسیار متداول است و همواره با کشت ها و پایش های متوالی انجام می شود. معمولا این روشها کاری پرهزینه، زمان بر و در نهایت با کارائی نسبتا پائین است (۱۷و ۲۱).

یک دسته از جلبک های میکروسکوپی که در بسیاری از آبهای شیرین یافت میشوند جلبک های سبز (کلروفیت) است. این جلبک ها از قبیل کلرلا (*Chlorella* spp.) و سندسموس (*Scenedesmus* spp.) کاربردهای بسیاری دارند و همواره مورد توجه بسیاری از محققان هستند. جلبک های سبز-آبی (سیانوباکتریها)از مهمترین جلبک های آلوده کننده در کشت های جلبک های سبز است. به منظور بهبود روش های خالص سازی جلبک های سبز از جلبک های سبز-آبی، یکی از مهمترین روش ها ایجاد تغییرات در شرایط شیمیایی محیط کشت است.

استفاده از تغییرات درسختی محیط کشت می تواندراهکار مناسبی در حذف جلبکهای سبز-آبی نامطلوب باشد. سختی آب بطور معمول بر ترکیب فیتوپلانکتونها و دینامیک جمعیت آنها تاثیر می گذارد. سختی می‌تواند معلول اختلاط انواع نمک های دو ظرفیتی باشد، هرچند که کلسیم و منیزیم معمول ترین منابع سختی آب هستند (۳۵). آبهای با غلظت بالای ۱۵۰ میلی گرم در لیتر (یا ۱/۴۹ میلی مولار) از کربنات کلسیم را آبهای سخت در نظر می گیرند(۵). بسیاری از خاک ها غنی از کربنات های کلسیم، منیزیم و سدیم می باشند که در واقع، شستشوی سطحی، آبهای جاری و روشهای آبیاری باعث تجمع و متراکم شدن این عناصر در اکوسیستمهای آبی میشود (۱۰). این املاح باعث افزایش ظرفیت هدایت الکتریکی، قلیائیت و سختی در منابع آب می شوند (۳۳).

افزایش سختی آب می تواند نقش مهمی در کاهش تراکم سیانوباکتریها از قبیل *Microcystis*، *Aphanocapsa* و *Anabena* داشته باشد (۷ و۸). Reynolds و همکاران در سال ۱۹۸۷ (۲۴) بیان نمودند که رشد و غالبیت در بسیاری از سیانوباکتریها مرتبط با مکانیسم شناوری آنها است و وجود واکوئل های گازی در آنها به سلولها اجازه می دهد تا جابجا شوند و خود را در شرایط نوری مناسب قرار دهند (۳۲). سختی آب با از بین بردن واکوئل های گازی دربعضی از سیانوباکتریهای آب شیرین باعث کاهش تعداد سلولهادر جمعیت آنها می شود (۷ و ۸).

دراین مطالعه تاثیر سختی‌های مختلف محیط کشت بر عملکرد ترکیب جلبک سندسموس (*Scenedesmus quadricauda*) و سیانوباکتریها با هدف اصلی خالص سازی جلبک سندسموس از سیانوباکتریها بررسی گردید. یافته های این تحقیق در خالص نمودن جلبک های سبز در محیط های آزمایشگاهی بخصوص در زمان آلوده شدن به سیانوباکتریها مفید است. از سوی دیگر، یافته های این تحقیق را می توان در مهار نمودن شکوفایی جلبکی ناشی

از سیانوباکتریها در محیط های آبی واستخرهای پرورش ماهی آب شیرین با استفاده از تغییرات در سختی آب استفاده نمود.

مواد و روشها

کشت و تهیه سوسپانسیون سلولی ناخالص اولیه: کشت سوسپانسیون سلولی مخلوط که شامل جلبک *S. quadricauda* به همراه گونه های از سیانوباکتریهابوده، با پرورش مخلوط جلبکی در ارلن مایرهای ۲ لیتری حاوی محیط کشت BBM (Bold Basal Medium) (جدول ۱) بعنوان محیط کشت پایه انجام گردید تا ذخیره اولیه ازجلبک سندسموس و سیانوباکتریها جهت انجام آزمایشات فراهم شود. برای کشت جلبک، ۲ لیتر آب مقطر در ارلن مایر ۲ لیتری شیشه ای ریخته شده و به آن ها طبق جدول۱ مقادیر ۱۰، ۱، ۱و ۱ میلی لیتر از استوک های A، B ، C و D اضافه گردید. با استفاده از pH متر اسیدیته آغازین محیط کشت در ۶/۸ تنظیم شده و محلول به حجم رسانیده شد. سپس کلیه ظروف حاوی محیط کشت‌های جلبک با سرپوش پنبه‌ای به همراه لوله‌های هوادهی در دمای ۱۲۱ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ دقیقه در دستگاه اتوکلاو (مدل 121A، ساخت ایران) ضدعفونی و استریل گردید. ۲۰۰ میلی لیتر از ذخیره جلبک سندسموس آلوده به سیانوباکتریها به عنوان ذخیره اولیه جلبک به محیط کشت دارای ویتامین B12 (یک میکروگرم در لیتر) اضافه گردید و در نهایت در دمای ۲۴ درجه سانتی گراد و شدت نور ۶۰ میکرومول فوتون بر متر مربع بر ثانیه و در شرایط نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی قرار داده شد. تراکم جمعیت جلبک سندسموس نسبت به سیانوباکتریها غالبیت داشت. این ذخیره مشترک از سندسموس و سیانوباکتر برای انجام آزمایش اصلی استفاده گردید.

جدول ۱- محیط کشت (۲۱).

استوک	نوع ماده مصرفی	مقدار ماده مصرفی (گرم)	حجم مورد نیاز (برای تهیه استوک ها)
A	$NaNO_3$	۱۰	۴۰۰ میلی لیتر
	$MgSO_4.7H_2O$	۳	
	K_2HPO_4	۴	
	KH_2PO_4	۶	
	$CaCl_2$	۱	
	NaCl	۱	
B	$ZnSO_4$	۸/۸۲	۱ لیتر (این استوک جهت حل شدن باید اتوکلاو شود)
	MoO_3	۰/۷۱	
	$Co(NO_3)_2.6H_2O$	۰/۴۹	
	$MnCl_2$	۱/۴۴	
	$CuSO_4.5H_2O$	۱/۵۷	
C	H_3BO_4	۱/۱۴	۱۰۰ میلی لیتر
	EDTA	۵	
	KOH	۳/۱	
D	$FeSO_4.7H_2O$	۴/۹۸	۱ لیتر
	HCl	۱(ml)	

اعمال شرایط افتراقی و جداسازی جلبکها: به منظور ارزیابی میزان خلوص جلبک *S. quadricauda* از آلودگی سیانوباکتریایی، محیط کشت BBM با سطوح مختلف سختی شامل چهار سطح صفر(شاهد)، ۲۰۰، ۴۰۰ و ۶۰۰ میلی گرم بر لیتر کربنات‌کلسیم در نظر گرفته شد. ابتدا مقدار کافی محیط کشت BBM (جدول ۱) تهیه گردید و سپس مقادیر کربنات‌کلسیم مطابق غلظت تیمارهای مورد نظر در فلاسک‌های ۲۵۰ میلی لیتری دارای BBM اضافه شد. پس از به هم زدن، pH تمام واحدهای آزمایشی در ۶/۸ تنظیم گردید. تنظیم pH تمام تیمارها با هیدروکسیدپتاسیم ۰/۱ نرمال و اسیدکلریدریک ۰/۱ نرمال با استفاده از pH متر انجام شد. پس از انجام اتوکلاو و هم دما شدن با دمای آزمایشگاه، محلول ویتامین B12 به میزان یک میکروگرم در لیتر از محیط کشت به هر فلاسک با رعایت شرایط استریل اضافه گردید. پس از بهم زدن ملایم، به هر فلاسک از ذخیره جلبکی مشترک، ۲۰ میلی لیتر اضافه و در شرایط کشت شامل دمای آب ۲۴ درجه سانتی گراد و شدت نور ۶۰ میکرومول فوتون بر متر مربع بر ثانیه (اندازه گیری شده با شدت نور سنج مدل LI-COR LI-189) و ۱۲ ساعت روشنایی/۱۲ ساعت تاریکی قرار گرفت. آزمایش به صورت طرح کاملا تصادفی با چهار تیمار و سه تکرار به مدت ۱۴ روز انجام شد. این دوره کشت اجازه می داد تا در شرایط ایجاد شده جلبک هاحداقل دودوره تکثیر را طی نمایند و اطمینان حاصل شود که جلبک ها در شرایط تیماری ایجاد شده تولید مثل حاصل نموده اند (۱).

ارزیابی تعداد سلولها: تعداد سلولهای جلبکی و کنترل میزان آنها در دوره آزمایش، جلبک ها با استفاده از لام هماسایتومتری (۰/۰۶۲۵mm^2 ×۰/۲ mm) ومیکروسکوپ اینورت (مدل Belgium Ceti) براساس روش Martinez و Chakroff (۱۹۷۵) (۲۰) پس ازتثبیت نمونه ها با محلول لوگول ایدین (مقدار ۰/۱ میلی لیتر لوگول در ۳ میلی لیتر نمونه) شمارش گردیدند.با توجه به اینکه حذف (و یاجداسازی) سیانوباکتریها در تیمارهای مختلف سختی نیازمند یک دوره آزمایش بود لذا ارزیابی و مقایسه تراکم جمعیت جلبک ها در پایان هفته اول و دوم انجام گرفت.

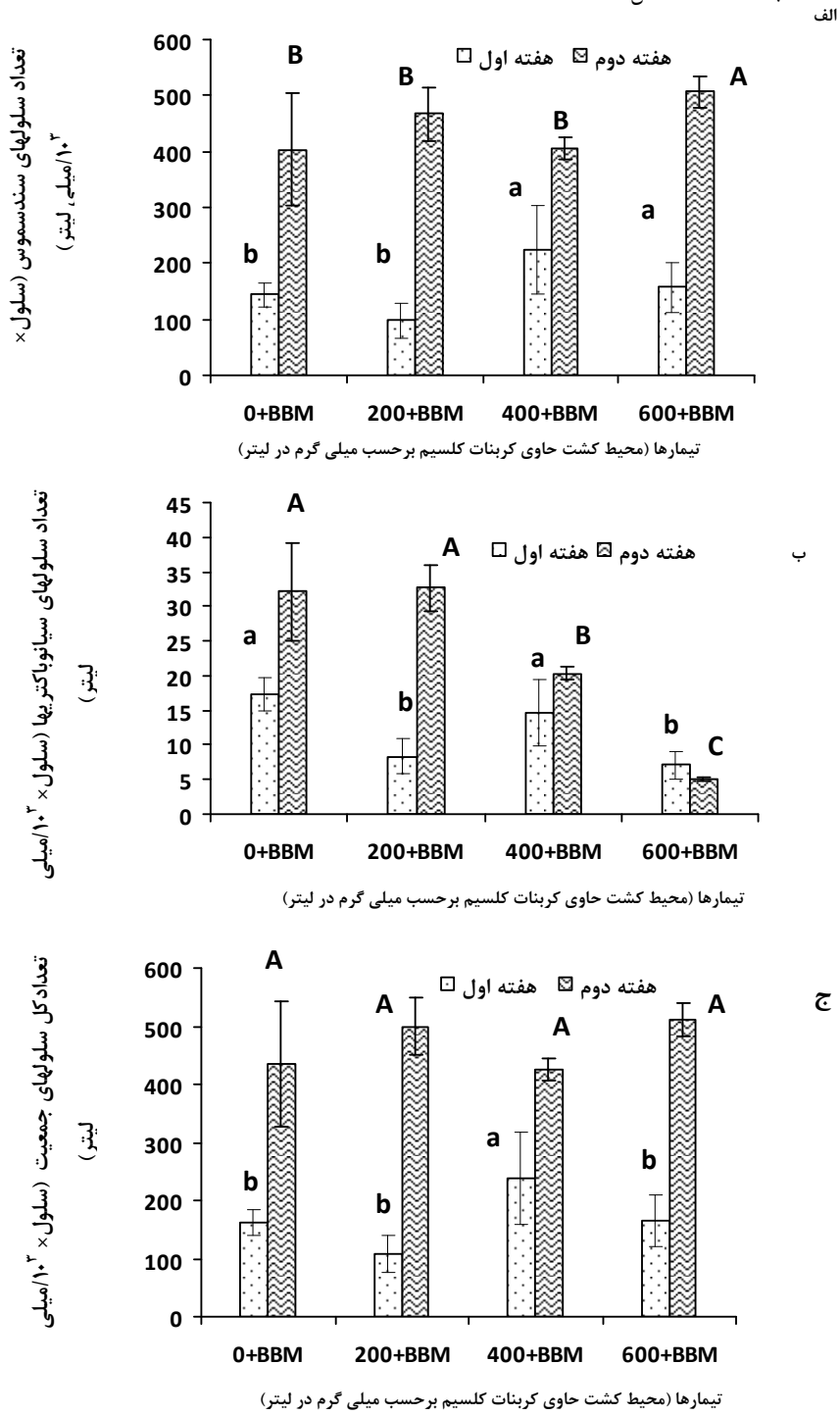
آنالیز آماری داده ها با تجزیه واریانس یک طرفه (One-way ANOVA)انجام شد. برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون چند دامنه دانکن (Duncan test) و آزمون تی تست (T-test)در سطح معنی داری ۵ درصد استفاده شد (۳۶). آنالیزهای آماری با استفاده از نرم افزار SPSS انجام گردید.

نتایج

خالص سازی سندسموس: نتایج حاصل ازشمارش تراکم جمعیت جلبک سندسموس (شکل ۱–الف)، سیانوباکتریها (شکل ۱–ب) و کل جمعیت (شکل ۱–ج) در طی هفته اول و دوم به تفکیک در تیمارهای مختلف در شکل ۱ ارائه شده است. نتایج نشان داد که تیمارهای مختلف از سختی محیط کشت، تاثیر معنی داری(P<۰/۰۵) بر خالص شدن گونه سندسموس در مقابل سیانوباکتریها دارند. تعداد سلولهای سندسموس در هفته اول و دوم به ترتیب ۲۲۴–۱۴۴ و ۵۰۶/۷–۴۰۲/۷ هزار سلول در میلی لیتر در حالیکه تراکم سلولهای سیانوباکتریها در هفته اول و دوم به ترتیب ۱۷/۳–۷/۱ و ۳۲/۸–۵/۱ هزار سلول در میلی لیتر است (شکل ۱). بررسی و مقایسه روند افزایش سلولهادر سندسموس و کاهش آن در سیانوباکتریها در تیمارهای مختلف سختی بر اساس درصدکل جمعیت برای هفته اول و هفته دوم در شکل ۲ ارائه شده است. نتایج نشان داد که در سختی های مختلف محیط کشت درصد سلولهای سیانوباکتر تفاوت معنی داری داشت (P<۰/۰۵) در حالیکه بر تعداد سلولهای جلبک سندسموس تاثیر معنی داری مشاهده نگردید (P>۰/۰۵).

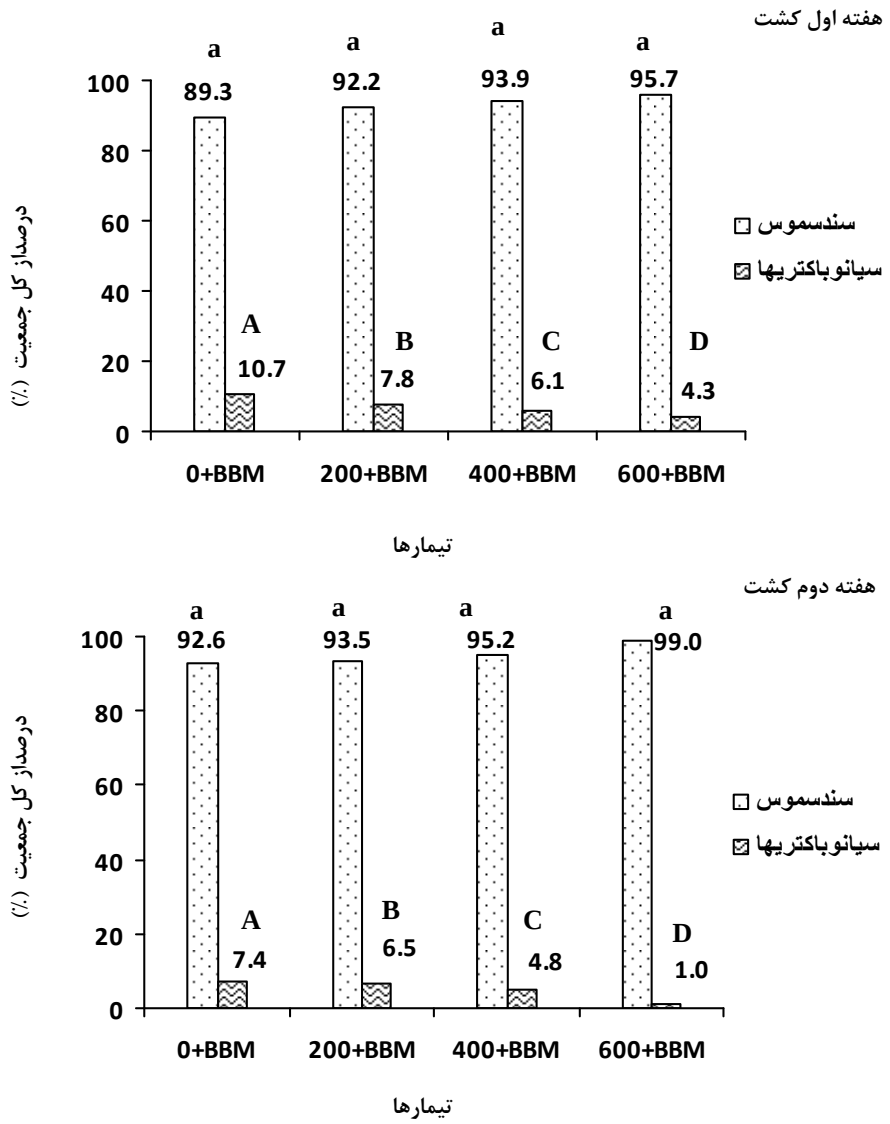
افزایش سختی آب تاثیر قابل ملاحظه‌ای را بر کاهش سلولهای سیانوباکتریها در مقابل سندسموس داشت (شکل ۲). بالاترین درصد خلوص کشت سندسموس (۹۹٪ در

پایان هفته دوم) و کمترین میزان سیانوباکتریها (۱ ٪ در پایان هفته دوم) در تیمار BBM+۶۰۰ بدست آمد (شکل ۲).



شکل ۱- تعداد سلول جلبک در تیمارهای مختلف از سختی محیط کشت در پایان هفته اول و دوم کشت . الف) جلبک سندسموس ، ب) سیانوباکتریها ، ج) کل جمعیت (سندسموس+سیانوباکتریها). مقادیر میانگین ± خطای استاندارد بوده و علائم نامشابه در هر ستون برای هفته اول (حروف کوچک) و برای هفته دوم (حروف بزرگ) در تیمارهای مختلف از سختی با آزمون دانکن بیانگر عدم تفاوت معنی داری است. مقایسه هر تیمار در طی دوهفته آزمایش با آزمون تی

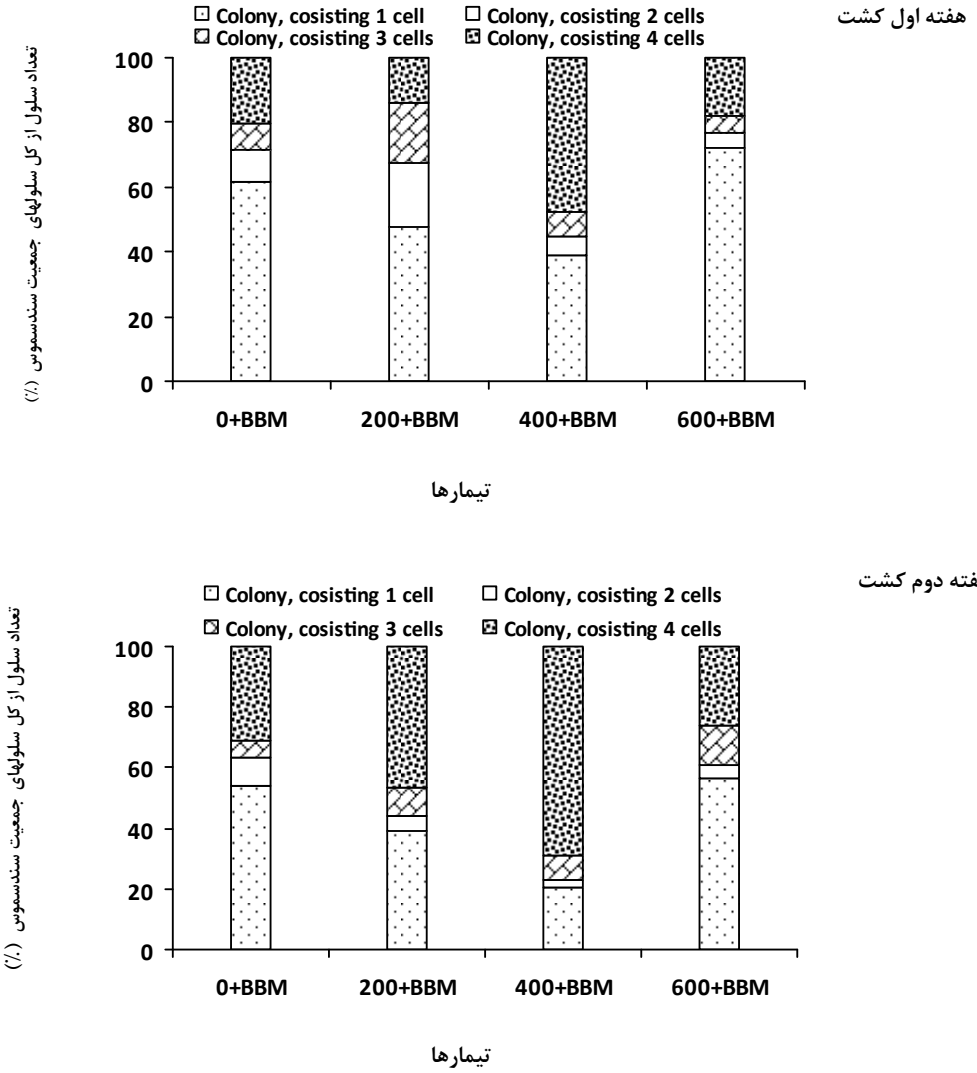
در سطح ۵ درصد انجام گردید.



شکل ۲- میانگین درصد جمعیت جلبک سندسموس و سیانوباکتریها در تیمارهای مختلف از سختی محیط کشت در پایان هفته اول و دوم کشت. میانگین ها ی دارای حروف مشابه از نظر آماری با آزمون دانکن در سطح ۵ درصد اختلاف معنی داری ندارند (حروف کوچک برای جلبک سندسموس و حروف بزرگ برای سیانوباکتریها). مقایسه هر تیمار در طی دوهفته آزمایش با آزمون تی در سطح ۵ درصد انجام گردید.

تشکیل کلونی یا اجتماعات چند سلولی در سندسموس: ترکیب انواع سلولها (بر اساس درصد از جمعیت کل) جلبک سندسموس(چهار گروه شامل کلونی های دارای ۱، ۲ ، ۳ و ۴ سلول) در تیمارهای مختلف از محیط کشت با سختی های مختلف در شکل ۳ ارائه شده است. نتایج نشان داد که افزایش سختی آب تا ۴۰۰ میلی گرم در لیتر باعث کاهش کلونی های تک سلولی در مقایسه با کلونی های چندسلولی (بیش از ۲ سلول) می شود. کلونی های چهار سلولی با افزایش سختی محیط کشت تا ۴۰۰ میلی گرم در لیتر افزایش داشت. در واقع، پاسخ سندسموس به افزایش سختی محیط کشت (تا ۴۰۰ میلی گرم در لیتر)

بصورت افزایش تعداد سلولها و تشکیل کلونی های چند سلولی ارزیابی گردید.



شکل۳- میانگین درصد سلولهای مختلف ازجمعیت جلبک سندسموس در تیمارهای مختلف از سختی محیط کشت در پایان هفته اول و دوم از دوره کشت.

بحث

در این مطالعه جلبک سبز سندسموس رشد و سازگاری مناسبی در سختی های مختلف محیط کشت داشت و خلوص جمعیت آن در مقابل سیانوباکترهای ناخواسته افزایش قابل ملاحظه‌ای را نشان داد. بسیاری از جلبک های تک سلولی در محدوده مشخصی ازسختی آب قادر به ادامه حیات هستند و با خارج شدن از این محدوده به تدریج تعدادآنهاکاهش می‌یابد. در رابطه با تأثیر سختی‌های مختلف محیط کشت بر عملکرد جلبک‌های تک سلولی و بخصوص جلبک *S. quadricauda* کمتر تحقیق صورت گرفته است (۲۷،۳۱و ۳۴). معمولا، محیط کشت های باغلظت‌های متفاوت از ترکیبات کلسیم‌دار، تأثیرات

مختلفی بر عملکرد پرورشی جلبکها به لحاظ تولید، رشد و زیست توده دارند. لذا غلظت‌های بسیار کم و یا زیاد کربنات کلسیم می‌تواند نقش ممانعت کننده بر عملکرد جلبک ها داشته باشد. برای مثال، Garg و Garg در سال ۲۰۰۲ (۱۲) گزارش دادند که سختی حدود ۶۳/۲-۳۱/۲ میلی گرم بر لیتر کلسیم برای اغلب جلبکها مناسب است و بالاتر از آن کند کننده رشد خواهد بود. آنها بیان نمودند که گسترده بودن محدوده سختی می تواند به علت شرایط متفاوت محیطی مانند دما، pH، میزان هوادهی، میزان و شدت نور مورد استفاده، تفاوت در ترکیب شیمیایی محیط کشت مورد استفاده و همچنین تفاوت در گونه های جلبکی مورد آزمایش باشد. برای مثال، زمانی که تنها منبع تامین نیتروژن در رشد جلبک *Chlorella pyrenoidosa* نیترات باشد، کلسیم و مس از مهمترین عناصر مورد نیاز است (۳۱). همچنین ممکن است که تأثیرات کلسیم بر رشد جلبک ها از طریق تأثیر آن بر محتوای فسفر قابل دسترس در آب ها باشد زیرا فسفر بصورت فسفات کلسیم محلول است اما افزایش میزان کلسیم در آب ها می‌تواند منجر به افزایش ته‌نشینی فسفات گردد که رشد جلبک ها را محدود مینماید (۱۰).

تعیین دامنه بهینه سختی محیط کشت زمینه را برای عملکرد مناسب جلبک‌های میکروسکوپی فراهم می نماید تا با رشد مناسب سایر مواد غذایی محیط کشت را جذب و مصرف نماید. در واقع ، جلبک های سبز را می‌توان بطور مفید و سودمندی در تصفیه پسآب‌ها بکار گرفت. پسآب‌ها در واقع محیطی غنی از مواد مغذی و به عبارتی محیط کشت‌هایی هستند که عمدتا تامین کننده نیتروژن و فسفات لازم برای رشد جلبک ها می باشند. Wu و Kow در سال ۲۰۱۰ (۳۴) بیان نمودند که تغییر در الگوی منابع فسفر و نیتروژن هماهنگ با زمان افزایش تراکم کلروفیت‌ها نبوده و نتیجه گیری کردندکه تفاوت به دلیل سختی های گوناگون در منابع آبی است.

در این پژوهش جمعیت سیانوباکتریها در سختی های مختلف محیط کشت کاهش معنی داری را نشان داد. اضافه نمودن کلسیم به محیط کشت هم بصورت کلرید کلسیم و هم بصورت کربنات کلسیم به شدت باعث کاهش رشد در سیانوباکتریها می شود (۷). این ممانعت از رشد می تواند ناشی از تاثیر کلسیم به لحاظ تعادل بارالکتریکی (۲۲)، افزایش میزان کدورت حاصل ازکربنات کلسیم و رسوب نمودن کلسیم توام با حضور سایر ترکیبات از قبیل فسفرباشد (۲۳). کلسیم تاثیر بازدارنده بر متابولیسم دارد (۸). Kellman و Neilan در سال ۲۰۰۷ (۱۳) نشان دادند که کلسیم بازدارنده رشد است و میزان محتویات سم را در سلولهای سیانوباکتریها کاهش می دهد.

در این مطالعه انواع مختلفی از اجتماعات سلولی و تشکیل کلنی در جلبک *S. quadricauda* در محیط کشت BBM با سختی های مختلف مورد بررسی قرار گرفت. پاره ای از تغییرات در مروفولوژی یا آرایش های سلولی (تعداد سلولها در کلونی ها) در رابطه با پاسخ این گونه به عواملی نظیر سیستم‌های شکار- شکارچی گری صورت گرفته است که نشان از تغییر فنوتیپی جلبک‌ها در پاسخ به تغییرات شرایط محیطی به دلایل مختلفی مانند حفظ بقا می‌باشد (۲۵). بطور کلی، برخی از جلبک های آب شیرین در مورفولوژی، ویژگی های فیزیولوژیکی، ساختار ژنتیکی و ترکیب بیوشیمیایی خود انعطاف پذیر هستند. این ویژگی جلبک های پلانکتونی بطور قابل توجهی، تحت شرایط زیست محیطی مختلف در اکوسیستم‌های آبی می‌تواند متفاوت باشد. جلبکهایی مانند *Staurastrum* گاهی اوقات ممکن است شکل خاردار خود را از دست بدهند (۱۸). جلبک های سبز آبی مختلف، از جمله *aeruginosa Microcystis*، پتانسیل برای تشکیل کلونی و ایجاد مسمومیت های شیمیایی را دارد. در سیستم هایی که با کمبود مواد غذایی مواجه است و نرخ رشد جلبک در آن آهسته است، این ویژگی ها از جلبک ممکن است یک مکانیسم های دفاعی در برابر چرای موجودات چراکننده

باشد (۱۴ و ۲۹). سایرمکانیسم‌های دفاعی از قبیل اندازه بزرگ، سختی دیواره سلولی، دفع مخاط و تولید سموم مزایای قابل توجهی است که در جلبک ها موجب کاهش تقاضای انرژی مصرفی می‌شود (۶، ۱۶، ۲۹ و ۳۰). از سوی دیگر، شواهد زیادی وجود دارد که نشان می‌دهد مواد شیمیایی آزاد شده توسط زئوپلانکتون‌ها می تواند باعث تشکیل کلونی در برخی فیتوپلانکتون‌های خاص مانند گونه های مختلف از جنس جلبک سندسموس شود (۲۸). برای مثال، مواد شیمیایی منتشر شده از دافنی (*Daphnia*) می تواند روی تشکیل کلونی در سندسموس (*Scenedesmus subspicatus*)موثر باشد (۱۵). چندین گونه از جلبک های سندسموس شناخته شده اند که متحمل تغییرات فنوتیپی در اندازه کلنی می شوند که به وسیله عاملهای زیست محیطی کنترل می شوند (۲۸).

بطور کلی پاسخ سندسموس به افزایش سختی آب تا ۴۰۰ میلی گرم در لیتر با افزایش میزان سلولها و تشکیل کلونی های چند سلولی همراه می باشد در حالیکه پاسخ سیانوباکتریها با کاهش قابل توجه در تعداد سلولها همراه بود. یافته های این پژوهش نشان داد که کشت های جلبک سندسموس بوسیله افزایش سختی محیط کشت از آلودگی های سیانوباکتریایی خالص می شوندو همچنین جمعیت آن تمایل به تشکیل کلونی های چند سلولی پیدا نموده که زیست توده جلبکی را افزایش می دهد. با توجه به یافته های این پژوهش و لحاظ کردن سختی مطلوب برای رشد جلبک سندسموس می توان از آن در محیط های تصفیه فاضلاب ها (۲، ۱۹ و ۲۷) و پسآب های کشاورزی و شهری (۹) و همچنین مزارع پرورش ماهی(۱) استفاده نمود. مطالعات بیشتر در خصوص رفتار جلبک های تک سلولی از قبیل جلبک سندسموس به عوامل مختلف زیستی و محیطی توصیه می شود.

تشکر وقدردانی

از معاونت پژوهشی دانشکده منابع طبیعی دانشگاه صنعتی اصفهان به لحاظ فراهم آوردن بودجه و امکان تحقیق سپاسگزاری می شود.

منابع

۱. حیدری ، ص.، فرهادیان ، ا. ، و محبوبی صوفیانی ، ن . ۱۳۹۰. تولید زیست توده و حذف آمونیاک و نیتریت از پساب کارگاه پرورش ماهی بوسیله کشت جلبک سبز سندسموس کوادریکوادا . مجله محیط شناسی . پائیز ۱۳۹۰ ، شماره ۵۹ ، صفحه ۲۸ –۱۵.

2. Abe, K., Imamaki, A., and Hirano, M. 2002. Removal of nitrate, nitrite, ammonium and phosphate ions from water by the aerial microalgae *Trentepohlia aurea*. Journal of Applied Phycology, 14: 129-134.

3. Barsanti L. and Gualtieri P., 2006. Algae: Anatomy, Biochemistry, and Biotechnology, CRC Press, Taylor and Francis Group, 320 P.

4. Bellinger, E.D., and Sigee, D. 2010. Freshwater Algae: Identification and use as Bioindicators. John Wiley & Sons, Ltd., UK, 271 pp.

5. Boyd, C.E. 1979. Water quality in warmwater fish ponds. Craftmaster Printers, Inc, Opelika, Alabama., 359 pp.

6. Bronmark, C., and Hansson, L. A. 2000. Chemical communication in aquatic system: an introduction. Oikos, 88: 103-109.

7. Carneiro, R. L., Pacheco, A. B. F., and de Oliveira e Azevedo, S.M.F. 2013. Growth and saxitoxin production by *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) correlate with water hardness. Marine Drugs 11: 2949-2963.

8. Carneiro, R.L., Alípio, A.C.N., Bisch, P.M., Azevedo, S.M.F.O., Pacheco, A.B.F. 2011**.** The inhibitory effect of calcium on *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) metabolism. Brazilian Journal of Microbiology. *42*: 1547–1559.

9. De la Noue, J., and Proulx, D. 1988. Biological tertiary treatment of urban wastewaters with chitosan-immobilized *Phormidium.* Applied Microbiol Biotechnology, 29: 292-297.

10. Delince, G. 1992. The ecology of the fish pond ecosystem. Kluwer Academic Publishers. London, 230 pp.

11. Demirbas A. and Demirbas M.F., 2010. Algae energy: Algae as a new source of biodiesel. Springer, 199 pp.

12. Garg, J. and Garg, H. 2002. Nutrient loading and its consequnces in a lake ecosystem. Tropical Ecology 43: 355-358.

13. Kellman, R.; Neilan, B.A. 2007. Biochemical characterization of paralytic shellfish toxin biosynthesis *in vitro*. Journal of Phycology. 43: 497–508.

14. Kyong, H., Jang, M. H., Joo, G. J., and Takamura, N. 2001. Growth and morphological changes in *Scenedesmus dimorphus* induced by substances released from grazer, *Daphnia magna* and *Moina macrocopa*. Korean Journal of Limnology, 34: 285-291.

15. Lampert, W., Rothhaupt, K.O., and von Elert, E. 1994. Chemical induction of colony formation in a green alga (*Scenedesmus acutus*) by grazers (*Daphnia*). Limnology and Oceanography, 39: 1543-1550.

16. Larsson, P., and Dodson, S. 1993. Chemicals communication in planktonic animals. Archive de Hydrobiologia, 129: 129-155.

17. Lavens, P. and Sorgeloos, P. (1996) Manual on the production and use of live food for aquaculture. FAO Fisheries Technical, 295 pp.

18. Lynch, M. 1980. *Aphanizomenon* blooms: Alternate control and cultivation by *Daphnia pulex*. American Society of Limnology and Oceanography. Special Symposium, 3: 299-304.

19. Martinez, M.E., Sanches, S., Jimenes, J.M., El Yousfi, F. and Munoz, L. 2000. Nitrogen and phosphorus removal from urban wastewater by the microalgae *Scenedesmus obliqus.* Bioresource Technology, 73: 263-272.

20. Martinez, M.R., Chakroff, C.L., Pantastico, J.F., 1975. Direct phytoplankton counting techniques using the haemacytometer. Philippine Journal of Agriculture. 55, 43–50.

21. Nichols, H.W. 1973. Growth media – freshwater. In: Stein, J. R. (Editor), Handbook of Phycological Methods – Culture Methods and Growth Measurements. Cambridge University Press, Cambridge, p. 7–24.

22. Pomati, F.; Rosseti, C.; Manarolla, G.; Burns, B.P.; Neilan, B.A. 2004. Interactions between intracellular Na+ levels and saxitoxin production in *Cylindrospermopsis raciborskii* T3. Microbiology 150: 455–461.

23. Reynolds, C.S. 2006. *Ecology of Phytoplankton: Ecology, Biodiversity and Conservation*; Cambridge University Press: New York, NY, USA, 2006; p. 535.

24. Reynolds, C.S., R.L. Oliver, and A.E. Walsby. 1987. Cyanobacterial dominance: The role of buoyancy regulation in dynamic lake environments. New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research 21**:** 379-390.

25. Sommer, U., Gliwicz, Z.M., Lampert, W. and Duncan, A. 1986. The PEG-model of seasonal succession of planktonic events in fresh waters. Archiev de Hydrobiologia, 106: 433-477.

26. SPSS, 2002. Statistical Package of Social Science, Version, 11.5. Chicago, IL, USA.

27. Tam, N.F.Y., and Wong, Y.S. (1989) Wastewater nutrient removal by *Chlorella pyrenoidosa* and *Scenedesmus* sp. Environmental Pollution, 58: 19-34.

28. Trainor, F.R. 1992. Cyclomorphosis in *Scenedesmus armatus* (Chlorophyta): An ordered sequence of ecomorph development. Journal of Phycology, 28: 553-558.

29. Van Donk, E., Lǔrling, M., Hessen, D.O., and Lokhorst, G.M. 1997. Altered cell morphology in nutrient-deficeint phytoplankton and its impact on grazers. Limnology and Oceanography, 42: 357-364.

30. Verity, P.G. and Smetacek, V. 1996. Organism life-cycles, predation and the structure of marine pelagic ecosystems. Marine Ecology Progress Series, 130: 277-293.

31. Walker, J. B. 1953. Inorganic micronutrient requirements like calcium (or strontium), copper and molybdenum of *Chlorella*. Archives of Biochemistry and Biophysics. Vol. 46, pp. 1-11.

32. Walsby, A.E. 1994. Gas vesicles. Microbiological Review. 58**:** 94-144.

33. Wetzel, R.G., Likens, G.E. 1985. *Limnological Analysis*, 2nd ed.; Springer Verlag: New York, NY, USA, p. 391.

34. Wu, J. T. and Kow, L. C. 2010. Alteration of phytoplankton assemblages caused by changes in water hardness in Feitsui Reservoir, Taiwan. Botanical Studies. 51: 521-529.

35. Wurts, W.A. and Durborow, R.M. 1992. Interaction of pH, carbon dioxide, alkalinity and hardness in fish pond. Southern Regional Aquaculture Center. NO.464.

36. Zar, J.H. 1984. Bioststistical analysis, 2nd edition. Prentice Hall Inc., Englewood Cliffs, New York, USA, 718 pp.

Effects of Hardness of Culture Medium on Purification and Colony Formation in Green Algae *Scenedesmus quadricauda*

Farhadian O. and Jafari O.

Natural Resources Dept., Isfahan University of Technology, Isfahan, I.R. of Iran

Abstract

In this study effect of different hardness of 0 (control), 200, 400, 600 mg $CaCO_3$/l of culture medium on purification and colony formation of green alga *Scenedesmus quadricauda* were investigated. Results showed that medium hardness had significant ($P<0.05$) effect on *S. quadricauda* purification. The cell density range were 144-224 and 402.7-506.7 cells$\times10^3$/ml for *S. quadricauda* and 7.1-173 and 5.1-32.8 cells$\times10^3$/ml for Cyanobacteria at 1st and 2nd week, respectively. In addition, BBM with different hardness had significant differences ($P<0.05$) in Cyanobacteria while not differences on *S. quadricauda* population. The Cyanobacteria cells were significantly ($P<0.05$) decreased at higher BBM hardness (400 and 600 mg/l as $CaCO_3$) and longer culture duration (two weeks). In addition, at higher BBM hardness the number of colony consisting of 1 cell decreased and multi-cell colonies (colony consisting of 2, 3 and 4 cells) increased; while Cyanobacteria response was significantly decreasing of cell density. Generally, in this study *S. quadricauda* cultures were purified from Cyanobacteria by increasing of culture medium hardness and also its population tends to make multi-cell colony formation that increased algal biomass.

Key words: Hardness, *Scenedesmus quadricauda*, Cyanobacteria, Culture Medium, Algal Purification, Colony Formation