کارگاه‌های آموزشی مرکز اطلاعات علمی

آموزش نرم‌افزار Word برای پژوهشگران

روش تحقیق کمی

آموزش مهارت‌های کاربردی در تدوین و چاپ مقالات ISI

فصلنامه علمی دوره ۱، شماره ۱، زمستان ۱۳۹۱، صفحه ۳۹-۵۱

زیست توده و رشد جلبک سبز کلروکوکوم (*Chlorococcum sp.*) با استفاده ازگونه‌های آلی و عصاره خاک

امیدوار فرهادیان[1*]، سیدمجتبی فلاحی[2] و نصراله محبوبی صوفیان[3]

۱- استادیار، دانشکده منابع طبیعی دانشگاه صنعتی اصفهان، ایران

۲- دانشجوی کارشناسی ارشد، رشته تکثیر و پرورش آبزیان، دانشکده منابع طبیعی دانشگاه صنعتی اصفهان، ایران

۳- دانشیار، دانشکده منابع طبیعی دانشگاه صنعتی اصفهان، ایران

دریافت: ۱۳۹۱/۰۲/۱۶ پذیرش: ۱۳۹۱/۰۹/۵

*- نویسنده مسئول مقاله: Email: fqbudyo@yahoo.com و omfghad@cc.iut.ac.ir

چکیده:

به‌منظور تعیین تأثیر گونه‌های مرغی و گاوی در پرورش جلبک سبز کلروکوکوم (*Chlorococcum sp.*)، آزمایشی در شش تیمار شامل ۰/۸، ۰/۴، ۰/۲ گرم در لیتر گرد مرغی و ۰/۸، ۰/۴، ۰/۲ گرم در لیتر از گرد گاوی با سه تکرار در طرح کاملاً تصادفی به‌مدت ۲۰ روز اجرا شد. نتایج نشان داد میانگین بالاترین تراکم سلولی ($۸۷/۱۸\times۱۰^{۵}$ سلول در هر میلی‌لیتر)، میزان رشد ویژه (۰/۵۲ در روز)، بیشترین خشک جلبکی (۰/۴۲۲ گرم در لیتر)، کلروفیل a (۹/۲۲ میلی‌گرم در لیتر) در پرورش با گرد مرغی با غلظت ۰/۴ گرم در لیتر است. به‌منظور مقایسه عملکرد این گردها با سایر محیط‌کشت‌ها، آزمایش دوم با پنج تیمار شامل محیط‌کشت BBM[1] (شاهد)، BBM + عصاره خاک، گرد مرغی ۰/۴ گرم در لیتر، گرد گاوی ۰/۴ گرم در لیتر و مخلوطی از تمام تیمارها (BBM + عصاره خاک + گرد مرغی + گرد گاوی به نسبت‌های مساوی) به مدت ۱۵ روز با سه تکرار به‌صورت طرح کاملاً تصادفی اجرا شد. نتایج مقایسه‌ها نشان داد که عصاره خاک + BBM بالاترین تراکم جلبک ($۱۱/۶\times۱۰^{۵}$ سلول در هر میلی‌لیتر) و بیشترین میزان زیست توده (۰/۸۸ میلی‌گرم در میلی‌لیتر)، میزان رشد ویژه (۰/۲۲ در روز)، میزان کلروفیل a (۱۰/۱۵ میلی‌گرم در لیتر) و کمترین زمان دو برابر شدن جمعیت (۳/۱۴ روز) را داشت. ترجیح‌های مهلی، عملکرد عصاره خاک + BBM در تولید زیست توده و رشد جلبک سبز کلروکوکوم مناسب‌تر است.

کلید واژگان: جلبک سبز *Chlorococcum*، گردهای مرغی و گاوی، محیط‌کشت BBM، عصاره خاک، میزان رشد ویژه، زیست توده، کلروفیل a.

1. Bold's Basal Medium

www.SID.ir

مقدمه

منابع تجدیدشونده انرژی، منابع بومی[1] هستند که پتانسیل فراهم آوردن انرژی را بدون آلودگی هوا و گازهای گلخانه‌ای دارند. در حال حاضر منابع انرژی تجدید شونده ۱۴٪ از تقاضای جهانی انرژی را تأمین می‌کنند در حالی‌که منابع آبی ۲۰٪ از انرژی الکتریکی جهان را تأمین می‌کنند. حفاظت و استفاده اصولی از منابع تجدید شونده لازمهٔ توسعه پایدار است (Hall et al., 1993). یکی از منابع مهم تأمین انرژی از دیرباز زیست توده[2] می‌باشد که شامل بقایای کشاورزی و جنگلی، جلبک‌ها، علف‌ها، کودهای جانوری، مواد زائد آلی و مواد زیستی‌اند. بطور سنتی زیست توده در پخت و تولید گرما بخصوص در کشورهای در حال توسعه در مناطق روستایی استفاده می‌شود. در حال حاضر زیست توده تنها ۳٪ از مصرف انرژی اولیه در کشورهای صنعتی را دارد. در کشورهای آسیای میانه سهم بیوماس در مصرف انرژی ۴۰/۲٪ است (Demirbas and Demirbas, 2010).

امروزه زیست توده جلبکی بطور اصلی بعنوان غذای دام و آبزیان پرورشی و کودهای زیستی استفاده می‌شود. علاوه بر این، زیست توده جلبکی را می‌توان طی فرایندهای پیرولیز[3] و تخمیر[4] برای تولید نفت[5]، گاز[6]، هیدروژن[7]، متان[8] و سایر منابع انرژی استفاده کرد (Demirbas, 2006; 2007; 2008; Demirbas and Demirbas, 2010). برای مثال تولید سوختهای زیستی[9] در کشور آلمان در سال ۲۰۰۷ حدود ۴۸۹۰ میلیون تن بود و در سال ۲۰۰۸ به ۵۲۰۲ میلیون تن رسید که نشاندهندهٔ اهمیت کاربرد این منابع انرژی متکی بر بیوماس جلبکی است. در هر شکل، تولید سوخت‌های زیستی از جلبک‌های میکروسکوپی مقادیر زیادی زیست توده لازم دارد (Demirbas and Demirbas, 2010).

علاوه بر نقش‌های یاد شده، کاربردهای متنوع و شگفت‌انگیز جلبک‌ها در تغذیه، پزشکی و خواص درمانی، منابع آبزی‌پروری و کاغذسازی در تکنولوژی‌های نوین محیط‌زیست و تصفیه‌خانه‌های آب بعنوان جاذب‌های زیستی مفید باعث شده تا جلبک‌ها بیش از گذشته مورد توجه و مطالعه قرار گیرند. تنها تولیدکنندگان اولیه غالب در اغلب محیط‌های آبی‌اند و عمده انرژی را برای بسیاری از شبکه‌های غذایی آب فراهم می‌کنند. جلبک‌ها به دلیل تأمین منابع غذایی کافی برای لاروهای آبزیان در آغاز زندگی‌شان، عموماً بهترین غذای زنده برای استفاده در پرورش آبزیان‌اند. وجود اسیدهای چرب، استرول‌های آمینه، ویتامین‌ها، کاروتنوئیدها و مواد معدنی مورد نیاز لاروها در جلبک‌ها بر اهمیت استفاده از آنها می‌افزاید (Barsanti and Gualtieri, 2006).

بطور کلی تولید ۹۹/۹٪ از بیوماس جلبکی به کفایت دسترسی ۶ عنصر عمده کربن، اکسیژن، هیدروژن، نیتروژن، سولفور و فسفر بستگی دارد. کربن نقش بسیار مهمی در چرخه رشد جلبک‌ها ایفا می‌کند. بعد از کربن، نیتروژن مهمترین نقش را در تولید زیست توده دارد (Barsanti and Gualtieri, 2006).

جنس کلروکوکوم *Chlorococcum* از جلبکهای سبز در آبهای شیرین است که به خانواده Chlorococcacese و رده Chlorophycese تعلق دارد. این جلبک توسط Zhang و همکاران در سال ۱۹۹۷ توصیف شده است. کلروکوکومها در هر دو محیط آبی و خاکی زندگی می‌کنند و دارای یک تا چند کلروپلاست به همراه پیرنوئید فرد ساختارهای شکوفه‌ای که از مشخصات سازی آنهاست. اندازه

---

1. Indigenous Resources
2. Biomass
3. Pyrolysis
4. Fermentation
5. Bio-Oil
6. Bio-Gas
7. Bio-Hydrogen
8. Bio-Methane
9. Biodisel

Archive of SID
www.SID.ir

سلولهای کلروکوکوم بین ۲۰۰ تا ۱۵۰۲ میکرون و رنگ آن سبز است و به صورت تکی یا کلنی وجود دارد (Bold and Parker, 1962; Akiyama, 1977; Becker, 1994; McNuff, 2007). اسپورهای کلروکوکوم در شرایط نامساعد و تاریکی حیات خود را حفظ می‌کنند و زمانی که در شرایط مساعد رشد در آب شیرین قرار می‌گیرند تکثیر به شکل هزاران سلول جدید.

جلبک کلروکوکوم رامی‌توان با استفاده از محیط‌کشت‌های شیمیایی BBM و A۹ پرورش داد (Lee and Pirt, 1981; Phang and Chu, 1999; Yuan et al., 2002) اما با توجه به ضرورت پرورش انبوه جلبک‌ها استفاده از مواد شیمیایی توجیه اقتصادی مناسبی ندارد. برای رفع چنین مشکلی با توجه به اینکه کودهای آلی دارای نیتروژن و فسفرند در تأمین مواد مغذی مناسب برای رشد جلبک‌ها از جایگاه ویژه‌ای برخوردارند. این کودها علاوه بر ایجاد سوسپانسیون مناسب به لحاظ نسبت کربن، نیتروژن یا کربن، نیتروژن، فسفر که عموماً ۱۰۰ و ۲۰ : ۱ : ۰/۴ هستند برای استفاده به عنوان محیط‌کشت کاربرد بسیاری دارند (Delmee, 1992).

اهداف مورد نظر در این تحقیق پس از جمع‌آوری، خالص‌سازی جلبک سبز *Chlorococcum*، بررسی تأثیر کودهای مرغی و گاوی به عنوان محیط‌کشت و مقایسه این کودها با سایر محیط‌کشتها از قبیل محیط‌کشت معمول BBM و عصاره خاک[1] با اندازه‌گیری‌های زیست توده، میزان رشد و کارتولیل a در یک دوره پرورش بود.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه‌های جلبکی با نمونه‌برداری آب از مخزن‌های پرورش ماهی انجام شد. سپس با استفاده از میکروپیت، سلولهای فیزیالکتری به طور ناخالص جدا شد و با بهره‌گیری از محیط‌کشت جامد آگار (Agar-Agar) و تجدید مداوم کشت ذخیره خالص جلبکی تهیه گردید. برای تهیه محیط‌کشت جامد به ۱۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر ۲ گرم آگار جامد به محیط‌کشت BBM (براساس روش Nichols (۱۹۷۲)) اضافه شد. محیط‌کشت تهیه شده در دمای ۱۲۱°C به مدت ۱۵ دقیقه اتوکلاو گردید. آنگاه محلول حاصل به صورت مایع و تقریباً گرم و در شرایط استریل در پتری‌دیشهای پلاستیکی (۵۰ میلی‌لیتری) ریخته و درب آن با پارافیلم بسته شد. پس از آنکه محیط‌کشت تهیه شده در دمای اتاق به حالت جامد تبدیل گردید سویه ناخالص تهیه شده از مخزن‌های پرورش ماهی روی محیط‌کشت قرار داده شد تا کلنی‌های جلبکی بعد از ۱۰ روز تشکیل شود. در مرحله بعد مشاهده جلبک خالص‌سازی شده در زیر میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ۱۰۰ میسر شد و بعد از حصول اطمینان کار پرورش آن با استفاده از محیط‌کشت مایع BBM انجام گردید. جلبکها بعد از کشت‌های مرحله‌ای در لوله آزمایش، ارلن مایرهای ۵۰ میلی‌لیتری و ۱۰۰ میلی‌لیتری و به دست آوردن تراکم سلولی مناسب‌ای از جلبک مورد نظر در ارلن مایرهای دو لیتری پرورش داده شد. جلبک کلروکوکوم مورد استفاده در این تحقیق از نظر مشخصات سلولی دارای ۱ تا ۲ کلروپلاست به همراه پیرنوئید فرد ستاره‌ای شکل و دارای صفحه‌ای شکل بود. کلروکوکوم از محدود جلبکهای سبز است که در کشت‌های با مدت بیش از ۲۰ روز رنگ آنها تدریج از سبز به نارنجی متمایل به زرد تغییر می‌یابد (Akiyama, 1977; Phang and Chu, 1999). اگرچه در این تحقیق تلاش شد که نام گونه کلروکوکوم نیز مشخص شود اما به لحاظ تفاوتهای نزدیک سلولشناسی در این جنس از آوردن نام گونه خودداری و تنها به نام جنس اکتفا شد.

1. Soil Extract

www.SID.ir

عصاره کود مرغی و کود گاوی از طریق مخلوط کردن کود با آب مقطر به نسبت ۱ به ۵ تهیه گردید. کود مرغی مورد استفاده دارای ۴۲ درصد کربن، ۱ درصد فسفر، ۱۲ درصد نیتروژن و کود گاوی دارای ۳۴ درصد کربن، ۰/۲ درصد فسفر و ۱۰ درصد نیتروژن بود. برای تهیه عصاره خاک، خاک با آب مقطر به نسبت ۱ به ۴ مخلوط و اتوکلاو شد و به مدت ۷ روز به حالت ثابت گذاشته شد. سپس از کاغذ صافی عبور داده شد و مایع حاصل پس از سه روز نگهداری در انکوباتور بخش رویی آن به آرامی و با دقت جداسازی گردید تا به صورت عصاره خاک استفاده گردد. خاک مورد استفاده دارای ۰/۵۲ درصد وزنی ماده آلی، ۰/۰۶ درصد وزنی نیتروژن و ۰/۰۱ درصد وزنی فسفر بود.

اندازه‌گیری کربن (ماده آلی) با استفاده از روش Wilkie و Black (۱۹۳۴) براساس اکسیداسیون مرطوب مواد آلی انجام شد (Black, 1982). اندازه‌گیری نیتروژن به روش Kjeldal (۱۹۶۵) با استفاده از اسید سولفوریک غلیظ در دمای ۳۶۰°C تا هنگام تشکیل رنگ سبز به صورت روشن‌تر شد (Black, 1982). فسفر به روش Olson (۱۹۶۵) با به کارگیری اسید آسکوربیک به عنوان ماده احیاکننده و به طریق کالریمتری با کمک اسپکتروفتومتر (۶۴۰۰ JENWAY) با قرائت میزان جذب در طول موج‌های ۸۸۰ نانومتر و ۷۲۰ نانومتر به دست آمد (Black, 1982).

به منظور ارزیابی میزان زیست‌توده و رشد جلبک کلروکوکوم، غلظت‌های ۰/۲، ۰/۴ و ۰/۸ گرم در لیتر (کیلوگرم در مترمکعب) از کود مرغی و غلظت‌های ۰/۲، ۰/۴ و ۰/۸ گرم در لیتر از کود گاوی به عنوان محیط کشت (تیمارهای آزمایشی) انتخاب شد و هر کدام با ۳ تکرار در یک طرح کاملاً تصادفی آزمایش (آزمایش اول) شدند. برای انجام آزمایش پس از اتوکلاو کردن آب شیرین (سختی کل معادل با ۴۵ میلی‌گرم در لیتر از کربنات کلسیم) فیلتر شده در ارلن مایرهای ۲ لیتری، کود در غلظت‌های مورد آزمایش به آنها اضافه شد و به میزان ۵۰ میلی‌لیتر از ذخیره اولیه جلبک کلروکوکوم به هر تیمار اضافه گردید و آزمایش در شرایط کنترل شده در دمای ۱۸°C و شدت نور ۶۰ میکرومول فوتون بر مترمربع بر ثانیه (اندازه‌گیری شده با نورسنج مدل LI-COR LI-189) و ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی (تنظیم شده با ساعت فرمان Fur Aussen-geeignet مدل IP44 ساخت آلمان) انجام گردید. طول دوره آزمایش ۲۸ روز بود که در روز آغازین و روز پایانی از تکرارهای هر تیمار نمونه‌های جلبکی برای شمارش و اندازه‌گیری برداشته شد.

به منظور تعیین مناسب‌ترین محیط کشت جلبک کلروکوکوم، آزمایش دوم در پنج تیمار شامل محیط کشت BBM، عصاره خاک + BBM (۵۰۰ میلی‌لیتر عصاره خاک به ۱۵۰۰ میلی‌لیتر BBM)، کود مرغی (۰/۸ گرم در لیتر)، کود گاوی (۰/۸ گرم در لیتر) و مخلوطی از تمام تیمارها (BBM + عصاره خاک + کود مرغی + کود گاوی به نسبت‌های مشابه) در سه تکرار در یک طرح کاملاً تصادفی مورد مقایسه قرار گرفت. برای انجام آزمایش پس از اتوکلاو کردن آب شیرین (سختی کل معادل با ۴۵ میلی‌گرم در لیتر از کربنات کلسیم) فیلتر شده در ارلن مایرهای ۲ لیتری، کود در غلظت‌های مورد آزمایش به آنها اضافه شد و به میزان ۵۰ میلی‌لیتر از ذخیره اولیه جلبکی به هر تیمار اضافه گردید و آزمایش در شرایط کنترل شده در دمای ۲۴°C و شدت نور ۶۰ میکرومول فوتون بر مترمربع بر ثانیه و ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی سپری شد. طول دوره آزمایش ۱۵ روز بود که در روز آغاز و روز پایانی آزمایش از تمام واحدهای آزمایشی نمونه‌برداری‌های لازم انجام شد.

Archive of SID
www.SID.ir

در این تحقیق شمارش جلبک‌ها با استفاده از لام هموسیتومتری و با روش Martinez و Chakroff (1995) بعد از تثبیت نمونه‌ها در محلول لوگل اولیه (مقدار ۰/۱ میلی‌لیتر در هر ۲ میلی‌لیتر نمونه) انجام شد. زیست توده خشک جلبکها با استفاده از روش Lavens و Sorgeloos (1996) با فرزدن حجم معینی از جلبک‌های شمارش شده به دست آمد. اندازه‌گیری کلروفیل a نمونه‌ها پس از فیلتراسیون نمونه‌ها و افزودن استون ۹۰ درصد آنها با کوت برای جذب نمونه‌ها بوسیله اسپکتروفتومتر در طول موج‌های ۶۶۴، ۶۴۷ و ۶۳۰ نانومتر با روش Patsons و همکاران (1944) محاسبه شد. سپس میزان کلروفیل a با استفاده از رابطه (OD664 - OD750) 11.85 - (OD647 - OD750) 1.54 - (OD630 - OD750) 0.08 = کلروفیل a محاسبه گردید.

میزان رشد ویژه (SGR) با استفاده از رابطه $SGR=(\ln N_t-\ln N_0)/\Delta t$ محاسبه شد که در آن N_t تعداد سلولهای جلبک در انتهای آزمایش و N_0 تعداد سلولهای جلبک در ابتدای آزمایش و Δt مدت زمان انجام آزمایش است (Omori and Ikeda, 1984). زمان دو برابر شدن (D_t) جمعیت جلبک‌ها با استفاده از رابطه $D_t=\ln 2/SGR$ محاسبه گردید (Omori and Ikeda, 1984).

تأثیر آماری داده‌ها با تجزیه واریانس یک طرفه[1] پس از حصول اطمینان از مفروضات تجزیه واریانس انجام شد. برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون دانکن در سطح معنادار ۵٪ استفاده شد (Zar, 1984). کارهای آماری لازم با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS انجام گردید (SPSS, 2002).

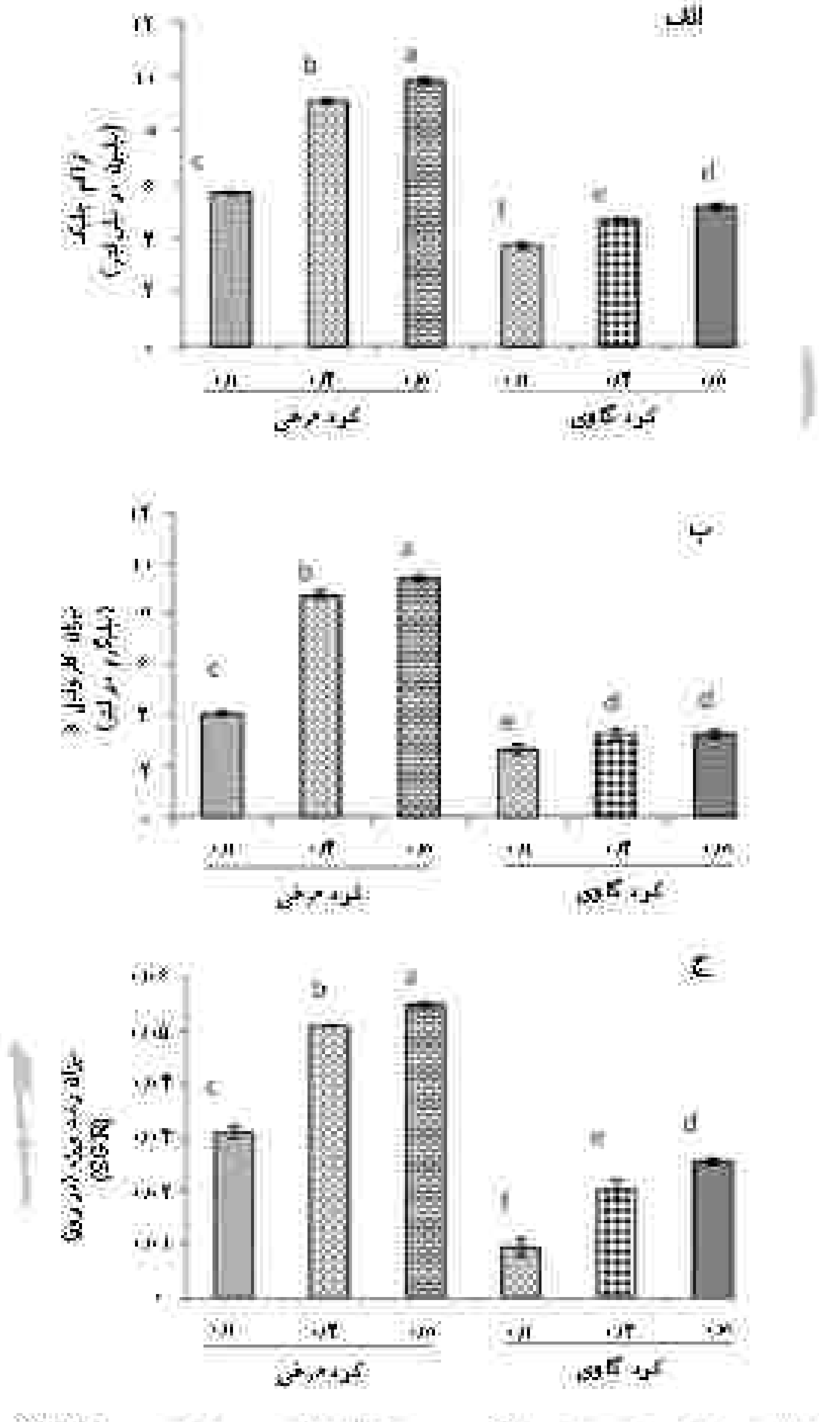
نتایج

نتایج آزمایش کرده‌های مرطی و کاوی در غلظت‌های مختلف نشان داد که ظروف کشت دارای ۰/۸ گرم در لیتر از کرد مرطی بیشترین میانگین تعداد سلول جلبکی ($10^6 \times 0/8$) سلول در هر میلی‌لیتر) را داشت که اختلاف معناداری با سایر تیمارهای آزمایشی داشت (نمودار۱- الف). میزان کلروفیل a در تیمار ۰/۸ گرم در لیتر از کرد مرطی به مقدار ۹۴ میلی‌گرم در لیتر رسید درحالی که این میزان در تیمار ۰/۱ گرم در لیتر از کرد کاوی ۲۶ میلی‌گرم در لیتر بود (نمودار۱- ب). اندازه‌گیری میزان رشد ویژه (SGR) در پایان دوره آزمایش (روز ۲۸ پرورش) نشان داد که رشد با توجه به میزان کردهای مرطی و کاوی دامنه‌ای از ۰/۰۰۹ تا ۰/۰۵۴ را دارد (نمودار۱- ج). به طور کلی می‌توان بیان کرد که مناسب‌ترین غلظت شاخص‌های رشد و تولید زیست توده جلبک کلروکوکوم در تیمار ۰/۸ گرد مرطی به دست آمد.

نتایج شمارش و تخمین جمعیت جلبک کلروکوکوم در مقایسه محیط‌کشت‌های مختلف (آزمایش دوم) در نمودار ۲ ارائه شده است. نتایج نشان داد که جلبک میانگین تراکم جمعیت در روز ۱۰ پرورش بود و از روز ۱۰ به بعد جمعیت کاهش یافت. همچنین مقایسه نتایج نشان داد که تیمار BBM + عصاره خاک اختلاف معناداری به لحاظ تولید زیست‌توده و رشد با سایر محیط‌کشت‌ها دارد ($P<0/05$). بالاترین میانگین تعداد سلول از تیمار BBM + عصاره خاک ($10^6 \times 11/4$ سلول در هر میلی‌لیتر) و پایین‌ترین میانگین تعداد سلول از تیمار ۰/۸ گرم در لیتر از محیط‌کشت تهیه شده از عصاره کرد کاوی ($10^6 \times 5/1$ سلول در هر میلی‌لیتر) به دست آمد (نمودار۲- الف). ماکزیمم میانگین زیست توده خشک جلبک کلروکوکوم با کشت این جلبک در محیط کشت BBM + عصاره خاک (۰/۶۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) و ماکزیمم میانگین کلروفیل a (۱۰/۱۵ میلی‌گرم در لیتر) حاصل شد (نمودار۲- ب و ج).

1. One-Way ANOVA

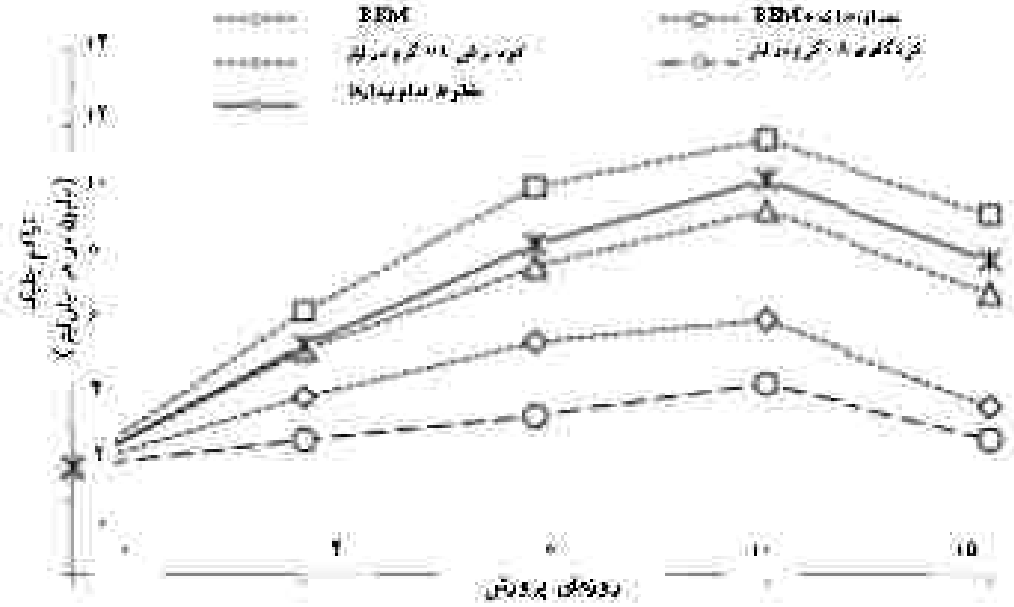
www.SID.ir



نمودار ۱: میانگین (±خطای استاندارد) الف: تراکم جلبکی، ب: میزان کلروفیل a، ج: میزان رشد ویژه (SGR) در جلبک کلروکوکوم پرورش یافته در تیمارهای مختلف از کودهای مرغی و گاوی مورد آزمایش

در هر نمودار حروف مشخص شده که دارای حداقل یک حرف مشابه‌اند از نظر آماری اختلاف معناداری ندارند ($P>0/05$)

www.SID.ir

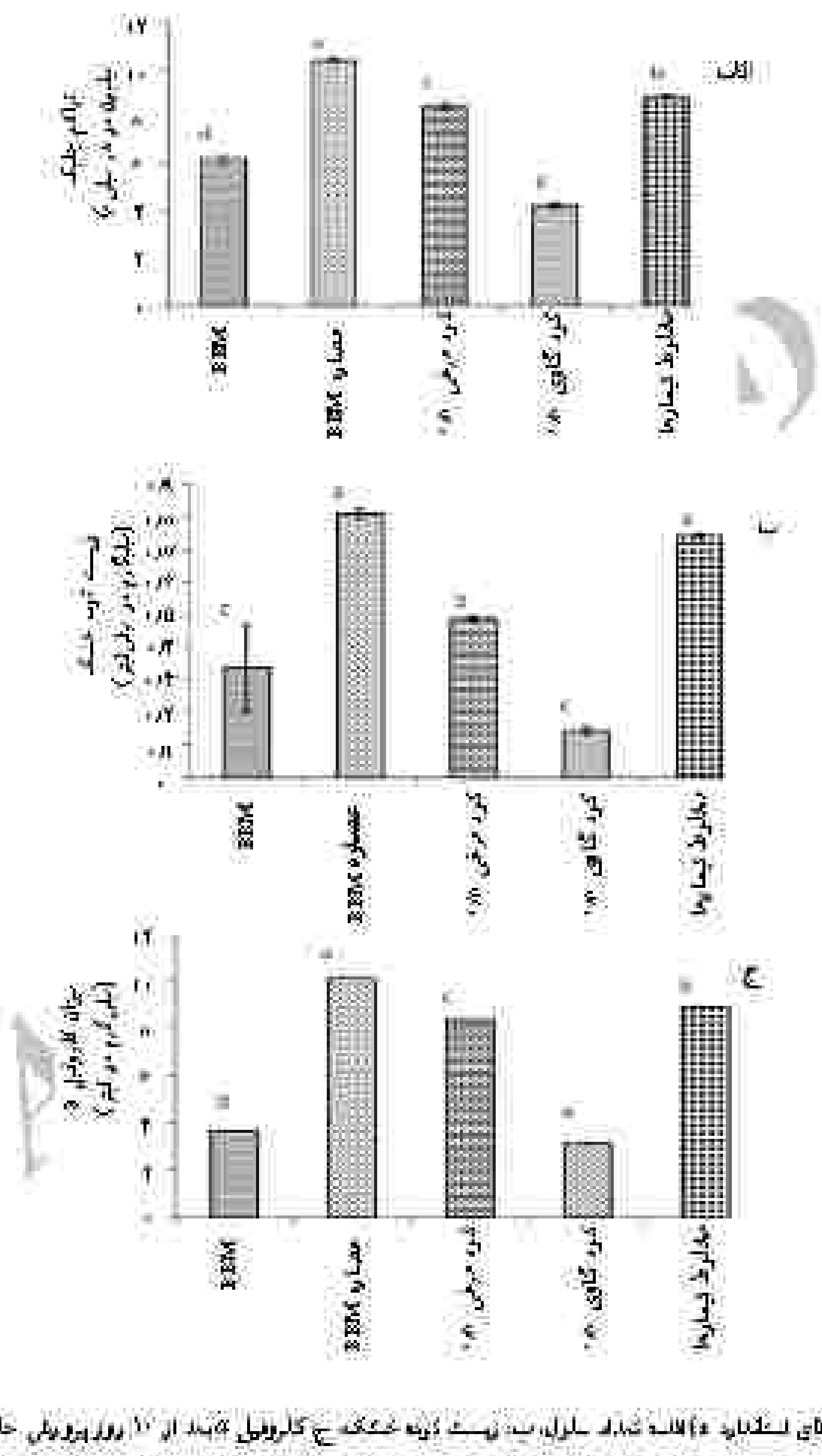


نمودار ۲- تغییرات تراکم جمعیت کلروکوکوم در تیمارهای آزمایشی در روزهای پرورش
داده‌ها میانگین ۳ تکرار ± میزان انحراف استاندارد می‌باشد

در این تحقیق بالاترین میانگین میزان رشد ویژه ۰/۱۲۹ در روز به دست آمد که حاصل پرورش جلبک کلروکوکوم با استفاده از محیط کشت BBM + عصاره خاک بود و به دنبال آن به میزان رشد ویژه ۰/۱۲۹، ۰/۱۲۱، ۰/۱۱۵ و ۰/۱۰۵ در روز به ترتیب در تیمار شاهد، ۰/۸ گرم در لیتر کود مرغی، BBM (شاهد) و تیمار ۰/۸ گرم در لیتر کود گاوی قرار داشت (نمودار ۲- الف). بر اساس این میزان محاسبه و بیان گردید که زمان دوبرابر شدن جمعیت کلروکوکوم در شرایط آزمایش انجام شده در محیط‌کشت‌های گوناگون متفاوت است و داده‌ای از ۳/۹۹ تا ۱۲/۱۶ روز را داشت. کوتاهترین زمان در تیمار BBM + عصاره خاک و طولانی‌ترین زمان در تیمار کود گاوی است (نمودار ۲- ب).

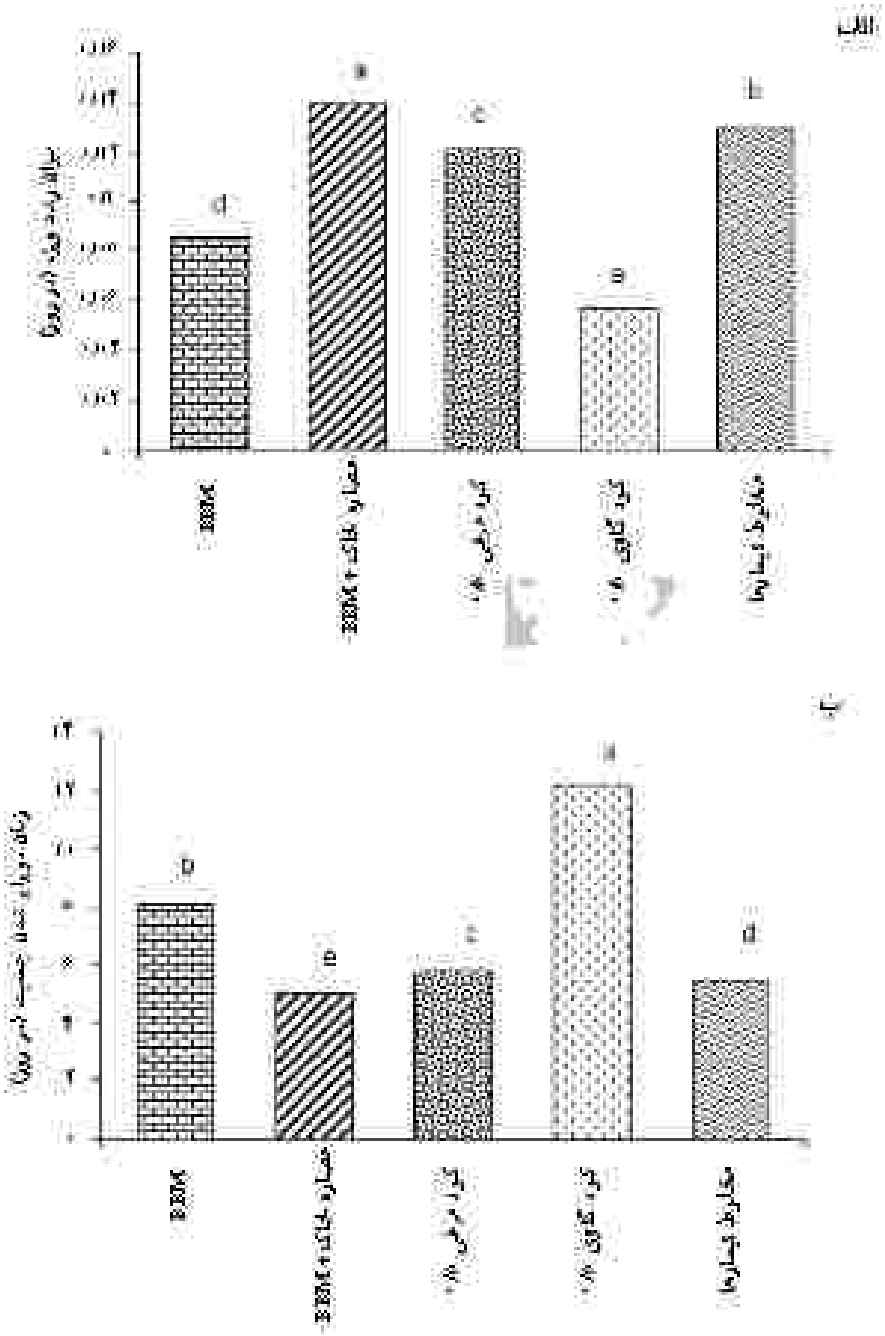
با توجه به یافته‌های این آزمایش می‌توان گفت که تیمار عصاره خاک + BBM به لحاظ میزان رشد ویژه، زمان دوبرابر شدن و میزان کلروفیل a مناسب‌ترین عملکرد را در مقایسه با محیط‌کشت‌های آزمایش شده برای جلبک سبز کلروکوکوم دارد.

www.SID.ir



نمودار ۳: میانگین (خطای استاندارد) الف) تعداد سلول، ب) وزن توده خشک، ج) کلروفیل a بعد از ۱۷ روز پرورش جلبک Chlorococcum
حروف مشخص شده روی نمودار که دارای حداقل یک حرف مشابه‌اند از نظر آماری اختلاف معنی‌داری ندارند (P>0.05)

www.SID.ir



نمودار ۴- میانگین (خطای استاندارد ±) الف- میزان پتاسیم ویژه (SGR) ب- زمان دوبرابر شدن جمعیت جلبک کلروکوکوم در تیمارهای آزمایشی
حروف مشخص شده بر روی نمودار که دارای حداقل یک حرف مشابه‌اند از نظر آماری با آزمون دانکن در سطح ۵ درصد اختلاف معناداری ندارند ($P>0.05$)

www.SID.ir

بحث

گونه‌های آلی به عنوان محیط‌کشتهای جایگزین در افزایش رشد و زیست توده جلبکهای میکروسکوپی از قبیل کلرولا، سلناستروس و کلروکرکوم به لحاظ ارزان و قابل دسترس بودن و سهولت استفاده اهمیت ویژه‌ای دارند. در این مطالعه بهترین جلبک سبز کلروکرکوم در شمار ۰/۵ گرم در لیتر از کود مرغی حاصل شد. درخصوص مناسب بودن کود مرغی نسبت به کود گاوی، Becker در سال ۱۹۹۴ بیان کرد کود مرغی با غلظت ۰/۵ گرم در لیتر جلبک سلناستروم در رشد دوره (۰/۱ در روز) در مقایسه با کود گاوی (۰/۴۲ در روز) و کود خوکی (۰/۴۲ در روز) در جلبکهای میکروسکوپی دارد. براساس گزارش Delince در سال ۱۹۹۲، کود مرغی ۲۹۶۶ تا ۵۰۲۱ کیلوژول بر کیلوگرم و کود گاوی ۱۵۱۰ تا ۲۲۲۲ کیلوژول بر کیلوگرم انرژی دارند. همچنین او نشان داد که کود مرغی دارای ۱۲ تا ۱۵٪ و کود گاوی دارای ۱۰ تا ۱۵٪ نیتروژن پروتئینی است. به طور کلی کود گاوی به دلیل داشتن حدود کمتر از ۱٪ پوسین، کمتر از ۱٪ نشاسته و کربوهیدرات و بیش از ۶۵٪ فیبر و انرژی کمتر از ۲۲۲۰ کیلوژول بر کیلوگرم، ارزش غذایی کمتری دارد (Schroeder, 1987). از سوی دیگر نسبت رطوبت در کودهای مرغی نسبت به کودهای گاوی کمتر است و میزان نیتروژن و فسفر آن حدوداً دو برابر بیشتر از کود گاوی می‌باشد (Little & Muir, 1987).

از نظر کیفیت آب، کودهای آلی اگرچه به روشهای گوناگون بر کیفیت آب تأثیر دارند، اما به طور عمده بر میزان مواد مغذی تأثیر دارند که در صورت متعادل بودن غلظت آنها نه تنها زیان‌آور نیستند بلکه موجب تداوم چرخهٔ حیات در آبها از طریق فرایند تولید اولیه می‌شوند. فسفرهای در آبخیزهای کوهستانی شده به میزان ۰/۱۴ تا ۱/۲۲ میلیگرم در لیتر در محیطهای قلیایی و آمونیوم به میزان ۰/۵۶ تا ۹/۲۸ میلیگرم در لیتر نیز می‌رسند (Bucketa., 1978; Edwards et al., 1981). میزان نیترات آب در هنگام استفاده از کودها پایین می‌ماند و کمتر از ۰/۱ میلیگرم در لیتر (Buck et al., 1978) و ۰/۰۵ تا ۰/۰۲ میلیگرم در لیتر (Edwards et al., 1981) می‌باشد که این مقادیر تأثیر زیان‌آوری بر محیط زیست ندارند. استفاده از جلبکهای میکروسکوپی از قبیل کلروکرکوم می‌تواند در جذب ترکیبات مغذی کودها در آبها مفید باشد.

علاوه بر کودهای آلی از سایر محیط‌کشتهای مصنوعی نیز در پرورش جلبکها استفاده می‌شود. برای مثال McNuff در سال ۲۰۰۰ در پرورش جلبک سبز کلروکرکوم از محیط‌کشت Chalkley's Medium همراه با عصاره خاک استفاده کرد. Yuan و همکاران در سال ۲۰۰۲ از محیط‌کشت BBM استفاده و بیان کردند که پس از گذشت ۷ روز از پرورش برای اینکه زیست توده جلبکی به رشد خود ادامه دهد، ۰/۲٪ کلرکز به محیط BBM اضافه شد که موجب افزایش رنگدانه‌ها برای فوتوسنتز در جلبک کلروکرکوم گردید. در این مطالعه تأثیر عصاره خاک در بهبود محیط‌کشت بررسی شد و مشخص گردید که عصاره خاکی را در ترکیب با محیط‌کشت BBM بر زیست توده و رشد جلبک کلروکرکوم دارد.

در این مطالعه میزان کلروفیل a در مناسب‌ترین شرایط ۹/۴۲ تا ۱۰/۱۵ میلیگرم در لیتر بود. به لحاظ مقایسه‌ای می‌توان بیان کرد که میزان کلروفیل a تولید در محیطهای غنی‌شده با کودها افزایش می‌یابد. Misiska و Cantrell (۱۹۴۵) نشان دادند که استفاده از کود مرغی در آبخیزهای سیمانی موجب تولید کلروفیل a تا حدود ۸۰ میکروگرم در لیتر می‌شود. همچنین Norega-Curiks در سال ۱۹۷۹ بیان کرد استفاده از کود گاوی در میزان ۲۰ کیلوگرم در هکتار در روز موجب تولید ۲۸ تا ۱۰۶

www.SID.ir

میکروگرم در لیتر کلروفیل a می‌شود که بسیار کمتر از مقدار بیان شده در رابطه با کودهای مرغی است. در اسلمی گزارش Buck در سال ۱۹۷۸ استفاده از ۲۰ تا ۷۰ گرم کود گوسفندی در هر هکتار در روز موجب تولید اولیه ۱۵۰۰۰ ارگلیسم در هر میلی‌لیتر یا معادل با ۱۲۵ میکروگرم کلروفیل a در هر لیتر می‌شود.

منابع

1. Akiyama, M. 1977. Illustrations of the Japanese Fresh-water Algae, Uchidarokakuho Publishing Company, Tokyo, Japan, 988 p.
2. Barsanti, L. and Gualtieri, P. 2006. Algae: Anatomy, Biochemistry, and Biotechnology, CRC Press, Taylor and Francis Group, 320 p.
3. Becker, E. W., 1994. Microalgae: Biotechnology and Microbiology, Cambridge University Press, Cambridge, Great Britain, 293 p.
4. Black, C. A., 1982. Method of Soil Analysis, Vol. 2, Chemical and Microbiological Properties, American Society, 211p.
5. Bold, H. C. and Parker, B. C. 1962. Some supplementary attributes in the classification of *Chlorococcum* species, *Archives Mikrobiology*, 42: 267-88.
6. Borowitzka, M. A. and Borowitzka, L. J. 1988. *Dunaliella*. In: Microalgal Biotechnology, Borowitzka, M. A. and Borowitzka, L. J. (Eds.), Cambridge University Press, Cambridge, UK, pp. 27-58.
7. Brown, T. E., Richardson, F. L., Vaughn, M. L. 1967. Development of red pigmentation in *Chlorococcum wimmeri* (Chlorophyta: Chlorococcales), *Phycologia*, 6: 167-184.
8. Buck, D. H., Baur, R. J., Rose, C. R. 1978. Utilization of swine manure in a polyculture of Asian and North American fishes, *Transition American Fish Society*, 107:216-222.
9. Delince, G. 1992. The ecology of the fish pond ecosystem, Kluwer Academic Publishers, London, 230 p.
10. Demirbas, A. and Demirbas, M. F. 2010. Algae energy: Algae as a new source of biodiesel, Springer, 199 p.
11. Demirbas, A. 2006. Biogas potential of manure and straw mixtures, Energy Sources Part A, 28: 71-78.
12. Demirbas, A. 2007. Progress and recent trends in biofuels, *Progress in Energy and Combustion Science*, 33: 1-18.
13. Demirbas, A. 2008. Recent progress in bio renewable feedstock's, *Energy Education Science and Technology*, 22: 69-95.
14. Edwards, P., Sinchumpasak, O. A., Tabucanon, M. 1981. The harvest of microalgae from the effluent of a sewage fed high rate stabilization pond by *Tilapia nilotica*, Part 2: studies of the fish ponds, *Aquaculture*, 21: 107-147.
15. Hall, D. O., Rosillo-Calle, F., Williams R. H., Woods, J. 1993. Biomass energy supply and prospects. In: Johansson, T. B., Kelly, H., Reddy, A. K. N. and Williams R.H. (eds.), Renewable Energy: Sources for Fuel and Electricity. Island Press, Washington, D.C., pp. 593-651.
16. Lavens, P. and Sorgeloos, P. 1996. Manual on the production and use of live food for aquaculture, *FAO Fisheries Technical Report*, 296p.
17. Lee, Y. K. and Pirt, S. J. 1981. Energetics of photosynthetic algal growth: influence of intermittent illumination in short (40s) cycle, *Journal of General Microbiology*, 124: 433-52.

تشکر و قدردانی

از معاونت پژوهشی دانشکده منابع طبیعی و معاونت پژوهشی دانشگاه صنعتی اصفهان به خاطر ایجاد شرایط مناسب برای این تحقیق کمال تشکر و سپاسگزاری را داریم.

www.SID.ir

18. Little, D. and Muir, J. 1987. A guide to integrated warm water aquaculture, Publishing Institute Aquaculture, University of Sterling, Sterling, U. K., 224 p.

19. Martines, M. P. and Chakroff, J. B. P. 1975. Direct phytoplankton counting technique using the hemacytometer, Philippine Agricultural Scientist, 59:43-50.

20. McNuff, B. 2007. *Hypsibius dujardini* collection notes and culture protocol, British National Grid, Ref. SD., 741078.

21. Msiska, O. V. and Cantrell M. A. 1985. Influence of poultry manure on growth of *Oreochromis shiranus chilwae*, *Aquaculture*, 44: 67-73.

22. Nichols, H. W. 1973. Growth media-freshwater, In: Stein, J.R. (Ed.), Handbook of Phycological Methods - Culture Methods and Growth Measurements, Cambridge University Press, Cambridge, pp. 7-24.

23. Noriega-Curtis, P. 1979. Primary productivity and related fish yield in intensely manured fishponds, *Aquaculture*, 17: 335-344.

24. Omori, M. and Ikeda, T. 1984. Methods in marine zooplankton ecology, John Wiley and Sons Inc., New York, 332 p.

25. Phang, S. M. and Chu, W. L. 1999. University of Malaya Algae Culture Collection (UMACC): Catalogue of Strains, Institute of Postgraduate Studies & Research University of Malaya, Kuala Lumpur, Malaysia, 77 p.

26. Parsons, T. R., Maita, Y., Lalli, C. M. 1984. A manual of chemical and biological methods for seawater analysis, Pergamon Press, Oxford.

27. Schroder, G. L. 1987. Carbon and nitrogen budgets in manured fish ponds, *Aquaculture*, 62: 259-279.

28. Yuan J. P., Chen F., Liu Xin Li, X. Z. 2002. Carotenoid composition in the green microalga *Chlorococcum*, Food Chemistry, 76: 319–325.

29. Zar, J. H. 1984. Biostatistical analysis, 2nd edition, Prentice Hall Inc., Englewood Cliffs, New York, USA, 718 p.

30. Zhang, D. H., Lee, Y. K., Phang, S. M. 1997. Composition and accumulation of secondary carotenoids in *Chlorococcum* sp., *Journal of Applied Phycology*, 9: 147-155.

Archive

www.SID.ir

Biomass and growth of green algae *Chlorococcum* sp. using organic manures and soil extract

Omidvar Farhadian[1*], Seyed Mojtaba Fallahi[2] and Nasrollah Mahboobi Soofiani[3]

1. Assistant Prof. of Department of Natural Resources, Isfahan University of Technology, Isfahan 84156-83111, Iran
2. M.Sc. of Fisheries Science, Department of Natural Resources, Isfahan University of Technology, Isfahan 84156-83111, Iran
3. Associate Prof. of Department of Natural Resources, Isfahan University of Technology, Isfahan 84156-83111, Iran

*Corresponding author: omfarhad@cc.iut.ac.ir, farhadyo@yahoo.com

Abstract: In order to determine effects of chicken and cattle manures in culture of *Chlorococcum*, an experiment was designed in six treatments including: 0.1, 0.4, 0.8 g/l of chicken manure and 0.1, 0.4, 0.8 g/l of cattle manure as completely randomize design with three replicates for 28 days. Results showed that the mean maximum density (87.1×10^6 cell/ml), specific growth rate (0.064 day^{-1}), algal dry biomass (0.644 g/l), and chlorophyll *a* (9.42 mg/l) were obtained with 0.8 mg/l chicken manure. In order to compare performance of these manures with other culture media, second experiment with five treatments including: BBM (control) (Bold's Basal Medium), BBM + soil extract, 0.8 g/l chicken manure, 0.8 g/l cattle manure and mixture of all treatment (BBM, BBM + soil extract, chicken manure and cattle manure) was designed as completely randomize design with three replicates for 15 days. Comparative results showed that BBM + soil extract had highest algal density (11.6×10^6 cells/ml), highest algal dry biomass (0.81 mg/ml), maximum SGR (0.13 /day), highest chlorophyll a (10.15 mg/l) and minimum doubling time (4.97 days). In conclusion, performance of BBM + soil extract was better in terms of biomass and growth parameters of *Chlorococcum*.

Keywords: Green algae *Chlorococcum*, BBM medium, Chicken and cattle manures, Soil extract, Specific growth rate, Biomass, Chlorophyll *a*

www.SID.ir

کارگاه‌های آموزشی مرکز اطلاعات علمی

آموزش نرم‌افزار Word برای پژوهشگران

روش تحقیق کمی

آموزش مهارت‌های کاربردی تایپ، تایپ و چاپ مقالات ISI