اثر محیط کشت های مختلف بر روی تراکم و میزان کلروفیل aسیانوباکتر آنابنا *Anabaena vaginicola*

زهرا موسویان، حسین اورجی، فاطمه خواجه پور

چکیده:

در این مطالعه، رشد و میزان کلروفیل a سیانوباکتر آنابنا *Anabaena vaginicola* با استفاده از دو محیط کشت Z_8 و BG 11 مورد بررسی قرار گرفت. تراکم سلولی و میزان کلروفیل a در محیط کشت Z_8 به ترتیب ۱/۴ میلیون در هر میلی لیتر و ۱۵/. ± ۳/۸ بیشتر از محیط کشت BG-11 ۱/۱ میلیون در هر میلی لیتر و ۲۵/. ± ۳/۱ بود ($p\leq.05$). با توجه به نتایج بدست آمده، برتری محیط کشت Z_8 مشاهده گردید.

کلمات کلیدی: *Anabaena vaginicola* ، محیط کشتZ_8 ، محیط کشتBG-11 ، کلروفیل a ، تراکم سلولی

مقدمه:

سیانوباکتری ها گروه بسیار بزرگی از ارگانیزم های تولید کننده اولیه هستند که در زیستگاه‌های مختلف از جمله استخرها، دریاچه ها وجود دارند و نقش مهمی در چرخه نیتروژن دارند(Palmer ,1962). سیانوباکتری ها به دلیل دارا بودن پروتئین با پروفیل امینواسید مناسب، اسیدچرب چند غیراشباع، کربوهیدرات، مواد معدنی، انواع ویتامین‌ها، رنگدانه‌ها و متابولیت‌های ثانویه بسیار ارزشمند هستند (Becker ، ۲۰۰۷). علاوه بر نقش این گروه در اکوسیستم طبیعی، در کشاورزی و ، صنایع غذایی و پزشکی و همچنین در خوراک دام، طیور و آبزیان استفاده می شوند(Sinha and Rastogi ، ۲۰۰۹). آنابنا، یک جنس از سیانوباکتر است که گونه های زیادی از آنها شناسایی شدند. از این جلبک ها برای تولید رنگدانه استفاده می شود. عواملی زیادی از جمله نور، درجه حرارت کمیت و کیفیت محیط کشت و غیره در ارتباط با تولید انبوه جلبک ها نقش دارند(معصومي و همکاران ، ۱۳۸۶). تراکم سلول های جلبک در محیط پرورشی نسبت به محیط های طبیعی بسیار بالا می باشد. لذا در محیط پرورش جلبک، کمیت و کیفیت مواد مغذی و شناخت محیط کشت مناسب برای پرورش هر گونه مورد نظر بسیار مهم می باشد(Srinivasakumar & Rajashekhar, 2009). در این تحقیق دو محیط کشتBG-11 و Z8 برای پرورش جلبک آنابنا مورد بررسی و مقایسه قرار گرفته اند.

مواد و روش ها

زمان، مکان و شرایط تحقیق

این مطالعه در آزمایشگاه کشت جلبک پژوهشکده شمال انستیتوپاستور ایران انجام شد. برای انجام آزمایش، کشت در ارلن‌های ۵۰۰ میلی‌لیتری که حاوی ۲۵۰ میلی‌لیتری انجام شد. آزمایش در شرایط استریل با دمای ۲ ±۲۳ درجه سانتیگراد صورت گرفت. سیستم هواده شامل پمپ هوا، شیلنگ و اتصالات بود که بطور دائم هوا استریل را به داخل محیط کشت تزریق می‌کرد. اتاق کشت، ظروف آزمایشگاهی و محیط کشت با لامپ فرابنفش و اتوکلاو استریل شدند.

تیمارهای آزمایشی

محیط کشت انتخابی در این مطالعه، محیط کشت رایج برای سیانوباکترها یعنی Z_8و BG 11 بود.

نمونه برداري

نمونه برداري براي انجام آزمايش تراكم سلولي و سنجش كلروفيل هر دو هفته يكبار انجام شد.

سنجش غلظت کلروفیل a

غلظت کلروفیل a مطابق با روش استاندارد (APHA, 1992) انجام شد.در این روش ۵۰ میلی لیتر از محیط کشت همگن شده توسط پمپ خلاء بر روی کاغذ صافی (GF/C) ۰/٤٥ میکرون فیلتر شد.سپس کاغذ صافی را تا کرده و بعداز اضافه کردن ۱۵ میلی لیتر استون ۹۰% به مدت ۱ دقیقه به‌وسیله هاون آسیاب شد. سپس مایع آسیاب شده را در داخل لوله‌های سانتریفوژ مدرج ریخته شد. سرپوش لوله را محکم بسته و به مدت ۲۰ الی ۲٤ ساعت در یخچال در دمای ٤ درجه سانتیگراد نگهداری شد. بعد از این مدت به مدت ٥ دقیقه در دمای ٤ درجه سانتیگراد با دور ٤۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ گردید. سپس حجم عصاره حاصل یادداشت می‌شود. در این مرحله ضریب محو نور عصاره در محلول آلکالین استون در طول موج‌های خاص طبق فرمول ۱ با استفاده از دستگاه اسپکتوفتومتر خوانده شد. برای هر طول موج، استون ۹۰ درصد بعنوان بلانک در نظر گرفته شد.

Chlorophyll a= $(11.85*(A_{664}-A_{750})-1.54*(A_{647}-A_{750})-0.08*(A_{630}-A_{750}))*V_e/ (V_f*Z)$

در اینجا:

V_e: حجم عصاره به میلی‌لیتر

V_f: حجم محیط کشت فیلتر شده به لیتر

Z خط سیر کوت به سانتی‌متر

تراکم یا شمارش سلولی

شمارش سلولی با استفاده از لام نئوبار و با روش پیشنهادشده توسط Lavens و Sorgelose (۱۹۹۶) انجام شد.

آنالیز آماری

در این آزمایش، داده های بدست آمده از شاخص های تراکم سلولی و میزان کلروفیل a به بصورت مقادیر میانگین همراه با انحراف معیار بیان شدند. مقایسه میانگین ها ا با استفاده آزمون t در سطح معنی داری ۵ درصد بوسیله نرم افزار SPSS17 انجام شد.

نتایج و بحث:

رشد جلبك ها به طور كلي تابعي از عوامل مختلفي از جمله كميت و كيفيت محيط كشت مي‌باشد. با توجه به نتایج بدست آمده مشاهده شد که تراکم سلولی سیانوباکترآنابنا در تیمار Z8 بیشتر از تیمار BG11 بود. همچنین نتایج حاصل از اندازه‌گیری رنگدانه کلروفیل a سلول های سیانوباکتر آنابنا کشت داده شده درتیمار Z8 بیشتر از تیمار BG11 بود. نتایج فوق با مطالعه sundaramو همکاران (۲۰۱۱) با بررسي فيزيولوژي و بيولوژي سيانوباكتر تحت شرايط استرس همخواني دارد. همچنین با مطالعه venkataraman و همکاران بر روي توليد جلبك سبز-آبي در برنج مطابق بود.

منابع:

حسینی، ع. ۱۳۷٦. گزارش دوره آموزش کشت جلبک. مرکز تحقیقات شیلاتی استان مازندران. ۸۰ صفحه.

معصومي، س.ز.، ياوري، و.، كوچنين، پ. و سواري، ا.(۱۳۸٦). بررسي تأثير رژيم نوري بر رشد ميكروجلبك Tetraselmis suecica در محيط كشت هاي ويتامينه و فاقد ويتامين، مجله پژوهش و سازندگي،٧٤: ١٣٩-١٣٠.

APHA, 1992. Standard Methods for the Examination ofWaterandWaste water, 18th ed. American Public Health Association, Washington DC.1268 pp.

Becker, E.W. 2007. Micro-algae as a source of protein.Biotechnology Advance, 25: 207–210.

Lavens, P., Sorgeloos, P., 1996. Manual on the production and use of live food for aquaculture. FAO Fisheries Technical paper. Gent.

Rastogi, R., and Sinha, R.P. 2009. Biotechnological and industrial significance of cyanobacterial secondary metabolites, Biotechnology Advances, 27. 521–539.

Srinivasakumar, K. P., Rajashekhar, M., 2009. The population abundance, distribution pattern and culture studies of isolated microalgal strains from selective sampling sites along the south east coast of India. African Journal of Biotechnology 8 (16): 3814-3826.