وزارت جهاد کشاورزی
سازمان تحقیقات و آموزش کشاورزی
مؤسسه تحقیقات شیلات ایران – انستیتو تحقیقات بین‌المللی ماهیان خاویاری

تهیه هرباریم جلبک از جلبکهای منطقه ساحلی دریای خزر

مجری :
زهره رمضانپور

شماره ثبت
۸۶/۵۷۴

وزارت جهاد کشاورزی
سازمان تحقیقات و آموزش کشاورزی
مؤسسه تحقیقات شیلات ایران – انستیتو تحقیقات بین‌المللی ماهیان خاویاری

عنوان پروژه / طرح : تهیه هرباریم جلبک از جلبکهای منطقه ساحلی دریای خزر
شماره مصوب : ۰۹-۰۷۱۰۴۴۰۰۰۰-۷۲
نام و نام خانوادگی نگارنده/ نگارنده گان : زهره مضانپور
نام و نام خانوادگی مجری مسئول (اختصاص به پروژه ها و طرحهای ملی و مشترک دارد) : -
نام و نام خانوادگی مجری / مجریان : زهره رمضانپور
نام و نام خانوادگی همکاران : عسگر زحمتکش- محمد صمدزاده- عما ارشد
نام و نام خانوادگی مشاور (ان) : -
محل اجرا : استان گیلان
تاریخ شروع : ۱۳۷۲
مدت اجرا : ۱ سال
ناشر : مؤسسه تحقیقات شیلات ایران
شمارگان (تیتراژ) : ۱۵ نسخه
تاریخ انتشار : سال ۱۳۸۶

حق چاپ برای مؤلف محفوظ است . نقل مطالب ، تصاویر ، جداول ، منحنی ها و نمودارها با ذکر مأخذ بلامانع است .

به نام خدا

عنوان	«فهرست مندرجات »	صفحه

چکیده ۴
مقدمه ۶
۱- کلیات ۸
۱-۱- جلبکهای سبزآبی ۸
۱-۲- اسپیرولینا ۱۰
۱-۳- جلبکهای سبز ۱۰
۱-۴- کلرلا ۱۳
۱-۵- سندسموس ۱۴
۱-۶- کشت جلبکها ۱۶
۲- مواد و روشها ۱۸
۲-۱- نمونه‌برداری ۱۸
۲-۲- تجهیزات ۱۸
۲-۲-۱- فضای نگهداری مواد شیمیایی و تجهیزات آن ۱۸
۲-۲-۲- فضای آماده‌سازی محیط کشت ۱۸
۲-۲-۳- اتاق کنترل کشت ۱۸
۲-۲-۴- آزمایشگاه مرطوب ۱۹
۲-۳- جداسازی ۱۹
۲-۳-۱- تمیز کردن ۲۰
۲-۳-۲- کیفیت آب ۲۰
۲-۳-۳- استریل کردن ۲۰
۲-۳-۴- محیط کشت ۲۱
۲-۳-۵- محیط کشت مایع ۲۲
۲-۳-٦- محیط کشت جامد ۲۳
۲-۳-۷- شیب آگار ۲٤
۲-۳-۸- پلیت آگار ۲۵
۲-۳-۹- جداسازی با روش کشت خطی ۲٦

عنوان	«فهرست مندرجات »	صفحه

۱۰-۳-۲- جداسازی با استفاده از پیپت پاستور ۲۷
۴-۲- تلقیح ۲۷
۵-۲- پرورش دادن ۲۸
۶-۲- نحوه ایجاد اتاق رشد ۲۹
۷-۲- جداسازی جلبکهای سبزآبی ۳۰
۸-۲- روشهای جداسازی جلبکهای سبزآبی ۳۲
۹-۲- خالص‌سازی ۳۳
۱-۹-۲- خالص‌سازی به روش تکرار کشت مایع ۳۳
۲-۹-۲- خالص‌سازی با سانتریفوژ ۳۳
۳-۹-۲- خالص‌سازی با استفاده از آنتی‌بیوتیک ۳۴
۴-۹-۲- خالص‌سازی به روش قطعه قطعه کردن ۳۵
۱۰-۲- تست آلودگی ۳۵
۳- بحث و نتیجه‌گیری ۳۶
۴- مصارف اقتصادی جلبکها ۴۲
منابع ۴۷
چکیده انگلیسی ۵۱

MINISTRY OF JIHAD - E - AGRICULTURE

AGRICULTURE RESEARCH AND EDUCATION ORGANIZATION

IRANIAN FISHERIES RESEARCH ORGANIZATION- International Sturgeon Research Institue

Establishment of Herbarium (Stock collection) of the Algae of the Southern part of the Caspian Sea

Executor :

Zohreh Ramezanpour

86.574

Ministry of Jihad – e – Agriculture
Agriculture Research and Education Organization
IRANIAN FISHERIES RESEARCH ORGANIZATION – International Sturgeon Research Institue

---

Title : Establishment of Herbarium (Stock collection) of the Algae of the Southern part of the Caspian Sea

Approved Number :72-0710440000-09

Author: Zohreh Ramezanpour
Executor *:* Zohreh Ramezanpour
Collaborator *:* A. Zahmtkesh; M. Samadzadeh; O. Arshad
Advisor : -
Location of execution : Guilan
Date of Beginning : 1993
Period of execution : *1year*
Publisher : *Iranian Fisheries Research Organization*
Circulation : *15*
Date of publishing : *2007*

All Right Reserved . No Part of this Publication May be Reproduced or Transmitted without indicating the Original Reference

بسمه تعالی

طرح **تهیه هرباریم جلبک از جلبکهای ساخلی دریای خزر** با مسئولیت اجرایی **خانم زهره رمضانپور** [1] در تاریخ **۱۳۸٤/۲/۸** در کمیته تخصصی شیلات با رتبه **خوب** تأیید شد .

موسسه تحقیقات شیلات ایران

۱- خانم زهره رمضانپور متولد سال در شهرستان دارای مدرک تحصیلی در رشته بوده و در حال حاضر در با عنوان شغلی مشغول به فعالیت می‌باشد.

چکیده

هرباریم جلبک از تاریخ ۷۲/۶/۱ در ایستگاه تحقیقاتی ساحل غازیان ـ مرکز تحقیقات شیلاتی استان گیلان افتتاح و شروع بکارنموده تاکنون نمونه برداری‌های متعددی از بخشهای مختلف تالاب انزلی و قسمتهایی از سواحل جنوبی دریای خزر انجام گرفت. این نمونه‌ها در دو بخش زنده و غیر زنده در آزمایشگاه نگهداری می‌شوند. در این ۱۶۳ نمونه بصورت زنده، در ۲۴ گونه بصورت سوش‌های مایع و جامد وجود دارندکه عبارتند از:

Nodularia sp1, Nodularia sp2, Spirulina sp. Oscillatoria sp., Anabaena sp1, Anabaena sp2, Dactylococcopsis raphidiodes, Lyngbia sp., Ankistrodesmus falacatus, Ankistrodesmus sp., Scenedesmus abundans, S. acuminatus, S. obliquus S.quadricada, Chlorella vulgaris, Thalassionema nitzschioides, Cyclotella sp., Rhizosolenia calcar avis, Navicula sp., Bacillaria sp., Chaetoceros sp., Spirulinas sp. Scenedesmus abundans. S. گونه Sceletonema sp., Nitzschia sp., Trachelomonas sp.

Chlorella vulgaris, Ankistrodesmus falacatus acuminatus, S. obliquus, S.quadricada

خالص سازی شدند. در بخش غیر زنده نمونه‌ها بصورت خشک و یا در فیکساتیوهای مناسب نگهداری می‌گردند، بیش از ۲۰۰ نمونه بدین صورت در آزمایشگاه وجود دارد که ۱۰۰ گونه از آنها تاکنون شناسایی شده است.

هدف از تاسیس هر باریم:

جلبکها از موجودات میکروسکوپی هستند که از دهه ۱۹۴۰ مطالعات بر روی آنها در کشورهای مختلف شروع شده است و هم اکنون نیز در ابعاد وسیع‌تری ادامه دارد.

این موجودات به دلیل دارا بودن مواد قندی غنی برای مصارف مختلف تغذیه‌ای و نیز تهیه سوخت بیوگاز مورد استفاده قرار می‌گیرند.

در سالهای اخیر تحقیقات وسیعی در مورد کاربرد جلبکهای میکروسکوپی انجام گرفته و دامنه‌های کاربرد آن مشخص‌تر شده است. جلبک‌ها در تهیه مواد شیمیایی خالص محیط‌های کشت سلولی، مواد قندی، بتا کاروتن‌ها و انواع دیگر رنگدانه‌ها استفاده شده و همچنین برای بهبود وضعیت خاک وتصفیه فاضلابها بکار برده می‌شوند.

جلبکها درتغذیه و زیست ماهیان نقش ارزنده‌ای ایفا می‌نمایند. مطالعات انجام شده نشان می‌دهد که کپور ماهیان بطور موفقیت آمیزی با استفاده از جلبکها رشد می‌نمایند و از نظر ارزش غذایی و ضریب تبدیل غذا به گوشت، جلبکها نسبت به بادام زمینی و غذای حاصل از تولیدات طبیعی استخر برتری دارند.

مطالعات انجام شده بر روی کپور معمولی و علفخوار نشان داد که جلبک سندسموس وغذای تهیه شده از آن باعث افزایش رشد در این ماهیان شده و برای ماهیان کپور علفخوار جوان غذای بسیار مفید و مطلوبی می باشد.

همچنین محاسبه شده است که در جیره غذایی ماهیان می‌توان حدود ۶۰٪ از جلبک استفاده کرد و کاربرد این مقدار جلبک محصولی معادل شرایط کاملا کنترل شده بدست می‌دهد. جلبک‌ها برای صدف‌ها و نرم تنان نیز غذای مناسبی هستند.

از برخی جلبک‌ها مواد حیاتی بسیار مفیدی نظیر علف کش‌ها و نیز ضد قارچ‌ها و همچنین مواد ضد عفونی کننده بالاخره طیف وسیعی از آنتی بیوتیک‌ها تولید می‌شود.

مقدمه

بیوتکنولوژی (Biotechnology) کاربرد عملی کلیه فرایندهای تغییر شکل مواد خام تجدید شدنی و محصولات حاصل از کشت سلولهای گیاهی و جانوری و همچنین انواع میکرو اورگانیسم های مورد نیاز بشر می باشد(Sassan,.A,1984)یکی از علومی که سهم عمده‌ای در علم بیوتکنولوژی دارد زیست شناسی سلولی و ملکولی است که به کشف رموز حیات در سطح سلول و ملکولهای متشکله می پردازد اما دستاوردهای علم زیست شناسی سلولی و ملکولی در مقایسه با دستاوردهای تکنولوژی میکروالکترونیک از نظر عامه مردم نمود کمتری دارد و کاربردهای آن در علوم، در ابتدای مسیر خود می باشد. با این حال تاثیر عمیق آن بر کشاورزی، تولیدانرژی، بهداشت و تغذیه آشکار است(Johnston & Sasson, 1984).

در سالهای اخیر تحقیقات ارزنده‌ای در مورد استفاده و کاربرد جلبکهای میکروسکوپی انجام گرفته است.

(Venkataraman, 1980; Venkataraman,1982; Anusuya Devil,&,Venkataraman,1984) & Venkataraman 1983; Becker.

دامنه کاربرد جلبکهای میکروسکوپی بسیار وسیع بوده وازتولید مواد شیمیایی خالص، روغنها، مواد قندی، بتاکاروتن و انواع دیگر رنگدانه‌ها (GelesKul & Khim, 1982; Meal & Yeda, 1981) تا استفاده برای بهبود بافت خاک و تصفیه فاضلاب (Saxena, 1982) را در برمی گیرد. تحقیقات پیرامون مواد غذایی مورد نیاز زئوپلانکتونها از سال ۱۹۵۰ شروع شده است. این تحقیقات ابتدا در مورد گونه‌های جلبکی دریایی انجام گردید (corner & cowey, 1968) سپس جهت ارزیابی کیفیت غذایی جلبکها، به منظور تامین نیاز غذایی زئوپلانکتونها، استانداردهایی تعیین گردید که نقطه شروعی برای بررسی ترکیبات مختلف اجزا جلبک بوده است (Burns, 1868) حضور اسیدهای چرب در ساختمان ملکولی جلبکهای کشف شده از مباحث بسیار جالب برای آبزیان بوده و امروزه، میکروزئوپلانکتونها و فیتوپلانکتونها به جهت دارا بودن مواد قندی غنی برای رژیم غذایی مراحل لاروی ماهی‌ها و صدف‌هایی که دارای اهمیت تجاری میباشند، توصیه می‌کردند (Taub, 1970; DePauw & Pruder, 1980). نقش جلبک در تغذیه نرمتان از سایر مواردی است که توسط دانشمندان زیادی بحث و

بررسی شده است (KiKuchi, 1984; Giese, 1959 ; Gomes, 1968;Mann, 1979 ; Walne, 1970, Loosanoff & Davis, 1963; Sastry, 1966) برای مثال، کشت تک گونه‌ای *Pseudoisochrysis sp*. *Chaetoceros gracilis* را بطور متناوب به عنوان غذای هفتگی *Ostrea ghilensis* توصیه می‌نمایند (Chaparro, 1990) .

از دهه ۱۹۴۰، تحقیقاتی محققین آلمانی برای تهیه سوخت مایع از جلبکهای میکروسکوپی بویژه دیاتومه‌ها و در پی آن تولید پروتئین از جلبکهای تک سلولی و تولید بتاکاروتن شروع شد (Borowitzko & Borowitzko, 1988). در حال حاضر تحقیقات در مورد جلبکهای میکروسکوپی روند روبه توسعه خود را طی می کند و پیش بینی می گردد که بررسیهای در حال انجام و مطالعات آینده به نمایانتر شدن نقش تولید انبوه این موجودات در نظام اقتصادی جوامع مختلف کمک شایانی بنماید.

۱-کلیات

اصطلاح جلبک معانی مختلفی برای افراد گوناگون دارد. متاسفانه حتی متخصصین گیاهشناسی و بیولوژیست‌ها مشخص برای این کلمه ندارند. عوام نامهایی مانند کف استخر (Pond Scum) بزاق دهان قورباقه (frog spittle) خزه آبی (Water mosses)، علف دریایی (Sea weed) را به آن داده‌اند. در حالیکه تعدادی از محققین مجموع این تعاریف را برای جلبکها در نظر می‌گیرند. جلبکها در بسیاری از صفات بارز خود با سایر گیاهان مشترک هستند. تعداد بیشماری از گلسنگ‌ها، خزه‌ها، سرخس‌ها و گیاهان دانه دار وجود دارند که در محیط‌های آبی با جلبکهای آب شیرین زندگی می‌کنند. در محیط‌های دریایی گیاهان دانه‌دار (که به علف دریایی شهرت دارند اما جزء خانواده علفی‌ها هستند) با جلبکها زندگی می‌کنند (Bold, 1985).

۱-۱ - جلبکهای سبز آبی (Cyanophyta)

جلبکهای سبز آبی قدمتی در حدود سه میلیارد سال دارند و فسیلهای بسیار کوچکی از آنها در لایه‌های رسوبی بنام استروماتولیت (Stromatolites) یافت شده است(Golubic, 1976; Taylor, 1981). این موجودات از لحاظ بیوژئولوژی حائز اهمیت هستند. عده‌ای از محققین هستند که جلبکهای سبز آبی اولیه موجودات زنده‌ای هستند که با انجام فتوسنتز موجب تراکم اکسیژن در جو زمین شده‌اند(Bold, 1985). جلبک‌های سبز آبی حاوی کلروفیل a میباشند. کلروفیل مذکور با نوع کلروفیل باکتریهای فتوسنتزی تفاوت دارد. این جلبک‌ها با انجام فتوسنتز اکسیژن آزاد میکنند که این خصوصیت در باکتریهای فتوسنتز کننده وجود ندارد. با این حال به لحاظ ویژگیهای ساختمانی و بیوشیمیایی بین جلبک‌های سبز آبی و باکتریها شباهتهایی وجود دارد.

محل رویش این جلبکها بسیار متنوع می‌باشد. درآبهای دارای مقادیر متفاوت شوری (Humm & Wicks, 1981; Witerbury & Stanier, 1980) و حرارت، در داخل خاک، روی صخره‌ها و شکافها و نیز بطور معلق در هوا می‌توانند زندگی کنند. (Brown, 1971) بنظر می‌رسد که جلبکهای سبز آبی در آبهای قلیایی یا خنثی بیشتر دیده می‌شوند. با این وجود برخی از انواع جلبکها مانند Chroococcus در باتلاقهای با اسیدیته کمتر از ۴ دیده شده‌اند (Brock, 1973). این جلبکها بصورت شناور(Planktonic) یا چسبیده به کف (Bentic) زندگی می‌کنند.

جلبکهای سبزآبی دارای انواع تک سلولی، کلنی و رشته‌ای هستند. در نوع کلنی سلولها در داخل یک زمینه (Matrices) پلی ساکاریدی قرار گرفته‌اند. کلنی‌ها ممکن است مسطح، خمیده، کروی یا بی شکل باشد. سلولهای

کلنی مشابه و نامتمایز از یکدیگراند. چنانچه تقسیم سلولی تنها در یک جهت انجام شود، ریسه‌ای غیر منشعب (Trichome) از سلولها بوجود می‌آید. ریسه‌های منشعب براثر تقسیم برخی از سلولها در یک سطح متفاوت با سطح تقسیم اولیه و با ایجاد انشعاب کاذب(fals branching) بوجود می‌آیند. باید توجه داشت وقتی صحبت از جلبک رشته‌ای (filament) به میان می آید، منظور ریسه‌های سلولی (Chain of cell) به اضافه غلاف پوششی(sheath) است. در برخی از نمونه‌ها رشته‌ها فاقد غلاف پوششی هستند در این صورت ریسه (Trichome) نامیده می‌شوند (Evans *et al*., 1976).

در حال حاضر، جلبکهای سبزآبی از طبقه‌بندی مورد توافق تمام محققین برخوردار نیستند. علت را می‌توان در وجود دیدگاههای متفاوت درباره صفات مورد نظر در طبقه‌بندی و چگونگی تشخیص آنها جستجو کرد. Drouet سالهای زیادی به تحقیق در مورد چگونگی طبقه‌بندی این جلبکها پرداخته است. روش وی شامل مطالعه نمونه‌های تیپ (Type speciments) و هزاران نمونه جلبک زنده و نگهداری شده در محلولهای تثبیت کننده هر باریم بود. Drouet مانند(1932, 1979) Geitler و (1979)Bourrelly اعتقاد دارد که روش او شامل مطالعه نمونه‌های تیپ (Type speciments) و هزاران نمونه جلبک زنده و نگهداری شده در محلولهای تثبیت کننده هر باریم بود. Drouet مانند(1932, 1979) Geitler و (1979)Bourrelly اعتقاد دارد که روش او سودمندترین طریقه برای طبقه بندی جلبک های سبزآبی است(Bold, 1985).

عده‌ای دیگر از محققین نیز روشهای میکروبیولوژی مانند تهیه سوش‌های خالص و عاری از آلودگی را برای طبقه‌بندی این گروه از جلبکها مهم می‌دانند. طرفداران شیوه اخیر کوشیده‌اند که در محیط کشت کاملاً کنترل شده طیفی از تنوع ریختی جلبکهای سبز آبی را ایجاد کرده و پس از بررسی ویژگیهای بیوشیمیایی و فیزیولوژیک اطلاعات لازم برای پی‌ریزی یک نظام طبقه‌بندی را بوجود آورند. Pringsheim (1967) تلفیقی از مطالعات محیطی و آزمایشگاهی جلبکهای سبز آبی را راه‌گشای طبقه‌بندی آنها می‌داند.

انواع تک‌سلولی، کلنی و رشته‌ای این جلبکها توسط مولفین مختلف به روشهای مختلفی طبقه‌بندی شده‌اند Geitler 1932 سه راسته Fritch (1942) ، Desikachary (1959) و Bourrelly (1970) پنج راسته Smith (1950) سه راسته Fott 1971 چهار راسته را برای جلبک‌های سبز آبی قائلند. در سال Drouet,1980 کلیه جلبکهای سبز آبی تک

سلولی و کلنی را در یک راسته بنام Chroococales و انواع رشته‌ای را در راسته دیگر بنام Hormagoniales قرار داده است.

۲-۱- اسپیرولینا (Spirulina)

اسپرولینا از یک لغت یونانی به نام اسپیرولا به معنی فنر کوچک گرفته شده است. این جنس متعلق به راسته Oscillatoriales و خانواده Oscillatoriaceae می‌باشد صفات تاکزونومیک این جنس عبارت است از: ریسه‌های (Trichom) مارپیچی، دارای حلقه‌های مشخص، در موارد نادر فاقد حلقه، فاقد صفحات مشخص یا بدون شکل ژلاتینی، رشته‌ها موکوسی یا موسیلاژی که بندرت هنگام جمع‌آوری سالم باقی می‌ماند. گونه‌های این جنس غوطه‌ور یا هوازی هستند. در گذشته تصور می‌شد که Spirulina فاقد دیواره‌های عرضی می‌باشد ولی رنگ‌آمیزی و نیز استفاده از میکروسکوپ الکترونی(Holmgren.*et al*,1971) نشان داد که دیواره‌های ظریف عرضی در آن وجود دارد. این دیواره‌های ظریف در آب شیرین و در انواع آب‌شور وجود دارند. این ترایکوم‌ها دارای حرکت هستند.Compere و Leonard در سال ۱۹۶۷، گزارش دادند که کیک‌های جلبکی در بازارهای Fort-Lamy جمهوری چاد در افریقا فروخته می‌شود. *Spirulina Platensis* (Nordst) Geitt در دریاچه‌های شمال جمهوری چاد در افریقا وجود دارد که از نظر NaCO3 غنی می‌باشد. آنالیزهای شیمیایی نشان داد که کیک‌ها دارای ۴۹ـ۴۵ درصد وزن خشک پروتیئن بودند و پیشنهاد شد که Spirulina می‌تواند یک منبع غذایی خوب باشد. Kilham و Melack در سال ۱۹۷۴ دریافتند که میزان فتوسنتر در این دریاچه بطور استثنایی بالا بوده و به این دلیل *Spirulina platensis* در آن دارای فراوانی بالایی بود. بازدید از هر انبار مواد غذایی در این ناحیه نشان خواهد داد که در تعداد زیادی از تولیدات غذایی اسپیرولینا به عنوان مکمل در نظر گرفته شده است. یک شرکت مکزیکی پرورش جلبک را در آبهای کم عمق با pH=۱۱ در نزدیکی مکزیکوسیتی توسعه داده بطوریکه روزانه ۴ تن Spiruline آنجا تولید و عمل‌آوری می‌شود.

۳-۱-جلبکهای سبز(Chlorophyta)

کلروفیتا یا جلبکهای سبز به علت فراوانی گونه‌ها و پراکندگی آنها یکی از گروههای عمده جلبک‌ها می‌باشند. این جلبکها در آبهایی با درجات شوری مختلف از آب شیرین تا آبهای دریایی فوق اشباع از املاح نمکی و نیز

در آبهای نیمه شور بسر می‌برند. چندین راسته از این جلبکها فقط دریایی هستند که شامل انواع کف‌زی و شناور می‌باشند. تعدادی نیز در هوا وجود دارند(Bold 1985).

جلبکهای سبز به انواع مختلف تک‌سلولی، ریسه‌ای، غشایی، صفحه یا لوله‌ای دیده می‌شوند. ساختمان سلولی کلروفیتا مانند تمام جلبکها بجز سیانوفیتا و پروکلروفیتا، یوکاریوتیک می‌باشد (Evans, 1974; Dodge, 1973; Bisalutra, 1974). مهمترین اندامک سلولی جلبک‌ها کلروپلاست است که اشکال متنوع داشته و توسط میکروسکوپ نوری قابل رویت است شکل کلروپلاست یک معیار مهم در طبقه‌بندی جلبکهای سبز می‌باشد. این اندامک ممکن است بزرگ بوده و بصورت جانبی، فنجانی، اسفنجی، توری محوری یا در نهایت ستاره‌ای شکل باشد (Dudge, 1972). در اکثر جلبکهای سبز پلاستیدها شامل یک یا چند ناحیه تخصص یافته به نام پیرونوئید می‌باشند. Gibbs (1962) و Griffiths (1970) حضور و اعمال این اندامک‌ها را در جلبکهای سبز و سایر جلبکها توضیح داده‌اند. در جلبکهای سبز پیرونوئید محل تشکیل نشاسته است. نشاسته در داخل کلروپلاست و چسبیده به سطح پیرونوئید تشکیل می‌شود. گفته می‌شود پیرونوئید محل ذخیره موقت محصولات اولیه فتوسنتز است که بعدها تبدیل به نشاسته می‌شوند (Griffith, 1970). برخی دیگراز دانشمندان عقیده دارند که پیرونوئیدها محل تولید آنزیمها هستند و ملکولهای گلوکز کلروپلاست را پلیمریزه کرده و به نشاسته تبدیل می‌کنند. در تعدادی از جلبکها (مانند Scenedesmus) ثابت شده (Bisalputra & Weier, 1964) که تمامی نشاسته کلروپلاست توسط پیرونوئید بوجود می‌آید، اما این مسئله در مورد بقیه جلبکها صدق نمی‌کند بعلاوه در تعدادی از جلبکها پیرونوئیدهای سازنده نشاسته وجود ندارند(مثل Microspora). در تعدادی از جلبکها (مثل Tetracystis) پیرونوئیدها هنگام تقسیمات سلولی تقسیم می‌شوند. بنابراین، بخشی که حاصل تقسیم پیرونوئید است به همراه قطعات پلاستید تقسیم شده، مستقیماً وارد سلولهای دختر می‌شوند(Brown & Bold, 1964). کلروپلاست جلبکهای سبز متحرک می‌باشد.

اغلب سلولهای جنسی جلبکهای سبز ساکن دارای اندامک خاصی به نام استیگما (Stigma) یا لکه چشمی قرمز می‌باشند. این اندامک حاوی رنگدانه می‌باشد. به نظر برخی از محققین این لکه بعنوان اندام گیرنده عمل می‌کند. موتانهای کلامیدوموناس اگر چه نسبت به نور حساس می‌باشند اما فاقد لکه چشمی هستند و خیلی کندتر از انواع دارای استیگما نسبت به نور واکنش نشان می‌دهند (Hartshorne, 1953).

سلولهای متحرک در جلبکهای سبز دارای اندام دیگری به تام تاژک می‌باشند. تاژک‌ها در جلبکها از نظر محل قرار گرفتن، تعداد و طول زوائد تفاوت‌هایی را دارا هستند. در تعدادی از اورگانیسم‌ها زواید مو مانند ظریفی در سطح تاژک دیده می‌شود. در صورتیکه بقیه سطح تاژک توسط یک یا چند لایه از فلسهای ریز پوشانده شده است به این نوع تاژک، "تنسل" (Tencel) می‌گویند. برخی دیگر از تاژکها لوله‌ای بوده و به همین جهت تاژک "شلاقی" (Mastigonema) نامیده می‌شوند. پیگمانهای موجود در کلروپلاست جلبکهای سبز عبارت است از کلروفیلهای a،b ، ، ، کاروتن و چند نوع گزانتوفیل است. برخی از جلبکهای سبزعلاوه بر کلروفیل‌ها و کارتنوئیدها(مانند: *Zygogoniam ericeterum*) حاوی پیگمانهای واکوئلی ارغوانی هستند که احتمالاً کمپلکس‌های تانن ـ آهن می‌باشند (Bold, 1985).

جلبک شناسان مختلف طبقه‌بندی‌های متنوعی را برای جلبکهای سبز ارائه دادند. براساس تقسیم‌بندی Bold در سال 1985 این شاخه دارای یک رده به نام Chlorophyceae است. راسته‌هایی که در این رده شناخته شده‌اند عبارتند از Volvocales، Chlorosarcinales، Tetrasporales، Chlorococcales، Ulvales، Zygnematales، Sphaeropleales، Oedogoniales، Ulotrichales، Chaetophorales، Cladophorales، Trentepohliales، Acrosiphoniales، Dasycladales، Siphonocladales، Caulerpales، دو جنس *Scenedesmus spp* و *Chlorella Vulgaris* از راسته Chlorococcales هستند. این راسته شامل جلبکهای تک‌سلولی غیرمتحرک و کلنی است. بعضی از کلنی‌ها سنوبیک (مانندPediastrum و Scenedesmus) هستند. تولید مثل در این راسته غیرجنسی است و توسط تشکیل اسپورهای متحرک و غیرمتحرک صورت می‌گیرد (Bold 1985).

٤-١-کلرلا (Chlorella)

این جلبک تک‌سلولی بشکل کروی تا بیضوی است گاهی تعدادی از سلولها تشکیل کلنی‌های کوچکی را می‌دهند. کلروپلاست آن منفرد، فنجانی، حاشیه‌ای و بندرت مارپیچی است. دارای یک پیرونوئید است که امکان دارد بوضوح قابل مشاهده نباشد. هر سلول یک هسته دارد.

تولید مثل در این جنس از طریق اتوسپور انجام می‌گیرد. پروتوپلاسم سلول به ۱۶،۸،۴،۲ پروتوپلاسم دختر تقسیم میشود. هر یک از سلولهای دختر یک دیواره ترشح میکنند پس از پاره شدن دیواره سلول مادر، سلولهای دختر آزاد می‌شوند.

گونه‌های کلرلا در آبهای شیرین و شور و همچنین بصورت همزیست وجود دارند. ۴ تا ۵ گونه کلرلا از هند گزارش شده‌اند که از جمله آنها *C. vulgaris* ، *C. ellipsoidea* می‌باشد. گونه *C. Conductrix* در هیدرا، استنتور(Stentor) و پارامسی دیده می‌شود. کلرلا را به دلیل خصوصیات تغذیه مناسب آن در کشورهای مختلف نظیر آمریکا، ژاپن، آلمان، فلسطین، بصورت انبوه کشت میدهند. این جلبک بسرعت در محلولهای معدنی رشد میکند و آنالیز آن نشان داده که مواد غیرآلی آن مشابه ذرت است، بطوریکه پروتئین (۵۰درصد)، کربوهیدرات(۲۰درصد) و چربی(۲۰درصد) موجود در آن بسیار زیاد میباشد. کلرلا دارای تمام آمینو اسیدهای ضروری است. رنگدانه‌های کلروفیل a، بتاکاروتن و گزانتوفیل در کلرلا نسبت به خیلی از گیاهان دیگر بیشتر است. کلرلا حاوی مقدار زیادی از ویتامین‌های B,A و C می‌باشد.

در رژیم غذایی انسان و حیوانات از پودر کلرلای خشک استفاده می‌شود. از کلرلا به عنوان ماده خام برای صنایع مختلف استفاده می‌گرددکه احتیاج به کلروفیل جهت تهیه مواد معطره (Deodorant) دارند. این جنس تاکنون بندرت در آبهای تالاب انزلی مشاهده شده است. در این پروژه ما توانستیم آن را از طریق فیلتر کردن آب تالاب انزلی جدا سازی و شناسایی کنیم. در *C. Vulgaris* (Beyerinck) قطر سلولها۵ـ۱۰میکرون بوده کروی شکل و تشکیل۲ـ۸ اتوسپور را می‌دهند (Tiffany & Britton, 1971).

۵-۱-سندسموس(*Scenedesmus Meyen*)

در این جنس سنوبیاها بصورت بیضی‌های پهن، مسطح، کشیده، دوکی یا تخم‌مرغی شکل هستند، تعداد سلولها بر ۲ بخش‌پذیر است. سلولها از پهلو یا بندرت از طریق برآمدگیهای کوتاهی با هم ارتباط دارند. سلولها بصورت ۱ یا ۲ ردیفی(گاهی بصورت مربعی) قرار می‌گیرند. دیواره سلولی صاف و دارای تزئینات مختلفی بوده و در قسمت انتهایی نیز فاقد خار و یا بدون خار (*S. quadricauda* Turp Breb) است (Tiffany L.H. & M.E. Britton, 1971). بعضی از گونه‌ها نیز علاوه بر خار دسته‌هایی از زوائد ریز و زبر دارند (Trainer and Massalaski, 1971 ; Massalaski, *et al.*, 1974)، که وظیفه شناوری گونه‌هایی را که دارای آن می‌باشند به آنها نسبت می‌دهند. سلولها تک‌هسته‌ای با کلروپلاست لایه‌ای منفرد و یا جانبی هستند، که اغلب تمام فضای سلول را اشغال می‌کند. این سلولها دارای یک پیرونوئید هستند (Bold, 1985)که تشکیل ۲ـ۳۲ اتوسپور را می‌دهند (Tiffany L.H. & M.E. Britton, 1971). تعداد کروموزومها در *S. quadricauda* n=۱۱ یا n=۱۳ گزارش شده (Sulek, 1975) است.

Kessler(1980) برای تقسیمبندی گونه‌ها، فیزیولوژی و بیوشیمی آنها را بررسی نمود. Hegewald (1982) تعدادی از گونه‌های Scenedesmus را مجدداً تقسیم‌بندی نمود(Bold, 1985).

Trainor (1963-A-C, 1979, 1980) و Trainor *et al.*(1976) معتقدند که ترکیب محیط کشت بر شکل یکایک گونه‌های Scenedesmus موثراست هنگامی که کشت خالص Kiita(Turp) *S. dimorphus* در حضور مخمر رشد داده شد، سلولهای سنوبیا فقط از قسمت راست به یکدیگر متصل شدند. این امر در جنس *Dactylococcus nageli* نیز دیده می‌شود. در حالیکه در محیط کشت دارای ۰/۱ درصد گلوکز این سلولها بطور جانبی به یکدیگر می‌چسبند و یک حالت تیپیک سنوبیا را بوجود می‌آورند. در محیط کشت مایع، *S*. Longus *Meyen* شباهت به تک‌سلولی *Chodatella subsalsalem* دارد، ولی هنگامی که همین محیط کشت بوسیله آکار جامد شد، شکل تیپیک سنوبیا بوجود آمد(Trainer, 1963) *S. dimorphous* در محیط کشت خالص تولید سنوبیا می‌کند اما در حضور نوعی باکتری خاک‌زی به صورت تک‌سلولی زندگی می‌کند(Trainor 1963).

تولید مثل در Scenedesmus از طریق اتوکلنی(Auto colony) انجام می‌شود، بدین ترتیب که هر سلول مادر کلنی‌های مینیاتور(Miniature) ایجاد می‌کند و سپس از داخل و گاهی از دیواره سلول مادر آزاد می‌شوند (Pickett-Heaps & Staehelin 1975). Trainor & Burg (1965) بطور شگفت‌انگیزی تشکیل گامت‌های دارای ۲ تاژک را در با تولید مثل غیرجنسی در *S. obliquus* گزارش کردند که هر کدام یک جنس بودند(جدا جنسی) کلنی‌های حاصل از این سلولهای متحرک، فعال و بطور اجباری دارای گامتهای یکسان هستند (آنها از طریق پارتنوژنز نمی‌توانند تکثیر یابند) اگر چنانچه این گامتها نتوانند جفت خود را بیابند تجزیه می‌شوند و از بین می‌روند. تا به امروز تولید مثل جنسی فقط در مورد *S. obliquus* گزارش و توضیح داده شده است (Bold, 1985).

S. quadricauda (Turp.) Breb سلولها ۳/۵-۶×۱۱-۱۶ میکرون، استوانه‌ای تا تخم‌مرغی شکل، در انتها گرد، سلولها در یک راستا یا بطور متناوب قرار دارند. قطب سلولهای بیرونی دارای خار، سلولهای داخلی بدون خار، طول خارها، ۱۰-۱۲ میکرون.

S. abundans (Kirchner) Chodat: سلولهای ۴-۷×۷-۱۲ میکرون دارای شکل تخم‌مرغی تا بیضی کشیده، ۱ تا ۲ خار در هر قطب (گاهی اوقات فقط در سلول انتهایی) و علاوه بر آن خارها و در روی سطح بیرونی سلول انتهایی وجود دارد.

S. obliquus (Turpin) Kuetzing : سلولها ۳-۹×۱۰-۲۱ میکرون، با راس نوک تیز سلولها در یک راستا یا تقریباً در یک راستا در کنار هم قرار دارند، سلولها از قسمت کناری با هم تماس مستقیم دارند. کناره آزاد سلولهای انتهایی مختلف است. دیواره سلولی صاف بدون دندانه یا خار.

S. acuminatus (Lagrheim) Chodat : سلولها ۳-۷×۳۰-۴۰ میکرون، دوکی، کمانی یا هلالی شکل، با انتهای نوک‌دار، دیواره سلولی صاف و بدون خار.

٦-١-کشت جلبک‌ها

در سال ۱۹۲۶-۱۹۳۹ به غیر از کلرلا و سندسموس که برای بررسی مواد مغذی معدنی و فتوسنتز استفاده می‌شدند، جلبکهای محدودی در آزمایشگاهها کشت می‌گردیدند و فعالیت‌های مربوط به جلبک‌شناسی تنها به جمع‌آوری آنها از محیط بستگی داشت. البته این روش هنوز هم ارزشمند است. اغلب هدف اصلی تهیه انبوهی از اورگانیزم‌های مورد نظر بود، زیرا در طبیعت زندگی آنها بصورت انفرادی و مجزا مقدور نیست. بنابراین، مدت‌های زیادی کار آزمایشگاهی بدون پویایی و خسته‌کننده (البته بجز برای محققین) لازم بود تا جلبکهای فیکس شده در فرمالدی‌هائید، مورد مطالعه دقیق قرار گیرند. موفقیت در کشت جلبکها در آزمایشگاه پیشرفت‌های بزرگی را در دانش سیستماتیک، فیزیولوژی، تاریخچه زندگی، جزئیات ساختمان سلولی، بیوشیمی و ژنتیک بوجود آورد. Bold (1942) ، Prigsheim (1946 A,B) و دیگران (Stein, 1973) روش‌های کشت و رشد جلبکها را در آزمایشگاه بطور جزء به جزء مورد بحث و بررسی قرار دادند.

نگهداری جلبک‌ها در آزمایشگاه و در زیر نور گاهی توالی گونه‌های مختلف را در طول زمان نشان می‌دهد. این حالت کشت نگهداری (Maintenance Culture) نامیده می‌شود. هنگام تکثیر یک یا چند گونه در محیط کشت نگهداری ممکن است انواعی از مواد مغذی مانند لپه، دانه برنج، نیترات یا فسفات را به آن محیط اضافه نمایند این حالت را "غنی‌سازی کشت" (Enrichment Culture) می‌گویند.

تکنیکهای مختلفی وجود دارند که جدا کردن جلبکها را از یکدیگر و از سایر میکرو اورگانیسم‌ها شامل (پروتوزواها، قارچها و باکتریها) و کشت جداگانه آنها را امکان‌پذیر می‌سازد. این نوع کشت را "کشت خالص" (Axenic Culture) می‌نامند و اگر چنانچه مطالعه پیرامون جمعیت ژنتیکی یک کشت همگن (Homogen) و یکنواخت از جلبک‌ها مورد نظر باشد می‌توان یک سلول از آن را جدا کرده و کشت داد و مقدار آن را به حد جمعیت مورد نظر رساند. حالت اخیر را "کلن" (Clon) و این‌گونه کشت را "کشت کلنی" (Clonal Culture) می‌نامند.

به رغم پیشرفت‌هایی که در کشت جلبک در آزمایشگاهها بعمل آمده است، به عقیده Pringsheim (1976,A) بعنوان یک میکروبیولوژیست برجسته بویژه در زمینه کشت جلبک "جلبک‌شناس‌هایی که در آزمایشگاه کار می‌کنند، باید توجه بیشتری به مسائل اکولوژیک یافته‌های خود معطوف دارند". کشت جلبک در آزمایشگاه مستلزم داشتن اطلاعاتی در مورد مبانی اساسی فیزیولوژی تغذیه جلبک‌هاست. معمولاً تصور می‌شود که جلبک‌ها فتواتوتروف هستند و می‌توانند با استفاده از نور، پروتوپلاسم خود را از منابع معدنی بوجود آورند. این فرضیه در بسیاری از موارد و زمانی تأیید می‌شود که میزان معینی از یک ترکیب معدنی خاص در pH معینی، در محیط وجود داشته باشد. چنین محیط کشت‌هایی که ترکیب کمی و کیفی آنها کاملاً شناخته شده است "محیط کشت تعریف شده" (Defined Medium) می‌نامند. مدتها پیش معلوم شد که برخی از جلبکها جهت رشد خود نیاز به موادی دارند که ویتامین نامیده می‌شوند. برای مثال *Euglena gracilis* نیاز به ویتامین B_{12} دارد. برخی از گونه‌ها مانند Mougeotia و برخی دیگر از جلبکها نیز جهت رشد خود به این ویتامین نیاز دارند. جلبکهای فتواتوتروف با چنین نیازمندیهایی فتواکسوتروفیک (Photoauxotrophic) نامیده می‌شود(Bold, 1985).

علاوه بر عناصر عمده مانند Mg, Fe, Ca, S, K, P, H, C تعدادی از عناصر بصورت جزئی مورد نیاز جلبک‌ها هستند که شامل B, Co, Cu, CL, Na, MO, Mn, Si, Zn می‌باشند، عناصر عمده ممکن است بصورت‌های مختلفی در محیط کشت بکار برده شوند (Okelley, 1974) نیتروژن ممکن است بصورت NO_2, NO_3, NH_4 و ترکیبات آلی دیگر برای انواع مختلف جلبک بکار رود لیکن در بیشتر موارد NH_4, NO_3 مورد استفاده قرار می‌گیرند. برخی از جلبکها می‌توانند نیتروژن را از ژلاتین گرفته و مورد استفاده قرار دهند (Archibald & Bold, 1970). بسیاری از

جلبکهای دریایی در محیط کشت‌هایی نگهداری می‌شوند که آب دریا بوسیله نیتروژن و فسفر غنی شده است. اگر خاک به کشت دریایی و آب شیرین اضافه شود رشد جلبک‌ها افزایش می‌یابد (Pringsheim, 1945 A, B).

۲- مواد و روشها

اولین مرحله در انجام کشت بدست آوردن علم انتشار گونه‌های مورد نظر در طبیعت است. این امر نه فقط برای پیدا کردن گونه مورد نظر است، بلکه با داشتن این اطلاعات اکولوژیک انتخاب محیط کشت وتامین pH، دما و سایر شرایط مورد نیاز ساده ترخواهد بود.

۲-۱- نمونه‌برداری

نمونه‌برداری از آب توسط نمونه‌بردار روتنر ۲ لیتری انجام گرفت. نمونه‌های آب در دبه پلاستیکی ریخته شده و بلافاصله در جعبه‌های چوب پنبه‌ای پر از یخ قرار گرفتند و به آزمایشگاه منتقل گردیدند.

۲-۲ تجهیزات

تجهیزات مورد نیاز و فضای آزمایشگاهی مناسب برای انجام این آزمایشها کاملاً تخصصی است. در زیر مشخصات هر یک از فضاهای آزمایشگاهی به همراه وسایل مورد نیاز آنها که در انستیتو اقیانوسی شناسی Makapuu Point (Duerr, O. & R. Edralin & M. Price) طرا حی شده به تفضیل شرح داده شده است.

۲-۲-۱- فضای نگهداری مواد شیمیایی و تجهیزات آن

اندازه محل نگهداری مواد شیمیایی تابعی از حجم مخازن و زمان مورد نیاز برای تهیه دوباره هر ماده شیمیایی می‌باشد. این فضا باید خشک بوده و مواد شیمیایی مورد نیاز در ظرفهای پلاستیکی نگهداری شوند.

۲-۲-۲- فضای آماده‌سازی محیط کشت

این فضا باید به ترازوئی با دقت ۰/۵-۵۰ کیلوگرم و ترازوئی دیگر با دقت ۰/۰۰۰۱گرم مجهز باشد. سایر ضروریات این آزمایشگاه وسایل شیشه‌ای، هم‌زن(Shaker) اتوکلاو، آون، دستگاه تقطیر و هود است. فضای کاری مناسب برای این آزمایشگاه ۳۰ مترمربع می‌باشد. در این آزمایشگاه باید فضایی برای مواد شیمیایی، میز کار و دستشویی در نظر گرفته شود.

۲-۲-۳-اتاق کنترل کشت

این اتاق می‌تواند قسمتی از آزمایشگاه تهیه محیط کشت باشد یا به صورت جداگانه بمساحت ۱۵مترمربع در مجاور آن قرار داشته باشد. این اتاق باید به سیستم تهویه، میزکار وسط(Benchavea) برای کار با میکروسکوپ و

اسپکتروفتومتر تجهیز شود. در این اتاق میکروسکوپ با بزرگنمائی ۱۰۰۰-۴۰۰ و اسکپتروفتومتر با طول موج ۶۸۰ نانومتر مورد نیاز می‌باشد.

٤-۲-۲- آزمایشگاه مرطوب (Wet Lab)

حداقل اندازه این آزمایشگاه ۵۰ مترمربع است و شامل ظرفشوئی، کانال تخلیه آب از کف اتاق خطوط هوای فشرده (لوله‌های هوا) لوله آب‌شور(در صورت نیاز) برق با قدرت کافی برای قفسه‌های دارای نور سرد و پمپ‌های آب و هوا می‌باشد. باید از ورود هوا به این آزمایشگاه جلوگیری کرد. وجود دیواره‌های شیشه‌ای در آن ضروری نیست و باید نسبتاً از اثرات جریان باد محافظت گردد.

آزمایشگاه کشت جلبک مرکز گیلان دارای ۲ کابینت آلومینیومی جهت نگهداری مواد شیمیایی و ظروف شیشه‌ای بود بطوریکه نگهداری داروها را دچار مشکل می‌ساخت. فضای آزمایشگاهی بیشتر از ۶۰ مترمربع بود. تجهیزات این آزمایشگاه شامل ترازویی با دقت ۰/۰۰۱گرم، هم‌زن مغناطیسی، وسایل شیشه‌ای، میزکار(در حدود ۲مترمربع) و یک ظرفشویی بود. آزمایشگاه کنترل قسمتی از اتاق کشت بوده که فقط با یک میزکاری به طول ۳ متر و عرض نیم‌متر، میکروسکوپ آزمایشگاه مرطوب اختصاص یافته بود یک قفسه چوبی دو طبقه بود که در سقف هر طبقه ۹ لامپ مهتابی ۲۰ وات در ۳ ردیف ۳ تایی در امتداد یکدیگر نصب شده بود. یک تایمر دستی، کنترل نور در هر طبقه را امکان‌پذیر می‌ساخت هوادهی در این طبقات نیز از طریق پمپ‌های هوای کوچک صورت می‌گرفت، اما با این حال مشکل جریان هوا، تنظیم و ثابت نگهداشتن دما در این قفسه ها تا حد زیادی وجود داشت. لذا جهت برطرف نمودن این مشکل جعبه‌ای در نظر گرفته شد و در داخل آن ۱۰ لامپ مهتابی بصورت عمودی نصب گردید، بطوریکه هر ۵ لامپ دارای یک کلید جداگانه است و ۵ تا از آنها توسط تایمر دستی برای تنظیم زمان روشنایی و تاریکی کنترل می‌شوند. جلوی جهبه توسط درب شیشه‌ای پوشانده شده است. در این جعبه تهویه، فن(Fan) و ترموستات با دقت ۱+ درجه سانتیگراد نصب گردیده است در قسمت بالایی جعبه ۵ دریچه برای کنترل حرارت تعبیه شده است.

۳-۲-جداسازی

بسیار از اورگانیزم‌ها که برای کشت مورد نیاز هستند در محیط‌های طبیعی بصورت نادر و انفرادی زندگی می‌کنند، بنابراین جداسازی و جمع‌آوری مستقیم آنها از محیط مشکل خواهد بود زیرا باید سلولها را بطور

جداگانه جدا نمود. با تمرین می‌توان سلول‌ها را با استفاده از پی‌پت‌های کوچک برداشته و به محیط کشت انتقال داد. در اغلب موارد نمونه‌ها را از محیط طبیعی آنان یعنی گیاهان آبزی، خاک یا آب بر می‌دارند و با اضافه کردن محیط‌های مغذی، رشد را در آنها تحریک می‌کنند، در نتیجه انبوهی از جلبک مورد نظر بدست می‌آید. در این صورت براحتی می‌توان آنها را برداشته و خالص نمود. برای کاهش تعداد باکتری‌های آلوده کننده و جلبکهای دیگر از روش شستشو استفاده می‌گردد. در این قسمت مراحل مختلف جدا سازی بتفصیل شرح داده شده است:

۱-۳-۲-تمیز کردن

برای تمیز کردن لوله‌های آزمایش و سایر ظروف شیشه‌ای مورد نیاز ابتدا، آنها را در تمام طول شب در اسید سولفوریک غلیظ غوطه ور می‌نمایند سپس روز بعد آنها را ۱۰ بار با آب معمولی و ۵ بار با آب مقطر شستشو می‌دهند، از آنجائی که وسایل فلزی، بطری، سرم لوله‌های کائوچو سیلیکون و غیره در مقابل اسید مقاوم نیستند برای تمیز کردن آنها از مواد پاک کننده استفاده می‌شود و سپس به طریقه فوق الذکر شستشو می‌کردند. تمامی وسایلی که در مقابل گرما مقاوم می باشند مانند فلاسک‌های والومتریک (volumetric flasks)، پیپت، ظروف شیشه‌ای و .... بایستی قبل از استفاده در آون ۱۱۰ درجه سانتیگراد خشک کردند (Kaushik, 1987).

۲-۳-۲-کیفیت آب (Water quality)

برای تهیه محلولهای کشت بجز در موارد خاص از آب مقطر موجود در مخازن شیشه‌ای پیرکس استفاده می شود (Kaushik, 1987)، در مواردی نیز از آب دریا (دریای خزر) فیلتر شده استفاده شد.

۳-۳-۲- استریل کردن

الف ـ شیمیایی ـ برای کاهش آلودگی‌های میکروبی در سطوح مختلف اتاق کشت، اتاق انکوباسیون، اتاق تلقیح و همچنین سطوح میز کار از دتول استفاده شد. حداقل هفته‌ای یکبار کف تمام اتاق توسط محلول دتول ضد عفونی گردید و میزکار قبل از هر بار تلقیح با استفاده از آن استریل می‌شد.

ب ـ بخار ـ بخار برای انواع محیط‌ها و موادی قابل استفاده است که می توان آنها را در دمای ۱۱۰-۱۰۰ درجه سانتیگراد نگهداشت. برای استریل کردن، ماده مورد نظر را در یک محیط مرطوب و گرم بمدت ۹۰ دقیقه قرار

می دهند یا ۳۰ دقیقه بطور متناوب طی سه روز این عمل انجام می‌شود. روش اخیر سبب از بین رفتن اسپورها می گردد.

ج ـ اتوکلاو ـ تمام محیط‌های آلی و غیر آلی را می‌توان با استفاده از اتوکلاو استریل نمود. بجز در مواردی که محیط کشت شامل ویتامین‌ها ، بی‌کربنات ها، ترکیبات قندی یا ترکیباتی از این قبیل باشد. در این پروژه پس از تهیه محیط کشت مورد نظر دهانه آن توسط پنبه، درپوش (که محکم بسته نشده باشد) یا کاغذ پوشانده می‌شد سپس محیط کشت تهیه شده بمدت ۳۰-۱۵ دقیقه در فشار یک اتمسفر یا 151b/in در دمای ۱۲۱ درجه سانتیگراد استریل می‌گردید. در این ارتباط قبل از اینکه دریچه فلزی بخار بسته شود، باید هوا کاملاً از آن خارج گردد (Kaushik, 1987).

د ـ گرمای خشک ـ تمام اجسام و ظروف شیشه‌ای که قابلیت تحمل دماهای مختلف را دارند، باید توسط هوای گرم آون استریل شوند. در این پروژه نیز ظروف به مدت یکساعت در دمای ۱۷۰ درجه سانتیگراد در آون قرار داده می‌شدند و وسایل مجدداً پس از سرد شدن در داخل آون مورد استفاده قرار می گرفتند.

ی ـ فیلتراسیون ـ برای محلولهایی که در مقابل حرارت بی‌ثبات می‌باشند می‌توان از این روش استفاده نمود. در این پروژه فیلتراسیون با فیلتر غشایی ۰/۲ میکرون و با استفاده از پمپ خلاء صورت گرفت.

هـ ـ اشعه ـ ازاشعه ماوراء بنفش میتوان عموماً برای استریل نمودن اتاق تلقیح و غیره .... استفاده کرد زمان اشعه دادن از ۶۰-۳۰ دقیقه می‌باشد. در این مورد نیز در اتاق تلقیح آزمایشگاه کشت جلبک برای استریل نمودن سطوح آلوده از لامپ .UV استفاده گردید.

۲-۳-٤ محیط کشت

محیط کشت ممکن است بصورت مایع یا جامد باشد برای تهیه محیط کشت مایع بجز در موارد استثنائی تمام میکروالمنت‌ها (Microelement) و ماکروالمنت‌های (Macroelement) مورد نیاز به آب مقطر اضافه گردیده و کاملاً در آن حل می‌شوند.

تمام محیط کشت‌ها باید قبل از تلقیح استریل گردند. دهانه لوله یا فلاسک محتوی محیط کشت با پنبه پوشانده می شوند این عمل مانع ورود آلودگی جدید به داخل محیط کشت میگردد، اما تبادل هوا به راحتی صورت می گیرد. برای تهیه محیط کشت جامد آسان ترین و متداول ترین روش اضافه کردن یک ماده جامد کننده به

محیط مایع می باشد. معروفترین ماده در این زمینه آگار است که نقطه ذوب آن ۱۰۰-۹۷ درجه سانتیگراد می‌باشد. آگار جوشانده شده حاوی محیط کشت در اثر سرد شدن، در دمای ۴۲ درجه سانتیگراد جامد میگردد اما در صورت تلقیح باید فقط تا دمای ۴۷-۴۵ درجه سانتیگراد سرد شود. این حرارت برای زمان کوتاه به جلبک ها صدمه‌ای نمی رساند. آگار یک کالاکتون است. کمپلکس کربوهیدراتی که از گلاکتوز تشکیل شده و توسط جلبکها شکسته نمی شود. برای روش خطی معمولاً از غلظت ۱/۵درصد آن استفاده میشود و این در حالی است که غلظت ۱/۸درصد محیط سخت تری را ایجاد می کند (Kaushik, 1987).

۵-۳-۲- محیط کشت مایع

یک راه ساده برای پرورش دستی جلبک‌ها، رشد دادن آنها در محیط کشت مایع در لوله‌های آزمایشگاهی، فلاسک‌های مخروطی یا بطری‌های کشت می‌باشد، جلبک‌ها در محیط کشت مایع بصورتهای مختلف ظاهر می گردند (Kaushik, 1987) .

Turbidity – بصورت یک ابر رنگی و کم و بیش متراکم ظاهر می‌گردند مانند: نوستوکNostoc ، آنابنا Anabaena، سین کوکوسSynechococcus

Pellicle – بصورت توده کوچکی از رشته‌ها است که بر روی سطح محیط مایع شناور هستند مانند: کلئوتریکس Calothrix، تولیپوتریکسTolypothrix ، وستیلوپسیس.Westieliopsis

Sediment – سلولها بصورت مجتمع و یا رسوب ظاهر می‌شوند اما اگر چنانچه ضربه آهسته به لوله وارد کنیم، سلولها بطرف بالا حرکت می کنند مانند: کلئوکپساGloeocapsa ، هاپلئوسیفونHapaiosiphons ، وستیلوپسیس.

٦-۳-۲- محیط کشت جامد

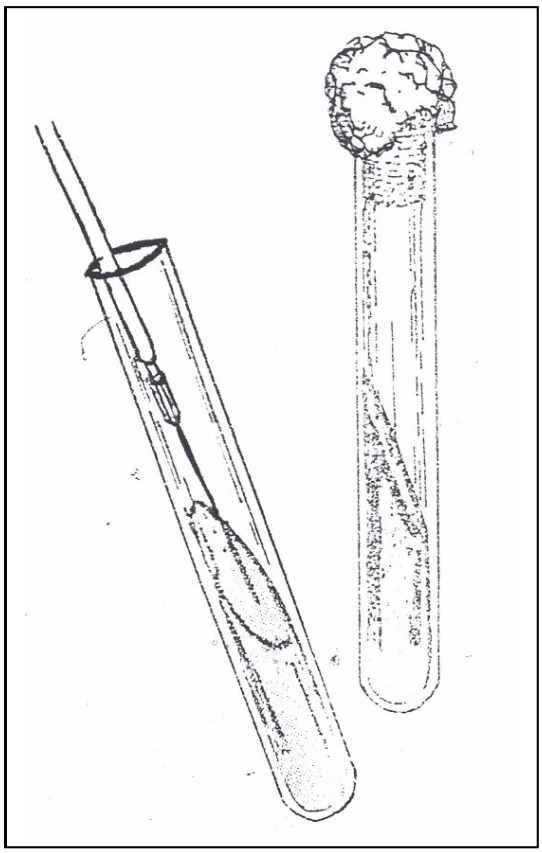
اضافه کردن مواد جامد کننده به محیط مایع محتوی سلولهای جلبکی، سلولهای منفرد را در جای خودشان به دام می‌اندازد و به جای شناور شدن در محیط مایع هنگام تکثیر، یک کلنی سلولی یا رشته‌ای ثابت را تشکیل می‌دهند و به صورت یک توده مشخص رشد می‌کنند. اگر سلولهای اصلی با فاصله از یکدیگر بدام بیفتند، هر سلول یا رشته یا توده سلولی بصورت کلنی‌های مشخص و جداگانه رشد می کند. هیچ روش دقیقی برای پیش بینی تعداد سلولهای زنده در یک نمونه وجود ندارد. بنابراین، همیشه باید نمونه را چندین بار رقیق کرد و در

چندین پلیت ریخت اما با کسب تجربه در مورد برخی از انواع نمونه ها می‌توانید غلظت نمونه ها را به حداقل برسانید، این تکنیک برای پخش کردن و جداسازی اشکال جلبکی خاص مناسب می‌باشد.

پلیت خالص به این صورت تهیه می‌گردد که یکسری نمونه شاهد (Water Blanks) با ml ۹۰ و ml ۹ آب مقطر در فلاسک‌های مخروطی ml ۲۵۰ و ml ۲۰ تهیه نموده و ml ۱۰ نمونه را نیز به فلاسک محتوی ml ۹۰ نمونه شاهد اضافه می‌کنند و سپس بر چسب رقت ۱۰ را به آن می‌چسبانند. از این سوسپانسیون ml ۰/۱ به ml ۹ نمونه شاهد از پیش تهیه شده اضافه می‌کنند و کاملاً آن را تکان می دهند و برچسب 10^{-2} بر آن می‌چسبانند. مجدداً ml ۰/۱ از سوسپانسیون رقیق شده را به لوله آزمایش محتوی محیط آگار ذوب شده با دمای ۴۷ درجه سانتیگراد اضافه می‌نمایند و سپس تمام محتویات لوله آزمایش را خوب مخلوط می‌کنند و در یک پتری دیش استریل می ریزند. قبل از انتقال دادن آن به اتاق انکوباسیون باید آن را در یک فضای مناسب قرار داد تا سرد شود. رقت‌های 10^{-4} و 10^{-5} نیز توسط یک فرایند مشابه تهیه می‌شوند و ml۰/۱ از سوسپانسیون هر رقت را بطور جداگانه به محیط آگار ذوب شده منتقل می‌نمایند و به این ترتیب از هر رقت یک پلیت خالص تهیه می‌گردد. موفقیت این روش به چگونگی اختلاط و توزیع سلولها بستگی دارد (Kaushik, 1987) .

۷-۳-۲- شیب آگار (Agar Slop)

شیب آگار، "اسلنت آگار" نیز نامیده میشود، یک لوله آزمایش محتوی محیط آگار جامد است که هنگام سرد شدن با کمی زاویه روی یک سطح قرار می‌گیرد (عکس ۱). نتیجه رشد روی شیب آگار به شکلهای ذیل ظاهر می‌شود.



تصویر ۱- روش تلقیح اسلنت آگار

(الف) Beaded: کلنی‌هایی شبیه توپ روی سطح (منظور سطح شیبدار اسلنت آگار است) آگار ظاهر می شود

(Gloeotrichia, Nostoc)

(ب) Filliform: بصورت خطوط سطحی روی سطح اسلنت آگار ظاهر می‌گردد مانند:Anacystis, Synechococcus و تعداد زیادی از انواع تک سلولی‌ها و کلنی‌ها.

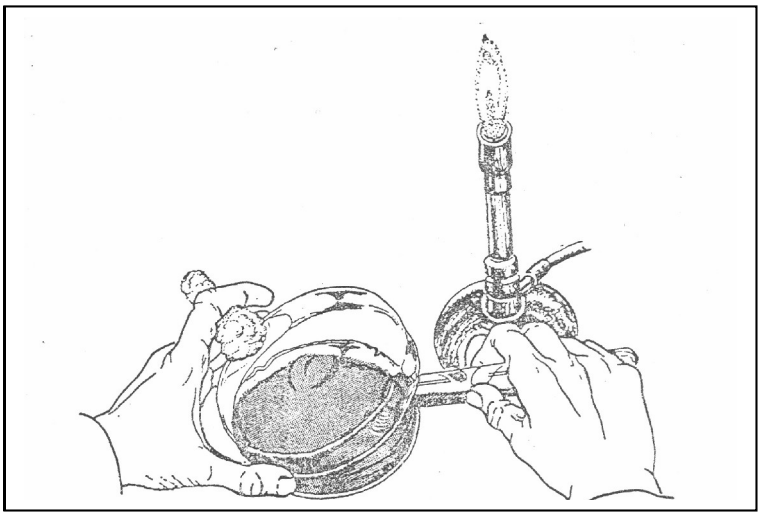
(ج) Arborescent: جلبکهایی هستند که کاملاً روی سطوح را می پوشانند و رشته‌های آنها روی دیواره پلیت و لوله آزمایش می‌خزند (Spirulina, Oscillatoria) .

۸-۳-۲-پلیت آگار (Agar Plates)

محیط کشت آگار را با گرم کردن در آب جوش ذوب نموده و سپس آن را رها کرده تا دمای آن به ۴۷-۴۵ درجه سانتیگراد برسد (سرد کردن سبب کم شدن میزان رطوبت اگار مایع هنگام سخت شدن در پتری دیش

می‌گردد). به هر پتری دیش یا پلیت ۱۲-۱۵ میلی لیتر از این آگار ذوب شده را اضافه می‌نمایند (عکس ۲). دقت زیادی باید برای جلوگیری از آلودگی اعمال گردد.

هنگامی که لوله آزمایش یا ارلن محتوی آگار ذوب شده را از حمام آب گرم خارج می‌کنید، باید جداره خارجی آن را توسط یک پارچه یا حوله کاغذی خشک نمود در غیر اینصورت آب وارد محیط کشت می شود و سبب آلودگی می‌گردد. وقتی که برای ریختن آگار درپوش پنبه‌ای برداشته می‌شود، باید قسمت خارجی دهانه ارلن یا لوله آزمایش را درمعرض شعله قرار داد زیرا میکرو اورگانیسم ها با این روش کشته می‌شوند. هنگام ریختن آگار از بالن به پلیت‌ها، باید درپوش پلیت را فقط به اندازه‌ای باز کرد که دهانه ارلن براحتی بتواند وارد آن شود باید مواظب بود که هنگام ریختن، دهانه بالن روی ظرف یا درپوش پتری دیش کشیده نشود. بعد از ریختن آگار، درپوش پتری دیش را فوراً پائین گذاشته و بعد پلیت را برداشته و به آرامی تکان می‌دهند تا آگار بطور یکنواخت پخش شود. سپس آن را رها کرده تا سرد و جامد گردد.

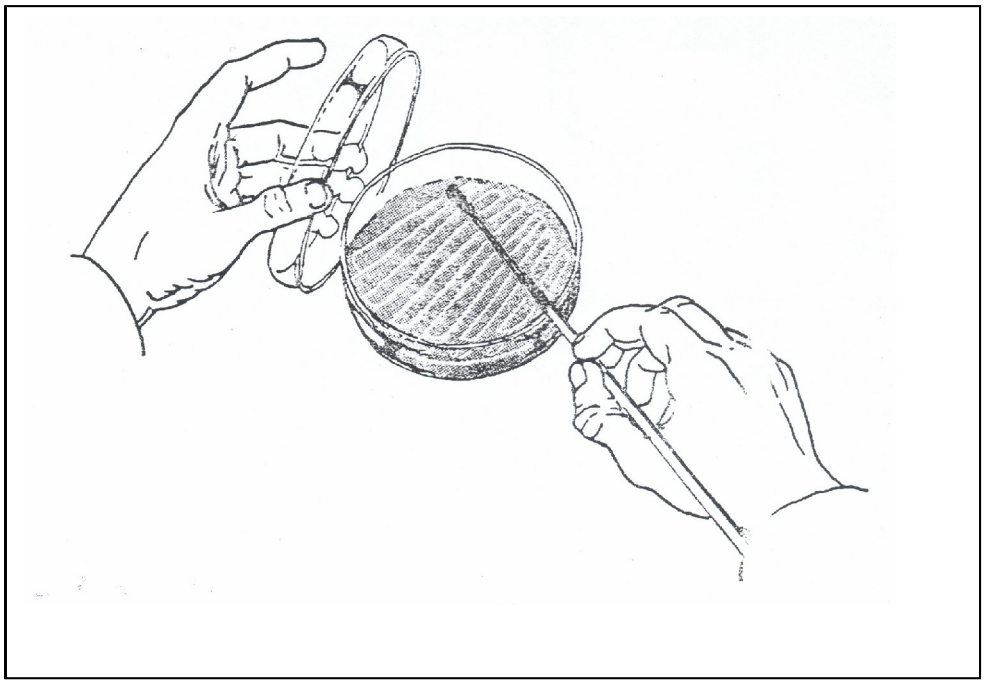


تصویر ۲ – نحوه ریختن آگار در پلیت

۹-۳-۲-جداسازی به روش کشت خطی

حالا می‌توان کشت جلبکی را روی سطح آگار قرار داد و توسط یک لوپ یا سوزن خمیده یا میله شیشه‌ای صاف آن را پخش کرد (تصویر۳). این روش با عنوان "کشت خطی" شناخته شده است. هدف از تهیه پلیت خطی تولید کلنی‌های جدا شده جلبک از یک سوسپانسیون متراکم سلولی می‌باشد. در طی تلقیح، هنگام استفاده از روش خطی در ابتداء سلولها تقریباً بطور فشرده در کنار یکدیگر قرار می‌گیرند. اما در صورتیکه این کار همچنان ادامه یابد، کم کم مقدار

فیلامنت‌هایی که روی سوزن قرار دارد کمتر و کمتر می‌شود و زمانیکه اینها روی پلیت می‌افتند کلنی‌های کاملاً، جدا از هم تشکیل می‌شود. اما اگر این کار سریع انجام گیرد کلنی‌های جدا از هم تشکیل نمی‌شود. در کشت خطی، سوزن مخصوص (مانند چوب هاکی خم شده) را روی آتش قرار می دهند و سپس آن را با فروکردن در کنار پلیت آگار، سرد می‌نمایند. کشت خطی را با قطره‌ای که در کنار پلیت و دور از قسمتی که برای کشت در نظر گرفته شده می توان به ترتیب زیر انجام داد، لوپ را از عقب به جلو از یک کناره به کناره دیگر و برعکس حرکت می‌دهند، این حرکت روی خطوط موازی باید به سمت بدن تا وسط پلیت ادامه یابد، سپس ۱۸۰ درجه آن را چرخانده همان حرکت را ادامه می‌دهند با این تفاوت که این بار حرکت به سمت مخالف بدن صورت می گیرد. این تغییر جهت مانع از مزاحمت سوزن می‌شود. در طول انجام کشت خطی در پوش پتری دیش را در دست چپ نگهداشته و یک پوشش نسبی به آگار داده می شود(Kaushik, 1987).



تصویر ۳- روش کشت خطی روی پلیت آگار

۱۰-۳-۲- جداسازی با استفاده از پی پت پاستور

ابتداء ظروف مورد احتیاج از قبیل شیشه ساعت، پتری دیش، لام، لامل، پی پت پاستور، لوله آزمایش، مثلث شیشه‌ای، لامل ۳ حفره‌ای، اسپاتول، تیغ، پنس آماده می‌شوند. ۸-۶ قطره از محیط کشت مایع را در ۴ شیشه ساعت (بجای آن میتوان از لامهای حفره دار استفاده کرد و در هر حفره آن ۴-۳ قطره از محیط کشت ریخت)

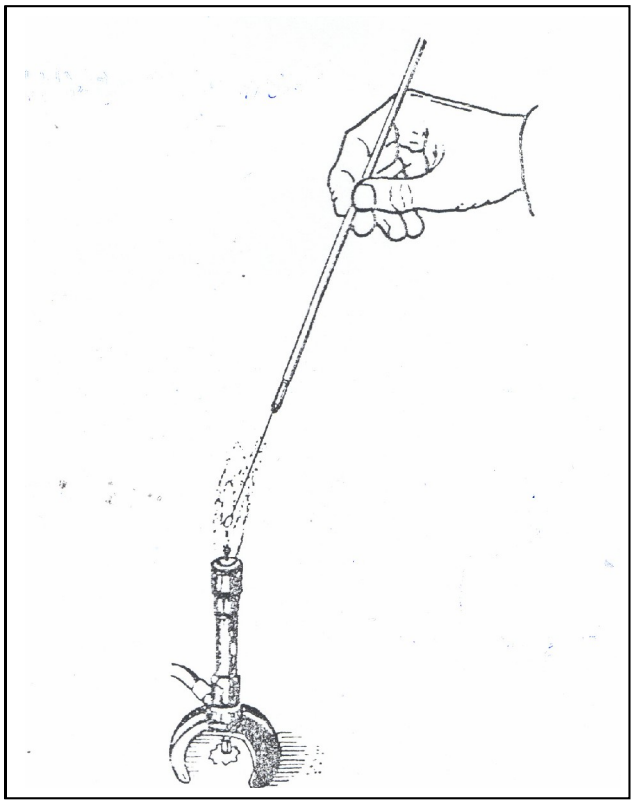
می‌ریزند. شیشه‌های ساعت روی لامهای شیشه‌ای مثلثی گذاشته می شوند و در داخل پتری دیش قرار می‌گیرد. درب آنها جز در مواقع استفاده بسته نگهداشته می شود. ۳-۲ قطره از نمونه جمع آوری شده حاوی جلبک در هر یک از شیشه‌های ساعت یا یک قطره در هر یک از حفره های لام حفره دار ریخته می‌شود. پی پت پاستور استریل شده را از انتهای باریک آن روی شعله ملایم چراغ گاز گرفته و در حالی که این قسمت از پی پت در حال قرمز و نرم شدن است از شعله گاز دور می گردد بدین طریق در یک انتهای پی پت لوله موئینی به قطر تقریبی ۷۵-۱۰۰ میکرومتر بوجود می‌آید. به سر دیگر پی پت، پستانک وصل می شود. هر یک از شیشه‌های ساعت حاوی محیط کشت و نمونه با میکروسکوپ اینورت بررسی می‌گردد و پس از پیدا کردن جلبک مورد نظر، نوک لوله موئین پی پیت پاستور را به آرامی وارد آن قسمت کرده بدین ترتیب جلبک مورد نظر به داخل لوله موئین پی پیت پاستور کشیده می‌شود. سپس پستانک را به آرامی فشار داده تا محتویات درون آن در شیشه ساعت دیگری که فقط حاوی محیط کشت تازه است ریخته شود. جهت شستشو دادن نمونه ها، با یک پی پیت پاستور دیگر نمونه جلبک به محیط کشت تازه انتقال داده می‌شود و سرانجام باز هم توسط یک پی پیت پاستور دیگر نمونه‌های مورد نظر به داخل لوله آزمایش دارای محیط کشت مایع منتقل می‌گردند و در داخل انکوباتور دارای سیستم نوردهی قرار داده می شوند.

٤-۲- تلقیح (Inoculation)

برای رشد یک اورگانیزم در محیط استریل تعدادی از سلولها یا فیلامنت‌ها که با دفت به محیط کشت تلقیح می شوند، سبب حفظ کشت خالص میگردند. در روش تلقیح با سوزن برای انتقال جلبک، سوزن قبل و بعد از تلقیح تا حد قرمز شدن روی شعله گرم می‌شود. لذا سوزن را روی شعله می‌گیرند که تمام سوزن و قسمت های پائین دسته آن گرم شود. شعله سبب از بین بردن تمام موجودات زنده روی سطح سوزن میگردد (تصویر ۴). در حین کار هرگز نباید درپوش نمونه پائین یا هر جای دیگر گذاشته شود.

لوله آزمایش تقریباً به صورت افقی نگهداشته می‌شود (تصویر ۵) و درپوش آن نباید بیش از میزان لازم باز شود. دهانه لوله آزمایش که نمونه کشت به آن وارد یا از آن خارج میگردد بسرعت قبل و بعد از عمل تلقیح روی شعله گرم می‌گردد. شعله دادن سبب ایجاد یک جریان کنوکسیونی به سمت بیرون می‌شود که شانس

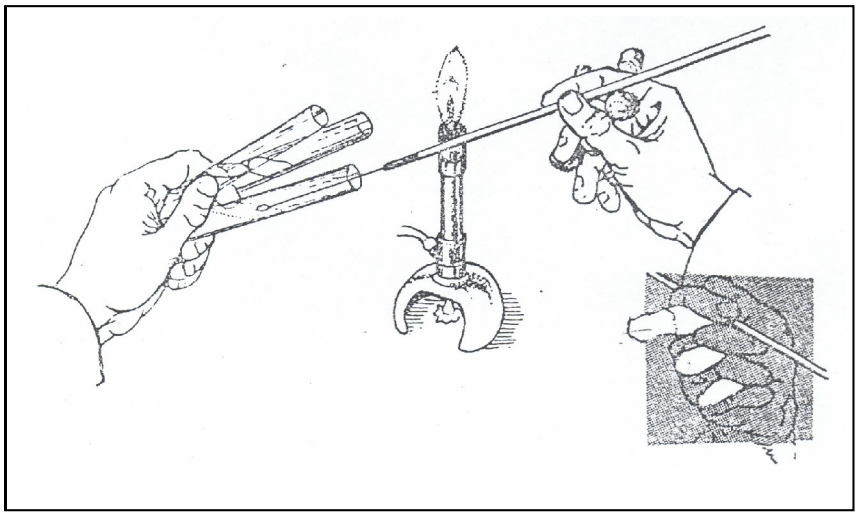
آلودگی را پائین می‌آورد. پس از انجام عمل تلقیح محیط کشت بدست آمده در یک محیط مناسب رشد داده می شود.



تصویر ٤- روش شعله دادن لوپ (فیلد پلاتین)

٥-٢-پرورش دادن

پرورش نمونه‌های تلقیح شده در انکوباسیون انجام می‌شود. در یک کشت معمولی، انکوباسیون در دمای ۲۵درجه سانتیگراد با نور ۳۰۰۰-۲۰۰۰ لوکس، صورت میگیرد، اما چون ما لوکس متر در اختیار نداشتیم با در نظر گرفتن اینکه هر لامپ فلورسنت در یک فاصله معین از نمونه میزان نوردهی مشخصی دارد نوردهی نمونه‌ها کنترل گردید در طول انکوباسیون آگار غلیظ و منجمد می‌شود و با توجه به تراکم بالای آب در آگار هنگامی که آگار در طول انکوباسیون غلیظ می‌شود و آب موجود بصورت قطراتی خارج می‌گردد، این قطرات روی آگار پخش می شوند و سبب از بین رفتن کلنی‌های تشکیل شده می‌شوند. جهت اجتناب از این امر، پلیت‌ها بصورت معکوس در انکوباسیون قرار داده شدند. بر روی تمام پتری دیش ها لوله‌های آزمایش، بالن‌ها و بطری‌های کشت بر چسبی چسبانده می‌شود که اسم و تاریخ و نوع تشخیص آورده شده است.



تصویر ۵- روش صحیح نگهداشتن لوله آزمایش هنگام انتقال نمونه کشت

٦-۲- نحوه ایجاد اتاق رشد

اتاق رشد (اتاق کشت یا محفظ انکوباتور) برای جلبکهای سبز آبی و سایر فیتوپلانکتون‌ها بسته به نوع کار طراحی می‌گردد. به طور عمده برای اتاق رشد، حرارت، هوادهی و نور ضروری است.

(i) **قفسه‌ها:** در اتاق عاری از گردو غبار قفسه‌ها را می‌توان بصورت افقی در طول دیوار به کمک چوبی به ضخامت cm ۴ با سطحی به رنگ سفید نصب کرد. ارتفاع بین قفسه ها باید cm ۴۵ (برای فلاسک‌های مخروطی، لوله‌های آزمایش، پتری دیش‌ها و غیره ...) و cm ۷۵ (برای سیلندرهای استوانه‌ای) باشد. برای ظروف کشت سنگین ۱۵-۱۰ لیتری می توان قفسه‌های فلزی را جایگزین قفسه‌های چوبی نمود(تصویر ۶)

(ii) **حرارت :** سیستم تنظیم کننده حرارت اتاق کشت مجهز به ترموستات می‌باشد که هوای اتاق را توسط ۲ سیستم هوادهی مختلف که هر کدام ۱۲ ساعت فعالیت می‌کنند کنترل می کند. دمای ۲۵-۳۰ درجه سانتیگراد حرارت استاندارد و مناسب برای بررسی ها و مطالعاتی نظیر مطالعه حاضر می‌باشد.

(iii) **نوردهی:** نور سرد فلورسنت (سفید) تقریباً ۳۵۰۰ لوکس است که برای کشت مناسب می‌باشد و این در حالی است که برای اتاق کشت ۱۰۰۰ لوکس نور کافی است.

دو لامپ فلورسنت سرد ۴۰ وات ، شدت نوری معادل ۳۲۰۰ لوکس روی یک سطح به فاصله cm ۴۰ از منبع نوری ایجاد می‌کنند. شدت واقعی نور در کناره و مرکز لوله آزمایش متغیر خواهد بود.

(iv) **هوادهی:** محیط کشت‌های مایع می‌توانند توسط هوای ساده حاصل از کمپرسورها یا هوای فشرده مخلوط با CO_2 هوادهی شوند. این هوا بایستی از بطریهای حاوی اسید سولفوریک (H_2SO_4)، سود (NaOH %30) ، آب مقطر و یک فیلتر لوله‌ای شامل پنبه استریل در یک زمان معین عبور کند.

۷-۲-جداسازی جلبکهای سبز آبی

جدای از گونه‌های تثبیت کننده اکسیژن بنظر می‌رسد که جلبکهای سبز آبی نیازهای غذایی مشابهی با سایر جلبکها دارند. به هر حال محیط‌های کشت معدنی که از نظر غذایی غیر انتخابی هستند و در ۳۵ درجه سانتیگراد انکوباسیون می‌گردند، می‌توانند جهت غنی سازی بسیاری از جلبکهای آبی ـ سبز آب استفاده شوند. چنین غنی سازی اولیه ترکیب بسیار خوبی را برای خالص سازی‌های بیشتر فراهم می‌نماید (Kaushik, 1987).

محیط کشت: محیط کشت Hughes *et al*. (1958) یا De (1939)، Fogg (1949) شرایط مورد نیاز برای رشد طیف وسیعی از جلبکهای آبی سبز را همانند سایر جلبکها تأمین می‌کنند. محیط‌های کشت بدون ترکیبات نیتروژن سبب انتخاب جلبکهای سبزآبی تثبیت کننده نیتروژن می‌شوند.

تهیه نمونه: ۵ میلی لیترمحیط کشت در داخل لوله‌های آزمایش ریخته می‌شودکه دارای درپوش بوده و استریل هستند. محیط کشت مایع باید قبل از تهیه نمونه همگن گردد. نمونه‌های آب باید به محیط کشت اضافه شده و به مدت نیم ساعت هم زده شوند، تا خوب مخلوط گردند. سریال‌های با ۱۰ بار رقت، باید برای هر نمونه آبی و جهت تلقیح لوله های آزمایش حاوی محیط کشت بکار روند.

انکوباسیون: لوله های تلقیح شده باید در دمای ۳۵ درجه سانتیگرادبدون هوا دهی توسط گاز یا آشفتگی (هم زدن) به مدت ۲ هفته انکوبه شوند. شدت نور بایستی در مدت انکوباسیون با استفاده از نور مهتابی از ۳۲۴۰ تا ۶۴۸۰ لوکس (۳۰۰-۶۰۰۰ ftc) تنظیم شده باشد.

تابلو ۱- انواع محیط کشت های جلبکهای سبز آبی

Miceral medium No.ll (Hughes et al., 1958). Initial pH 8-8.5; final pH 9-10.

$NaNO_3$	1.5
K_2HPO_4	0.369
$MgSO_4$. $7H_2O$	0.075
$CaCL_2$. $2H_2O$	0.036
Na_2CO_3	0.020
Na_2SiO_3. $9H_2O$	0.058
Ferric citrate	0.006
Citric acid	0.006
EDTA	0.001
Minor element soln.	0.08 ml
Minor element aolation	
N_2BO_3	3.1
$MnSO_4$. $4H_2O$	2.23
$ZnSO_4$. $7H_2O$	0.287
$(NH_4)_8$ Mo_7O_{24}. $4H_2O$	0.088
$Co(NO_3)_2$. $4H_2O$	0.146
Na_3WO_4. $2H_2O$	0.33
KBr	0.119
KI	0.083
$Cd(NO_3)_2$. $4H_2O$	0.154
$NiSO_4$ (NH_4) SO_4 $6H_2O$	0.198
$VOSO_4$. $2H_2O$	0.02
$AL2(SO_4)_2 - K_2SO_4$. $24H_2O$	0.474
Autoclave iron separately added aseptically.	

Nitrogen free medium, pH 7.5 (Fogg, 1949)

KH_2PO_4	0.2
$MgSO_4$. $7H_2O$	0.2
$CaCL_2$. $2H_2O$	0.1
Fe-EDTA	1.0ml
A8-Solution	1.0ml
(See table 2)	

Chu No. 10, With modified iron Source (Gerloff *et al.*, 1950)

Ca $(NO_3)_2$. $4H_2O$	0.04
K_2HPO_4	0.01
$MgSo_4$. $7H_2O$	0.025
Na_2CO_3	0.02
Na_2SiO_3.$9H_2O$	0.025
Ferric citrate	0.003
Citric acid	0.003

Gerloff's medium, pH 7.0 (Gerloff *et al.*, 1950)

$NaNO_3$	0.0413
Na_2HPO_4	0.0082
KCL	0.0086
$MgCL_2$. $6H_2O$	0.02
Na_2SO_4	0.015
$CaCL_2$. $2H_2O$	0.359
Ferric citrate	0.003
Citric acid	0.003
Na_2CO_3	0.02
$NaSiO_3$. $9H_2O$	0.025
As-Solution(See Table 2)	1.0ml

۸-۲-روش های جداسازی جلبکهای سبز آبی

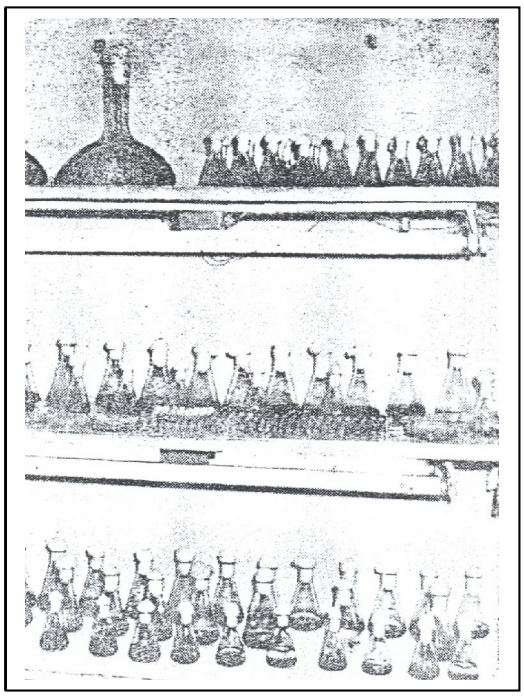
الف – جلبکهای سبز آبی تک سلولی

I. نمونه‌ها از لوله‌های غنی شده اولیه به محیط مایع تازه منتقل و انکوبه می‌شوند.

II. جلبکها از لوله ثانویه برداشته و روی پلیت آگار (معدنی) کشت خطی داده می‌شوند و مجدداً انکوبه می‌گردند.

III. بعد از انکوباسیون، کلنی‌ها با استفاده از لوپ استریل جدا می‌گردند و در داخل یک محیط کشت جدید کشت داده می‌شوند.

IV. بعد از انتقال موفقیت آمیز از محیط مایع به جامد معمولاً کشت خالص حاصل می‌گردد.



عکس شماره ٦- نحوه قرار گرفتن قفسه ها در اتاق کشت و لامپها و مهتابی در بالای قفسه ها نشان داده شده است.

(ب) جلبکهای رشته ای

کشت خالص جلبکهای رشته‌ای معمولاً از طریق انتقال مکرر مقدار کمی از آن امکان پذیر است. عکس العمل نوری جلبکها نیز برای جداکردن آنها روش مناسبی است.

I. توده کوچکی از سلول را روی لام شیشه‌ای در محیط کشت مایع قرار می‌دهند.

II. بوسیله درپوش شیشه‌ای روی لام‌ها پوشانده می‌شود، البته قبل از اینکار اطراف لامل باید پارافین مالیده شود.

III. لامها با استفاده از نورتابیده شده از یک طرف بمدت ۱۰-۲ ساعت انکوبه می‌گردند.

IV. نمونه‌ها بطرف نور یک طرفه حرکت می‌کنند، سپس با استفاده از پیپت پاستور استریل از آن جدا می‌گردند و به داخل یک محیط کشت مایع و یا به سطح محیط کشت جامد انتقال داده می‌شوند. تراکم ۱/۵درصد آگار برای بدست آوردن نتیجه مطلوب مناسب می‌باشد زیرا رشته‌های جلبک بسرعت وارد این غلظت از آگار می‌شوند. در حالیکه باکتری‌ها نمی‌توانند.

V. نمونه‌ها از محیط کشت مایع می‌توانند وارد محیط آگار شوند و سپس مجدداً در محیطی با نور یک طرف انکوبه شوند.

VI. پس از رشد، رشته هایی که فاقد آلودگی باکتریایی هستند از پلیت جدا می‌گردند. به روشهای مختلفی می‌توان رشته‌های خالص را ازآگار بدست آورد.

۹-۲- خالص سازی

۱-۹-۲-خالص سازی به روش تکرار کشت مایع

هنگامیکه نمونه خاص در در محیط زیاد باشد استفاده از این تکنیک مناسب می‌باشد(Gerloff, *et al.* 1950).

۲-۹-۲ خالص سازی به روش سانتریفوژ

ابتداء به اندازه نصف لوله سانتریفوژ محیط کشت و آب مقطر به هر لوله سانتریفوژ استریل شده اضافه میشود سپس جلبک جدا شده به داخل آن منتقل می‌گردد. نمونه با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ می‌شود. پس از گذشت این زمان لوله خارج کرده و سوسپانسیون آن دور ریخته می‌شود، توده جلبکی ته لوله سانتریفوژ به لوله دیگری که حاوی محیط کشت یا آب مقطر بود منتقل می‌گردد و مجدداً سانتریفوژ انجام می‌شود. این کار در واقع نوعی شستشو است و باید حداقل ۵ بار تکرار شود، پس از اتمام پنجمین مرحله شستشو با استفاده از پی پت پاستور استریل، توده جلبکی به داخل لوله آزمایش حاوی محیط کشت تازه انتقال داده می‌شود و در داخل انکوباتور نگهداری می‌گردد (Kaushik, B.D. 1987).

۳-۹-۲- خالص سازی به روش آنتی بیوتیک

از بین بردن برخی از آلودگی‌ها توسط اولترا سونیک یا تکرار کردن کشت کار مشکلی است در چنین مواردی روشهای شیمیائی بر فیزیکی ترجیح داده می شوند لیکن روشهای فیزیکی از قبیل شستن و اولتراسونیک کاربرد

بیشتری دارند. استفاده از آنتی بیوتیک یکی از روشهای شیمیائی است که جداگانه یا به همراه ترکیبات دیگر سبب جلوگیری از رشد آلودگی یا از بین رفتن آلاینده‌هایی می‌گردد که بشدت به نمونه می‌چسبند (Kaushik, B.D. 1987).

روش تهیه:

الف ـ ۱۰۰ میلی‌گرم پنی سیلین G (نمک سدیم یا پتاسیم) را به همراه ۵۰ میلی‌گرم سولفات استرپتومایسین در ۱۰ میلی لیتر آب حل نموده، ۱۰ میلی گرم کلرا مفنیکل حل شده در ۱ میلی لیتر اتانول ۹۵درصد را به محلول پنی سیلین و استرپتو مایسین اضافه می‌کنند و خوب مخلوط می نمایند.

ب ـ محلول آنتی بیوتیک تهیه شده را بایستی بسرعت ۳ بار با استفاده از دستگاه فیلتر استریل و فیلتر غشایی فیلتر نمود.

ج ـ یک میلی لیتر از سوسپانسیون جلبکی خالص شده به ۶ ارلن ۱۲۵ میلی لیتر ریخته و به هر یک ۵۰ میلی لیتر محیط کشت اضافه می‌گردد.

د ـ به هر کدام از آنها (۶ ارلن) یکی از حجم‌های ۳، ۲، ۱، ۰/۵، ۰/۲۵، ۰/۱۲۵ میلی لیتر از محلول آنتی بیوتیک تهیه شده اضافه می‌گردد. در این حالت محلولهای با سطح پنی سیلین ۵۰۰-۲۰ میلی گرم در لیتر تهیه شده و سطح دو آنتی بیوتیک دیگر نیز مشابه خواهندبود.

هـ – فلاسک کشت در شرایطی مناسب برای رشد قرار می‌گیرد.

ی ـ بعد از ۴۸-۲۴ ساعت بدون آلوده کردن نمونه‌ها، مقداری از توده‌های جلبکی هر ارلن مایر به داخل لوله های استریل حاوی محیط کشت فاقد پنی سیلین منتقل می‌شود. لوله‌های آزمایش به تعداد ۳ عدد برای هر نمونه در پریودهای مختلف زمانی تهیه می‌گردد.

و ـ بعضی از ترکیبات باکتریو استاتیک مانند فلوریت پتاسیم به میزان ۱۰ میلی گرم در لیتر (K_2TeO_3) جهت بدست آوردن کشت‌های جلبکی فاقد باکتری استفاده می‌شوند (Rosowski and Hoshaw, 1970; Ducker and Willoughby, 1964) خالص سازی را می‌توان با استفاده از ترکیب سیلکو سرین به میزان ۵ میلی گرم در میلی لیتر نیز انجام داد.

٤-۹-۲-خالص سازی به روش قطعه قطعه کردن

محیط کشت حاوی نمونه با یک همزن شیشه‌ای مخلوط می‌شود که در نتیجه آن رشته‌هایی با شکل یکسان و کوتاه حاصل می‌گردند. با تلقیح این نمونه روی پلیت آگار با استفاده از کشت خطی، کلنی‌های مورد نظر ایجاد می‌شوند (Kaushik, B. D. 1987) .

۱۰-۲- تحت آلودگی

تمام گونه‌ها برای انواع آلودگی باید کشت شوند. با توجه به نوع جلبک جدا شده آن باید در هر دو محیط حاوی مواد مغذی یا Peptone- glucose پرورش داده شود. لوله آزمایشهای تلقیح شده باید در تاریکی و به مدت حداقل ۲ هفته در حرارتهای مختلف انکوبه شوند. مشاهدات و بررسی ها ۲۴ ساعت بعد از تلقیح صورت می‌گیرند (Kaushik, 1987).

روش تهیه :

نوترینت آگار موجود در لوله آزمایش باید با جوشاندن در آب حل شود. اگر این گرم کردن به مدت ۱۰ دقیقه ادامه یابد، اکسیژن محلول در آن آزاد می‌شود . سپس لوله‌های آزمایش را در حمام آب گرم قرار می‌دهند تا سرد گردد پس از اینکه دمای آن به ۴۵ درجه سانتیگراد رسید جلبک خالص جدا شده ، به آن تلقیح گردیده و سپس کاملاً مخلوط می شود. برای این کار از یک محیط کشت تقریباً غنی استفاده می‌شود. یکسری از این لوله‌ها باید با هوادهی در حرارت های مختلف به مدت ۲ هفته انکوبه شوند. در دومین مرحله قسمتهای روی در پوش پنبه‌ای بریده میشود و ۳ تا ۴ cm در داخل لوله آزمایش فرو برده میشود سپس فضای بالای پنبه با پیروکالل پر می‌گردد و مقدار کمی هیدروکسید سدیم غلیظ به آن اضافه می‌شود. دهانه آن را با یک درپوش لاستیکی محکم می بندند، در این حالت لوله‌های آزمایش باید بصورت معکوس نگهداشته شوند و به همین صورت جهت تعیین آلودگی انکوبه شوند.

سری دیگر لوله های آزمایش در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۲ هفته انکوبه می گردند سپس تمام لوله‌ها (هردو سری) جهت بررسی آلودگی باکتریایی (هوازی و بی هوازی) بررسی می‌گردند. اگر جلبکها آلوده باشند مجدداً برای خالص سازی محیط ها اقدام می‌شود.

۳-بحث و نتیجه گیری

۱-۳-اسپرولینا Spirulina

اسپیرولینا از آبهای سواحل جنوبی دریای خزر تهیه گردید. نمونه اولیه از ایستگاه روبروی کارگاه ساحل غازیان، ایستگاه عیسی پور، ایستگاه علیپور برداشته شد. این نمونه از عمق یک متری ساحل مجاور ایستگاه تحقیقاتی ساحل غازیان و از اعماق 20,15,10,5,3,1,0 متری ایستگاههای عیسی‌پور و علیپور گرفته شد. نمونه برداری با روتنر انجام گردید. نمونه ها بلافاصله پس از جمع آوری در جعبهٔ های چوب پنبه‌ای پر از یخ قرار داده شدند و به ازمایشگاه منتقل گردیدند.

در آزمایشگاه از پیش ارلن‌های حاوی محیط کشت استریل تهیه شده بوند. برای هر نمونه ۴ ارلن ml ۲۵۰ در نظر گرفته شد و ml ۱۵۰ محیط کشت Zehnder, hugthes,Gorhan (تابلو ۱) در هر یک از آنها ریخته شد و سپس توسط اتوکلاو در فشار ۱ اتمسفر و دمای ۱۱۰-۱۰۰ درجه سانتیگراد به مدت نیم ساعت استریل شدند. به هر یک از این ارلن ها ml ۵۰ نمونه آب دریا اضافه شده و مشخصات کامل نمونه آب بر روی هر ارلن نوشته شد. به هر یک از این ارلن ها ml ۵۰ نمونه آب دریا اضافه شده و از هر چهار ارلن محیط کشت به دو ارلن پمپ هوا متصل شد. سپس هر یک از آنها در محیط هایی با دمای ۲۳-۱۹ ، ۳۳-۳۰ درجه سانتیگراد قرار داده شدند. دومحیط کشت باقیمانده از هر نمونه نیز در دو محیط با دمای ۲۳-۱۹ و ۳۳-۳۰ درجه سانتیگراد قرار گرفتند. میزان نور دهی برای هر ۴ ارلن حاوی محیط کشت از هر نمونه یکسان بود. پس از دو هفته از میان تمام این نمونه‌ها جلبک اسپیرولینا فقط در محیط کشت هایی ظاهر گردید که حاوی آب دریای ایستگاه عیسی پور (عمق ۱۵ متر) بودند و در دمای ۳۳ درجه سانتیگراد بدون هوادهی قرار داشتند نمونه‌های جلبکی که بدین صورت ایجاد می‌شوند خالص نیستند بلکه یک نمونه غنی سازی شده است. زیرا مقدار یا میزان جلبک موجود در نمونه یا نمونه‌های جمع آوری شده باید در حدی باشد که بتوان مراحل جداسازی و تخلیص آنرا بخوبی انجام داد و در غیر این صورت باید با عمل غنی سازی به اینکار مبادرت شود.

برای بدست آوردن اسپیرولینا خالص از محیط کشت اختصاصی Zarrouk استفاده شد که در سال ۱۹۶۶ (تابلو ۲) به عنوان یک استاندارد ارائه گردید. در تعداد ۵ ارلن با ظرفیت ml ۱۲۵ مقدار ml۵۰ از محیط کشت آماده شده

ریخته و در اتوکلاو استریل شدند. قبل از اضافه کردن نمونه حاوی جلبک آنرا بمدت ۳۰ دقیقه بر روی هم زن دوار هم زده تا محلول کاملاً یکنواخت با رشته‌های کوتاه حاصل شود از این محلول ml ۱۰-۵ به هر یک از

تابلو ۲-ترکیبات محیط کشت زاروک (Zarrouk)

$NaHCO_3$	18.0g
K_2HPO_4	0.5 g
$NaNO_3$	2.5 g
K_2SO_4	1.0 g
NaCL	1.0 g
$MgSO_4.\ 7H_2O$	0.2 g
$CaCl_2$	0.04 g
$FeSO_4$	0.01 g
EDTA	0.08 g
A_5-Soluion	1.0 ml
B_6	1.0 ml

غلظت ترکیبات B_6 در یک لیتر

NH_4VO_3	۲۳ mg
$K_2Cr_2(SO_4)_4\ .24H_2O$	۹۶ mg
$NiSO_4.\ 7H_2O$	۴۸ mg
$Na_2WO_4.\ 2H_2O$	۱۸ mg
$Ti_2(SO_4)_3$	۴۰ mg
$Co(NO_3)_2.\ 6H_2O$	۴۴ mg

غلظت ترکیبات A_5 در یک لیتر

H_3BO_3	۱/۸۶ g
$MnCL_2.\ 4H_2O$	۱/۸۱ g
$ZnSO_4.\ 7H_2O$	۰/۲ g
$CuSO_4.\ 5H_2O$	۷۹ mg
MoO_3	۱۵ mg

ارلن های استریل شده اضافه گردید تا بدینوسیله محیط کشت اختصاصی شانس بیشتری را به اسپیرولینا جهت غالب شدن در محیط بدهد. به مدت دو هفته ارلن ها در داخل انکوباتور با درجه حرارت ۳۰ درجه سانتیگراد

بدون حرکت دادن قرار داده شدند. پس از گذشت این مدت نمونه‌ها برای خالص سازی به محیط کشت جامد ۳درصد Zarrouk (w/v) منتقل شدند. خالص سازی در محیط کشت جامد به روش خطی انجام شد. شایان ذکر است که نمونه جلبکی مطلوب با یکبار انجام این فرایند خالص نشد، بلکه بیش از ۵ بار تمام مراحل انتقال به محیط کشت مایع Zarrouk و محیط کشت جامد آن تکرار گردید و در نهایت بعد از بدست آوردن تک کلنی‌های خالص برای جداسازی باکتری ها از آنتی بیوتیک استفاده گردید که به سلولها یا رشته ها می چسبند. تهیه و مصرف آنتی بیوتیک بتفصیل در فصل ۲ شرح داده شده است.

۲-۳-کلرلا Chorella

جهت دستیابی به نمونه کلرلا در تاریخ ۷۲/۱۱/۱۱ از نقاط مختلف تالاب غرب و سه راهی شیجان با روتنر ۲ لیتری نمونه برداری شد. نمونه‌ها بلافاصله توسط دبه‌های پلاستیکی به آزمایشگاه منتقل شدند . ml ۵۰ از هر نمونه توسط پمپ خلاء و فیلترهای میلی پور ۵ میکرون فیلتر گردید سپس ml ۲ از نمونه آب زیر فیلتر را به لوله‌های آزمایش که از پیش ml ۱۰ محیط کشت CFTRI (تابلو ۳) در آن ریخته شده بود، اضافه گردید. این لوله‌های آزمایش در نور و هوای معمولی آزمایشگاه حدود ۲۲-۲۰ درجه سانتیگرد نگهداری شدند. پس از گذشت ۲ ماه در نمونه‌های آبی کلرلا ظاهر گردید که از بخش غربی تالاب انزلی آورده شده بودند. این نمونه های کلرلا در مراحل بعدی خالص گردیدند. برای برای خالص نمودن آنها از محیط کشت جامد CFTRI ۳ درصد استفاده شد. پس از تهیه محیط کشت فوق یک قطره از نمونه های کلرلا که غنی سازی شده بودند روی پلیت آگار حاوی محیط کشت CFTRI ریخته و به روش خطی گسترش داده شدند. پلیت‌ها به صورت معکوس در انکوباتور چراغ دار قرار داده شدند، پس از دو هفته کلنی های سبز رنگی روی آنها ظاهر گردید که همان کلرلا بود. مجدداً نیز پلیت‌هایی از محیط کشت جامد CFTRI تهیه گردید و هر یک از این کلنی‌ها روی یک پلیت آگار به روش خطی کشت داده شدند و مجدداً در انکوباتور قرار گرفتند. این مرحله ۴ بارتکرار گردید و در نهایت کلنی های کاملاً خالص از کلرلا بدست آمد. در بررسی تاکزونومیکی این نمونه *Chlorella vulgaris* تشخیص داده شد. سرعت رشد *C. vulgaris* در ۳ محیط کشت CFTRI، محیط کشت Formula Chlorophyceae IV (Venkataraman, L.V.; E.W. Becker, 1985) بررسی گردید (تابلو ۴). رشددر محیط کشت Formula IV نتیجه مطلوبتری را داشته است.

تابلو ۳- محیط کشت اصلاح شده برای Scenedesmus در CFTRI میسور هند.

Spirulina			g/l
Nutrients	CFTRI Medium	Improved medium	CFTRI
$NaHCO_3$	4.50	$NaHCO_3$	4.0
K_2HPO_4	0.50	N.PK.^{00} 15:15:15 Super ^{00}	1.0
$NaNO_3$	1.50	Phosphate	0.1
K_2SO_4	1.00	$MgSO_4$	0.2
Crude Seasak	1.00		
$MgSO_47H_2O$	0.20		
$CaCL_22H_2O$	0.04		
$FeSO_47H_2O$	0.01		

۳-۳-سندسموس .Scenedesmus sp

نمونه اولیه *Scenedesmus sp.* از بخش غربی تالاب، شیجان و نیز از ۵۰ متر بیرون کانال کشتیرانی برداشته شد و توسط جعبه‌های چوب پنبه ای حاوی یخ به آزمایشگاه منتقل شد. ml ۵۰ ازهر نمونه به ml ۱۵۰ محیط کشت (Venkataraman,; Becker, 1985) Formule IV در یک ارلن ml ۲۵۰ استریل در شرایط استریل اضافه گردید. از هر نمونه آن تعداد ۴ ارلن کشت تهیه شد. همه نمونه‌ها در زیر یکی از قفسه‌های انکوباتور که در سقف آن ۳ لامپ مهتابی ۲۰ وات تعبیه شده بود قرار داده شدند. دما ۲۸-۲۵ درجه سانتیگراد در نوسان بود. بعد از یک هفته، تمام نمونه‌ها بخوبی رشد کردند نتایج هر یک از ارلن‌های کشت به تفکیک مکان نمونه برداری در ذیل آورده شده است.

تابلو ٤- ترکیبات محیط کشت Venkataraman, 1985(mg/l) Chlorophyceae

Urea	100
K_2CO_3	25
Na_3PO_4	25
$CaCl_2.2H_2O$	
Crude salt	25
$(NH_4)_2SO_4$	20
$MgSO_4.7H_2O$	20
$FeSO_4.7H_2O$	2

- ترکیبات محیط کشت Formula IV

Scenedesmus	(mg/l)
Nutriants	Formula IV
Urea[00]	100
$(NH_4)2SO_4$	20
K_2CO_3	25
$Na_3\ PO_4$	25
Crude sea salt	25
$MgSO4.\ 7\ H_2O$	10
$FeSO_4.7H_2O$	2

٤-٣-خارج از کانال کشتیرانی

در ارلن‌هایی که نمونه آب خارج از کانال کشتیرانی تزریق شده بود، *S. acuminatus* بصورت غالب رشد کرد اما در چند درصد باقیمانده *S. abundans* و *S. S. obliquus, quadicauda,* نیز وجود داشت. برای جداسازی این چند گونه از *S. acuminatus* محیط کشت Formula IV با pH های مختلف ۶/۵ ، ۸، ۹ تهیه شد و ml ۲ از محیط کشت حاوی *S. acuminatus* به ارلن های ۱۲۵ و حاوی ml ۵۰ محیط کشت تزریق شد. هر یک از این ارلن ها درشرایط نور و دمای مذکور فوق قرار داده شدند. پس از دو هفته داخل تمام ارلن ها سبز شد *S. acuminatus* در ارلن محتوی محیط کشت Formula IV با pH = ۶/۵ بهتر از سایر ارلن‌ها رشد کرده بود. لذا این نمونه برای جداسازی و خالص‌سازی *S. acuminatus* در رقت ۱۰ کاملاً جداسازی شد. برای خالص سازی آن، محیط کشت Formula IV جامدتهیه شد و با استفاده از کشت خطی (در فصل ۲ شرح داده شده است) قسمتی از خالص سازی انجام شد. برای آخرین مرحله خالص سازی پرورش، شستشو با آب مقطر و استفاده از آنتی بیوتیک انجام گرفت. نمونه‌های بدست آمده هر۲ ماه یکبار به محیط جدیدتر منتقل شدند. *S. obliguus* و *S. quadricauda* نیز طی مراحل مختلف جداسازی *S. acuminatus* جداسازی و خالص سازی شدند.

٥-٣-شیجان

درارلن هایی که نمونه آب شیجان تزریق شده بود، *S. quadricauda* و *S. obliguus* به صورت نیمه غالب رشد کردند. برای جداسازی این دو گونه از سایر گونه‌ها از روش تکرار کشت در محیط مایع استفاده شد به این ترتیب که طی سه دوره رشد هر بار ml ۲ از نمونه به ml ۵۰ محیط کشت Formula IV استریل تلقیح شد و

نمونه‌ها در یک قفسه قرار داده شدند که ۳ لامپ مهتابی ۲۰ ولت در سقف آن نصب شده بود. دمای محیط نیز ۲۸-۲۵ درجه سانتیگراد بود. پس از طی این مرحله تقریباً ۹۰درصد فراوانی را مجموع این دو گونه تشکیل دادند برای جداسازی *S. obliquus* از محیط کشت Formula IV استریل با محلول ۱درصد گلوکز استفاده گردید. ۵ ml از نمونه‌ای که در آخرین مرحله تهیه شده بود، به ۱۰۰ ml از این محیط کشت اضافه شد. این مرحله دو بار تکرار گردید که در نتیجه آن *S. obliquus* بصورت یک نمونه غالب در محیط کشت رشد کرد. دما و نور طی این آزمایش مانند آزمایشهای قبلی بود. در ادامه، محیط کشت Formula IV جامد تهیه گردید و کشت خطی درآن انجام شد. این مرحله نیز ۳ بار تکرار گردید. در خاتمه از روش شستشو با آب مقطر و تزریق به محیط Formula IV حاوی پنی سلین ۲ بار برای جداسازی از باکتری‌ها استفاه شد.

برای جداسازی *S. quadricauda* محیط کشت Formula IV با pHهای مختلف ۶/۵-۷/۵-۷-۸-۹ تهیه شد . ml ۲ از نمونه حاوی درصد بالایی از *S. obliquus* و *S. quadricauda* را به ml ۲ از نمونه حاوی درصد بالایی از *S. obliquus*, *S. quadricauda* را به ۵۰ ml محیط کشت از هر یک از محیط کشت‌های مذکور تزریق شد. پس از ۱۰ روز در محیط کشت با pH ۸ و ۹ گونه *S. quadricauda* بصورت غالب رشد کرد. برای رسیدن به یک نمونه صد درصد از روش تکرار کشت در محیط کشت Formula IV و بعد از آن شستشو با آب مقطر و نهایت تزریق پنی سیلین به محیط کشت استفاده شد.

۵-۳-بخش غربی تالاب

در ارلن هایی که نمونه آب شیجان تزریق شده بود، *S. obliquus* و *S. quadricauda* به مقدار کم سبز شد. *Oscillatoria spp.*, Merismopedia, *Microcystis aeruginosa Tetraedron minimum* . از گونه‌های دیگری بودند که به مقدار کم در نمونه یافت شدند. در ابتدا سعی داشتیم تمام این نمونه‌ها را از یکدیگرجدا کنیم به این دلیل محیط کشت جامد Gorhan و Formula IV تهیه شد سپس کشت خطی در هر یک از این دو محیط انجام شد. در محیط کشت Gorhan یک گونه *Oscillatoria sp.* به سرعت طی ۵ روز رشد کرد بطوریکه تمام سطح روی آگار را پوشاند و مانع رشد سایر جلبکها گردید. در محیط کشت جامد، Formula IV روی تعدادی از پلیت‌های آگار *S. abundans* و روی تعدادی دیگری از آنها *S. quadricauda* بخوبی رشد کردند. جداسازی سایر گونه‌ها موفقیت آمیز نبود. کشت خطی هر یک از گونه‌های *S. abundans* و *S. quadricauda* در محیط کشت جامد Formula IV ۳ بار دیگر

تکرار گردید. زمان مورد نیاز برای رشد *S. abundans* بسیار کمتر از سایر گونه‌ها بود بطوریکه پس از۷-۵ روز کاملاً روی پلیت آگار رشد کردند. این رشد سریع سبب گردید تا پس از هر دوره از سایر سلولها بخصوص هنگام خالص سازی کاسته شود که از تزریق آنتی بیوتیک به محیط کشت استفاده گردید. این کاهش بسیار قابل ملاحظه بود، لذا این نمونه‌ها در اسلنت آگار برده شد و سپس به مدت ۶ ماه در انکوباتور بدون چراغ در دمای ۱۰-۴ درجه سانتیگراد نگهداری شدند. پس ازطی این دوره، نمونه‌ها مجدداً به محیط کشت تازه تزریق شدند و نمونه حاصله پس از یکماه به ml ۵۰ محیط کشت جامد (Formula IV) در یک ارلن ml ۱۲۵ منتقل شد و در دمای۲۸-۲۵ درجه سانتیگراد و نوردهی لامپ مهتابی ۲۰ ولت قرار داده شدند. پس از سبز شدن نمونه ها در یخچال نگهداری شدند.

٤ - مصارف اقتصادی جلبکها

٤-١-پرورش ماکیان

بیشتر آزمایشهای تغذیه‌ای در مورد ماکیان انجام شده است. بکارگیری جلبک در جیره غذایی ماکیان دور نمای رضایت‌بخشی برای مصرف تجارتی جلبک در تغذیه جانوران می‌دهد. در جدول ۵ داده‌های انتخاب شده از بررسی‌ها آورده شده است. جلبک‌هایی که در فاضلاب رشد می‌کنند، درفلسطین اشغالی با هدف جایگزینی پروتئین سویا در گوشتهای فشرده (broiler mash) آزمایش شدند.

(Mokady , S.yanna... 1980; Lip stein *et al.* 1980) . اطلاعات جدول ۵ نشان می‌دهند که همهٔ گونه های جلبک‌های آزمایش شده براحتی می توانند جایگزین پروتئین سویا شوند. مصرف زیاد جلبک ضریب تبدیل غذا را ۱۵ درصد کاهش می‌دهد (Venkataraman, 1985). در این بررسی، جلبکها نمی‌توانند در جایگزینی غذای ماهی به عنوان منبع تامین رشد بکار گرفته شوند. نتیجه مشابهی توسط هنینگ نیز مشاهده شد (Hennig, A. *et al.* 1970) بدین گونه که غذای بادام زمینی و غذای ماهی را با سندسموس (Scenedesmus) جایگزین کردند. Chatu rvedi, Vermakhare (1980) در بررسی خود غذای ماهی را یکبار بطور کامل و یکبار با اندکی سندسموس و اسپیرولینا (Spirulina) جایگزین کردند و کاهش رشد را در گروه هایی مشاهده کردند که از جلبک تغذیه کرده بودند و توصیه کردند که در رژیم غذایی ماهی مقدار جلبک نباید بالاتر از ۵ درصد باشد. این مشاهدات با یافته های Reddy *et al.*(1978) مربوط به بازدهی مرغهای تغذیه شده با سندسموس به جای غذای ماهی مقایسه شد و این نتیجه بدست آمد که پروتئین جلبک را می‌توان در جیره غذایی ماکیان به جای غذای ماهی استفاده کرد.

این نتایج متفاوت ممکن است به دلیل طرز تهیه غذاهای مختلف بدست آمده باشند. اطلاعات معدودی در مورد ارزش تغذیه‌ای جلبکهای دیگر غیر از کلرلا (Chlorella)، سند سموس و اسپیرولینا به عنوان ترکیب جیره غذایی ماکیان موجود است. در یکی از بررسی‌های انجام شده پیرامون گونه‌های جلبکی توسط Hill, Lincoch (1980) گزارش شده که اوگلنا (Euglena) و سینکوسیستیس (Synechocystis) که در فاضلاب رشد می‌کنند می‌توانند در ترکیب غذایی مرغهای گوشتی استفاده شوند. غلظت حدود ۱۰درصد نتایج مطلوبی را داشته است.

در تمام بررسی‌های مذکور بیوماس کل جلبک برای جیره غذایی استفاده شد. بخش‌هایی از اسپیرولینا و سندسموس (استخراج لیپید با استفاده از اتیلن کلرید (Ethylen Chloride) به عنوان منبع اصلی پروتئین توسط

Brune (1982) استفاده شد). همانطور که در تابلو ۵ آمده است موادی که چربی از آن استخراج شده نتایج یکسان یا حتی بهتری نسبت به جلبک عمل‌آوری نشده دارند. بر خلاف گزارشهای دیگر، در این بررسی بدون ایجاد تاخیر و افت در رشد، پروتئین جلبک منحصراً برای تغذیه جانوران استفاده شد

تابلو ٥- نتایج تغذیه ماکیان از رژیم غذایی محتوی غلظتهای متفاوتی از جلبکها.

Diet	Wt. Gain (g)	Feed efficiency ratio [a]	Ref. No.
Control	1763		64
Chlorella/ Euglena 25% replacement		2.04	
Soya protein in the diet	1794	1.96	64
Chloralla/Euglena 50% replacement	1740	2.00	64
Micractinium 25% replacement	1847	1.96	64
Micractinium 50% replacement	1736	2.00	64
Control	637(4weeks)	1.67	64
Chlorella/Euglena 25% replacement	646	1.67	64
Chlorella/Euglena 50% replacement	637	1.62	64
Micractinium 25% replacement	629	1.70	64
Micractinium 50% replacement	600	1.65	64
Oocystis 25% replacament	543	1.78	64
Oocystis 50% replacament	571	1.81	64
Scenedesmus 25% replacement	644	1.71	64
Scenedesmus 50% replacement	615	1.77	64
Control	135(4 weeks)	3.10	19
(vacuum -dried) Chlorella + 10% Chlorella	262	2.40	19
Chlorella + 10% Chlorella + 0.1% meat	298	2.30	19
Complete broiler mash	342	2.20	19
Control +0.1% met + 22% Soya Protein		2.00	16
Scenedesmus (24% protein) + 0.1% met		5.20	16
Scenedesmus (16% protein) + 0.1% met		4.40	16
Scenedesmus (2.9% protein) + Soya (21.1% protein)		2.30	16
Scenedesmus (4.8% protein) + Soya (19.2% protein)		1.90	16
Control (4.8% protein) +fishmeal (2%protein)+Soya(17.2% protein)		2.30	16
Control (16% Soya protein) + 0.54% met	237(3 weeks)	1.83	55
(18%protein) Scenedesmus Chlorella	87	3.58	55
Chlorella (18%protein)	9	17.90	55
Spongicoccum (18% protein)	13	17.90	55
Control	667	3.27	56
Scenedesmus 5% in the diet	461	4.17	56
Scenedesmus 7.5% in the diet	385	4.95	56
Scenedesmus 10% in the diet	374	5.07	56
Spirulina 5% in the diet	636	4.53	56
Spirulina 10% in the diet	466	5.08	56
Control (22% protein)	484(3 weeks)	1.60	57
(22%protein) Chlorella (7.5% in the diet)	485	1.64	57
(22%protein) Chlorella (15% in the diet)	474	1.63	57
Control(19% protein)	1878(8weeks)	2.20	57
(19%protein) Chlorella (15% in the diet)	1732	2.29	57
Control(20% protein)	383(18 days)	22.29	17
Spirulina (19% protein)	384	1.92	17
Spirulina extracted with Methylene, Chloride (19%protein)	402	2.01	17
Scanedesmus (19%protein)	282	2.61	17
Scenedesmus extracted with Methylene Chloride (19%protein)	301	2.36	17

[a] Feed consumed (g)/ Weight gain (g)

۲-٤-پرورش ماهی

استفاده از جلبک در تکثیر و پرورش ماهی بصورت تازه و عمل آوری شده موفقیت هایی را بدست داده است. مطالعات انجام شده در هند نشان میدهد که ماهیانی مانند تیلاپیا (Tilapia) و کپور (Carp) می‌توانند بطور موفقیت آمیزی با استفاده از جلبک رشد نمایند (Technical Notes, 1977). از نظر ارزش غذایی و ضریب تبدیل جلبک‌ها نسبت به بادام زمینی (ground nut) و غذای حاصل از تولیدات طبیعی فیتو و زئوپلانکتونی برتری دارد.

قابلیت جایگزینی غذاهای جلبکی به جای غذاهای گران قیمت ماهی در استخرهای طبیعی ارزیابی گردید. این بررسی‌ها وجود نوعی تعادل بین غذاهای جلبکی و تولیدات غذای طبیعی را در استخر نشان داد، اثرات غذای جلبکی هنگامی که تراکم ماهی بالا بوده و غذای طبیعی استخر محدود می‌شود، بیشتر واضح می گردد (Pfeffer, Meske, 1978).

مطالعات و بررسی‌هایی که با ماهی کپور علفخوارمعمولی انجام شده است، نشان داد که *Scenedesmus sp.* و غذای تهیه شده از آن سبب افزایش رشد در این ماهیان شده است. غذای جلبکی برای کپور معمولی و نیز کپور علفخوار جوان بسیار مطلوب می‌باشد هر دو این گونه‌ها بر اثر استفاده از غذای غنی شده با جلبک رشد بیشتری نسبت به هر نوع غذای دیگر نشان میدهند. استفاده بیش از حد از جلبک سبب ایجاد نارحتی‌هایی بویژه در علفخواران می‌گردد. آنالیزهای شیمیائی که پیرامون کپور انجام گردید، نشان میدهد که کپور تغذیه کرده از جلبک در کل بدن و نیز در هر یک از ارگانها چربی کمتری دارد که یکی از مزایای رژیم غذایی جلبکی است (تابلو ۷، ۶) قابلیت کپور برای هضم جلبک های مختلف بصورت ذیل می باشد.

۸۳ درصد برای Oocystis

۸۱ درصدبرای Scenedesmus

۸۰ درصدبرای Ankistrudesmus, Euglena

جیره غذایی حاوی جلبک بخوبی توسط کپور پذیرفته می‌شود و میزان بقا در آن نیز بالا است. بررسی‌ها نشان می‌دهد که جلبک براحتی می‌تواند به جای دانه سویا در پرورش کپور بکار گرفته شود. در ۶۰ درصد غذای ماهی می‌توان از جلبک‌ها استفاده کرد. هیچگونه آثار سویی ناشی از کاربرد جلبک برای تغذیه ماهی دیده نشد. آزمایشهایی با مقادیر مختلف پروتئین در مدت ۱۳۲ روز انجام شد و نشان داد که جلبک‌ها را براحتی می‌توان در

قسمتی از جیره غذایی ماهی جایگزین کرد. وزن بدست آمده برای کپور و کپورسرگنده که از جیره غذایی حاوی جلبک استفاده کرده بودند، بیشتر از وزن حاصل از دو گروه کنترل تغذیه شده با غذای ماهی بود. در حالیکه رشد و افزایش رشد تیلاپیا و فیتوفاک در هر دو تیمار یکسان بود. ضریب تبدیل غذا در تیمار با جلبک ۱/۵، در حالیکه در تیمار کنترل ۱/۶۹ بود. کپور می‌تواند ۶۰ درصد جلبک را بدون اثرات بیماری تغذیه نماید. این آزمایشها نشان دادند که جلبک ها می‌توانند بطور موفقیت آمیزی در جیره غذایی ماهی جای گیرند (Venkataraman L.V. 1985) .

تابلو ٦- وزن نهایی و نسبت تبدیل غذایی در کپور علفخوار تغذیه کرده از جیره غذایی حاوی نسبت های متفاوت جلبک سبز

نسبت استفاده از جلبک در جیره غذایی	وزن متوسط کپور علفخوار در مرحله نهایی (گرم)	نسبت تبدیل غذایی
۵	۳۲/۱	۳/۰۴
۱۰	۳۹/۹	۳/۳۶
۲۰	۴۴/۲	۲/۰۴
۳۰	۵۴/۷	۱/۸۸
۴۰	۵۲/۴	۱/۸۰
۵۰	۶۰/۵	۱/۷۳
۶۰	۶۶/۵	۱/۵۷
۷۰	۸۵/۷	۱/۴۲
۸۰	۹۵/۶	۱/۳۴
۹۰	۷۱/۸	۱/۶۹

تابلو ۷- آزمایشات رشد کپور با استفاده از جیره غذایی تجارتی قزل آلا و جیره غذایی قزل آلا جایگزین شده با جلبک

	رژیم غذایی	جیره غذایی قزل آلا	جلبک + غذای قزل آلا
ماهی / گرم	وزن ابتدایی	۳۳/۳	۳۳/۳
ماهی / گرم	وزن نهایی بعد از ۴۸ روز	۶۹/۸	۱۱۶/۲
ماهی/ گرم	افزایش وزن	۳۶/۵	۸۲/۹
گرم /گرم	ضریب تبدیل غذایی	۲/۹	۱/۹۳

مطالعات جدی تری لازم است تا اینکه امکانات تولید غذای ماهی حاوی جلبک را در سطح تجارتی بررسی نمود. تولید انبوه جلبکهای میکروسکوپی برای پرورش مولدین دو کفه‌ایهای دریایی گزارش شده است

(Depauw, *et al*. 1983)

تشکر و قدردانی

مجموعه تهیه شده در این آزمایشگاه در نوع خود اولین و تنها مجموعه جلبکی(زنده و فیکس شده) در ایران می‌باشد. تشکیل این مجموعه بدون مساعدت مسئولین محترم سازمان تحقیقات شیلات تهران و گیلان و همچنین بدون همکاری همکاران گرامی غیر ممکن بود. لذا بدینوسیله مراتب قدردانی و تشکر خود را از:

مسئولین محترم:

آقایان – دکتر امینی، دکترنظامی، مهندس حق پناه، مهندس عبدالحی، مهندس صفایی، مهندس رضوی، مهندس وثوقی ، مهندس دانش

پرسنل آزمایشگاه کشت جلبک:

خانم مددی و آقای صلواتیان

همکاران گرامی:

آقای مهندس ایمانپور، خانمها مهندس محمد جانی، مهندس ارشد، مهندس صادقی

پرسنل زحمتکش

بخش‌های اطلاعات علمی، ترابری، امور اداری، خدمات، تدارکات عرض می‌نمایم.

منابع

- علی اکبر صدر افشار، زهره رمضانپور، ۱۳۶۷ گزارش پایانی استفاده از جلبک اسپیرولینا برای تصفیه فاضلاب و تولید مکملهای پروتئینی برای غذای ماکیان و ماهی. جهاد دانشگاهی، دانشگاه شهید بهشتی.

1- Anusuya, Devi, M. and Venktaraman. L.V. (1983) Hypocholbeste. Rolic effect of the blue green algae *Spirulina platensis* fed to albino rats. Nutr. Rep. Intl. 28-519-530.
2- Archibald, P.A. & H.C. Bold, 1970. Physiological Studies. The genus *Chlorococcum menengini*. Univ. Texas Pub1. 7015.115pp.
3- Becker, E.W. and Venkataraman. L.V. (1984). Production and Utilization of bluegreen algae. Spirulina in India. Biomass 4:105-125.
4- Becher, E.W. and Venkataraman. L. V(1985). Production of algae based on Local means: 1. Technological aspects of algal Production. 2.Algl biofertilizer. Ln; Hand – book of Algal mass Culture. Ed:G.Richmond CRC Press, Florida USA.
5- Bisalputra,T.& T.e.Weier, 1964.The Pyrenoid of *Scenedesmus quadricauda*. Am.J.Bot. 51:881-892.
6- Bisalputra, T., 1974. Plastids in algal physiology and Biochemistry (W.D.P. Stewart, Ed.) University of California Press, Berkeley. Chap. 4.Xi + 998pp.
7- Bold, H.C., 1942. The Cultivation of algae. Bot. Rev. 8:69-138.
8- Bold, H.C., and Micheal L Wynne 1985. Introduction to the Algae Structured and Reproduction, Second ed. Prentice Hall, INC, 1985.
9- Bolten E. T. (ed) (1982). Intensive marine bivalve Cultivation in a Controlled recirculating Seawater Prototype system. Deloware.
10- Browitzka, A. & L.J. Borowwitzka, 1988. Micro-Algal Biotechnology, Cambridge Univ. Press.
11- Bourrelly, P., 1970. Les algues d'eau douce. Initiation a la systematique. III.Les alguues bleues et rouges, les Euyleniens, Peridiniens et Cryptomonadines.N. Boubee, Paris 512pp.
12- Bourrelly, P.,1979.Les Cyanophyceas, algues ou bacteries? Rev. Algol., N.S.14:5-9
13- Brock, T.D., 1973. Lower pH limit for the existence of blue – green algae; evolutionary and ecological implications. Science 179: 480-483.
14- Brown, R. M. & H.C. Bold, 1964. Physiological Studies. V. Comparitive Studies of the algal genera Tetracystis and Chlamydomonas. New Phytol. 52:292-297.
15- Brown, R. M., 1971. Studies of Hawaiian freshwater and soil algae andfernspores across the island of Oahu, Hawaii. In Contributions in Phycology. (B.C. Parker and R. M. Brown, Jr. Eds) Allen Press Lawrence, Kans, pp175-188.
16- Brune, H. and walz, D.P. (19780. Studies on Some nutritive effects of blue – green algae *Scenedesmus acutus* with Pigs and broilers. Arch. Hydrobiol. Ergebn. Limnol. 11.79.
17- Brune, H (1982). Zur Vertrag Lichkeit der Einzelleralgen *Spirulinian maxima* and *Scenedesmus acutus* als alleirige Eiweissquelle Fur Broiler. Z. Tierphysol. Tierenn Futtermittel – Ke 35:55
18- Chaturvedi, D.K.Verma, S.S. and KharkeS.S and Kharke S. P. (1980). Stucles on the effect of feeding freshwater alga Scenedesmus to Starting Chicks and laying hens, Poc. Nat. Work. Algal systems. Indian Soc. Biotechnol. P. 145.
19- Combs, G.F., 1952. Alga (Chlorella) as a source of nutrient for the chick Science. 116-423.
20- Corner E.D.S. and Coway, C.B.(1968) Biochemical studies of the Production of marine Zooplankton. Biochemical Studies of the Production of Marine Zooplankton. Biol. Rev., 43: 363-426
21- De,P.K. 1939. The role of blue green algae in nitrogen fixation in rice fields. Proc. R. Soc. London. 127b:121-139.
22- Depauw, N. and Pruder G. (1986) use and Production as food in aquaculture: Practice, Problems and research needs. In Bilio, M., Rosenthal, H. and Sindermann, C.J. (eds), Realism in Aquaculture: Achievements Constraints, Perspectives. European Aquaculture Society, Bredene, Belgium pp.77-106.
23- Desikachary,T.V., 1959, Cyanophyta, Indian council Agr. Res. New Delhi, pp.686
24- Desikachary,T.V., 1970. Taxonomy of blue – green algae – problems and prospects. Schweiz. Z. Hydrol. 32:490-494.
25- Dodge, J. D., 1972. The ultrastucture of the dinoflagellate pusule; a unique osmo – regulatory organelle protoplasma 75:285-302.
26- Dodgs, J. D., 1973. The fine structure of algal cells, Academic press, London. x+ 261pp.
27- Drout, F. 1968. Revision of the classification of Oscillatoriaceae. Monogr. Acad. Nat. Sci. Phila. 15.370pp..
28- Ducker, S.C. & Willoughby, L. G. 1964. Potassium tellurite a bacteriostatic agent in isolating algae. Nature, 202:210
29- Duerr. O. R., R. Edralin M, price, Facitities Requirements and Procedures for the …, oceanic Institute makapuu Point.

30- Evans, L.V., 1974. Cytoplasmic organellesin algal physiology and Biochemistry (W.D.P. Stewart, Ed.). University of California Press, Berkrley. Chap. 3. 989pp.
31- Evans, E.H., I. Foulds and N. G. Carr, 1976. Environmental conditions and morphological variation in the blue – green alga Chlorogloea fritschii. J. Gen. Microbiol. 92: 147-155.
32- Fogg, G. E. 1949. Growth and heterocyst production in *Anabaena cylinderica* Lemm. II. in relation to carbon and nitrogen metabolism. Ann. Bol., 13:241-259
33- Fott, B., 1971. Algenkunde. 2nd ed. Gustav Fisher,Jena. 581pp.
34- Fritch, F. E. 1942: The interrelations and classification of myxophyceae (Cyanophyceae). New phytol. 4:134-148.
35- Geitler, L., 1976.A. Cyanophyceae. In kryptogamenflora von Deutschland Osterreich und der Schweiz, vol. 14 (l. Rabenhorst, Ed.). Akademische Verlags gesellschaft, Leipzig, pp. 673-1056.
36- Geitler, L., 1976. A. Einigekritische Bemerkungen zuneuen zusammenfassenden Darstellung der morphologie und systematic dercyanophycean. Plant syst. Evol. 132:153-160.
37- Geleskul. Yu.F. (USSR). Khim. Tekhnol. (kiev) 1982). Production technology of Carotene Preparation from the alga *Dunaliella salin*e reservoirs for livestock breeding food industry. (6), 40-2(Russ).
38- Gerloff, G.C., Fizgerald, G. p. & Skoog, F.1950. The isolation, Purification and culture of blue – green algae. Amer. J. Bot. 37:216-218.
39- Gibb, D.C., 1957. The free living forms of Ascophyl.
40- Gibb, D.C., 1962. The ultrastructure of the pyrenoids of algae, exclusive of green algae. J. Ultrastruct. Res. 7:247-261.
41- Giese A.C. 1959. Comparative physiology annual reproductive cycles of marine invertebrate. Annual Review of physiology 21,547-576.
42- Goubic, S. , 1976. Taxonomy of extant stromatolite building cyanophytes. In Stromatolites (M.R. Walter, Ed.). Developments in sedimentology zo, Elsevier, New york, pp, 113-126.
43- Gomes L. A.(19680 Cultivo de Crustaceos e moluscos. Nobel, Saopaulo.
44- Gorham, P. R., Mclachlan, J.S., Hamme. U. T. and Kim, W.K. 1964. Isolation and culture of toxic strains of Anabaena flos –aqu (Lyngb) de Bred. Verh. Int. Verein. Theor. Angw. Limnol, 15:796-804.
45- Griffiths, D.W. 1970, Thepyrenoid. Bot. Rev. 36: 29-58
46- Gunel Anlgren, Lisa Lundstedt, Michael Brett and Curt Forsberg, 1990. Lipid Composition and food quality of some fresh water phytoplankton for Cladoceran Zooplankters, J. of Plankton Research Vol. 12 no. 4 pp. 809-818.
47- Hammer, U. Y. & J. Shamess & R.C. Haynes. The distribution and abundance of algae in saline lakes of Saskatchchewan, Canada Hydrobiologia 105, 1-269(1983).
48- Hartshorne, J.N., 1953. The function of the eyespot in Chlamydomonas. New phytol. 52:292-297.
49- Hegewald, E. 1982. Taxonomisch morphologische unteungenrsuch Von Seenedesmus – Isolaten aus Stammsammlungen. Arch. Hydrobiol Suppl. 60:375-406.
50- Hennig, A., Gruhn, K. Kleeman. J. and Han, C. (1970) Prufug dar verdau – Lichkeit und der N-Bilanz von *Scenedesmus quadricauda* and Schweinen und Broilern jb. Tierenahrg. Futter. 7:426.
51- Holmgren, P, R., H.P. Hostetter, & V. E. Scholes, 1971. Ultrastructural observation of cross walls in the blue – green alga *Spirulina major*. J. phycol. 7:309 –311.
52- Hughes E. O., Gorham, P. R. & Zehnder, A. 1958. Toxicity of unialgal cultures of *Microcystis aeruginosa*, Can. J. Microbial, 4: 225- 236
53- Kaushik B.D. 1987. Laboratory methods for blue –green algae, Associated Publixhing Company.
54- Leonard, J. and P. Copere. 1967. *Spiulina platensis* (Gom0 Geitl., algue bleue de grand Valeur alimenttai. Re par sa richesse en proteins. Bull. Jard. Bot. Nat. Belg. 37 suppl: 1-23.
55- Leveille, G.A. Sauberlich. J. W. and Shockley. J.W. (1962). Protein value and the amino acid deficiencies of various algae for growth of rats and chicks. J.Nutr. 76:423.
56- Lincoln, P. and Hill, D. T.(1980). An integrated microalgae system In. algae Biomass. Eds.: G. Shelef and C.J. Soeder. Elsevier north Holland Biomedical Press. P. 229.
57- Lipstein, B. and Hurwitz, S. (1980). Thenutriional value of algae for poultry. Dried dhlorella in broiler diets. Br. Poult. Sci.21:9.
58- Loosanoff, V.L & Davids, H. C. (1963). Rearing of bivalve mollusks. Advances in Marine Biology 1, 1-136.
59- Mann, R. (1979). Some biochemical and physiological aspects of growth and gametogenesis in Grassostrea gigas and strea edulis grown at sustained elevated temperatures. Journal of the marine Biology Association, U.K 59, 95-110
60- Massalski, A., F.R. Trainor, and L. E. shubert. 1974. Wall ultra structure of Scenedesmus culture N. 46. Arch. Mikrobiol, 96:146-153.
61- Meal. Yeda, 1981. Glvcerol, Carotenes and algae. Research and Development Co. Ltd.
62- Melack, J.M, and P. kilham. 1974. Photosynthetic rates of phytoplankton in east African alkaline saline lakes, lemon, oceanogr. 19:743-755.

63- Meske, C. H. and Pfeffer, E. (1978). Growth experiments with carp and carp. Arch. Hydrobiol. Ergebn. Limnol. 11.98.
64- Mokady, S.Yanni, S.Einav, P. and Berk, Z. (1980). Protein nutritive value of several microalgae species for young chicken and rats In:; Algae Biomedical Press. P. 665.
65- Okelly, J.C., 1974. Inorganic nutrients in algalogy and biochemistry (W.D.p. Stewart, Ed.). Univerrsity of California Press, Berkeley. Chao. 2.989pp.
66- Pickett-Heaps, J.D. &L.A. Staehelin, 1975. The ultrastructure of Scenedesmus (chlorophyceae) II. Cell division and colony formation. J. Phycol. 11:86-202.
67- Prescott G. W., 1969, Algae of the western great Lakes Area, WM. C. Brown Co. INC., Dubugue, Iowa.
68- Pringsheim, E.G., 1946a. Pure cultures of Algae, Their preparation and maintenance, Cambridge University Press. 119pp.
69- Pringsheim, E.G., 1946 b. The biphasic or soil water culture method for growing algae and flagellata. J.Ecol. 33:193-204.
70- Reddy, V.R. Reddy, C.V. Varadarajulu, P. and Reddy, G.V. (1978). Utilization of algae protein (*Scenedesmus acutus*) in chick rations. Indian Poultry Gazette. 62:67.
71- Sasson & Johnston, 1986, New technologies and development.
72- Sastry A. (1966) Temperature affects in the reproduction of the bay scallop Aeqipecten irradians Lamarck. Biological Bulletin 130, 118-143
73- Sastry A.N(19680) the relationships among food, temperature and gonad development of the bay scallop A equipotent irradiants physiological zoology 41, 44-53
74- Smith, G.M., 1950. The freshwater algae of the United States. 2nd. Ed. McGraw Hill, New York. Vii + 719pp.
75- Stein, J. R. 1973. Handbook of phycological methods. Cambridge University Press, Cambridge, Xii + 448pp.
76- Suluk, J. 1975. Nuclear division in *Scenedesmus quadricauda* (Turp) Bred. Arch. Hydrobiol. Suppl. 46:224-258.
77- Taylor, D.l.1981. Evolutionary impact of intracellular symbiosis. Ber. Dtsch. Bot. Ges. 94: 583-590.
78- Taub, F. B. (1970) Algal culture as a source of food. Proc. Of the first Annual Workshop world Mariculture Society. Louisiana State University, Baton Rouge, pp.101-117.
79- Tiffany, L.H.& M.E. Britton, 1971. The algae of Illinois, Hafner publishing company, New York.
80- Trainer, F.R. 1963 a. The occurrence of a Dactylococcus like stage in an axenic culture of Scenedesmus. Can. J. Bot. 4:967-968.
81- Trainer, F.R.1963c. Culture of *Scenedesmus longus*. Bull. Torrey Bot. Club 90:407-412.
82- Trainer, F.R.1979. Scenedesmus (chlorophyceae) polymophic in the laboratory but not in the field. Phycologia. 18: 273-277.
83- Trainer, F.R. 1980. Control of development in Scenedesmus. In Handbook of phycological methods: Developmental and cytological methods (E. Ganttt, Ed.) Cambridge University Press, Cambridge, pp.16-23.
84- Trainer, F. R. & C. A. Burg, 1965A. Mortality in *Scenedesmus obliquus* and *Coelastrum micrsoporus*. J. phycol. 1:15-18.
85- Trainer, F.R. & A. Massalski 1971. Ultrastructure of Scenedesmus strain 614 bristles. Can. J. Bot. 49:1273-1276.
86- Trainer, F.R. & J. R. Cain and L.E. Shubert, 1976. Morphology and nutrition of the colonial green alga Scenedesmus: 80 years later. Bot . Rev. 42:5-25.
87- Ukin. & Kituchis S. (1984) Regulation of maturation and spawning of an abalane, Haliotis (Gastropoda) by external environmental factors. Aquaclture 39, 247-261.
88- Venkataraman, L.V.(1982). Algae – a future food source. Science Report, (India). 19(3):150
89- Venkataraman, L.V. & Anasuya Devi, M. Biotechnology of algal culture. The Chin. C. ch. E. No. 124 76-91 (In Chinese).
90- Venkataraman. L.V. and Anusuya Devi, M. (1982). Utilization of microbial Proteins in feeds in: Role of Proteins in foods and feeds. Eds: A. Srinivasan and S. Gopalan. Protein Research unit, Loyola College. Nadras. 90-170
91- Venkataraman L.V. & E.W. Becker, 1985. Biotechnology and utilization of Algae the Indian Experience, Biotechnology Exploitation of Algae – the Indian Approach.
92- Walne P. R. (1970) Present Problems in the Culture of the Larvae of ostrea edulis. Helgolanden Wiss enschaftliche Meeresunter suchungen 20, 514-525
93- Waterbury, J.B. and R. Y. Stainer, 1981. Isolation and growth of cyanobacteria from marine and hypersaline environments. In the prokaryotes, vol. 1(M.p.Starr, H.G. Truper, A. Balows and H.G. Schlegel, Eds.0. Springer – Verlag. Berlin, Chap. 99pp221 – 223). 1102pp + 156pp. Index.

Abstract:
The algal herbarium was set up and put into operation officially since 22 August 1993 at the Ghazian research station of the Gilan Fisheries Center. Several samplings were carried out from different regions of the Anzali Lagoon and Parts of the Southern shores of the Caspian Sea. The Samples Collected are being stored in the Laboratory in Living and non Living form.
163 Living samples of 23 phytoplankton species are stored in the form of different types of inoculants liquid media and agar Plates.
The species collected are as follows: Nodularia *sp$_{1,}$ Nodularia sp$_{2,}$ Spirulina sp. Oscillatoria sp., Anabaena sp$_1$, Anabaena sp$_2$, Dactylococcopsis raphidiodes Lyngbia sp., Ankistrodesmus falacatus, Ankistrodesmus sp., Scenedesmus abundans S. acuminatus, S. obliquus, S. quadricada, Chlorella vulgaris Thalassionema nitzschioides, Cyclotella sp., Rhizosolenia calcar avis, Navicula sp., Bacillaria sp.*
Pure cultures of seven phytoplankton species have been developed which include: *Scenedesmus abundans, S. obliquus, S. acuminatus, S. quadricada, Chlorella vulgaris, Spirulina sp.*and *Ankistrodesmus falacatus.*
The non Living sampeles are stored dried or fixed in suitable Preservatives.
More than 200 phytoplankton specimens are available in the Laboratory at present, of which 100 species have been identified.

This document was created with Win2PDF available at http://www.daneprairie.com.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.