بررسی مقایسه‌ای نگهداری برخی جلبک‌های آب شیرین به روش‌های انجماد خشک و محافظت سرمایی

الهام فیاضی آتدوتان[۱]، هومن رجبی اسلامی[۲]*

*rajabi.h@srbiau.ac.ir

۱-دانشگاه آزاد اسلامی، واحد رشت، رشت، ایران.
۲-دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، صندوق پستی: ۱٤٥۱٥/۷۷٥، تهران، ایران.

تاریخ دریافت: اسفند ۱۳۹۳ تاریخ پذیرش: خرداد ۱۳۹٤

چکیده

این تحقیق به منظور بررسی امکان نگهداری جلبک‌های آب شیرین به روش انجماد خشک و محافظت سرمایی و مقایسه قابلیت رشد آنها انجام شد. ۳ گونه جلبک آزمایشی شامل *Chlamydomonas moewusii*، *Scenedesmus obliquus* و *Chlorococcum olefaciens* پس از تهیه محیط کشت زایندر در ۶ ارلن به مدت ۲۰ روز کشت داده شدند. سپس هر گونه با نه تکرار (سه تکرار برای هر یک از روزهای اول، پنجم و دهم) به روش‌های انجماد خشک و محافظت سرمایی برای نگهداری آماده گردید. جلبک‌ها در ادامه، کشت مجدد شده و رشد آنها با سنجش کلروفیل *a* طی روزهای اول، پنجم و دهم پس از خروج از شرایط حفاظتی بررسی گردید. تعداد ۹ ارلن نیز برای هر گونه جلبکی تنها با افزودن محیط کشت اختصاصی جلبک به عنوان تیمار شاهد آماده گردید تا مقیاس مشابهی برای بررسی رشد جلبک‌ها در روزهای یکسان فراهم آید. نتایج نشان داد که بیشترین رشد هر سه گونه در انجماد خشک پس از گذشت ده روز از کشت مجدد به دست آمد که به شکل معنی‌داری ($p<0.05$) بالاتر از تیمار شاهد بود. با این وجود تفاوت معنی‌داری در میزان رشد *Scenedesmus obliquus* و *Chlorococcum olefaciens* پس از محافظت سرمایی و انجماد خشک به دست نیامد ($p>0.05$). یافته‌های پژوهش حاضر نشان داد که هر دو روش حفاظتی برای نگهداری سه گونه جلبک سبز مطالعاتی مناسب است، گرچه روش انجماد خشک در گونه *Chlamydomonas moewusii* نتایج بهتری را ارایه نمود.

لغات کلیدی : *Chlamydomonas moewusii*، *Scenedesmus obliquus*، *Chlorococcum olefaciens*، انجماد خشک، محافظت سرمایی.

*نویسنده مسئول

مقدمه

جلبک‌ها گروه وسیعی از موجودات زنده شبه‌گیاهی ساده‌ای هستند که به صورت مستقیم و غیرمستقیم در تغذیه انسان و تولید مواد شیمیایی مختلف کاربرد دارند (El Gamal, 2010). بخش عمده‌ای از درآمد حاصل از زیست‌فن‌آوری دریایی در حال حاضر توسط این گروه از موجودات تامین می‌شود (Reddy *et al*., 2010) به طوری که می‌توان جلبک‌ها را منابع سرشاری از انواع اسیدهای چرب، اسیدهای آمینه، پروتئین‌ها، پلی‌ساکاریدها، مواد معدنی و ویتامین‌ها دانست (Richmond, 2006; Hasan & Chakrabarti, 2009). چنین شرایطی موجب افزایش تقاضا به گونه‌های خاصی از جلبک‌ها برای استفاده در بخش‌های صنعتی، کشاورزی، دارویی و غذایی گردیده است (Barsanti & Gualtieri, 2006).

خالص‌سازی و نگهداری از جلبک‌ها بر خلاف باکتری‌ها و قارچ‌ها به دلیل وجود پیچیدگی‌های چرخه زندگی آنها از سابقه کمتری در جهان برخوردار است (Park, 2006). موسسه‌های مختلفی در سراسر دنیا اقدام به جداسازی و نگهداری سویه‌های ژنتیکی خاصی از جلبک‌ها نموده‌اند که از آن جمله می‌توان به UTEX در آمریکا، CCAP در انگلستان و SAG در آلمان اشاره نمود. علیرغم تلاش‌های پراکنده صورت گرفته در ایران (Hejazi *et al*., 2010; Noroozi *et al*., 2011)، همچنان یک بانک ژن از جلبک‌های بومی کشور به وجود نیامده که شاید یکی از بزرگترین مشکلات در این زمینه مربوط به عدم قابلیت نگهداری طولانی‌مدت جلبک‌ها و به ویژه ریزجلبک‌ها است.

روش‌های مختلفی برای نگهداری جلبک‌ها استفاده شده که از آن جمله می‌توان به نگهداری زیر روغن، انتقال پیوسته، محافظت سرمایی، انجماد خشک و نگهداری در دمای پایین یا فوق پایین اشاره نمود (Day *et al*., 1997; Park, 2006). اساس تمام این روش‌ها بر پایه خروج آب یا تغییر محیط فیزیکوشیمیایی سلول جلبکی است. زیرکشت متوالی (serial subculturing) معمول‌ترین روش نگهداری جلبک‌ها به ویژه در مقیاس کوچک است که با وجود سادگی نیازمند تلاش زیاد و فرآیند زمان‌بری است. علاوه بر این همواره خطر آلودگی‌های ثانویه جلبک‌ها در نگهداری به این روش وجود دارد (Apt & Berens, 1999; Day, 2007).

انجماد خشک (Freeze-drying) به فرآیند خشک کردن مواد در دمای زیر صفر درجه سانتی‌گراد درون لوله‌های خلاء گفته می‌شود که اولین بار در آمریکا طی جنگ جهانی دوم برای جلوگیری از فساد سرم‌های انتقالی به اروپا مورد استفاده قرار گرفت (McCleary, 1987). این فرآیند یک روش تجاری برای انتقال مواد بدون نیاز به یخچال است که مایعات محیط در آن پس از انجماد به صورت مستقیم از فاز جامد به فاز گازی می‌روند. بسیاری از ترکیبات نظیر داروها، واکسن‌ها و آمپول‌های تزریقی را می‌توان به این طریق بدون نیاز به تجهیزات یا مواد شیمیایی خاص در دمای اتاق برای زمان‌های طولانی نگهداری کرد (Melián-Martel *et al*., 2012). با این وجود یافته‌های مربوط به استفاده از این روش برای نگهداری جلبک‌ها محدود است (Wagner *et al*., 2005; Tindal, 2007). محافظت سرمایی روش دیگری است که از دمای پایین به وسیله نیتروژن مایع برای نگهداری بسیاری از باکتری‌ها و البته برخی جلبک‌ها استفاده نموده، هرچند که بیشتر موفقیت‌ها در این زمینه به جلبک‌های سبز آبی بر می‌گردد (John, 2011).

بر این اساس، پژوهش حاضر به مطالعه امکان نگهداری برخی از جلبک‌های سبز بومی ایران با استفاده از دو روش انجماد خشک و محافظت سرمایی خشک پرداخت. علاوه بر این قابلیت نگهداری هر یک از گونه‌های آزمایشی در دو روش انجماد خشک و محافظت سرمایی مقایسه گردید تا روشی مناسب برای نگهداری جلبک‌های بومی در ایران ارایه گردد.

مواد و روش‌ها

تهیه گونه‌های جلبکی و آماده‌سازی محیط کشت

سه جلبک در این پژوهش شامل گونه‌های *Scenedesmus obliquus*، *Chlamydomonas moewusii* و *Chlorococcum olefaciens* از شرکت پژوهشی و تحقیقاتی دانش یاران، تهران تهیه و به صورت استریل درون لوله‌های ۲۰ میلی‌لیتری اختصاصی درب بسته به آزمایشگاه منتقل شدند. لازم به ذکر است که جلبک‌های فوق با کمک

خصوصیات ژنتیکی توسط عابدینی و همکاران (۱۳۹۴) شناسایی و در سایت NCBI (National Center for Biotechnology Information) نیز به ترتیب با شماره مسلسل‌های KF58423، KF584222 و KF584224 ثبت گردیده بودند. محیط کشت مورد استفاده در این تحقیق شامل محیط زایندر (Komarek, 1973; Miller, 1978) بود که بلافاصله پس از آماده‌سازی طبق دستورالعمل سترون گردید.

سترون‌سازی

فرآیند سترون‌سازی تمام وسایل و لوازم در این پژوهش بر اساس روش پیشنهادی Kawachi و Noël (۲۰۰۵) انجام گرفت. فضای آزمایشی شامل هود میکروبی نیز با کمک الکل اتانول و لامپ ماوراء بنفش ضدعفونی شد. همچنین کلیه وسایل مصرفی یک یا چندبار مصرف نیز ضدعفونی شدند. وسایل ابتدا در آب حاوی هیپوکلریت کلسیم تجاری با غلظت ۵ میلی‌لیتر به ازای هر لیتر آب برای ۳ تا ۴ ساعت غوطه‌ور و سپس درون محلول تیوسولفات سدیم با غلظت ۳۲ میلی‌گرم در لیتر شستشو شدند. شستشو در مرحله آخر توسط آب مقطر صورت گرفت تا از تشکیل لکه روی ظروف و لوازم جلوگیری شود. تمام وسایل به منظور سترون‌سازی به مدت ۱۵ دقیقه درون اتوکلاو با دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و فشار ۲ اتمسفر قرار گرفتند. وسایل شیشه‌ای بعد ازعملیات اتوکلاو درون آون قرار گرفت تا رطوبت روی آنها خشک شود. تمام محلول‌ها درون ارلن‌های ۲۵۰ تا ۱۰۰۰ میلی‌لیتری درون اتوکلاو قرار گرفته و برای ۱۰ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و فشار ۲ اتمسفر سترون گردیدند. ضدعفونی محلول ویتامین‌ها و مواد غیرمقاوم در برابر حرارت نیز توسط فیلترهای غشایی استریل (اتوکلاو شده) با سوراخ‌های کمتر از ۰/۲ میکرومتر انجام پذیرفت (Shearer & Jackson, 2006).

کشت نمونه‌ها

نمونه‌ها دورن ۳ ارلن دو لیتری (یک ارلن برای هر جلبک) به عنوان محیط ذخیره کشت داده شدند. میزان ۱۵۰۰ میلی‌لیتر از محیط کشت‌های زایندر بدین منظور داخل ارلن‌ها ریخته شده و سپس یک لوله هواده در ورودی هر ارلن تعبیه گردید. روی هر کدام از ارلن‌ها به خوبی با پنبه پوشانده و دهانه ارلن‌ها در ادامه با فویل آلومینیومی پیچیده شد. تمام ارلن‌ها درون دستگاه اتوکلاو قرار داده شدند تا در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد برای مدت ۲۰ دقیقه سترون شوند. کاغذهای فیلتر اکمن با قطر ۲۵ میلی‌متر (GF/F) بعد از سترون‌سازی نمونه‌ها در ورودی دستگاه هواده قرار گرفت تا از ورود هر گونه آلودگی ثانویه به داخل ارلن‌ها جلوگیری گردد.

کشت نمونه‌ها در مجاورت شعله با انتقال تمام ۲۰ میلی‌لیتر از جلبک‌های خریداری شده به ارلن‌های حاوی محیط کشت ذخیره جلبک انجام شد. سپس تمام ارلن‌ها داخل دستگاه کشت جلبکی طبق روش پیشنهادی Park (۲۰۰۶) قرار گرفتند. شدت بهینه تابش بر این اساس برابر ۱۵۰ میلی‌مول بر مترمربع بر ثانیه تنظیم گردید که به نسبت ۸:۱۶ روشنایی به تاریکی توسط دو لامپ فلورسنت سرد تامین گردید. لام مرطوب پس از گذشت ۱۰ روز از کشت نمونه‌ها تهیه و خلوص نمونه زیر میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ۱۰۰ بر اساس خصوصیات ریخت‌شناسی انجام گرفت تا از عدم ورود آلودگی‌های مختلف به نمونه اطمینان حاصل شود. جلبک‌ها پس از گذشت ۲۰ روز و کنترل مداوم محیط کشت به فاز نمایی رشد رسیده و برای انجام تحقیق آماده گردیدند.

تیمارهای آزمایشی در این پژوهش شامل تیمار انجماد خشک، تیمار محافظت سرمایی و تیمار شاهد (برای مقایسه رشد جلبک‌ها در آن به عنوان مبنا با رشد جلبک‌ها در دیگر تیمارهای آزمایشی) بودند. جلبک‌ها درون ارلن‌های آزمایشی بر اساس طرح کاملا تصادفی با سه تکرار کشت داده شده و رشد آنها طی روزهای اول، پنج و دهم پس از کشت بررسی گردید. کشت جلبک‌ها در تیمار شاهد با معرفی ۲ میلی‌لیتر محیط کشت ذخیره همان گونه به ارلن‌های بیست و پنج میلی‌لیتری حاوی ۸ میلی‌لیتر محیط کشت با سه تکرار برای هر گونه جلبکی صورت گرفت. همزمان نیز تلقیح جلبک‌ها در تیمارهای انجماد خشک و محافظت سرمایی انجام پذیرفت تا مقیاس مشابهی برای رشد هر یک از گونه‌های جلبکی بین تیمارهای آزمایشی به دست آید.

آماده‌سازی بر اساس روش انجماد خشک

میزان ۲ میلی‌لیتر از محیط کشت ذخیره حاوی هر یک از گونه‌های جلبکی با نه تکرار (سه تکرار برای هر یک از زمان‌های آزمایشی) در لوله‌های حاوی ۸ میلی‌لیتر محیط کشت جلبکی تلقیح شدند. تمام محتویات هر ظرف ابتدا برای مدت زمان ۱۰ دقیقه درون نیتروژن مایع به شکلی قرار گرفت که نیتروژن مایع تمامی سطح ظروف را بپوشاند. ارلن‌ها سپس به مدت ۲۴ ساعت طبق روش Taylor وFletcher (۱۹۹۸) درون دستگاه انجماد خشک (Freeze-dryer) قرار گرفت تا با ایجاد خلاء به صورت پودر خشک در آیند. ظروف پس از آن درون یخچال با دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. محتویات لوله‌های مربوط به هر گونه جلبکی در فواصل زمانی ۱، ۵ و ۱۰ روز از یخچال خارج و با ۱ میلی‌لیتر از محیط کشت زایندر مجدداً از حالت پودر به صورت مایع درآمدند. این محلول به ارلن‌های بیست و پنج میلی‌لیتری حاوی ۹ میلی‌لیتر محیط کشت جلبکی با روش توضیح داده شده برای کشت همان جلبک در تیمار شاهد مجددا کشت گردیده و میزان کلروفیل a آن در روزهای اول، پنجم و دهم پس از کشت مشخص شد.

آماده‌سازی بر اساس روش محافظت سرمایی

جلبک‌های آزمایشی برای بررسی تاثیر محافظت سرمایی طبق روش Day و همکاران (۲۰۰۰) با اندکی تغییرات آماده شدند. تعداد ۹ ارلن آزمایشی حاوی محیط ذخیره جلبک تا رسیدن به فاز نمایی رشد (مدت ۲۰ روز به صورت بازه استاندارد موسسه CCAP) در شرایط کشت باقی ماندند. سلول‌های ته‌نشین شده پس از سپری شدن این مدت به همراه ۱۵ میلی‌لیتر از محیط کشت به درون بشر استریل منتقل گردیده و متناوباً با سرعت ۲۱۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردیدند. فاز فوقانی به آهستگی تخلیه و جلبک‌ها در ۱۵ میلی‌لیتر از محیط کشت تازه معلق گردیدند.

میزان ۳ میلی‌لیتر از محیط کشت زایندر با ۵ میلی‌لیتر محلول دی‌متیل سولفوکساید (DMSO) ۱۰ درصد مخلوط گردید. ۲ میلی‌لیتر از مخلوط ارلن‌های مربوط به کشت هر جلبک با ۹ تکرار (برای بررسی قابلیت بقا پس از گذشت ۱، ۵ و ۱۰ ساعت از نگهداری به روش محافظت سرمایی) به ظروف انجماد استریل منتقل و مشخصات هر یک از جلبک‌ها روی ظروف انجماد ثبت گردید. به این ترتیب غلظت DMSO درون ظروف انجمادی برابر ۵ درصد بود. ظروف در ادامه به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق نگهداری و سپس برای ۱۵ دقیقه در حمام سرد با دمای ۳۰- درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. ظروف انجمادی پس از این به سرعت درون محفظه مخصوص فلاسک‌های نیتروژن مایع منتقل شدند و به مدت ۴۸ ساعت درون فلاسک نیتروژن باقی ماندند.

ظروف انجماد با سه تکرار جهت بررسی حیات و قابلیت تکثیر جلبک‌های ذخیره شده در فواصل ۱، ۵ و ۱۰ روز با کمک گیره از فلاسک نیتروژن مایع خارج و به حمام آب گرم با دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد منتقل شدند تا بلورهای یخ به سرعت ذوب گردند. ظروف انجماد بلافاصله به زیر هود میکروبی استریل منتقل، سطح خارجی آنها توسط اتانول ۷۰ درصد ضدعفونی و حجم جلبک‌های درون هر ظرف با محیط کشت استریل به ۱۰ میلی‌لیتر رسید. ارلن حاوی محیط کشت و جلبک در انتها به اتاقک کشت منتقل شدند تا رشد جلبک‌ها پس از انجماد در شرایط مشابه تیمارهای انجماد خشک و شاهد در فواصل زمانی یک، پنج و ده روزه با بررسی میزان کلروفیل a تعیین گردد.

سنجش میزان کلروفیل a

میزان کلروفیل a در این تحقیق در روزهای اول، پنجم و دهم پس از انجماد خشک برای هر یک از گونه‌های جلبکی در تیمارهای آزمایشی بر اساس روش Jeffrey و Humphrey (۱۹۷۵) تعیین گردید. ارلن‌ها برای این منظور ابتدا به خوبی تکان داده شده تا مخلوط یکنواختی از هر جلبک به دست آید. سپس ۵ میلی‌لیتر از نمونه درون لوله‌های فالکون درب‌دار ریخته شد و ۳ میلی‌لیتر استون به آن اضافه گردید.

مخلوط حاصله برای یک دقیقه با سرعت ۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد تا استون با جلبک‌ها به خوبی مخلوط شود. نمونه‌ها در صورت نیاز پس از سانتریفوژ با استفاده از یک میله شیشه‌ای کاملا مخلوط گردیده و حجم نمونه‌ها به وسیله آب مقطر برابر ۱۰ میلی‌لیتر تنظیم شد. نمونه‌ها حداقل برای

۲ ساعت در تاریکی و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد خیسانده شدند. کاغذهای فیلتر اکمن با قطر ۲۵ میلی‌متر (GF/F) دارای حجم جابجایی ۰/۰۳ برای استخراج کلروفیل *a* استفاده شد.

نمونه‌ها در ادامه برای مدت ۳۰ دقیقه با سرعت ۲۸۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوز شده و مایع فوقانی آنها به آرامی و با دقت درون جایگاه مخصوص دستگاه اسپکتروفتومتر قرار گرفت. جذب نوری در طول موج‌های ۶۳۰، ۶۶۴ و ۷۵۰ نانومتر اندازه‌گیری و میزان کلروفیل *a* در هر یک از بازه‌های زمانی برای گونه‌های جلبکی بر اساس فرمول زیر تعیین گردید:

$$Chl_a = 11.85\,(OD_{664}) - 1.54\,(OD_{647}) - 0.08\,(OD_{630})$$

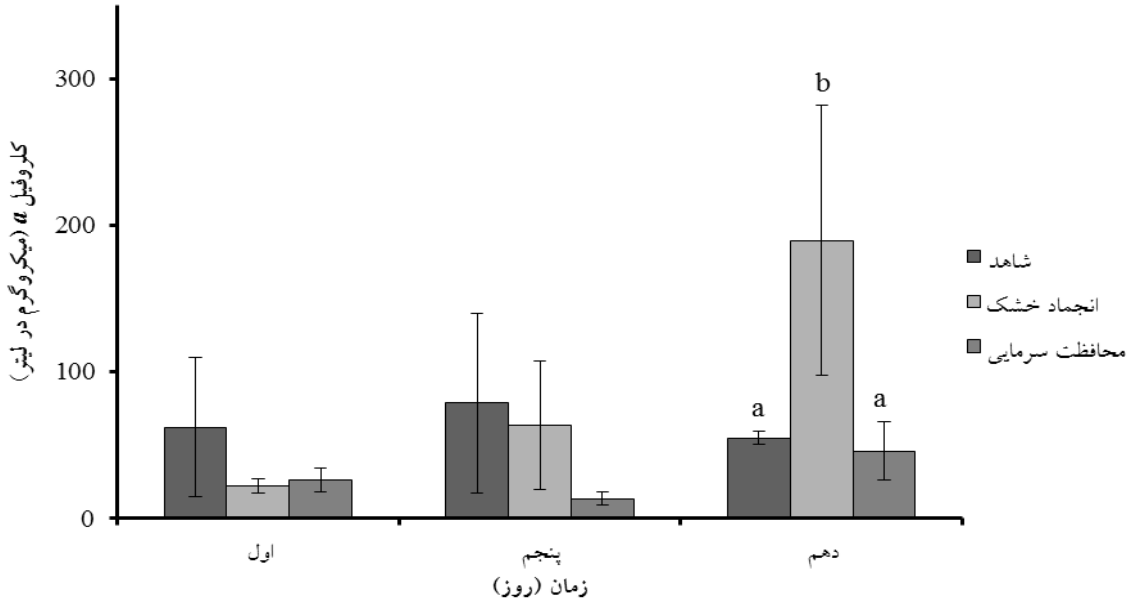
تجزیه و تحلیل آماری

تجزیه و تحلیل داده‌های به دست آمده با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۱۹ انجام شد. این تحقیق در قالب طرح کاملا تصادفی انجام گرفت. نرمال بودن داده‌ها در ابتدا با آزمون کولموگروف- اسمیرنوف و آزمون همگنی گروه‌ها با آزمون Levene انجام پذیرفت. با توجه به همگنی نتایج از آنالیز واریانس یک طرفه one way-ANOVA و برای تشخیص نقاط دارای اختلاف معنی‌دار از آزمون Tukey HSD در سطح احتمال ۵ درصد استفاده گردید. نمودارها به کمک نرم افزار Sigma Plot نسخه ۶ رسم شدند.

نتایج

Chlamydomonas moewusii

میزان رشد جلبک *Chlamydomonas moewusii* در محیط کشت زایندر در روزهای اول، پنجم و دهم تحت تاثیر تیمارهای آزمایشی در شکل ۱ نشان داده شده است. کلروفیل *a* جلبک *Chlamydomonas moewusii* در تیمارهای انجماد خشک و محافظت سرمایی تفاوت معنی‌داری با تیمار شاهد پس از ۵ روز کشت مجدد نداشت ($p<0.05$). با این وجود میزان کلروفیل *a* این جلبک در تیمار محافظت سرمایی پس از ده روز به شکل معنی‌داری بیش از تیمار شاهد و محافظت سرمایی گردید ($p>0.05$)، هرچند تفاوت معنی‌داری بین دو تیمار شاهد و محافظت سرمایی طی این زمان وجود نداشت.

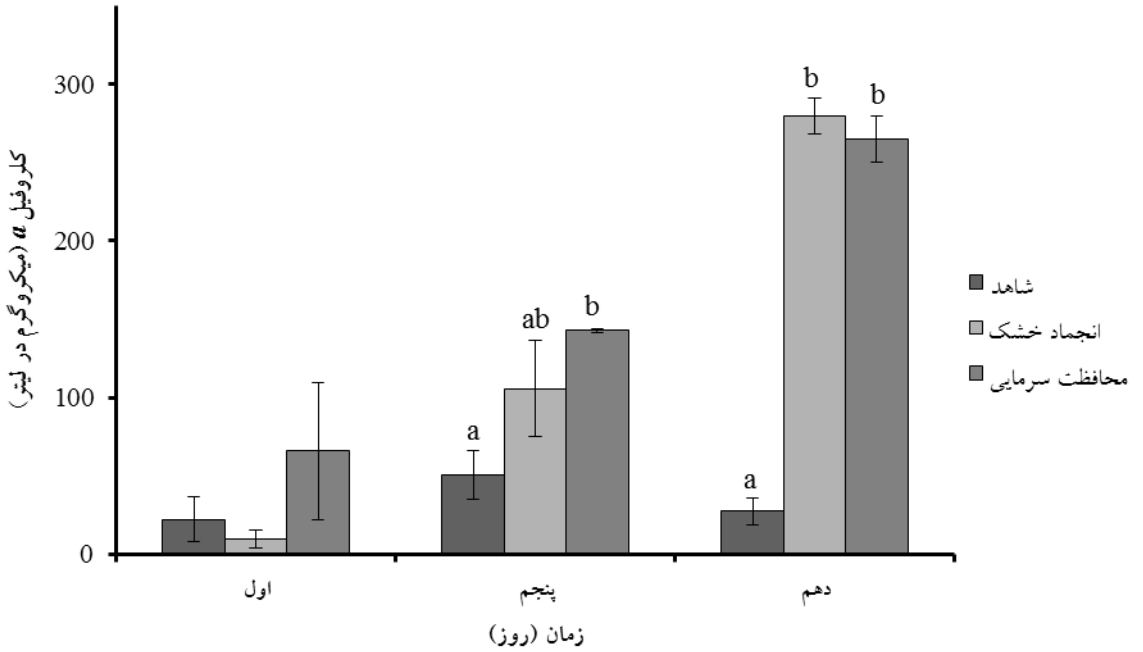


شکل ۱: میزان کلروفیل *a* جلبک *Chlamydomonas moewusii* در تیمارهای آزمایشی طی زمان‌های مختلف. حروف متفاوت روی ستون‌ها در هر یک از زمان‌های آزمایشی بیانگر اختلاف معنی‌دار بین تیمارها در سطح ۵ درصد است.

Scenedesmus obliquus

میزان کلروفیل *a* جلبک *Scenedesmus obliquus* نیز یک روز پس از کشت مجدد تفاوت معنی‌داری را از خود نشان نداد، هر چند که رشد جلبک‌ها در تیمار انجماد خشک کمتر و در تیمار محافظت سرمایی بیشتر از سایر تیمارها بود (شکل ۲). اختلاف معنی‌داری در رشد جلبک‌ها در روز پنجم نیز بین تیمارهای انجماد خشک و محافظت سرمایی مشاهده نشد($p<0.05$). با این تفاوت رشد جلبک *S. obliquus* در تیمار محافظت سرمایی پس از طی این زمان به شکل معنی‌داری بیش از تیمار شاهد گردید ($p<0.05$) که البته اختلاف معنی‌داری بین دو تیمار محافظت جلبکی به دست نیامد.

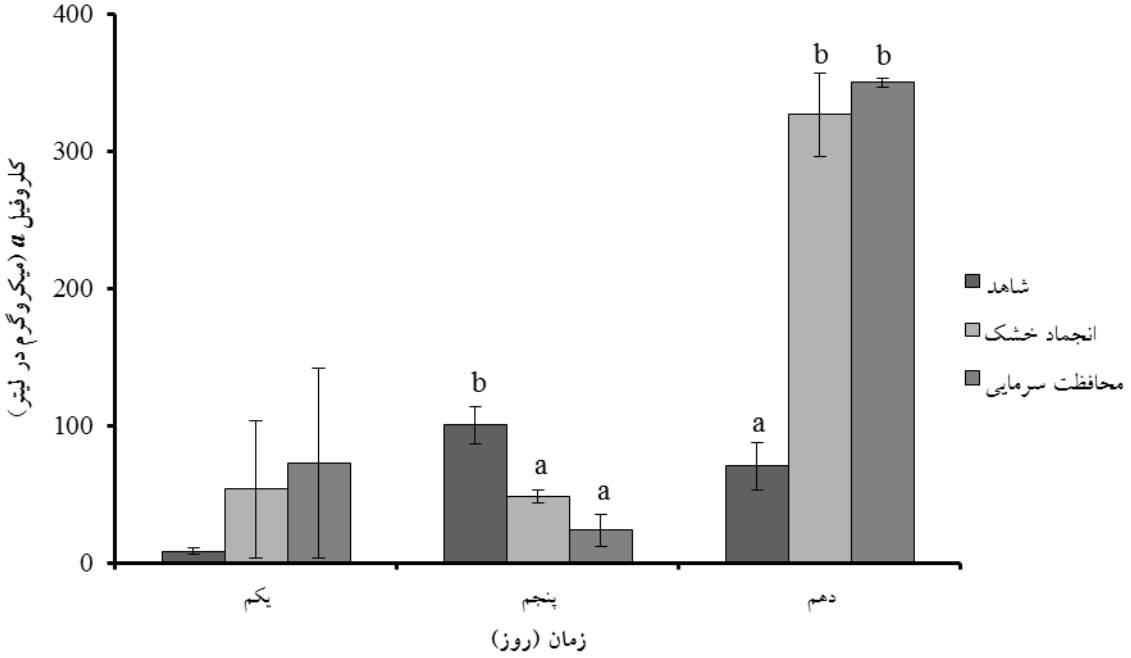
یافته‌های پژوهش حاضر نشان داد که رشد *S. obliquus* در تیمارهای محافظت سرمایی و انجماد خشک پس از طی ۱۰ روز از کشت مجدد به شکل معنی‌داری بیش از تیمار شاهد گردید ($p<0.05$) هر چند که تفاوت معنی‌داری در رشد *S. obliquus* میان دو تیمار آزمایشی به دست نیامد.



شکل ۲: میزان کلروفیل *a* جلبک *Scenedesmus obliquus* در تیمارهای آزمایشی طی زمان‌های مختلف. حروف متفاوت روی ستون‌ها در هر یک از زمان‌های آزمایشی بیانگر اختلاف معنی‌دار بین تیمارها در سطح ۵ درصد است.

Chlorococcum olefaciens

یافته‌های مربوط به میزان کلروفیل *a* برای جلبک *Chlorococcum olefaciens* طی روزهای اول، پنجم و دهم نیز در شکل ۳ آورده شده است. میزان کلروفیل *a* جلبک *Chlorococcum olefaciens* پس از فرآیندهای محافظت سرمایی و انجماد خشک در روز اول کشت مجدد بیشتر از تیمار شاهد بود، هرچند که این اختلاف از لحاظ آماری معنی‌دار نبود ($p>0.05$). این در حالی است که رشد این جلبک در تیمار شاهد پس از پنج روز به شکل معنی‌داری ($p<0.05$) بیش از تیمارهای محافظت سرمایی و انجماد خشک گردید. البته رشد جلبک‌ها در تیمارهای محافظت سرمایی و انجماد خشک پس از طی ده روز از شروع آزمایش به شکل معنی‌داری در مقایسه با تیمار شاهد افزایش یافت ($p<0.05$). با این وجود اختلاف معنی‌داری بین دو روش آزمایشی از لحاظ آماری به دست نیامد ($p>0.05$).



شکل ۳: میزان کلروفیل *a* جلبک *Chlorococcum olefaciens* در تیمارهای آزمایشی طی زمان‌های مختلف. حروف متفاوت روی ستون‌ها در هر یک از زمان‌های آزمایشی بیانگر اختلاف معنی‌دار بین تیمارها در سطح ۵ درصد است.

بحث

پژوهش روی جلبک‌ها در مقایسه با دیگر موجودات زنده کمتر صورت گرفته که دلیل آن را می‌توان به عوامل مختلفی از جمله اندازه کوچک، مشکلات مربوط به شناسایی و به ویژه عدم توانایی نگهداری سویه‌های مشخص برای طولانی‌مدت جستجو نمود. بر این اساس روش‌های مختلفی برای حفاظت جلبک‌ها در مدت زمان‌های طولانی استفاده می‌گردد که نگهداری به وسیله انجماد و محافظت سرمایی از جمله آنها است که مزایایی برای ذخیره‌سازی جلبک در زمان‌های طولانی دارد. این فن‌آوری موجب کاهش زمان و فضای نگهداری جلبک‌ها شده و در مقابل باعث افزایش پایداری ژنتیکی نمونه‌ها خواهد شد (Day *et al*., 2000; Gwo *et al*., 2005). با این وجود بسیاری از فن‌آوری‌های مرتبط با نگهداری جلبک‌ها برای مدت زمان طولانی هنوز توسعه نیافته و استقرار روش متناسب با گونه‌های جلبکی نیازمند بررسی‌های عملی است (Tzovenis *et al*., 2004).

جلبک *Chlamydomonas moewusii* از جمله منابع غنی از پروتئین و اسیدهای چرب ضروری، موادمعدنی و ویتامین‌ها است (Arisz *et al*., 2000; Irihimovitch & Yehudai-Resheff, 2008) که به دلیل عدم وجود دیواره سلولی مشخص در مطالعات ژنتیکی برای تزریق و استخراج DNA کاربرد دارد (Coleman & Maguire, 1983). این جلبک همچنین دارای عامل منحصر به فرد CGF (فاکتور رشد) می‌باشد که بر اساس نتایج پژوهش حاضر از رشد خوبی پس از انجام عمل انجماد خشک و محافظت سرمایی در مقایسه با تیمار شاهد برخوردار بود، هرچند که رشد این جلبک پس از انجماد خشک در مقایسه با محافظت سرمایی به مراتب بیشتر بود. علاوه بر این رشد *C. moewusii* نسبت به دو گونه دیگر نیز کمتر بود که دلیل آن را می‌توان در عدم وجود دیواره سلولزی با ضخامت بالا در این جلبک نسبت به دو گونه دیگر نسبت داد (Triemer & Brown, 1975) که از آن در مقابل تغییرات محیطی محافظت نمی‌کند.

گونه *Scenedesmus obliquus* نیز پس از انجام عمل انجماد خشک و محافظت سرمایی رشد خوبی نسبت به تیمار شاهد داشت، اما میزان رشد در روش محافظت سرمایی از انجماد خشک کمتر بود. چنین شرایطی را می‌توان به ساختمان خاص این گونه جلبکی نسبت داد. گونه *S. obliquus* از ساختمان چهار واحدی تشکیل شده (Guiry & Guiry, 2015) که به طبع دارای مقادیر قابل ملاحظه‌ای آب درون خود می‌باشند. رفع انجماد جلبک‌ها به روش محافظت سرمایی در این پژوهش نیز تنها با یک مرحله هم‌دماسازی برای ایجاد شرایط رشد مجدد صورت گرفت. این احتمال وجود دارد که در این شرایط کریستال‌های یخی با سرعت بیشتری ذوب شده و در نتیجه موجب تخریب دیواره سلولی *S. obliquus* گردیده باشند. Bui و همکاران (۲۰۱۳) نیز نشان دادند که کاهش و افزایش مرحله‌ای دما بر میزان بقا جلبک‌های سبز در فرآیند محافظت سرمایی اثرگذار است. این در حالی است که آب درون جلبک در روش انجماد خشک از آن خارج شده و به احتمال زیاد تاثیر تخریبی کمتر در این گونه خواهد داشت.

علاوه بر این جلبک رشد جلبک *Chlorococcum olefaciens* در هر دو تیمار محافظت سرمایی و انجماد خشک پس از گذشت ۵ روز از کشت مجدد دارای یک کاهش معنی‌دار در میزان رشد نسبت به تیمار شاهد بود، در حالی که میزان رشد پس از طی ۱۰ روز افزایش معنی‌داری در مقایسه با تیمار شاهد پیدا کرد. این نتایج یافته‌های Park (۲۰۰۶) را تایید می‌کند که جلبک‌ها دارای یک فاز رشد کند (lag phase) بین ۴ تا ۳۰ روزه بسته به نوع گونه و زمان نگهداری پس از اعمال روش‌های حفاظتی هستند تا قابلیت تکثیر و رشد مطلوب خود را بازیابی کنند. با این وجود چنین شرایطی در مورد سایر گونه‌های آزمایشی در این تحقیق دیده نشد که می‌تواند به دلیل زمان فاز رشد کند کوتاه‌تر آنها نسبت به *Chlorococcum olefaciens* باشد. به نظر می‌رسد که پاسخ گونه‌های جلبکی به روش‌های نگهداری کاملا اختصاصی بوده و باید بر اساس نوع گونه تعیین گردد.

عوامل مختلفی در موفقیت روش‌های نگهداری اهمیت دارند که از آن جمله می‌توان به ماده نگهدارنده، نرخ کاهش دما، شرایط فیزیولوژیک گونه همراه با نوع و غلظت ماده نگهدارنده اشاره نمود (Park, 2006). ترکیب DMSO در این آزمایش برای روش محافظت سرمایی به عنوان ماده نگهدارنده بافت سلولی جلبک استفاده شد که در مورد هر سه جلبک اثرات مثبتی را به همراه داشت. DMSO از جمله ترکیباتی است که با موفقیت برای نگهداری بسیاری از باکتری‌ها (Krumnow *et al*., 2009; Hoefman *et al*., 2013) و حتی اسپرم ماهیان (Billard, 2001; Liu *et al*., 2006; Kopeika *et al*., 2007) استفاده شده است. با این وجود تحقیقات Si و همکاران (۲۰۰۴) نشان داد که استفاده از غلظت یک درصد DMSO برای نگهداری اسپرم میمون رئوس مناسب نمی‌باشد. یافته‌هایی از تاثیر بهتر سایر مواد نگهدارنده برای حفظ باکتری‌ها نیز در مقایسه با DMSO وجود دارد (Park, 2006; Tindal, 2007). وجود چنین اختلافاتی می‌تواند به خصوصیات گونه‌ای، شرایط نگهداری، نوع ترکیب و حتی غلظت ماده نگهدارنده بستگی داشته باشد. بنابراین استفاده از ساز و کار مناسب حفاظتی به شکل بیان شده توسط Tindal (۲۰۰۷) و Adams (۲۰۰۷) همراه با تغییر نوع یا غلظت ماده نگهدارنده می‌توان موفقیت بیشتری در نگهداری نمونه‌های جلبکی به دست آورد. رشد بیشتر گونه‌های آزمایشی در تیمارهای انجماد خشک در مقایسه با محافظت سرمایی نیز بیانگر تاثیر تا حدودی منفی استفاده از DMSO در این زمینه است. لذا توصیه می‌گردد که از ترکیبات دیگر معمول نظیر اتیلن گلیگول، گلیسرول و پروپیلن گلیکول نیز برای نگهداری جلبکا استفاده نمود (Gwo *et al*., 2005).

سلامتی جلبک‌ها پس از انجام عمل انجماد خشک و محافظت سرمایی وابسته به انجام دقیق مراحل قبل و بعد از سرد کردن می‌باشد. یافته‌های حاصل از این پژوهش بیانگر آن است که گونه‌های *Chlamydomonas moewusii*، *Scenedesmus obliquus* و *Chlorococcum olefaciens* به عنوان جلبک‌های سبز قابلیت نگهداری به هر دو روش انجماد خشک و محافظت سرمایی را دارند. با این وجود ممکن است که نگهداری جلبک‌ها برای بازه‌های زمانی طولانی بر میزان بقا گونه‌های جلبکی اثرگذار بوده و لذا توصیه

می‌گردد که قابلیت بقا و تکثیر جلبک‌ها پس از اعمال چنین روش‌های نگهداری در بازه‌های زمانی طولانی‌تر بررسی گردد.

منابع

عابدینی ن.، رجبی اسلامی ه. و عصاره ر.، ۱۳۹۴. اثرات بازدارندگی نانوذره دی‌اکسید تیتانیوم بر رشد جلبک‌های آب شیرین. محیط زیست طبیعی، پذیرفته شده برای چاپ.

Adams, G., 2007. The Principles of Freeze-Drying. *In*: Day J. and Stacey G. (ed), Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols, 2nd edition. Humana Press, Totowa, New Jersey. pp. 15–38.

Apt, K.E. and Behrens, P.W., 1999. Commercial developments in microalgal biotechnology. Journal of Phycology, 35: 215-226.

Arisz, S.A., van Himbergen, J.A.J., Musgrave, A., van den Ende, H. and Munnik T., 2000. Polar glycerolipids of *Chlamydomonas moewusii*. Phytochemistry, 53(2): 265-270.

Barsanti, L. and Gualtieri, P., 2006. General Overview, Algae Anatomy, Biochemistry and Biotechnology. CRC Press, NewYork. 361p.

Billard, R., 2001. Techniques of Genetic Resource Banking in Fish. *In*: Watson P.F. and Holt W.V. (Eds), Cryobanking the Genetic Resource. CRC Press, NewYork. pp. 145-158.

Bui, T.V.L., Ross, I.L., Jakob, G. and Hankamer, B., 2013. Impact of Procedural Steps and Cryopreservation Agents in the Cryopreservation of Chlorophyte Microalgae. PLoS ONE, 2013; 8(11): e78668.

Coleman, A.W. and Maguire, M.J., 1983. Cytological detection of the basis of uniparental inheritance of plastid DNA in *Chlamydomonas moewusii*. Current Genetics, 7(3): 211-218.

Day, J.G., 2007. Cryopreservation of Microalgae and Cyanobacteria. Methods in Molecular Biology, 368: 141-151.

Day, J.G., Watanabe, M.M., Morris, G.J., Fleck, R.A. and McLellan, M.R., 1997. Long-term viability of preserved eukaryotic algae. Journal of Applied Phycology, 9: 121-127.

Day, J., Fleck, R. and Benson, E., 2000. Cryopreservation-recalcitrance in microalgae: novel approaches to identify and avoid cryo-injury. Journal of Applied Phycology, 12(3-5): 369-377.

El Gamal, A.A., 2010. Biological importance of marine algae. Saudi Pharmaceutical Journal, 18(1): 1-25.

Gwo, J.C., Chiu, J.Y., Chou, C.C. and Cheng, H.Y., 2005. Cryopreservation of a marine microalga, *Nannochloropsis oculata* (Eustigmatophyceae). Cryobiology, 50(3): 338-343.

Guiry, M.D. and Guiry, G.M., 2015. AlgaeBase. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. http://www.algaebase.org; cited 10 March 2015.

Hasan, M.R. and Chakrabarti, R., 2009. Use of algae and aquatic macrophytes as feed in smal-scale aquaculture: a review. FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper. No. 531. Rome, 123p.

Hejazi M.A., Barzegari A., Hosseinzadeh Gharajeh N. and Hejazi M.S., 2010. Introduction of a novel 18S rDNA gene arrangement along with distinct ITS region in the saline water microalga *Dunaliella*. Saline Systems, 6:4.

Hoefman, S., Pommerening-Röser, A., Samyn, E., De Vos, P. and Heylen, K., 2013. Efficient cryopreservation protocol enables accessibility of a broad range of ammonia-oxidizing bacteria for the scientific community. Research in Microbiology, 164(4): 288-292.

Irihimovitch, V. and Yehudai-Resheff, S., 2008. Phosphate and sulfur limitation responses in the chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii*. FEMS Microbiology Letters, 283(1): 1-8.

Jeffrey, S.W. and Humphrey, G.F., 1975. New spectrophotometric equations for determining chlorophylls *a, b, c* and *c2* in higher plants, algal and natural phytoplankton. Biochemie und Physiologie der Pflanzen, 167: 191-194.

John, M.J., 2011. The Freshwater Algal Flora of the British Isles. Cambridge University Press, Cambridge, UK. 702p.

Kawachi, M. and Noël, M.H., 2005. Sterilization and sterile technique. *In*: Andersen R.A. (ed), Algal culturing techniques. Elsevier Academic Press, Burlington, Canada. pp. 65-81.

Komarek, J., 1973. Culture collections. *In*: Carr N.G. and Whitton B.A. (Eds), The biology of blue-green algae. Blackwell Scientific publication, USA. pp. 519-524.

Kopeika, E., Kopeika, J. and Zhang, T., 2007. Cryopreservation of fish sperm. Methods in Molecular Biology, 368: 203-17.

Krumnow, A.A., Sorokulova, I.B., Olsen, E., Globa, L., Barbaree, J.M. and Vodyanoy, V.J., 2009. Preservation of bacteria in natural polymers. Journal of Microbiological Methods, 78(2): 189-194.

Liu, L., Wei, Q., Guo, F. and Zhang, T., 2006. Cryopreservation of Chinese sturgeon (*Acipenser sinensis*) Sperm. Journal of Applied Ichthyology, 22: 384-388.

Melián-Martel, N., Sadhwani, J.J., Malamis, S. and Ochsenkühn-Petropoulou, M., 2012. Structural and chemical characterization of long-term reverse osmosis membrane fouling in a full scale desalination plant. Desalination, 305: 44-53.

McCleary, J., 1987. Vacuum freeze-drying, a method used to salvage water-damaged archival and library materials: a RAMP study with guidelines. General Information Programme and UNISIST. Unesco, Paris:, 63p.

Miller, D.E., Green, J.C. and Shiroyama, T., 1978. The *Selenastrum capricornatum* Printz algal assay bottle test. Experimental Design, application and Data Interpretation Protocol. Environmental Protection Agency, U.S. 126p.

Noroozi, M., Omar, H., Tan, S.G. and Napis, S., 2011. Studies on the Genetic Variation of the Green Unicellular Alga *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae) Obtained from Different Geographical Locations Using

ISSR and RAPD Molecular Marker. Molecules, 16: 2598-2608.

Park, H., 2006. Long-term preservation of bloom-forming cyanobacteria by cryopreservation. Algae, 21(1): 125-1131.

Reddy, C.R.K., Gupta, V. and Jha, B., 2010. Developments in Biotechnology of Red Algae. *In*: Seckbach J. and Chapman D.J (Eds) Red Algae in the Genomic Age. Springer, Netherlands, pp. 307-341.

Richmond, A., 2006. Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology, Blakwell Publishing, Iowa. 588p.

Shearer, J.f. and Jackson, M., 2006. Liquid culturing of microsclerotia of *Mycoleptodiscus terrestris*, a potential biological control agent for the management of hydrilla, Biological Control, 38(3): 298-315.

Si, W., Zheng, P., Li, Y., Dinnyes, A. and Ji, W., 2004. Effect of glycerol and dimethyl sulfoxide on cryopreservation of rhesus monkey (*Macaca mulatta*) sperm. American Journal of Primatology. 62(4): 301-306.

Taylor, R. and Fletcher, R., 1998. Cryopreservation of eukaryotic algae - a review of methodologies. Journal of Applied Phycology, 10(5): 481-501.

Tindal, B., 2007. Vacuum-Drying and Cryopreservation of Prokaryotes. In: Day J. and Stacey G. (ed), Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols, 2nd ed. Humana Press, Totowa, New Jersey. pp. 73–98.

Triemer, R. and Brown Jr, R.M., 1975. The ultrastructure of fertilization in *Chlamydomonas Moewusii*. Protoplasma, 84(3-4): 315-325.

Tzovenis, I., Triantaphyllidis, G., Naihong, X., Chatzinikolaou, E., Papadopoulou, K., Xouri, G. and Tafas, T., 2004. Cryopreservation of marine microalgae and potential toxicity of cryoprotectants to the primary steps of the aquacultural food chain. Aquaculture 230(1–4): 457-47

Wagner, S., Hoffer, S. and Holt, Z., 2005. Comparative Analysis of Two Cryopreservatives on Two Marine Plankton Species: *Isochrysis* and *Pseudo-nitzschia*. UWT Journal on the Environment. 3: 1-8.

Comparison of some freshwater green algae conservation using the of freeze-drying and cryopreservation methods

Fayazi Atdotan E.[1]; Rajabi Islami H.[2*]

[*]rajabi.h@srbiau.ac.ir

1-Department of Fisheries, Islamic Azad University, Rasht Branch, Rasht, Iran.
2-Department of Fisheries, Islamic Azad University, Science and Research Branch, Tehran, Iran.

Keywords: *Chlamydomonas moewusii*, *Scenedesmus obliquus*, *Chlorococcum olefaciens*, Freeze-drying, Cryopreservation.

Abstract

This study was conducted to evaluate the possible conservation of freshwater green algae using the freeze-drying and cryopreservation methods and comparative of their growth potential. Three experimental algae including *Chlamydomonas moewusii*, *Scenedesmus obliquus*, and *Chlorococcum olefaciens* were cultured for 20 days in 6 Erlenmeyer flasks after preparation of Zinder growth medium. Each algal strain was preserved according to freeze-drying and cryopreservation protocols with 9 replications (3 replications for the days of 1, 5, and 10). Algae were then re-incubated and their growth was evaluated in 1, 5, and 10 days after preservation. Another 9 Erlenmeyer flasks for each algal species were prepared as control treatment by adding the respective growth medium to consider the growth of algae in the same days with similar scale. Highest growth of all experimental algae was obtained after 10 days which was significantly higher than the corresponding control treatments ($p<0.05$). However, no significant difference was observed in the growth of *Scenedesmus obliquus* and and *Chlorococcum olefaciens* after freeze-drying and cryopreservation ($p>0.05$). Results of the present study illustrated that both preservative methods are suitable for maintenance of experimental algae, although freeze-drying provided better results in *Chlamydomonas moewusii*.

[*]Corresponding author