

شناسایی مژه دار شکارچی *Stylonychia histriomuscorum* در استخر پرورش روباز ریز جلبک *Dunaliella salina* و بررسی راهکارهای کنترل آن

زهرا امینی خویی^۱، اشکان اژدری^۱، هادی غفاری^۲ و بهزاد خالقی^۳

۱- سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، مرکز تحقیقات شیلات آبهای دور، چابهار، ایران

۲- سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، تهران، ایران

۳- مدیر شرکت جلبک آبی مکران، پارک علم و فناوری استان سیستان و بلوچستان، پردیس چابهار

چکیده

نوع مقاله

مقاله پژوهشی اصیل

دریافت: ۱۴۰۴/۰۴/۲۰

بازنگری: ۱۴۰۴/۰۸/۳۰

پذیرش: ۱۴۰۴/۰۹/۱۵

چاپ الکترونیکی: ۱۴۰۴/۰۹/۲۵

*نویسنده مسئول:

zamini.41@gmail.com

ریز جلبک *Dunaliella salina*، به دلیل توانایی تولید بتاکاروتن طبیعی، یکی از ارزشمندترین منابع بیولوژیکی در صنایع غذایی و دارویی محسوب می‌شود. تولید این ریز جلبک در مقیاس صنعتی در استخرهای کشت روباز متداول است. مزیت این سیستم‌ها هزینه پایین احداث و عملیات و چالش مهم آن‌ها آسیب‌پذیری بالادر برابر آلودگی‌های بیولوژیکی است. یکی از مخرب‌ترین نوع آلودگی در استخرهای روباز کشت *D. salina*، شکارچیان چراگر هستند. بنابراین، شناسایی و یافتن روش‌های کارآمد برای کنترل چراگرهای مزاحم برای تولید موفق *D. salina* در استخرهای روباز ضروری است. در این مطالعه، ابتدا، ریز جلبک *D. salina* در استخر روباز کشت داده شد و پویایی جمعیت آن و چراگرهای مزاحم استخر پرورش روزانه پایش گردید که منجر به شناسایی مژه دار *Stylonychia histriomuscorum* به عنوان چراگر غالب شد. متعاقباً، یک آزمایش کنترل‌شده *in vitro* جهت ارزیابی روش‌های کنترل این مژه دار مزاحم طراحی گردید و تأثیر سه سطح شوری (۱۳۰، ۱۵۰ و ۱۸۰ g/L)، شش سطح pH (۶/۵ تا ۹/۵) و چهار ترکیب شیمیایی (اوره، سولفات آمونیوم، کلرید آمونیوم و نیتрат آمونیوم) بررسی شد. نتایج این تحقیق نشان داد که افزایش شوری تأثیر معنی‌داری بر جمعیت مژه دار *S. histriomuscorum* نداشته است. از طرفی، تغییرات pH سبب کاهش رشد جلبک و جمعیت مژه دار شد. در مقابل، افزودن نیترات آمونیوم سبب کاهش معنی‌دار جمعیت مژه دار مزاحم بدون اثر منفی بر رشد *D. salina* شد. بنابراین، استفاده از غلظت ۰/۵ g/L نیترات آمونیوم یک راهکار مؤثر، برای کنترل آلودگی مژه دار *S. histriomuscorum* در کشت‌های روباز *D. salina* می‌باشد.

کلید واژه‌ها: ریز جلبک، *Dunaliella salina*، استخر روباز، شکارچی و مژه دار.

مقدمه

ریز جلبک‌ها به دلیل توانایی بالا در تولید طیف وسیعی از ترکیبات زیستی ارزشمند نظیر پروتئین‌ها، لیپیدها، پلی‌ساکاریدها، ویتامین‌ها، رنگدانه‌ها و متابولیت‌های زیست فعال، کاربردهای متنوعی در صنایع غذایی، دارویی، آرایشی و بهداشتی، خوراک دام و آبزیان و تولید سوخت‌های زیستی دارند. صنعت تولید ریز جلبک‌ها از دهه ۱۹۴۰ آغاز شده و با شیب نسبتاً کند به پیش رفت (۱). اما در سال‌های اخیر، به دلیل نگرانی‌های اقلیمی، امنیت انرژی و تمایل به مواد مغذی فراسودمند و محصولات بهداشتی، شرکت‌های بیشتری در دنیا در پی توسعه و تولید بالاتر این صنعت می‌باشند (۲).

در این میان، ریز جلبک سبز نمک‌دوست *Dunaliella salina*، به دلیل قابلیت‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی منحصر به فرد خود، از اهمیت ویژه‌ای در زمینه زیست‌فناوری برخوردار است. این گونه قادر است در شرایط تنش محیطی، به ویژه در مواجهه با شوری بالا و نور شدید، مقادیر قابل توجهی از رنگدانه بتاکاروتن را در خود انباشت کند (۳). بتاکاروتن تولیدی توسط *D. salina*، به عنوان یک رنگدانه طبیعی و پیش‌ساز مهم ویتامین A، کاربردهای گسترده‌ای در صنایع غذایی (به عنوان افزودنی غذایی و مکمل)، دارویی (به عنوان آنتی‌اکسیدان و عامل ضدسرطان)، و

آرایی (به عنوان ماده فعال در محصولات مراقبت از پوست) دارد. علاوه بر این، مقاومت بالای *D. salina* در برابر نوسانات شدید شوری و دما، آن را به یک کاندید مناسب برای پرورش در محیط‌های با دمای بالا و شوری زیاد تبدیل کرده است (۴).

پرورش ریزجلبک در مقیاس صنعتی مستلزم انتخاب سیستم‌های کشت کارآمد و اقتصادی می‌باشد. در میان سیستم‌های پرورش موجود، استخرهای روباز^۱ به ویژه استخرهای ریس وی^۲ به دلیل سادگی طراحی، هزینه پایین ساخت و بهره‌برداری، و قابلیت مقیاس پذیری بالا، به عنوان سیستم‌های رایج در تولید مورد استفاده قرار گرفته‌اند. اما، با وجود مزایای سیستم‌های کشت روباز و مقاومت ذاتی *D. salina*، پایداری تولید زیست‌توده در این سیستم‌ها به شدت تحت تأثیر چالش‌های زیستی و محیطی قرار گرفته است (۵). یکی از جدی‌ترین چالش‌ها در استخرهای روباز، آلودگی ناشی از ارگانیسم‌های ناخواسته، به ویژه شکارچیان چراگر (Grazers) است. این موجودات، که غالباً شامل پروتوزوا (Protozoa) مانند مژه‌داران (Ciliates) و آمیب‌ها (Amoebae)، و همچنین روتیفرها (Rotifers) می‌باشند، با مصرف مستقیم سلول‌های ریزجلبک، می‌توانند در مدت زمان کوتاهی موجب کاهش چشمگیر و حتی نابودی کامل زیست‌توده در استخرها شوند. این پدیده نه تنها منجر به خسارات اقتصادی قابل توجهی می‌گردد، بلکه فرایند تولید را نیز مختل می‌سازد. خسارات کشت مستقیماً منجر به زیان‌های اقتصادی شده‌اند. بر اساس تحلیل‌ها، آلودگی بیولوژیکی مسئول ۳۰ درصد موارد شکست کشت در عملیات‌های تجاری تولید ریزجلبک بوده‌اند. هزینه این شکست‌ها چندوجهی است: اولاً، از دست رفتن مستقیم ارزش محصول. دوماً، هدررفت کامل هزینه‌های متغیر تولید مانند مواد مغذی، آب و CO₂ که در کشت تزیق شده‌اند؛ و سوم، هزینه‌های ثابت مرتبط با توقف تولید، نیروی کار برای پاکسازی و تلقیح مجدد استخر که می‌تواند کل چرخه تولید را هفته‌ها به تأخیر اندازد. در مجموع، این خسارات مکرر، هزینه‌های عملیاتی را به شدت افزایش داده و به عنوان یکی از اصلی‌ترین موانع برای دستیابی به سودآوری پایدار در صنعت تولید ریزجلبک شناخته می‌شوند (۶).

برای مقابله با این مشکل، راهکارهای مختلفی مورد بررسی و استفاده قرار گرفته است که از جمله آن روش‌های فیزیکی مانند فیلتراسیون آب (برای حذف شکارچیان بزرگ‌تر) و روش‌های شیمیایی نیز شامل تنظیم pH محیط کشت و کنترل غلظت بی‌کربنات می‌باشند. همچنین، انواع آفت‌کش‌های بیولوژیکی (Biocides) یا سموم برای کنترل مستقیم جمعیت شکارچیان مورد آزمون قرار گرفته‌اند (۷). با این حال، بسیاری از این ترکیبات ممکن است برای سلامتی انسان و محیط زیست مضر باشند و یا بر کیفیت محصول نهایی، به ویژه بتاکاروتن طبیعی که یک محصول غذایی و دارویی است، تأثیر منفی داشته باشند. روش‌های بیولوژیکی نیز، مانند استفاده از باکتری‌های خاص یا ویروس‌ها برای کنترل شکارچیان، در مراحل اولیه تحقیق قرار دارند و هنوز به طور گسترده به کار گرفته نشده‌اند (۸). بنابراین، با توجه به محدودیت‌ها و تأثیرات جانبی روش‌های کنترلی موجود، شناسایی و توسعه راهکارهایی که به طور مؤثر جمعیت شکارچیان را کنترل کرده و در عین حال تأثیر منفی بر رشد ریزجلبک نداشته باشد، به عنوان یک چالش اساسی و حیاتی در صنعت پرورش *D. salina* مطرح است و انجام تحقیقات کاربردی در این زمینه از اهمیت بالایی برخوردار است.

سواحل دریای عمان در منطقه چابهار، به دلیل برخورداری از تعداد قابل توجهی روزهای آفتابی، منابع آب شور طبیعی (نمکزارها و دریا)، و دسترسی به نیروی کار، پتانسیل بالایی برای توسعه کشت صنعتی ریزجلبک *D. salina* دارد. با این حال، استفاده بهینه از این پتانسیل مستلزم درک عمیق از چالش‌های اقلیمی و زیستی منطقه و بهینه‌سازی فرآیندهای کشت متناسب با شرایط خاص اقلیمی و زیستی آن است. بنابراین، این تحقیق با هدف شناسایی گونه غالب شکارچی مزاحم و بررسی اثربخشی روش‌های مختلف برای کنترل آن در استخرهای روباز پرورش ریزجلبک *D. salina* در سواحل چابهار انجام شد.

¹ Open Pond Systems

² Raceway pond

مواد و روش ها

ریز جلبک *D. salina* از کلکسیون پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی شمالغرب کشور (تبریز) تهیه گردید (۹). کشت اولیه در مراحل متوالی از مقیاس آزمایشگاهی (ارلن مایرهای با حجم ۵۰ میلی لیتری تا مخازن ۱۰ لیتری) در محیط کشت اصلاح شده جانسون جدول (۱) و با شوری اولیه ۹۰ گرم در لیتر، دمای 25 ± 2 درجه سانتی گراد، شدت نور، $150 \mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$ تحت شرایط کنترل شده انجام شد (۱۰). محیط کشت به طور مداوم با استفاده از یک پمپ هوادهی کوچک هوادهی گردید تا از ته نشینی سلول ها جلوگیری شود. پس از گذشت ۱۰ روز و رسیدن سلول ها به فاز لگاریتمی رشد، کشت ها به مخازن پلی اتیلنی با ظرفیت های ۳۰۰ و ۱۰۰۰ لیتر منتقل شدند. پس از دستیابی به تراکم مطلوب (حدود 10^6 سلول/میلی لیتر)، مایع تلقیح به استخر روباز با ابعاد 10×2 متر و عمق ۵۰ سانتی متر در سواحل چابهار (با آب دریای فیلتر شده از خلیج چابهار، شوری پایه ۹۰ گرم در لیتر) منتقل گردید. به منظور حفظ شرایط یکنواخت، استخرها به طور مداوم با سیستم پدیل ویل هوادهی شدند تا جریان یکنواختی شکل گیرد.

جدول ۱: محیط کشت اصلاح شده جانسون ریز جلبک *D. salina* (۱۰)

غلظت (mg/L)	ترکیب
۵۰	NaHCO ₃
۱۰۰۰	KNO ₃
۵۰	K ₂ HPO ₄
۵۰	MgSO ₄ ·7H ₂ O
۲۰	CaCl ₂ ·2H ₂ O
۵	Fe-EDTA کلات آهن
	ویز مغذی ها
۲/۸۵	H ₃ BO ₃ اسید بوریک
۱/۸	MnCl ₂ ·4H ₂ O
۰/۲۲	ZnSO ₄ ·7H ₂ O
۰/۰۸	CuSO ₄ ·5H ₂ O
۰/۰۵	Co(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O
۰/۰۲	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O

در این مطالعه، نمونه برداری روزانه از سه نقطه مختلف استخرهای روباز انجام شد. برای این منظور، از بطری های استریل استفاده گردید. نمونه ها از طریق صافی نایلونی با اندازه مش ۴۰ میکرومتر عبور داده شدند تا ذرات بزرگتر از آن ها حذف گردند. نمونه ها در آزمایشگاه با استفاده از میکروسکوپ نوری مدل (YS2-H) و با بزرگنمایی های ۱۰ و ۴۰ برابر مورد بررسی قرار گرفتند (۱۱). ویژگی های مورفولوژیکی شامل اندازه، شکل و تعداد مژه ها به دقت ثبت گردید. به منظور شناسایی شکارچیان موجود، از کلیدهای شناسایی استاندارد استفاده شد (۱۲).

تأثیر سه سطح شوری (۱۳۰، ۱۵۰ و ۱۸۰ گرم در لیتر)، شش سطح pH (۵/۶ تا ۹/۵) و چهار ترکیب شیمیایی شامل اوره، سولفات آمونیوم، کلرید آمونیوم و نیتрат آمونیوم بر کنترل جمعیت *S. histriomuscorum* و رشد *D. salina*، در شرایط آزمایشگاهی ارزیابی شد. تنظیم شوری با افزودن نمک و pH با HCl/NaOH انجام شد (۱۳). گروه های کنترل شامل: کنترل مثبت (کشت آلوده بدون تیمار) و کنترل منفی (کشت سالم بدون آلودگی) تعیین شدند. به منظور شبیه سازی آلودگی طبیعی، مژه دار *S. histriomuscorum* با تراکم اولیه حدود 650 سلول در هر میلی لیتر به کشت های *D. salina* تلقیح گردید.

به منظور بررسی جمعیت ریز جلبک *D. salina* و مژه دار چراگر *S. histriomuscorum* شمارش منظم تعداد سلول های ریز جلبک با استفاده از لام هموسیستمتر و چراگر با استفاده از لام سدویک-رافتر Sedgewick-Rafter انجام شد. جذب نوری یا تراکم سلولی ریز جلبک *D. salina*

با اندازه‌گیری جذب نوری در طول موج ۷۵۰ نانومتر در دستگاه اسپکتروفوتومتر (Evolution™ 300 UV-Vis Spectrophotometer) تعیین شد و اعتبارسنجی آن با شمارش مستقیم در هموسیتومتر صورت گرفت (۱۴).

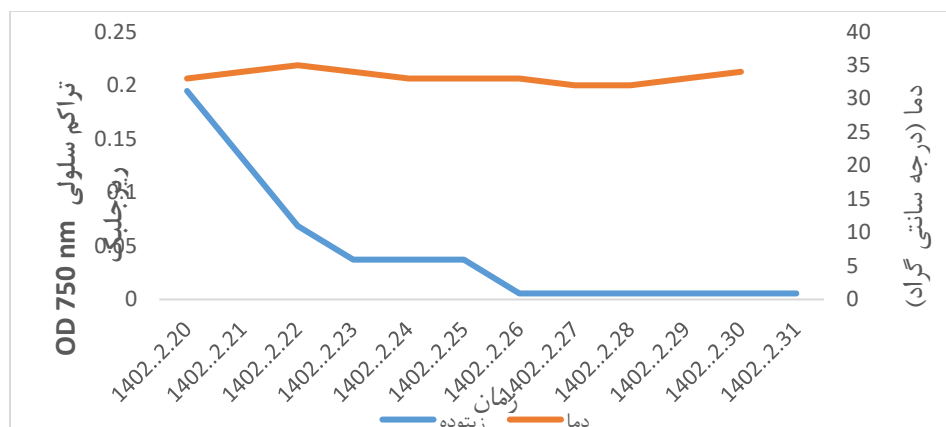
داده‌های به‌دست‌آمده از آزمایش‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۶ تحلیل شدند. برای مقایسه میانگین جمعیت *S. histriomuscorum* و تراکم *D. salina* در تیمارهای مختلف، از آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه (ANOVA) استفاده شد. در صورت معنی‌دار بودن نتایج ($p < 0/05$)، آزمون توکی (Tukey's HSD) برای شناسایی تفاوت‌های بین تیمارها انجام شد. این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار اجرا شد.

نتایج

کشت ریز جلبک *D. salina* از ۲۰ لغایت ۳۱ اردیبهشت ماه ۱۴۰۲ در استخرهای روباز ریس وی در سواحل چابهار صورت گرفت. تغییرات دما در بازه زمانی مورد نظر از ۳۲ تا ۳۴ درجه متغیر بود. شدت نور دریافتی در زمان پرورش از ۳۹۲ تا ۶۹۴ میکرومول بر متر مربع بر ثانیه تغییر کرد. رنگ استخر در روز اول تا چهارم از رنگ سبز به قهوه‌ای روشن متغیر بود (شکل شماره ۱). بر اساس اطلاعات به دست آمده، نرخ رشد ویژه ریز جلبک *D. salina* از ۰/۱۹ در زمان آغاز رشد تا ۰/۰۴ در روز چهارم دوره پرورش کاهش یافت و سپس تا ۰/۰۲ و کراش کامل تا روز هفتم ادامه یافت (شکل شماره ۲).



شکل ۱- استخرهای ریس وی روباز کشت ریز جلبک *D. salina* در سواحل چابهار



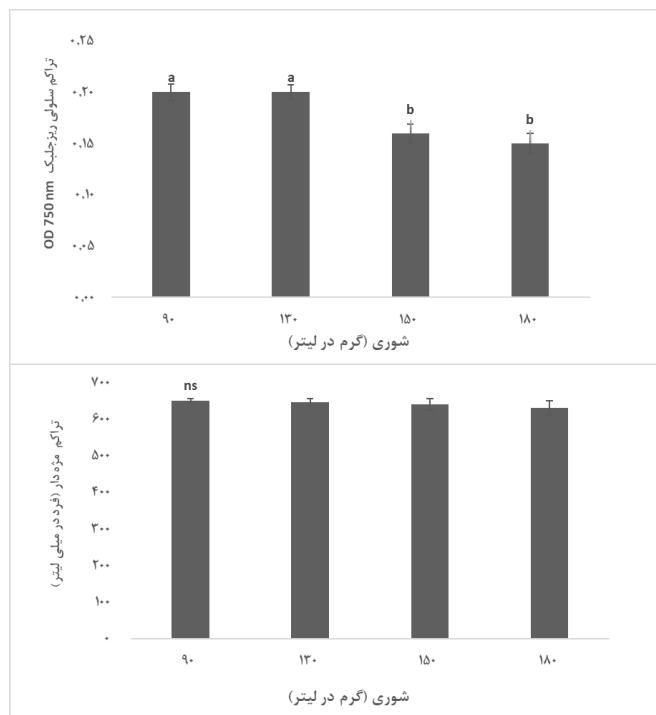
شکل ۲- نرخ رشد ویژه ریزجلبک *D. salina* در استخرهای ریس وی روباز در سواحل چابهار

مشاهدات میکروسکوپی نمونه‌های جمع‌آوری شده از روز اول تا هفتم پس از کشت در استخرهای روباز پرورش *D. salina* نشان داد که شکارچی غالب در این استخر، مژه‌دار *S. histriomuscorum* است. در همه نمونه‌های استخر این شکارچی در حال تغذیه از ریزجلبک *D. salina* مشاهده شد. فراوانی این مژه دار مهاجم در کشت آلوده از روز چهارم تا هفتم پس از تلقیح از ۲۵ تا ۶۵۰ فرد در میلی لیتر افزایش یافت. از نظر ریخت شناسی این گونه بیضوی شکل و کشیده با اندازه تقریبی ۱۰۰ میکرومتر و با انعطاف بدنی و تعداد زیاد مژه در اطراف بدن قابل تشخیص است. در شکل شماره ۳، مژه‌دار *S. shistriomuscorum* با سلول *D. salina* در داخل بدن قابل مشاهده است.



شکل ۳- عکس میکروسکوپی از شکارچی مژه‌دار *S. histriomuscorum* شناسایی شده در استخرهای روباز پرورش ریزجلبک

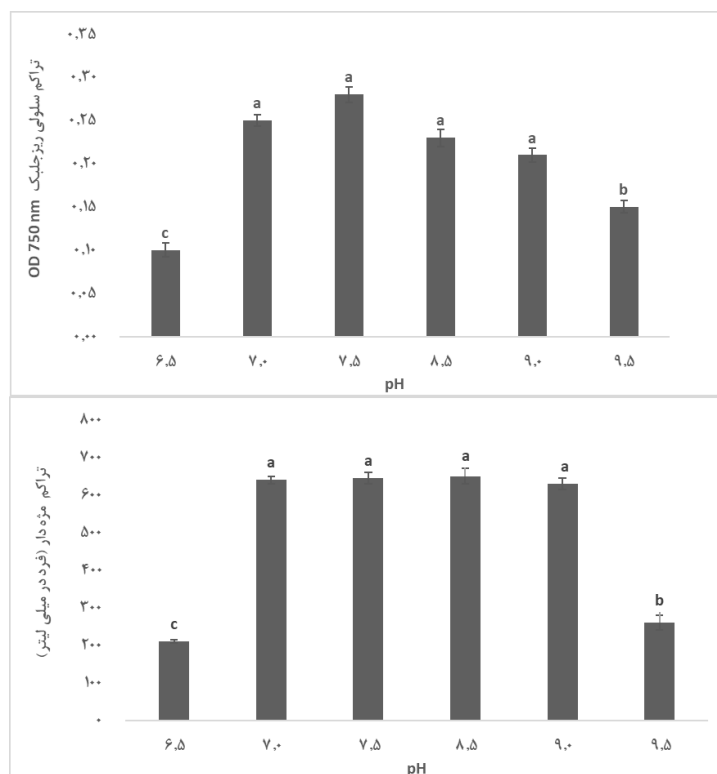
در شکل شماره ۴، نرخ رشد ویژه ریزجلبک *D. salina* در هر سه سطح شوری نشان داده شده است. نتایج تحلیل آماری نشان داد که با افزایش سطح شوری از ۹۰ تا ۱۸۰ گرم در لیتر تراکم سلول‌های ریزجلبک *D. salina* به طور معنی داری کاهش یافت. به طوری که، پایین ترین نرخ رشد در شوری ۱۸۰ گرم مشاهده شد (شکل شماره ۴ الف). مقایسه جمعیت مژه دار در گروه‌های مختلف شوری نشان داد که تغییرات ناگهانی شوری از ۹۰ تا ۱۸۰ گرم در لیتر تاثیر معنی داری در تراکم مژه داران مهاجم نداشته است (شکل شماره ۴ ب).



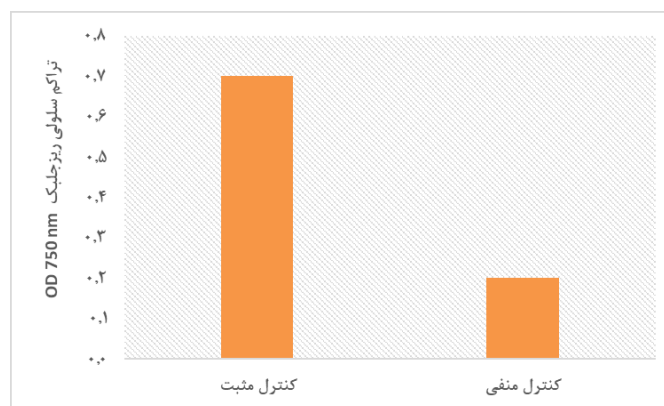
شکل ۴ (الف و ب) - تأثیر سطوح مختلف شوری بر تراکم سلول‌های ریز جلبک *D. salina* و مژه دار شکارچی *S. histriomuscorum*

نتایج تحلیل آماری نشان داد که pH محیط کشت در دامنه pH ۶/۵ تا ۹/۵ تأثیر معنی داری بر روند رشد و تکثیر سلول‌های ریز جلبک *D. salina* داشته است. در تیمارهای با محیط کشت pH اسیدی ۶/۵ و قلیایی ۹/۵ روند رشد سلولی کاهش یافت. تغییرات pH در بازه ۷ تا ۹ تأثیر معنی داری بر روند رشد و تراکم سلولی نداشت (شکل شماره ۵ الف). همچنین تغییر در pH اسیدی ۶/۵ تا ۹/۵ و قلیایی ۹/۵ منجر به از بین رفتن سلول‌های مژه دار شکارچی *S. histriomuscorum* شد. مژه دار مقاومت بالایی در pH ۷ تا ۹ از خود نشان داد و تراکم سلولی آن در بازه زمانی ۹۶ ساعت اختلاف معنی داری با یکدیگر نداشتند (شکل شماره ۵ ب).

در این پژوهش، تأثیر چهار ترکیب شیمیایی نیتروژن دار شامل اوره، سولفات آمونیوم، کلرید آمونیوم و نترات آمونیوم بر رشد ریز جلبک طی یک دوره ۹۶ ساعت مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس آنالیزهای آماری نوع و غلظت ترکیبات شیمیایی اوره، سولفات آمونیوم، کلرید آمونیوم و نترات آمونیوم تأثیر معنی داری بر جمعیت ریز جلبک *D. salina* و مژه دار *S. histriomuscorum* نداشته است. نتایج نشان داد که در کشت‌های کنترل مثبت که فاقد مواد شیمیایی و آلودگی مژه دار *S. histriomuscorum* بودند، تراکم سلولی طی ۹۶ ساعت از جذب نوری اولیه ۰/۳ در طول موج ۷۵۰ نانومتر به حدود ۰/۷ رسید. در گروه کنترل منفی، کشت‌های آلوده شده با تراکم اولیه ۳۰ فرد در میلی‌لیتر مهاجم *S. histriomuscorum* که تحت هیچ‌گونه تیمار شیمیایی قرار نداشت، پس از ۹۶ ساعت، تراکم این مژه‌دار به ۶۱۰ سلول بر میلی‌لیتر افزایش یافت، در حالی که تراکم سلولی بر اساس شاخص جذب نوری (OD750) به حدود ۰/۲ کاهش رسید.



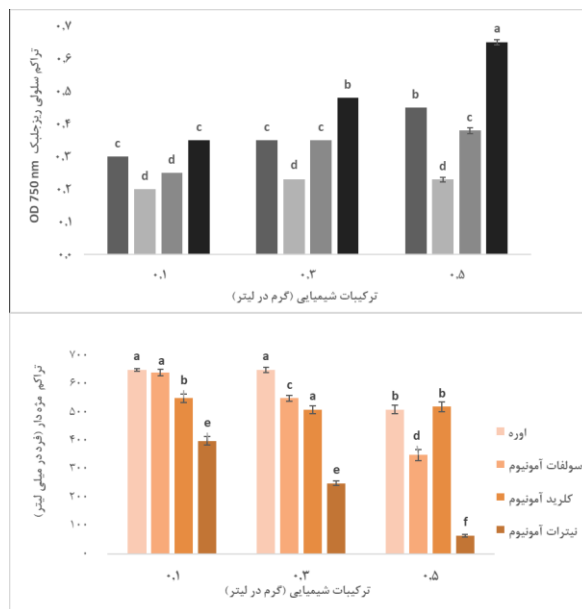
شکل شماره ۵ (الف و ب) - تأثیر سطوح مختلف pH بر تراکم سلول‌های ریزجلبک *D. salina* و مژه دار *S. histriomuscorum*



شکل ۶- نمودارهای کنترل مثبت و کنترل منفی تأثیر مواد شیمیایی بر تراکم سلول‌های ریزجلبک *D. salina*

نوع و غلظت منبع نیتروژن منجر به اختلاف معنی داری در روند رشد و تکثیر سلول‌های ریزجلبک و جمعیت مژه‌داران مورد آزمایش شد (شکل شماره ۷). در تیمارهای اوره با افزایش غلظت اوره از ۰/۳ تا ۰/۵ گرم در لیتر اختلاف معنی داری در روند رشد ریزجلبک *D. salina* مشاهده شد. به طوری که میزان جذب نوری نمونه از ۰/۳۵ تا ۰/۴۵ افزایش یافت. شمارش سلول‌های مژه دار در غلظت‌های مختلف اوره نشان داد که استفاده از این ترکیب در غلظت ۰/۵ گرم در لیتر تأثیر معنی داری بر کاهش جمعیت مژه دار داشته است و فراوانی آن را از ۶۵۰ سلول تا ۲۱۰

کاهش داده است. در محیط کشت های ریزجلبک که از سولفات آمونیوم و کلرید آمونیوم برای مقابله با مژه دار مهاجم استفاده شد مشخص شد که این دو ترکیب تاثیر منفی بر روند رشد جلبک داشته و باعث کاهش جذب نوری به ترتیب تا ۰/۲۳ و ۰/۳۸ شده اند. در مقابل استفاده از این مواد شیمیایی به ترتیب جمعیت مژه داران را تا ۱۵۰ و ۲۲۰ فرد در هر میلی لیتر کاهش داده است. نتایج آنالیز داده های رشد ریزجلبک در تیمار نیترات آمونیوم نشان داد که با افزایش غلظت این ماده روند رشد سلولی نسبتا به شکل مناسب تری افزایش یافته است و جذب نوری نمونه پس از ۹۶ ساعت رشد در غلظت های ۰/۳ و ۰/۵ تا حدود ۰/۴۸ و ۰/۶۵ افزایش یافت. در مقابل به کار بردن این ترکیب سبب شد تا جمعیت مژه دار مهاجم به طور معنی داری کاهش یابد. به طور یکه مصرف ۰/۳ و ۰/۵ گرم در لیتر از نیترات آمونیوم سبب شد تا جمعیت *S. histriomuscorum* به ترتیب تا ۷۰ و ۲۰ فرد در هر میلی لیتر کاهش یابد.



شکل ۷ الف و ب - تأثیر ترکیبات شیمیایی بر تراکم سلول های ریزجلبک *D. salina* و مژه دار *S. histriomuscorum*

بحث

کشت ریزجلبک در استخرهای روباز غالباً تحت تاثیر مهاجمان شکارچی است و برای موفقیت در این سیستم، مدیریت کنترل آفات ضروری است. بر این اساس، تکنیک هایی که رشد جلبک های هدف را تقویت کرده و چراگرها را کنترل می کنند بایستی شناسایی شوند (۶). اولین گام در مدیریت چرا، جداسازی چرندگان و شناسایی آنها است. در مرحله بعد یافتن روش هایی برای مبارزه و یا کنترل آنها است (۶، ۱۲). در تحقیق حاضر، در حین پایش استخرهای روباز ریزجلبک حضور چراگرهای مهاجم در کشت های روباز ردیابی شد. و با نمونه برداری های روزانه نرخ رشد ریزجلبک و چراگر مهاجم سنجش شد. روند تکثیر ریزجلبک از روز اول تا چهارم با سرعت کاهش یافت و تا روز هفتم غلبه شکارچی مهاجم کامل و کشت ریزجلبک با سقوط سریع یا کراش^۳ مواجه شد. با مشاهدات دقیق میکروسکوپی و بررسی های مورفولوژیکی مژه دار مهاجم *S. histriomuscorum* شناسایی شد. تراکم این مژه در استخرهای پرورش در ۹۶ ساعت اولیه از ۳۰ تا ۶۵۰ فرد در هر میلی لیتر رسید. این گونه یک پروتوزوا مژه دار از رده سیلیافورا (Ciliophora) تشخیص داده شد. از نظر اندازه این مهاجم نسبت به ژئوپلانکتون های رایج مانند کلادوسراها کوچک تر بود. این مژه دار چراگر با داشتن اندام حرکتی یا مژه های بسیار فعال با تراکم بالا در اطراف بدن تعداد بسیار زیادی از سلول های

³ crash

ریزجلبک را به دام انداخته و از آن تغذیه کرد و در نتیجه آسیب زیادی را به کشت ریزجلبک وارد کرد. به طور مشابه در مطالعه Hu و همکاران (۲۰۱۸) نیز مشاهده شد که در کشت های ریزجلبک *Chlamydomonas reinhardtii* SAG 77.81 که با تراکم اولیه پایین ۲۵ سلول در میلی لیتر با *S. histriomuscorum* آلوده شدند جمعیت آن در ۷۲ ساعت به ۷۰۰ سلول در میلی لیتر رسید. این آلودگی تأثیر چشمگیری بر کاهش زیست توده جلبک داشته و منجر به سقوط سریع (crash) کشت شد (۱۵). در مطالعات مختلف کشت های روباز سویه های مختلف از چراگر ردیابی شده است. برای هر یک از آنها آستانه بحرانی متفاوتی گزارش شده است. برای مثال، آستانه بحرانی تأثیر دو چراگر *Euplotes* sp. و *Oxyrrhis* sp. بر ریزجلبک *C. vulgaris* به ترتیب حدود ۲۰۰۰/۵ سلول در هر میلی لیتر و ۵۰۰۰ سلول در هر میلی لیتر مشاهده شد (۱۶). Wang و همکاران در سال ۲۰۱۶ دریافتند که از ۱۶ گونه میکروژوپلانکتون شناسایی شده در کشت انبوه روباز *Arthrospira platensis*، روتیفر *Brachionus plicatilis* آلاینده اصلی بود که سبب بیشترین کاهش در زیست توده آن شد. در سیستم آب شور کشت *A. platensis*، مژه دار مهاجم گونه *Frontonia didieri* شناسایی شد. مهم ترین چراگران زئوپلانکتون رایج در کشت های ریزجلبک اغلب شامل پروتوزوا، دینوفلاژله ها، آمیب ها و مژه داران می باشند. در این میان اغلب، مژه داران فراوان ترین گروه و آمیب ها کمترین فراوانی را داشتند (۱۷). بر اساس مطالعات مختلف، چراگرهای زئوپلانکتون که از فیتوپلانکتون های کشت شده تغذیه می کنند، شامل گروه های متنوعی از جانوران میکروسکوپی از جمله پروتوزوا، روتیفرها، کپه پودها، کلادوسراها و اوستراکودها می شوند. از نظر مورفولوژی (شکل ظاهری)، این گروه ها تفاوت های قابل توجهی دارند؛ پروتوزواها تک سلولی و یوکاریوتی بوده و اندازه آن ها از میکروسکوپی بسیار کوچک (مانند برخی گونه های تاژک دار) تا گونه های غول پیکر متغیر است. در زمینه سیستم تغذیه، این چراگرها روش های متنوعی برای مصرف فیتوپلانکتون ها و سایر ذرات دارند: برخی مانند بسیاری از روتیفرها و اوستراکودها فیلترکننده هستند. برخی دیگر مانند کپه پودها و برخی پروتوزواها تغذیه کننده معلق هستند که ذرات طعمه را شکار می کنند. پروتوزواها می توانند با فاگوسیتوز (دربرجرفتن) ذرات غذا مانند آمیب ها، یا با هدایت ذرات به دهان با استفاده از مژه ها تغذیه کنند. روتیفرها همچنین می توانند خوردکننده های سطحی باشند. بسیاری از این شکارچیان علاوه بر فیتوپلانکتون، از دتریتوس آلی و سایر طعمه های زنده مانند باکتری ها و سایر زئوپلانکتون های کوچک تر نیز تغذیه می کنند. انتخاب طعمه توسط چراگرها به عواملی مانند اندازه و مورفولوژی سلول فیتوپلانکتون و همچنین اندازه و محدودیت های فیزیکی شکارچی برای گرفتن طعمه بستگی دارد. نرخ تغذیه نیز می تواند بین گونه های مختلف چراگر بسیار متفاوت باشد. گروه های مختلف استراتژی های تغذیه متنوع و نرخ های تولید مثل متفاوت دارند. بنابراین ضروری است که رفتارشناسی آنها مطالعه شود تا روش های مقابله مناسب با آنها تشخیص داده شود (۱۸). نتایج این مطالعه نشان داد که افزایش شوری تا ۱۸۰ گرم در لیتر سبب کاهش روند رشد ریزجلبک شده در حالی که تأثیر معنی داری بر کاهش جمعیت *S. histriomuscorum* نداشت. این نتیجه نشان می دهد که تنظیم شوری به تنهایی نمی تواند راهکار مؤثری برای کنترل آلودگی های زیستی در کشت *D. salina* باشد، به ویژه در مناطقی که شوری محیط به طور طبیعی بالاست. در مقابل، تنظیم pH تا سطح ۶/۵ به کاهش همزمان جمعیت *D. salina* و *S. histriomuscorum* منجر شد، که این امر کاربرد آن را به عنوان یک راهکار عملی محدود می کند. این یافته با گزارش های Wang و همکاران (۲۰۱۳) در مورد تأثیر pH پایین بر کاهش رشد ریزجلبک ها همخوانی دارد، که نشان دهنده حساسیت *D. salina* به تغییرات pH است. این محدودیت نشان می دهد که تنظیم pH، اگرچه ممکن است بر شکارچیان تأثیر بگذارد، به دلیل اثرات منفی بر ریزجلبک هدف، گزینه ای مناسب برای مدیریت آلودگی زیستی نیست. این نتیجه بر نیاز به روش های انتخابی تر برای کنترل شکارچیان تأکید می کند، که تأثیر حداقلی بر رشد ریزجلبک داشته باشند (۱۹). در تحقیق حاضر، همچنین تأثیر چهار ترکیب شیمیایی نیتروژن دار برای مقابله با چراگر مهاجم بررسی شد. نتایج نشان داد که استفاده از نیترات آمونیوم با غلظت ۰/۵ گرم در لیتر، تکثیر *S. histriomuscorum* را به طور معنی داری مهار کرد، در حالی که رشد *D. salina* کاهش معنی داری نشان نداد. این یافته حاکی از آن است که نیترات آمونیوم می تواند به عنوان یک روش کارآمد برای کنترل آلودگی زیستی در پرورش *D. salina* مورد استفاده قرار گیرد. مکانیسم تأثیر نیترات آمونیوم در مهار تکثیر شکارچی می تواند مربوط به اثرات سمی احتمالی آمونیوم بر ساختار سلولی یا فرآیندهای متابولیکی مژه دار نسبت داده شود. از سوی دیگر، *D. salina* به دلیل توانایی خود در استفاده

از نیترات به عنوان منبع نیتروژن، تحت تاثیر منفی قرار نگرفت، که این تفاوت در پاسخ فیزیولوژیکی، عامل کارآمدی این روش تشخیص داده شد. نیترات آمونیوم به دلیل انتخاب پذیری خود (تاثیر بر شکارچی بدون آسیب به *D. salina* از اهمیت ویژه ای برخوردار است. بر اساس مطالعات پیشین، افزایش غلظت آمونیاک آزاد تا ۲۰ میلی گرم در لیتر با ایجاد شرایط سمی برای چراگرها، جمعیت *Brachionus rubens* و *Diaphanosoma brachyurum* را کاهش داد (۲۰). ترکیب کینین سولفات نیز با اثر بر پروتوزوآها، جمعیت *Brachionus calyciflorus* را کاهش داد (۲۱). این ترکیبات اگرچه برای کنترل چراگرها موثر واقع شده اند، اما هزینه تولید و پایداری محیطی آنها بسیار بالا می باشد. انتخاب ترکیبات شیمیایی مناسب به عواملی مانند نوع چراگر، مقیاس سیستم کشت، هزینه و الزامات محصول نهایی بستگی دارد. این احتمال که چرندگان ممکن است در برابر مواد شیمیایی مقاومت کنند باید در نظر گرفته شود. یکی از راهبردها برای تعدیل این خطر، استفاده متناوب از ماده شیمیایی تنها در مواقع ضروری است. به نظر می رسد تلفیق روش های شیمیایی و فیزیکی با توجه به نوع جلبک، نوع چراگر و شرایط محیطی برای کنترل چراگران رویکرد مناسبی باشد. بنابراین تحقیقات بیشتر در زمینه شناسایی چراگران و توسعه روش های جدید کنترل ضروری است.

نتیجه گیری نهایی

نتایج این پژوهش نشان داد که کنترل آلودگی مژه دار شکارچی *S. histriomuscorum* در استخر پرورش روباز ریز-جلبک *D. salina* به روش شیمیایی و با استفاده از نیترات آمونیوم قابل انجام است. این ترکیب کم هزینه یکی از جدی ترین موانع تولید تجاری *D. salina* را مرتفع می سازد. مزیت برجسته این روش به سمیت انتخابی آن مرتبط است؛ برخلاف تیمارهای فیزیکی که به طور غیر اختصاصی به هر دو ارگانسیم آسیب رساندند، نیترات آمونیوم بدون آنکه بر رشد ریزجلبک تاثیر منفی نداشته باشد به طور مؤثری شکارچی را حذف کرد. اهمیت این یافته در این است که از یک ماده مغذی می توان برای مدیریت آلودگی استفاده کرد که نه تنها از نظر اقتصادی مقرون به صرفه است، بلکه پایداری اکوسیستم کشت را نیز بهبود داده است.

تشکر و قدردانی: از همکاری های ارزشمند کارشناس فنی مرکز تحقیقات شیلات آب های دور چابهار آقای خالد دشتی و آقای بیژن آژنگ که با دانش و مهارت تخصصی خود به سرانجام رسیدن این تحقیق کمک شایانی کردند، تشکر و قدر دانی می کنم.

تعارض منافع: در این مقاله موردی از تعارض منافع توسط نویسندگان گزارش نشده است.

تأییدیه اخلاقی: هیچ موردی توسط نویسندگان گزارش نشده است.

سهم نویسندگان: زهرا امینی خوئی: طراحی روش شناسی، فرضیات تحقیق، تحلیل داده ها، اندازه گیری داده ها و ارائه نسخه نهایی مقاله. هادی غفاری: تحلیل های آماری داده های آزمایشگاهی اشکان اژدری: طراحی آزمایش و تحلیل های آزمایشگاهی و بهزاد خالقی: آزمون های آزمایشگاهی و تحلیل داده ها. تمامی نویسندگان موافق ارائه این مقاله به مجله علوم شیلاتی هستند.

منابع مالی/حمایت: پژوهش حاضر حاصل پروژه تحقیقاتی با کد مصوب ۱۳-۷۸-۱۲۰۵-۰۴-۱۰۱۳-۰۱۰۲۴۵ موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور است.

منابع

1. Coutinho P, Ribeiro MP, Miguel SP. Biomedical applications of microalgae based on anticancer and antimicrobial activities. *Algae Biotechnology for Biomedical and Nutritional Applications*. 2025:47-68.
2. Balavigneswaran C, Kumar TSJ, Packiaraj RM, Veeraraj A, Prakash S. Anti-oxidant activity of polysaccharides extracted from *Isocrysis galbana* using RSM optimized conditions. *International journal of biological macromolecules*. 2013;60:100-8.

3. Ben Amor F, Elleuch F, Ben Hlima H, Garnier M, Saint-Jean B, Barkallah M, et al. Proteomic Analysis of the Chlorophyta *Dunaliella* New Strain AL-1 Revealed Global Changes of Metabolism during High Carotenoid Production. *Marine Drugs*. 2017;15(9).
4. Barbosa M, Inácio LG, Afonso C, Maranhão P. The microalga *Dunaliella* and its applications: a review. *Applied Phycology*. 2023;4:99 - 120.
5. Pulgarin A, Decker J, Chen J, Giannakis S, Ludwig C, Refardt D, et al. Effective removal of the rotifer *Brachionus calyciflorus* from a *Chlorella vulgaris* microalgal culture by homogeneous solar photo-Fenton at neutral pH. *Water research*. 2022;226:119301.
6. Fernandez-Valenzuela S, Chávez-Ruvalcaba F, Beltrán-Rocha JC, San Claudio PM, Reyna-Martínez R. Isolation and Culturing Axenic Microalgae: Mini-Review. *The Open Microbiology Journal*. 2021;15: 111-9.
7. Ma M, Wei C, Huang W, He Y, Gong Y, Hu Q. A systematic review of the predatory contaminant *Poteroochromonas* in microalgal culture. *Journal of Applied Phycology*. 2023;35:1103-14.
8. Molina-Aulestia DT, Soccol CR, Júnior AIM, González-Marín OI, Souza CGd, Medeiros ABP, et al. Resistance of *Neochloris oleoabundans* to six terpenes applicable as green contamination control agents. *Journal of Applied Phycology*. 2021;34:261 - 7.
9. Hejazi MA, Barzegari A, Gharajeh NH, Hejazi MS. Introduction of a novel 18S rDNA gene arrangement along with distinct ITS region in the saline water microalga *Dunaliella*. *Saline Systems*. 2010;6(4):4-15.
10. Hejazi MA, Holwerda EK, Wijffels RH. Milking microalga *Dunaliella salina* for β -carotene production in two-phase bioreactors. *Biotechnology and Bioengineering*. 2004;85(5):475-81.
11. Markina ZV, Maslennikov SI, Botsun LA. Application of the Spectrophotometric Method for Determination of the Cell Numbers of Microalgae in the Genus *Tetraselmis* (Chlorophyta): Calibration Curves and Equations for Calculation. *Russian Journal of Marine Biology*. 2022;48:525-8.
12. Foissner W, Berger H. A user-friendly guide to the ciliates (Protozoa, Ciliophora) commonly used by hydrobiologists as bioindicators in rivers, lakes, and waste waters, with notes on their ecology. *Freshwater Biology*. 1996;35:375-482.
13. Zhuo-ping C. Optical density method and cell count method for determining the growth of three energy microalgae and their correlation and verification. *Journal of Southern Agriculture*. 2012.
14. Zhou Z, editor *Investigation on Relationships between Optical Properties and Cell Concentrations of Microalgae* 2018.
15. Hue NTK, Deruyck B, Decaestecker E, Vandamme D, Muylaert K. Natural chemicals produced by marine microalgae as predator deterrents can be used to control ciliates contamination in microalgal cultures. *Algal research*. 2018;29:297-303.
16. Molina-Grima E, García-Camacho F, Acien-Fernández FG, Sánchez-Mirón A, Plouviez M, Shene C, et al. Pathogens and predators impacting commercial production of microalgae and cyanobacteria. *Biotechnology advances*. 2022;55:107884.
17. Wang L, Yuan D, Li Y, Ma M, Hu Q, Gong Y. Contaminating microzooplankton in outdoor microalgal mass culture systems: An ecological viewpoint. *Algal research*. 2016;20:258-66.
18. Uzuka A, Kobayashi Y, Onuma R, Hirooka S, Kanesaki Y, Yoshikawa H, et al. Responses of unicellular predators to cope with the phototoxicity of photosynthetic prey. *Nature Communications*. 2019;10(1):5606.
19. Wang H, Zhang W, Chen L, Wang J, Liu T. The contamination and control of biological pollutants in mass cultivation of microalgae. *Bioresource technology*. 2013;128:745-50.
20. Lincoln E, Hall T, Koopman B. Zooplankton control in mass algal cultures. *Aquaculture*. 1983;32(3-4):331-7.
21. Xu C, Wu K, Van Ginkel SW, Igou T, Lee HJ, Bhargava A, et al. The use of the schizonticidal agent quinine sulfate to prevent pond crashes for algal-biofuel production. *International journal of molecular sciences*. 2015;16(11):27450-6

Identification of the predatory ciliate *S. histriomuscorum* in Open-pond cultivation of the microalga, *Dunaliella salina* and investigation of its control strategies

Zahra Aminikhoei¹, Ashkan Ajdari¹, Hadi Ghaffari², and Behzad Khallaghi³

1-Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Iranian Fisheries Science Research Institute (IFSRI), offshore fisheries Research Center, Chabahar, Iran.

2- Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Iranian Fisheries Science Research Institute (IFSRI), Tehran, Iran.

3- Makran Blue Algae Company, Science and Technology Park of Sistan and Baluchestan Province, Chabahar Campus, Iran.

ABSTRACT

The microalga *Dunaliella salina* is a valuable biological source in the food and pharmaceutical industries due to its ability to produce natural beta-carotene. Its industrial-scale production relies on open pond cultivation systems, which are cost-effective but highly vulnerable to biological contamination, particularly from predatory grazers. Therefore, identifying and developing efficient control methods for these grazers is essential for the successful cultivation of *D. salina*. In this study, the ciliate *Stylonychia histriomuscorum* was first identified as the dominant grazer in an open pond culture by monitoring population dynamics daily. Subsequently, a controlled *in vitro* experiment was designed to evaluate methods for its control. The effects of three salinity levels (130, 150, and 180 g/L), six pH levels (6.5 to 9.5), and four chemical compounds (urea, ammonium sulfate, ammonium chloride, and ammonium nitrate) were investigated. Results showed that increased salinity had no significant effect on the *S. histriomuscorum* population, while pH alterations negatively affected both the alga and the ciliate. In contrast, the addition of ammonium nitrate significantly reduced the grazer population with no adverse effects on *D. salina* growth. Therefore, using 0.5 g/L of ammonium nitrate is an effective strategy for controlling *S. histriomuscorum* contamination in open pond cultures of *D. salina*.

KEYWORDS: Microalgae, *Dunaliella salina*, Open Pond, Predator and Ciliate

ARTICLE TYPE

Original Research

ARTICLE HISTORY

Received: July 10, 2025

Revised: November 21, 2025

Accepted: December 6, 2025

Online Publication:
December 16, 2025

* Corresponding Author:

Email address:

Tel:

© Published by Tarbiat Modares University

ISSN: 2322-5513