# باکتری‌های غالب محیط‌های کشت آنتن منشعب *Daphnia magna* و سیکلوپس خاردار *Acanthocyclops robustus*

**رامین شرفی[1]، امیدوار فرهادیان[1*] و محسن سلیمانی[1]**

۱. دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان، ایران

[*] نویسنده مسئول: omfarhad@cc.iut.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۳/۱۱/۲۶ تاریخ پذیرش: ۹۴/۶/۸

## چکیده

باکتریها و زئوپلانکتونها عناصر مهم در شبکه غذایی پلاژیک هستند و نقش مهمی را در فرآیندهای بیوژئوشیمیایی دارند. در این تحقیق باکتری های غالب در محیطهای کشت آنتن منشعب (*Daphnia magna*) و خاردار (*Acanthocyclops robustus*) تغذیه شده با کود (گاوی+ مرغی به نسبت ۱:۱ وزنی)، سبزیجات (جعفری+ اسفناج +گشنیز به نسبت ۱:۱:۱ وزنی) و جلبک سندسموس (*Scenedesmus quadricauda*) بررسی گردید. نتایج نشان داد که در کشت *D. magna* با کود و سبزیجات دارای باکتریهای جنس *Acinetobacter* و برای کشت با جلبک سندسموس باکتریهای جنس *Aeromonas* غالب بودند در حالیکه در کشت *A. robustus* تغذیه شده با کود، سبزیجات و جلبک سندسموس به ترتیب جنس های *Neisseria*، *Enterobacteria* و *Alcaligenes* غالب شدند. جیره های مختلف غذایی تاثیر معنی داری را بر میزان تراکم *D. magna* و *A. robustus* ، جمعیت باکتریها، BOD و COD محیط کشت داشتند (P<۰/۰۵). بالاترین میزان جمعیت باکتریایی محیط کشت *D. magna* در تغذیه با جلبک سندسموس (۵×۱۰^۴ cell/ml) و کمترین در کود (۹×۱۰^۳ cell/ml) بدست آمد. همچنین در کشت *A. robustus* با سبزیجات و جلبک سندسموس به ترتیب بالاترین و کمترین میزان جمعیت باکتریایی ۱/۴×۱۰^۴ cell/ml و ۵×۱۰^۳ cell/ml بدست آمد. بیشترین میزان BOD در کشت *A. robustus* تغذیه شده با سبزیجات (۹۰ میلی گرم در لیتر) و کمترین آن درکشت *D. magna* تغذیه شده با کود (۲۸ میلی گرم در لیتر) بدست آمد. بیشترین میزان COD (۳۱۳ میلی گرم در لیتر) و کمترین آن (۴۳ میلی گرم در لیتر) به ترتیب در *A. robustus* تغذیه شده با سبزیجات و جلبک سندسموس بدست آمد. علاوه بر این، پارامترهای BOD، COD و جمعیت باکتریایی همبستگی معنی داری با تراکم جمعیت *D. magna* و *A. robustus* داشت (P<۰/۰۵). بطورکلی، یافته های این تحقیق نشان داد که نوع باکتریها و تراکم جمعیت آنها در محیطهای کشت زئوپلانکتونی به گونه زئوپلانکتون و جیره غذایی آنها در طی پرورش بستگی دارد.

**واژگان کلیدی:** باکتریها، زئوپلانکتون، جلبک سندسموس، کود، سبزیجات، BOD، COD

## مقدمه

زئوپلانکتون‌ها موجودات میکروسکوپی فاقد قدرت جابجایی و حرکات قابل ملاحظه هستند که با کمک جریان آب حرکت می‌کنند. روتیفرها، آنتن منشعب ها، پاروپایان و استراکودها گروه اصلی زئوپلانکتونی را تشکیل می دهند. زئوپلانکتون ها به عنوان مهمترین سطح ارتباطی چرخه غذایی آبزیان با مشارکت در تولیدات ثانویه اکوسیستم های آب شیرین دارای اهمیت هستند. زئوپلانکتون‌ها حدواسط چرخه

زیستی بوده و انرژی را از سطوح پایین تروفی به سطوح بالاتر انتقال میدهند (Waters, 1977). بنابراین زئوپلانکتون ها به عنوان مهمترین سطح ارتباطی چرخه غذایی آبزیان به حساب می آیند (Sharma, 1998).

زئوپلانکتونها موجوداتی فیلتر کننده بوده که می توانند از جلبک ها مثل کلرلا (Savas and Erdogan, 2008)، سندسموس (Ranta *et al*., 1993)،مخمرها مانند مخمرنان *Saccharomyces cerevisiae* (Farhadian et al., 2008; Lashkarbolouki and Jafaryan, 2011)، مواد آلی گیاهی همچون یونجه (Barkoh *et al*., 1996; Farhadian et al., 2013)، گندم و برنج (Barkoh *et al*., 2005)، مواد آلی جانوری همانند کودهای گاوی و مرغی (Srivastava *et al*., 2006) و باکتری ها همانند باسیلوس ها به عنوان پروبیوتیک (Erlania and Adiwilaga, 2010) تغذیه نمایند.

همزیستی زئوپلانکتون ها و باکتری ها سبب شده تا آنها از مهمترین اجزاء زنجیره غذایی پلاژیک و بزرگترین عامل تنوع زیستی پلاژیک و فرآیندهای زیست شیمیایی در نظر گرفته شوند. باکتری ها و سخت پوستان زئوپلانکتونی اغلب به عنوان دو گروه عملکردی جداگانه در شبکه های مواد غذایی به طور غیر مستقیم از طریق چرخه های غذایی و سطوح تروفی با هم مرتبط هستند (Azam and Malfatti, 2007). برای مثال، می توان ساختار بیرونی و پوششی احشاء پاروپایان را نام برد که سطوح مناسبی برای اتصال باکتری ها فراهم می آورد (Nagasawa and Nemoto, 1988; Pruzzo *et al*., 1996, Carman and Dobbs, 1997). این ارتباطات باکتریایی فقط به سخت پوستان زئوپلانکتونی محدود نمیشود و در باکتری های همزیست در زئوپلانکتون هایی همچون روتیفرها (Selmi, 2001) و ژله فیش‌ها (Schuett and Doepke, 2009) نیز گزارش شده است. معمولا سطح بدن زئوپلانکتون ها حاوی تعداد متنوع و فراوانی از باکتری ها ($10^{7}$ تا $10^{11}$ سلول در میلی لیتر) حتی گاهی اوقات بسیار بیشتر از باکتریهای موجود در محیط کشت است (Tang *et al*., 2010). سطح بدن موجودات زنده غنی از مواد آلی بسیار ریز است که سبب رشد سریع باکتریها می شود. سطح بدن زئوپلانکتون ها معمولا باکتری ها را در مقابل تنش های محیطی محافظت می نماید. علاوه بر این، جابجایی باکتریایی با کمک سطح بدن زئوپلانکتون ها می تواند موجبات پراکندگی باکتریایی را در فواصل طولانی تداعی نماید (Grossart *et al*., 2010). علاوه بر این، زئوپلانکتون ها می توانند از طریق پوست اندازی (Molts)، مدفوع (Fecal pellets) و لاشه (Carcasses) در تمام ستون آب در کمک رسانی به نقل و انتقال جوامع میکروبی اعماق به شیوه های مختلف موثر باشند (Tang *et al*., 2010). از سوی دیگر، شرایط فیزیکی و شیمیایی محیط، خود به صورت مجزا بر جوامع مختلف باکتری ها تاثیرگذار بوده و جوامع متفاوتی از باکتری ها را انتخاب می نماید (Tang *et al*., 2010).

با توجه به موارد بیان شده ویژگی های بیولوژیک و اکولوژیک بسیاری از این باکتری ها در خصوص ارتباطات با زئوپلانکتونها مبهم باقی مانده است. برای مثال، انواع بسیاری از ارتباطات متقابل بین زئوپلانکتون و باکتریها از قبیل شکارچی گری، تولید کلنی بر روی بقایا و لاشه های تروفیکی زئوپلانکتونها و چرخش عناصر و مواد غذایی در زیستگاههای آبی

وجود دارد. زئوپلانکتونها در محیط های دریایی و آب شیرین ارتباطات محکمی با باکتریها دارند و می‌توانند بر رفتار، رشد و فعالیت های بیوژئوشیمیایی آنها تاثیر داشته باشند (Dattagupta *et al.*, 2009).

بطورکلی توجه و نیاز مبرم برای درک رابطهٔ بین زئوپلانکتون ها و باکتری ها و همچنین چگونگی ارتباطات متقابل بین آنها وجود دارد. چنین مطالعاتی ایجاب می نماید تا با استفاده از روش های مختلف به بررسی باکتری ها زئوپلانکتون ها در منابع آبی اعم از آب شیرین و شور پرداخته شود. هدف از این پژوهش بررسی برخی باکتری های غالب در محیطهای کشت دو گونه از سخت پوستان مزوزئوپلانکتونی متعلق به آنتن منشعب *Daphnia magna* و پاروپای *Acanthocyclops robustus* و تاثیر آنها بر BOD و COD آب در شرایط آزمایشگاهی است.

## مواد و روش‌ها

### تهیه ذخیرهٔ اولیه زئوپلانکتونها

نمونه زئوپلانکتونی موجود از آبگیرهای حوالی زاینده رود در ۳۵ کیلومتری شهر اصفهان (مختصات جغرافیایی ۵۱ درجه و ۲۲ درجه شرقی و ۳۲ درجه شمالی) با استفاده از تور پلانکتون گیری با چشمه ۱۰۰ میکرون با تورکشی عمودی جمع آوری و به آزمایشگاه هیدروبیولوژی دانشکده منابع طبیعی منتقل گردید. نمونه ها پس از چند ساعت ته نشینی با کمک لوپ آزمایشگاهی (Olympus, SZ6045, Japan) و میکروسکوپ اینورت (CETI, Belgium) مورد بررسی قرار گرفت. پس از بررسی های اولیه جداسازی یک گونه آنتن منشعب *D. magna* و یک گونه پاروپای *A. robustus* از میان گروههای زئوپلانکتونی موجود انجام شد. ماده های بالغ این دو زئوپلانکتون ابتدا در مقیاس کوچک (ویا ۵۰ میلی لیتری) و سپس در ظروف بزرگتر (بشر ۵۰۰ میلی لیتری) کشت داده شد تا علاوه بر آماده کردن تعداد کافی نمونه برای شروع کار آزمایشگاهی، گونه های مورد نظر نیز به شرایط موجود در آزمایشگاه سازگار شوند. گونه های مورد نظر با استفاده از کلیدهای شناسایی زئوپلانکتون های آب شیرین شناسایی گردیدند (Collado *et al.*, 1984; Dussart and Defaye, 2001; Fernando, 2002).

### تهیهٔ جیره های غذایی

جلبک سبز *Scenedesmus quadricauda* در ارلن مایرهای ۵ لیتری با استفاده از محیط کشت BBM (Bold's Basal Medium) پرورش داده شد(Nichols and Bold, 1965). برای کشت جلبک ها، ۵ لیتر آب مقطر در ارلن مایرهای شیشه ای ریخته شده و به آن محیط کشت BBM اضافه شد و سپس با استفاده از pH متر (مدل 744 Metrohm، ساخت سوئیس) اسیدیته آغازین کشت ۶/۸ تنظیم گردید. در مرحله بعد ظروف حاوی محیط کشت جلبکها به همراه لوله های هوادهی و پنبه های کتانی مورد نیاز در دمای ۱۲۱ درجه سانتیگراد به مدت ۱۵ دقیقه در دستگاه اتوکلاو (مدل 121A، ساخت ایران) ضدعفونی و استریل گردید. پس از اتمام اتوکلاو و هم دما شدن با دمای آزمایشگاه، محلول ویتامین $B_{12}$ به میزان یک میکروگرم در لیتر از محیط کشت اضافه گردید و سپس با رعایت شرایط استریل، به هم زده شد. ۲۰۰ سی سی از ذخیره جلبک ها (با غلظت $10^6$ تا $10^5$سلول در میلی لیتر) (جلبک خالص سازی شده

در دانشکده منابع طبیعی دانشگاه صنعتی اصفهان) به محیط کشت دارای ویتامین اضافه گردید برداشت جلبک بعد از رسیدن به مرحله رشد سریع، در روز ۱۰ کشت صورت گرفت. شرایط پرورش این گونه جلبکی شامل آب شیرین فیلتر و اتوکلاو شده، دمای ۲۳±۱°C، دوره نوری ۱۲ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی، شدت نور ۶۰ میکرومول فوتون بر مترمربع در ثانیه، pH آغازین ۶/۹ و اکسیژن محلول بالای ۵ میلی‌گرم در لیتر بود. برداشت جلبک‌ها در فاز رشد سریع از طریق سانتریفیوژ کردن (مدلCenturion Scientific Ltd) با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه برای مدت ۵ دقیقه انجام گرفت. برای تهیه تیمارهای غذایی غیر جلبکی از مخلوط کود حیوانی (گاوی+ مرغی) به نسبت (۱:۱ وزنی) و مخلوط پودر سبزیجات (جعفری+ اسفناج + گشنیز) به نسبت (۱:۱:۱ وزنی) استفاده گردید. کودها ابتدا برای مدت یک هفته در آب مقطر حل شد و سپس عصارهٔ حاصل با استفاده از کاغذ صافی پمپ وکیوم بصورت مایع جمع آوری شد. به منظور اطمینان از عدم وجود باکتریها نمونه مورد اتوکلاو قرار گرفت. بعضی از مهمترین خصوصیات جیره های غیر جلبکی مورد استفاده در این تحقیق در جدول شماره ۱ ارائه شده است.

اندازه گیری خصوصیات فیزیکوشیمیایی کود و سبزیجات با استفاده از هدایت الکتریکی برای محاسبه EC متر ( Conductivity Meter 4310, JENWAY)، pH به وسیله pH متر مدل (744 pH Meter) میزان کلسیم و منیزیم به روش کمپلکسومتری، پتاسیم به روش عصاره گیری با استات آمونیوم، فسفر به روش اولسون، ازت به روش کجلدال، کربن آلی از روش والکی و بلاک و کربنات کلسیم به روش تیتراسیون استفاده شد (StandardMethod,1998).

**جدول ۱- میانگین ( ± خطای استاندارد) خصوصیات فیزیکو- شیمیایی جیره های کود و سبزیجات مورد استفاده در تحقیق.**

| خصوصیت ها | کود* | سبزیجات** |
|---|---|---|
| pH | ۷/۲۳±۰/۰۹ | ۵/۹ ± ۰/۰۳ |
| هدایت الکتریکی(ds/m) | ۷/۷۷±۰/۰۵ | ۵/۰۴±۰/۱۱ |
| کلسیم(mg/L) | ۱۱۳۳/۳۳±۲۱۶/۰۲ | ۱۴۶۶/۶۷±۸۱/۶۵ |
| منیزیم(mg/L) | ۵۶۷±۴۹/۶۰ | ۱۲۱/۵۰±۰/۰۰ |
| پتاسیم(mg/L) | ۷۹۲±۱/۵۳ | ۱۴۱۹±۶/۲۸ |
| درصد کربنات کلسیم | ۴۴/۶۷±۰/۷۴ | ۴۳±۱/۲۷ |
| درصد مواد آلی | ۶۵±۳/۵۴ | ۸۴/۳۳±۲/۸۶ |
| درصد فسفر | ۲/۰۸±۰/۰۴ | ۱/۳۹±۰/۰۳ |
| درصد نیتروژن | ۱/۲۳±۰/۰۲ | ۱/۳۳±۰/۰۲ |
| C:Nنسبت | ۳۷/۷۰ | ۴۸/۷۰ |

*مخلوط کود: کود مرغی + گاوی (نسبت وزنی ۱:۱) **مخلوط سبزیجات: اسفناج+ گشنیز+ جعفری (نسبت وزنی۱:۱:۱)

**نحوه انجام آزمایش**

دو آزمایش جداگانه در قالب طرح کاملا تصادفی با کشت آنتن منشعب *D magna.* و پاروپای *A. robustus* هرکدام با سه تیمار غذایی (کود، سبزیجات و جلبک سندسموس) و سه تکرار بطور همزمان به مدت ۳۰ روز انجام گرفت. پرورش زئوپلانکتونها در ظروف پلاستیکی شفاف ۴ لیتری انجام شد. در کشت آنتن منشعب *D. magna* تعداد ۱۵ ماده بالغ و در ظروف پاروپای *A. robustus*تعداد ۷ فرد ماده بالغ بطور کاملا تصادفی بعنوان تراکم آغازین قرار داده شد. در کشت این دو زئوپلانکتون از آب فیلتر و اتوکلاوه شده استفاده گردید. شمارش تعداد زئوپلانکتونها در پایان آزمایش (روز ۳۰ پرورش) با استفاده از لام باگاروف (Bogorov's Chamber) با انتقال ۵ میلی لیتر از محیط کشت به درون لام با مشاهده در زیر لوپ آزمایشگاهی با بزرگنمایی ۳ تا ۶ برابر انجام شد.

محاسبهٔ تعداد باکتری ها محیط با استفاده از روش رقیق سازی مرحله ای (Serial Dilution) انجام گرفت. در این روش ۱ میلی لیتر از نمونه در غلظت های $۱۰^{-۱}$ تا $۱۰^{-۶}$ رقیق گردید و سپس روی محیط کشت جامد نوترینت آگار (NA) در دمای ۲۳ درجه سانتی گراد کشت داده شد و پس از ۴۸ ساعت تعداد کلنی های تشکیل شده شمارش شد. سپس با استفاده از رابطه $N=\frac{C}{D\times S}$ تعداد باکتریها در هر میلی لیتر از محیط کشت تخمین زده شد. که در این رابطه $N$ تعداد باکتریها در هر میلی لیتر از محیط کشت، $C$ تعداد کلونی ها ( CFUs = colony-forming units)، $D$ ضریب رقیق‌سازی نمونه، $S$ میزان نمونه مورد استفاده بر حسب میلی لیتر است. به منظور تهیه کشت از باکتریها، با استفاده از روش خطی کلونی های تکی جداسازی گردید. سپس از هر کلونی بر روی محیط کشت NA، کشت صورت گرفت و نمونه ها به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت در انکوباتور با دمای ۲۸ درجه سانتی گراد نگهداری شد. جهت شناسایی باکتری به روش بیوشیمیایی با بررسی مشخصات ماکروسکوپی کلنی ها، مشخص کردن مرفولوژی و واکنش گرم باکتری، انجام تست های بیوشیمیایی به کمک کشت تازه باکتری خالص از جمله تست های کاتالاز، اکسیداز، کوآگولاز، احیاء نیترات، حساسیت به نووبیوسین، اوره، رشد در محیط فنل رد مانیتول سالت آگار، و تخمیر قند مانیتول انجام شد. در انتها شناسایی باکتریایی با استفاده از کتاب سیستماتیک برگی صورت گرفت (Holt *et al*., 1994).

شاخص های کیفی آب همچون COD و BOD5 در پایان آزمایش اندازه گردید. تعیین اکسیژن خواهی شیمیایی (COD) از روش تقطیر برگشتی بسته و برای تعیین اکسیژن خواهی بیولوژیکی (BOD5) از روش وینکلر استفاده گردید (Standard Method, 1998).

**تجزیه و تحلیل داده ها و آنالیز آماری**

داده های حاصل از تیمارهای آزمایشی با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه (One- way ANOVA) مورد تجزیه آماری قرار گرفت. تفاوت بین میانگین ها با استفاده از آزمون چند دامنه دانکن با هم مقایسه گردید (Zar, 1984). تمام تجزیه و تحلیل ها در سطح معنی دار۵ درصد با استفاده از نرم افزار آماری (*SPSS*, 19) انجام شد. همبستگی بین داده ها از طریق ضریب همبستگی پیرسون محاسبه گردید.

## نتایج

تراکم جمعیت زئوپلانکتونها در تیمارهای تغذیه شده با کود، سبزیجات و جلبک سندسموس در *D. magna* به ترتیب ۰±۰، ۷±۸/۶ و ۳۴۳±۲۱/۵ فرد در لیتر و در تیمار *A. robustus* به ترتیب ۳۸/۹±۱۵/۸، ۵۸۰/۳±۴۲/۸ و ۱۴۲/۹±۲۶/۸ به دست آمد (جدول۲).

در این پژوهش، باکتری های غالب در محیط کشت *D. magna* باکتریهای جنس *Acinetobacter* در تغذیه با کود و سبزیجات و باکتریهای جنس *Aeromonas* در تغذیه با جلبک سندسموس شناسایی گردید (جدول ۳). همچنین، از محیط کشت *A. robustus* تغذیه شده با کود، سبزیجات و جلبک سندسموس به ترتیب جنس های باکتریایی *Neisseria*، *Enterobacteria* و *Alcaligenes* غالب بود (جدول ۴).

تراکم جمعیت باکتریها در محیط کشت های تغذیه شده باجیره های مختلف غذایی ۲گونه *D. magna* و *A. robustus* در جدول ۶ ارائه شده است. تراکم جمعیت میکروبی محیط کشت *D. magna* تغذیه شده با جلبک سندسموس بالاترین میزان جمعیت میکروبی ($۵\times۱۰^{۴}$ cell/ml) و کمترین تعداد ($۹\times۱۰^{۳}$ cell/ml) را داشت (جدول ۵). همچنین، در محیط کشت *A. robustus* نیز بالاترین و کمترین میزان $۱/۴\times۱۰^{۴}$ cell/ml و $۵\times۱۰^{۳}$ cell/ml به ترتیب در کشت های تغذیه شده با سبزیجات و جلبک سندسموس بدست آمد (جدول ۵).

میزان BOD و COD آب نمونه برداری شده از محیط کشت زئوپلانکتون ها در پایان دوره آزمایش نشان داد که بیشترین و کمترین میزان BOD به ترتیب در گروه پاروپای *A. robustus* تغذیه شده با سبزیجات (۹۰میلی گرم در لیتر) و آنتن منشعب *D. magna* تغذیه نموده با کود (۲۸میلی گرم در لیتر) بدست آمد (جدول ۶). بیشترین و کمترین مقدار COD در تیمار تغذیه شده با سبزیجات تیمار خاردار *A. robustus* با ۳۱۳ میلی گرم در لیتر و تیمار تغذیه شده با جلبک سندسموس با ۴۳ میلی گرم در لیتر بدست آمد (جدول ۶).

در این تحقیق بین تراکم آنتن منشعب *D. magna* با BOD و COD و همچنین بین تراکم باکتریها و BOD همبستگی معنی داری وجود داشت ($P<۰/۰۵$)، در حالیکه بین جمعیت باکتریها ، تراکم *D. magna* و COD همبستگی معنی داری وجود نداشت ($P>۰/۰۵$) (جدول ۷). علاوه بر این، بین پارامترهای تراکم پاروپای *A. robustus* ، جمعیت باکتریایی، BOD و COD همبستگی معنی داری بدست آمد ($P<۰/۰۵$) (جدول ۸).

**جدول۲ - میانگین (±خطای استاندارد) تراکم *D. magna* و *A. robustus* تغذیه شده با جیره های مختلف غذایی پس از ۳۰ روز پرورش.**

| تیمارها | *D. magna* | *A. robustus* |
|---|---|---|
| کود | ۰± ۰ [a] | ۳۸/۹±۱۵/۸ [a] |
| سبزیجات | ۷±۸/۶ [b] | ۵۸۰/۳±۴۲/۸ [b] |
| جلبک سندسموس | ۳۴۳±۲۱/۵ [c] | ۱۴۲/۹±۲۶/۸ [c] |

*در هر ستون میانگین های دارای لااقل یک حرف مشابه در سطح ۵ درصد باهم اختلاف معنی داری ندارند.

**جدول ۳- باکتری های شناسایی شده در محیط کشت آنتن منشعب*D. magna* تغذیه شده با جیره های مختلف غذایی پس از ۳۰ روز پرورش.**

| تیمارها | کود | سبزیجات | جلبک سندسموس |
|---|---|---|---|
| تست گرم | – | – | – |
| شکل | Rod/Coccus | Rod/Coccus | Rod |
| هوازی | + | + | + |
| بی هوازی | – | – | + |
| اسپور | – | – | – |
| حرکت | – | - | + |
| کاتالاز | + | + | + |
| بنزیدین | – | – | + |
| اکسیداز | – | – | + |
| گلوکز | + | – | + |
| O/F | O | O | F |
| باکتری شناسایی شده | *Acinetobacter* | *Acinetobacter* | *Aeromonas* |

**جدول ۴- باکتری های شناسایی شده در محیط کشت پاروپای *A. robustus* تغذیه شده با جیره های مختلف غذایی پس از ۳۰ روز پرورش.**

| تیمارها | کود | سبزیجات | جلبک سندسموس |
|---|---|---|---|
| تست گرم | – | – | – |
| شکل | Coccus | Rod | Rod |
| هوازی | + | + | + |
| بی هوازی | – | + | – |
| اسپور | – | – | – |
| حرکت | – | - | + |
| کاتالاز | + | + | + |
| بنزیدین | + | – | + |
| اکسیداز | + | – | + |
| گلوکز | – | + | – |
| O/F | O | F | – |
| باکتری شناسایی شده | *Neisseria* | *Enterobacteria* | *Alcaligenes* |

**جدول ۵- محاسبه تعداد میکروارگانیسم ها در محیط کشت *D. magna* و *A. robustus* به روش رقیق سازی مرحله ای پس از ۳۰ روز پرورش.**

| محیط کشت | جمعیت میکروبی *D. magna* (cell/ml) | جمعیت میکروبی *A. robustus* (cell/ml) |
|---|---|---|
| کود | $۹\times۱۰^{۳}$ | $۷\times۱۰^{۳}$ |
| سبزیجات | $۳\times۱۰^{۴}$ | $۱۴\times۱۰^{۳}$ |
| جلبک سندسموس | $۵\times۱۰^{۴}$ | $۵\times۱۰^{۳}$ |

**جدول ۶- میزان شاخص های کیفی COD و BOD بر حسب میلی گرم در لیتر محیط کشت *D. magna* و *A. robustus* پس از ۳۰ روز پرورش.**

| محیط کشت | *D. magna* | | *A. robustus* | |
|---|---|---|---|---|
| | BOD | COD | BOD | COD |
| کود | ۲۸ | ۶۷ | ۶۷ | ۱۰۲ |
| سبزیجات | ۳۲ | ۶۶ | ۹۰ | ۳۱۳ |
| جلبک سندسموس | ۳۵ | ۷۲ | ۳۶ | ۴۳ |

**جدول۷- ضریب همبستگی پیرسون برخی خصوصیات آنتن منشعب *D. magna* در طی دوره ی آزمایش . اعداد درون پرانتز ها سطح معنی دار را نشان می دهند *همبستگی معنی دار در سطح ۰/۰۵ ، ** همبستگی معنی دار در سطح ۰/۰۱.**

| پارامترها | تراکم | آنتن منشعب *D. magna* BOD | COD | جمعیت میکروبی |
|---|---|---|---|---|
| BOD | *۰/۷۲۰ (۰/۰۲۹) | ۱ | | |
| COD | **۰/۸۳۳ (۰/۰۰۵) | *۰/۶۲۱ (۰/۰۴۴) | ۱ | |
| جمعیت میکروبی | ۰/۴۲۰ (۰/۲۶۰) | **۰/۸۳۰ (۰/۰۰۶) | ۰/۴۲۲ (۰/۲۵۸) | ۱ |

**جدول۸- ضریب همبستگی پیرسون برخی خصوصیات پاروپا *A. robustus* در طی دورهٔ آزمایش. اعداد درون پرانتز ها سطح معنی دار را نشان می دهند *همبستگی معنی دار در سطح ۰/۰۵ ، ** همبستگی معنی دار در سطح ۰/۰۱.**

| پارامترها | تراکم | پاروپا خاردار *A. robustus* BOD | COD | جمعیت میکروبی |
|---|---|---|---|---|
| BOD | *۰/۶۹۹ (۰/۰۳۶) | ۱ | | |
| COD | **۰/۹۲۳ (۰/۰۰۰) | **۰/۹۱۹ (۰/۰۰۰) | ۱ | |
| جمعیت میکروبی | **۰/۸۶۰ (۰/۰۰۳) | **۰/۸۵۷ (۰/۰۰۳) | **۰/۹۱۹ (۰/۰۰۰) | ۱ |

**بحث**

زئوپلانکتونها و باکتریها اجزاء بسیار مهمی در شبکه غذایی پلانکتونی آبها هستند و نقش مهمی در فرآیندهای بیوژئوشیمیایی و تنوع زیستی موجودات پلانکتونیک دارند. از آنجائیکه بطور معمول غذا اثر چشمگیری بر تولید مثل و چرخه زندگی زئوپلانکتون ها دارد ( Sabatini and Kiørboe,1994). لذا، در این تحقیق تاثیرات غذاها یا جیره های مختلف را با تاکید بر باکتریها و تراکم آنها در محیط کشت های زئوپلانکتونی بررسی گردید. *D. magna* تغذیه شده با سندسموس و *A. robustus* تغذیه شده با سبزیجات از رشد و عملکرد بهتری نسبت به دیگر جیره ها برخوردار بودند. مناسب بودن جلبک سندسموس برای گونه *D. magna* و سایر آنتن منشعب ها نه تنها در این مطالعه بلکه در سایر مطالعات نیز بیان شده است. برای مثال، خانجانی و همکاران در سال ۱۳۹۰ عملکرد مناسب جلبک سبز *S. quadricauda* در مقایسه با کود مرغی و گاوی را برای تراکم *Ceriodaphnia quadrangula* بررسی نمودند. همچنین، Ranta و همکاران در سال ۱۹۹۳ تاثیر غذای جلبکی *S. quadricauda* را بر رشد سه گونه *Daphnia longisina*، *Daphni magna*و *Daphnia pulex* بررسی و بیان کردند که مقدارجیره غذایی بر رشد و اندازه این آنتن منشعب ها تاثیر گذار بوده و این تاثیر بر تولید و تراکم *D. magna* بیشتر بود. بنابراین، کمیت و کیفیت غذا فاکتورهای مهمی هستند که رشد و تولید مثل را در آنتن منشعب ها کنترل می کند (Ovie and Egborge, 2002). همچنین، نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که گونه *A. robustus* تغذیه شده با سبزیجات مخلوط عملکرد مناسبتری دارد. بر اساس مطالعه *et al*. (1982) Kahan استفاده از جیره های غذایی ترکیبی گیاهی شامل کاهو، دانه گندم، هویج، اسفناج، نخود، گوجه فرنگی، باعث تولید پاروپایان *Tisbe holothuria* و *Amphiascella subdebili* گردید. علاوه بر این، Farhadian *et al*. (2013) تاثیر جیره غذایی ترکیبی یونجه با ریز جلبک ها و مخمر بر میزان رشد و تولید مثل جمعیت روتیفر *Euchlanis dilatata* آب شیرین بررسی نمودند و نتیجه گیری نمودند که افزایش یونجه به محیط کشت باعث بهبود رشد و تولید در روتیفر می شود.

با توجه به تراکم های متفاوت حاصل از پرورش *D. magna* و *A. robustus* با غذاهای مختلف می توان یکی از دلایل اصلی و اساسی را به نوع جیره های مورد استفاده نسبت داد، اما در این خصوص با توجه به یافته های این تحقیق در خصوص باکتریها میتوان به نقش عوامل دیگر هم بپردازیم و قابل بحث است. در این پژوهش، از سوی دیگر در *Daphnia magna* تغذیه شده با کود و سبزیجات جنس باکتریایی *Acinetobacter* و در کشت با جلبک سندسموس جنس *Aeromonas* شناسایی شد، همچنین در *A. robustus* تغذیه شده با کود، سبزیجات و جلبک سندسموس به ترتیب جنس های *Neisseria*، *Enterobacteria* و *Alcaligenes* و شناسایی گردید. Grossart و همکاران در سال ۲۰۰۹ از سخت پوستان زئوپلانکتونی آب شیرین گروههای باکتریایی از جنسBetaproteobacter، *Alphaproteobacter* ، *Bacteriodetes*، *Gammaproteobacter* ، *Actinobacter* و *Firmicutes* را شناسایی نمودند و بیان کردند که باکتریها در آبهای با تولید کم بسیار محکم به سطح بدن پاروپایان می چسبند و در مقابل عوامل محیطی

از خود مقاومت بهتری در مقایسه با آبهای پرتولید نشان می دهند. علاوه بر این، محیط بی هوازی معده در زئوپلانکتونها و پلت های دفعی آنها محیط زیست مناسبی برای ارگانیسم های بی هوازی باکتریها می باشد و بعبارت دیگر شرایط هوازی ستون آب توان زنده ماندن را برای باکتریهای بی هوازی نخواهد داشت (Proctor, 1997; Braun *et al.*, 1999). بطورکلی می توان گفت که زئوپلانکتونها از نظر باکتریایی کاملا با محیط آب متفاوت هستند.

هردو زئوپلانکتون مورد مطالعه در این تحقیق در شرایط یکسان آزمایشگاهی پرورش داده شد. اگرچه هر دو گونه صافی خوار (Filter feeder) بوده و تمایل مناسبی به استفاده از صافی خواری برای بلع ذرات غذایی بر اساس اندازه نشان دادند اما به لحاظ تفاوت در انواع باکتریها و همچنین نوع اقلام غذایی تفاوت های قابل ملاحظه ای در جمعیت باکتریایی محیط کشت ها بوجود آمد. نتایج شمارش جمعیت باکتریها از محیط کشت به ترتیب برای *D. magna* تغذیه شده با جیره های کود، سبزیجات و جلبک سندسموس به ترتیب $۹\times۱۰^{۳}$، $۳\times۱۰^{۴}$ و $۵\times۱۰^{۴}$ سلول در هر میلی لیتر و برای *A. robustus* *به ترتیب* $۷\times۱۰^{۳}$، $۱۴\times۱۰^{۳}$ و $۵\times۱۰^{۳}$ سلول در هر میلی لیتر تخمیین زده شد. نتایج بدست آمده با نتایج سایر محققان تقریبا مطابقت هایی را نشان داد. برای مثال، Hansen and Bech (1996) تعداد باکتریهای موجود در محیط کشت پاروپای *Acartia tonsa* را $۲\times۱۰^{۵}$ سلول در هر میلی لیتر گزارش کردند. Olsen و همکاران در سال ۲۰۰۰ تعداد $۱/۷\times۱۰^{۴}$ سلول در هر میلی لیتر در محیط کشت *Artemia franciscana* محاسبه کردند.

Tangدر سال ۲۰۰۵ شمارش تعداد باکتری را در محیط کشت زئوپلانکتون *A. tonsa* تعداد $۴/۵\times۱۰^{۵}$ تا $۲\times۱۰^{۳}$ سلول در هر میلی لیتر بدست آورد. همچنین Tang و همکاران در سال ۲۰۰۹ تعداد باکتری ها را در محیط کشت های *Daphnia cucullata*، *Eudiaptomus gracilis* و *Diaphanosoma brachyurum* به ترتیب $۳/۹\times۱۰^{۵}$ تا $۱\times۱۰^{۵}$، $۴/۳\times۱۰^{۵}$ تا $۱/۷\times۱۰^{۵}$ و $۳/۳\times۱۰^{۵}$ سلول در هر میلی لیتر گزارش کردند.

بطورکلی باکتریها می توانند یک زئوپلانکتون را از سطح بدن کاملا کلونیزه نمایند (Nagasawa and Nemoto, 1988; Carman and Dobbs, 1997). همچنین، باکتریها ممکن است به فیتوپلانکتونها و یا سایر ذرات غذایی (مثلا کود یا سبزیجات در این مطالعه) چسبیده شوند (Simon *et al.*, 2002) و از طریق بلع این ذرات غذایی به روده یا معده زئوپلانکتونها وارد شوند (Tang, 2005). پس از قرار گرفتن در معده میزبان، باکتری معده میزبان را به طرف محیط اطراف رها مینماید، بنابراین یک تبادل فعال باکتریایی بین زئوپلانکتون و محیط آب وجود دارد که خصوصیات فیزیکوشیمیایی گوناگون محیط ممکن است برای باکتری مناسب باشد (Hansen and Bech, 1996).

با توجه با اینکه شرایط تغذیه ای مشابه برای *D.magna* و *A. robustus* فراهم شده بود. لذا ، در مقایسه جمعیت باکتریایی مشخص شد که *A. robustus* تغذیه شده با کود، سبزیجات و جلبک باکتریهای با ترکم کمتری در محیط کشت دارند وگمان می رود که عملکرد متفاوت *A. robustus* به تفاوت در نوع باکتریها، اندازه حجمی آنها و تراکم جمعیت آنها مرتبط باشد( Tang *et al.*, 2010). از سوی دیگر نرخ پوست اندازی و تولید پوسته در این دو نوع سخت پوست زئوپلانکتونی کاملا متفاوت است که خود می تواند

دلیل بسیار مهمی برای چنین تفاوت هایی باشد. در این خصوص Tang و همکاران ۲۰۰۹ بیان نمودند که لاشه های آنتن منشعب ها در مقایسه با پاروپایان برای کلونی شدن باکتریها بستری مناسبتری بوده و به سرعت هم در محیط های طبیعی و هم در محیط های آزمایشگاهی دچار کلونیزاسیون می شوند. در هر شکل تجزیه لاشه و تجمع باکتریها روی لاشه های زئوپلانکتونی و یا روی پوسته های آنها تماما تابع گونه مورد نظر و کیتین آنها و شرایط محیطی و تغذیه ای است.

شرایط فیزیکوشیمیایی آب بر عملکرد زئوپلانکتونها و جمعیت باکتریایی می تواند تاثیر گذار باشد ( Tang *et al*., 2010). برای مثال، اکسیژن محلول آب در طی پرورش زئوپلانکتونها تغییر می نماید بطوریکه با افزایش تراکم جمعیت زئوپلانکتونها و همچنین تجمع ذرات غذایی خورده نشده یا بعضا قابل خوردن و تجمع پوسته های حاصل از پوست اندازی سخت پوستان زئوپلانکتونی همواره میزان تقاضای زیستی اکیسژن (BOD) و تقاضای شیمیایی اکسیژن محلول (COD) دچار تغییرات خواهد شد. در این مطالعه افزایش مقدار BOD در زئوپلانکتونهای کشت داده شده با جیره های کود و سبزیجات توام با افزایش میزان جمعیت باکتریها بود. این تفاوت ها را می توان به میزان ترکیبات آلی جیره های مورد استفاده در این تحقیق و همچنین ارزش غذایی گوناگون جیره ها، بازچرخش و نرخ تجزیه متفاوت اقلام غذایی نسبت داد.

## تشکر و قدردانی

بدینوسیله نویسندگان از معاونت پژوهشی دانشکده منابع طبیعی و معاونت پژوهشی و تحصیلات تکمیلی دانشگاه صنعتی اصفهان که موجبات انجام این تحقیق را فراهم نمودند کمال سپاسگزاری را دارند.

## منابع

خانجانی، م، ح.، فرهادیان، ا. کیوانی، ی و ابراهیمی، ع. ۱۳۹۰.، تاثیر جیره های مختلف بر تولید و میزان رشد ویژه جمعیت مجله علمی *Ceriodaphnia quadrangula*، شیلات ایران. تابستان، صفحات ۲۹ تا ۴۰.

Azam, F., Malfatti, F., 2007. Microbial structuring of marine ecosystems. Nature Reviews *Microbiology 5*, 782–791

Barkoh, A., 1996. Effect of three fertilization treatments on water quality, zooplankton, and *striped bass* fingerling production in plastic lined ponds. *Progressive Fish Culturist* 58, 237-247.

Barokh, A., Hamby, S., Kurten, G., Warren Schlechte, J., 2005. Effects of rice bran, cottonseed meal, and alfalfa meal on pH and zooplankton. *North American Aquaculture 67*, 237-243.

Braun, S.T., Proctor, L.M, Zani, S, Mellon, M.T., Zehr, J.P., 1999. Molecular evidence for zooplankton-associated nitrogenfixing anaerobes based on amplification of the nifH gene. *FEMS Microbiology and Ecology* 28, 273–279.

Carman, K.R., Dobbs, F.C., 1997. Epibiotic microorganisms on copepods and other marine crustaceans. *Microscopic Research Technology 37*, 116–135.

Collado, C., Defaye, D., Dussart, B.H. and Fernando, C.H., 1984. The freshwater Copepoda (Crustacea) of Costa Rica with notes on some species. *Hydrobiologia 119*, 89–99.

Dattagupta, S., Schaperdoth, I., Montanari, A., Mariani, S., Kita, N.,Valley, J.W., Macalady, J.L., 2009. A novel symbiosis between chemoautotrophic bacteria and a freshwater cave amphipod. *ISME Journal 3*, 935–943.

Dussart, B.H., Defaye, D. 2001. Introduction to the Copepoda. In: Guides to the Identification of the Microinvertebrates of the Continental Waters of the World (ed. by H.J.F. en. 344 p.

Erlania, W., Adiwilaga, E.M., 2010. Penyimpanan rotifer ainstan (*Brachionus rotundiformis*) pada suhu yang berbeda dengan pemberian pakan mikroalga konsentrat. *Journal Riset Akukulture 5*, 287-297.

Farhadian, O., Daghighi, L., Ebrahimi Dorche, E., 2013. Effect of microalgae and alfalfa meal on population growth and production of a freshwater rotifer, *Euchlanis dilatata*. *Journal of the World Aquaculture Society 44*, 86-95.

Farhadian, O., Yusoff, F., Arshad, A., 2008. Population growth and production of *Apocyclops dengizicus* fed on different diets. *Journal of the World Aquaculture Society 39*, 384-396.

Fernando, C.H., 2002. A Guide to tropical freshwater zooplankton. *Backhuys Publisher*, Leiden, 123-187.

Grossart, H.P., Dziallas, C, Leunert, F., Tang, K.W., 2010. Bacteria dispersal by hitchhiking on zooplankton. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 107 (26):* 11959-11964.

Grossart, H.P., Dziallas, C., Tang, K.W., 2009. Bacterial diversity associated with freshwater zooplankton. *Environmental Microbiology Reports 1*, 50–55.

Hansen, B., Bech, G., 1996. Bacteria associated with a marine planktonic copepod in culture. Bacterial genera in seawater, body surface, intestines and fecal pellets and succession during fecal pellet degradation. *Plankton Research 18*, 257–273.

Holt, J. G., Krieg, N. R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T., Williams, S.T., 1994. Bergey's manual of determinative bacteriology. Maryland, USA.

Lashkarbolouki, M., Jafaryan, H., 2011. Evaluation of resistance in *Acipenser percicus* larvae fed with bioencapsulated *Daphnia magna* via *Saccharomyce scerevisiae* product (Amax) against challenge test. *World Journal of Fish and Marine Sciences 3*, 340-345.

Nagasawa, S., Nemoto, T. 1988. Presence of bacteria in guts of marine crustaceans and on their fecal pellets. *Plankton Research 10*, 559–564.

*Fishery and Aquatic Science 23*, 113-116.

Schuett, C., Doepke, H., 2009. Endobiotic bacteria and their pathogenic potential in cnidarian tentacles. *Helgoland Marine Reserch 64 (3)*, 205-212.

Selmi, G., 2001.Ectosymbiotic bacteria on ciliated cells of a rotifer. *Tissue Cell 33*, 258–261.

Sharma, B.K., 1998. Faunal Diversity in India: Rotifera. In: Faunal Diversity of India, pp: 57-70, Edited by: J.R.B., Alfred, A.K. Das, A.K. Sanyal, Published by ENVIS Centre, *Zoological Survey of India*, Calcutta.

Simon, M., Grossart, H.P., Schweitzer, B., Ploug, H. 2002. Microbial ecology of organic aggregates in aquatic ecosystems. *Aquatic Microbial Ecology 28*, 175–211.

Srivastava, A., Rathore, R.M., Chakrabarti, C., 2006. Effects of four different doses of organic manures in the production of *Ceriodaphnia cornuta*. *Bioresource Technology* 97, 1036 – 1040.

*Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*., 1998. 20th Edition, *American Public Health Association*, New York.

Tang, K.W., Turk, V., Grossart, H.P., 2010. Linkage between crustacean zooplankton and aquatic bacteria. *Aquatic Microbial Ecology 61*, 261-277.

Tang, K.W. 2005. Copepods as microbial hotspots in the ocean: effects of host feeding activities on

Nichols, H.W., Bold, H.C., 1965. Trichorsarcina polymorpha gen. et sp. nov. *Journal of Phycology 1*, 34-38.

Olsen, Al., Olsen, Y., Attarmadal, Y., Chrisie, K., Birkbeck, TH., Skjermo, J., Vadstein, O. 2000. Effects of short term feeding of microalgae on the bacterial flora associated with juvenile *Artemia franciscana*. *Aquaculture 190*, 11–25.

Proctor, L.M., 1997. Nitrogen-fixing, photosynthetic, anaerobic bacteria associated with pelagic copepods. *Aquatic Microbial Ecology 12*, 105–113.

Pruzzo, C., Crippa, A., Bertone, S., Pane, L., Carli, A., 1996. Attachment of *Vibrio alginolyticus* to chitin mediated by chitin binding proteins. *Microbiology 142*, 2181–2186.

Ranta, E., Bengtsoon, J., Mc Manus, J., 1993. Growth, size and shape of *Daphnia longispina*, *Daphnia magna* and *Daphnia pulex*. *Annales Zoologici Fennici 30*, 299-311.

Sabatini, M., Kiørboe, T. 1994. Egg production, growth and development of the cyclopoid copepod *Oithona similis*. *Plankton Research 16*, 1329–1351.

Savas, S., Erdogan, O., 2006. The effect of food (*Scenedesmus acuminatus* (Von Lagerheim) R.H. Chodat) densities and temperature on the population growth of the Cladoceran *Ceriodaphnia quadrangula* (O.F. Muller, 1785).

attached bacteria. *Aquatic Microbial Ecology 38*, 31–40.

Tang, K.W., Bickel, S.L., Dziallas, C., Grossart, H.P. 2009. Microbial activities accompanying decomposition of cladoceran and copepod carcasses under different environmental conditions. *Aquatic Microbial Ecology 57*, 89–100.

Waters,T.F.1977. Secondary production in inland waters. *Advances in ecological research 10*,11-164

# The dominant bacteria of culture media of cladoceran *Daphnia magna* and copepod *Acanthocyclops robustus*

**Ramin Sharafi[1], Omidvar Farhadian[1*], Mohsen Soleimani[1]**

1. Department of Natural Resources, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran

*Corresponding author: omfarhad@cc.iut.ac.ir

Received:15/02/2015 Accepted30/08/2015

**Abstract**

Bacteria and zooplankton are important components of the pelagic food web and major contributor to biogeochemical processes. In this research, the dominant bacteria associated with culture media of cladoceran (*Daphnia magna*) and copepod (*Acanthocyclops robustus*) fed on manure (cattle+poultry, 1:1 ratio in weight), vegetable(spinach + parsely + coriander, 1:1:1 ratio in weight), and algae (*Scenedesmus quadricauda)* were investigated. Results showed that *D. magna* fed on manure and vegetable had bacteria of *Acinetobacter* and with had *Aeromonas* bacterias while *A. robustus* fed on manure, vegetable and *Scenedesmus* dominated by bacteria of *Neisseria*, *Enterobacteria* and *Alcaligenes*, respectively. Effects of different diets were significant ($P<0.05$) on *D. magna* and *A. robustus* densities, bacterial density, BOD and COD of culture media. The highest bacteria density was obtained in D. magna culture medium fed on *Scenedesmus* ($5\times10^4$ cell/ml) and the lowest on manure ($9\times10^3$ cell/ml). In addition, at *A. robustus* cultures the highest and lowest bacteria were obtained $1.4\times10^4$ and $5.0\times10^3$ cell/ml, respectively. The maximum BOD was recorded on *A. robustus* fed on vegetable (90 mg/l) and minimum by *D. magna* fed on manure (28 mg/l). The maximum COD (313 mg/l) and minimum (43 mg/l) were recorded by *A. robustus* fed on vegetable and *Scenedesmus*, respectively. In addition, the parameters of BOD, COD and bacteria density had significant correlation with density of *D. magna* and *A. robustus*. As conclusion, findings of this research illustrated that type and density of bacteria were changed in different zooplankton culture media which depended on zooplankton species and their diets during cultivation.

**Keywords**: Bacteria, Zooplankton, *Scenedesmus*, Manure, Vegetable, BOD, COD