تأثیر دما و عوامل معدنی و آلی بر رشد و تکثیر *Paramecium caudatum* در محیط کشت مخمر

سید سجاد شاهرخی[۱،۲]، منیژه کرمی[۱،۲،*] و بهرام کاظمی[۳]

[۱] **تهران، دانشگاه شاهد، مرکز تحقیقات نوروفیزیولوژی**

[۲] **تهران، دانشگاه شاهد، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی**

[۳] **تهران، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات سلولی – مولکولی**

تاریخ دریافت: ۸۹/۸/۲۲ تاریخ پذیرش: ۹۲/۱/۱۹

چکیده

تک یاختگان مژه دار مانند *Paramecium caudatum* را می توان در محیط کشت مخمر پرورش داد. در این پژوهش تأثیر دما و غنی سازی محیط کشت مخمر بر رشد و تکثیر جمعیت *P. caudatum* بررسی شد. رشد جمعیت *P. caudatum* در محیط کشت مخمر تحت دماهای مختلف (۴۰-۲۰ درجه سانتی گراد) و تحت غنی سازی با یونهای Ca^{2+} وMg^{2+} و اسید آمینه ال-آرژینین مورد مقایسه قرار گرفت. طبق نتایج، جمعیت این جانوران ۴۸ ساعت پس از پاساژ در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد نسبت به سایر دماها افزایش قابل ملاحظه ای داشت ($p<۰/۰۰۱$). همچنین غنی کردن محیط کشت با یونهای Ca^{2+} وMg^{2+} و به ویژه افزودن اسید آمینه ال-آرژینین در دمای بهینه موجب افزایش بیشتر جمعیت *P. caudatum* در این محیط نسبت به محیط کشت معمولی مخمر شد ($p<۰/۰۰۱$). بررسی منحنی رشد این جانوران تک سلولی در محیط کشت معمولی مخمر تحت دمای بهینه نشان داد که رشد و تکثیر این جانوران تک سلولی دارای چهار مرحله است. مقایسه منحنیهای رشد محیط معمولی نسبت به محیط غنی شده، نشان دهنده رشد بیشتر سلولها در محیط غنی شده نسبت به محیط معمولی است. بر اساس یافته های حاضر محیط کشت غنی شده مخمر را تحت دمای ۳۰ درجه سانتی گراد می توان به عنوان یک محیط کشت مصنوعی مناسب برای تکثیر و ازدیاد *P. caudatum* معرفی کرد.

واژه های کلیدی: *P. caudatum*، دمای بهینه، محیط کشت مخمر، عوامل معدنی و آلی، منحنی رشد

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۲۱۵۱۲۱۲۲۴۳ ، پست الکترونیکی: Karami@shahed.ac.ir

مقدمه

جانوران تک یاخته ای گروهی از موجودات زنده جانور مانند هستند که فقط از یک سلول ساخته شده اند. یک گروه بزرگ از این جانوران را مژه داران تشکیل می دهند که در خاک، مردابها، دریاها، دریاچه ها و چشمه ها پراکنده اند (۱۰).

مژه داران از مصرف کنندگان اولیه و تجزیه کنندگان در اکوسیستم به حساب می آیند و نقش مهمی را در چرخه ماده و انرژی بر عهده دارند (۳). آنها همچنین به عنوان عوامل پاکسازی کننده محیط زیست، موادی را که توسط گیاهان قابل جذب نیست به مواد قابل جذب تبدیل می کنند، به طوری که این مواد مستقیم یا غیر مستقیم توسط گیاهان جذب می شوند. این مسئله می تواند در حفظ و احیای جنگلها توسط مژه داران مؤثر باشد (۳). همچنین از آنجایی که بسیاری از مژه داران به عنوان باکتری خوار (Bacterivore) و گندیده خوار(Saprovore) عمل کرده، می توانند در تصفیه و پاکسازی فاضلاب شهری و صنعتی نقش بسیار مهمی داشته باشند (۶، ۷، ۸ و ۹)، بررسی عوامل محیطی مؤثر بر رشد و تکثیر این جانوران در راستای کاهش آلودگیهای زیست محیطی اهمیت وافر می یابد.

این جانوران تک سلولی نسبت به تغییرات محیطی بسیار حساس هستند، به طوری که دما و کیفیت محیط زندگی

آنها تأثیر قابل توجهی بر میزان رشد و تکثیرشان بر جای می گذارد (۱۰ و ۱۱). فرآیند تنظیم دما (thermoregulation)، به عنوان یکی از فرآیندهای فیزیولوژیک حیاتی در *Paramecium caudatum* به عنوان یک مژه دار مطالعه و نقش تنظیمی نیتریک اکساید بر فرآیند مذکور نشان داده شده است (۱۱). این مولکول به واسطه اسید آمینه ال-آرژینین در حضور آنزیم نیتریک اکساید سینتاز بیوسنتز می شود و به عنوان یکی از پیامدهای انتقال سیگنال، سطح یون کلسیم داخل سلول را افزایش می دهد (۵). بنابراین با توجه به نقش یونهای Ca^{2+} وMg^{2+} در فرآیند تقسیم سلولی (۱۳) می توان از ال-آرژینین به عنوان عامل رشد و تکثیر *P. caudatum* استفاده کرد (۱۱).

از طرف دیگر، از آنجایی که این جانور تک سلولی به لحاظ اندازه نسبتاً بزرگ است و روشهای تغذیه ای متنوعی دارد (۱۰)، در آزمایشگاهها جهت فعالیتهای تحقیقاتی مورد استفاده قرار می گیرد. اما در بیشتر موارد آن را در محیطهای کشت طبیعی مانند خیسانده یونجه می پرورانند (۲) که این محیط از شرایط ایده آل بر خوردار نیست و شاهد نامطلوبیت آن هم رشد انواع متعددی از مژه داران و سایر تک یاختگان و یا حتی پریاختگان کوچک در کنار انواعی از باکتریها در این نوع محیط کشت است (۲). بنابراین ایجاد شرایط بهینه رشد در محیطهای کشت مصنوعی برای تکثیر و پرورش خالص *P. caudatum* به منظور استفاده از این مدل ارزشمند در مطالعات و تحقیقات سلولی ضروری به نظر می رسد که این امر نیز در تحقیق حاضر مد نظر قرار گرفته است.

مواد و روشها

جمع آوری نمونه حیوانی از محیطهای طبیعی: برای جمع آوری *P. caudatum* از ایستگاههای آب شیرین موقت از جمله آبگیرهای کم عمق و آبگاهها، نمونه برداری به صورت تصادفی از این مکانها انجام و نمونه های آب سریعاً به آزمایشگاه منتقل شد. هر نمونه چند بار تحت مشاهده مستقیم با لوپ و میکروسکوپ قرار گرفت تا حیوان دلخواه رؤیت شود و در صورت عدم مشاهده حیوان مورد نظر (به تشخیص افتراقی *P. caudatum* مراجعه شود)، اجازه داده شد تا نمونه آب جمع آوری شده تحت محیط کشت طبیعی (استفاده از خیسانده یونجه) در آزمایشگاه نگهداری شود تا وقتی که تک یاخته مذکور در آنها ظاهر گردد. آنگاه به کمک پیپت پاستور و تحت مشاهده با لوپ، پاساژ تک یاخته به محیطهای تازه و استریل انجام شد. این عمل تا آنجا که کشت خالصی از این تک یاخته تهیه شود، تکرار گردید. سرانجام فرآیند کشت دادن در محیط مصنوعی (حاوی ۲ گرم مخمر در ۱ لیترآب مقطر که نحوه تهیه و غنی سازی آن در قسمتهای بعد ذکر شده است) به اجرا درآمد.

تشخیص افتراقی *P. caudatum* : برای تشخیص این نمونه از سایر انواع *Paramecium* به ویژگیهای تشخیصی مهم پرداخته شد از جمله داشتن یک ریز هسته (Micro-nucleus) و یک درشت هسته (Macro-nucleus) به شکلی که ریز هسته داخل فرورفتگی کلیه ای شکل درشت هسته فشرده جای داشته باشد (مراجعه شود به نمودار ۱)، سیستم خطوط نقره دوست (Silver line system) که فشردگی منحصر به فردی در نزدیکی ساختار دهانی دارد، وجود یک دسته مژه دمی طویل که اصطلاحاً دسته دمی (Caudal tuft) نامیده می شود و این امر حتی به تنهایی می تواند باعث تمیز نمونه حاضر از سایر انواع *Paramecium* شود، ابعاد بدن که از این نظر دومین مقام را بعد از *P. multimicronucleatum* دارد (عموماً بین ۳۰۰ تا ۴۰۰ میکرون) و وجود مجموعه بزرگی از عناصر یا اجسام کشنده که در ناحیه دمی مجتمع می شوند (refractile-r-bodies).

تهیه محیط کشت طبیعی به کمک خیسانده یونجه: مقداری یونجه خشک (یک مشت) در ۵۰۰ میلی لیتر آب به مدت ۵ دقیقه جوشانده شد و پس از خنک شدن در شیشه در دار به عنوان محیط مغذی ذخیره در دمای ۴

درجه سانتی گراد نگهداری گردید (۲). برای تهیه محیط کشت طبیعی به ازای هر ۲۰۰ میلی لیتر آب معمولی، یک قاشق سر پر از یونجه خیسانده همراه مقدار کمی مایع رویی از محیط مغذی ذخیره اضافه و میکروارگانیسم مورد نظر با کمک پیپت پاستور (حداقل ۳ پیپت سر پر) به این محیط تلقیح شد (۲).

تهیه محیط کشت مخمر: پودر مخمر (۲ g/L) در آب مقطر حل و پس از اتوکلاو در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شد. به منظور تهیه محیط کشت مخمر به ازای هر ۶۰ میلی لیتر از این محیط که در پتری دیش استریل اضافه می شد، تعدادی میکروارگانیسم از محیط ذخیره با پیپت به این محیط تلقیح شد (حداقل ۱ پیپت سر پر).

تنظیم pH مناسب جهت رشد *P. caudatum* : pH مناسب برای رشد *P. caudatum* در محدوده ۲/ ۰± ۶/۸ است (۲). برای تنظیم pH از محلولهای اسید استیک و سود ۰/۱ نرمال استفاده شد (۲).

ایجاد شرایط دمایی مختلف (۴۰، ۳۵، ۳۰، ۲۵ و ۲۰ درجه سانتی گراد) جهت بررسی تأثیر دماهای مختلف بر رشد *P. caudatum* در محیط مخمر: برای بررسی تأثیر دماهای مختلف بر روی رشد جمعیت حیوانات تحت مطالعه، شرایط استانداردی از نظر استریل بودن و قابل تنظیم بودن دما تدارک دیده شد: پلیتهای کشت با ظرفیت ۶۰ mL که در زیر هود استریل مجهز به تهویه مطبوع و لامپ UV قرار داشتند، تحت فضای هود و بر روی یک آکواریوم مجهز به بخاری دیجیتال ساعت دار با قابلیت تنظیم دما (به واسطه وجود حسگر) جایگزین شدند تا در فواصل زمانی مشخص، جمعیت *P. caudatum* در واحد حجم به کمک لام شمارش مخصوص (Sedgewick-Rafter counting chamber) برآورد شود.

نحوه شمارش جمعیت سلولی *P. caudatum* : برای شمارش جمعیت سلولی تحت کشت به کمک لام استاندارد سدویک رافتر، ابتدا در زمانهای تعیین شده، محیط کشت حاوی جمعیت *P. caudatum* به وسیله پیپت همگن و ۱ mL از آن به درون لام سدویک انتقال داده شد. سپس به کمک میکروسکوپ نوری تحت ۴x مشاهده و شمارش سلولی انجام گرفت: مساحت میدان دید تحت لنز ۴ میکروسکوپ نوری برابر $\frac{1}{66/66}$ از کل مساحت لام سدویک رافتر است، بنابراین با ضرب کردن تعداد سلولهای شمارش شده تحت نمای مذکور در عدد ۶۶/۶۶ تعداد سلولها در ۱ mL محیط کشت به دست آمد.

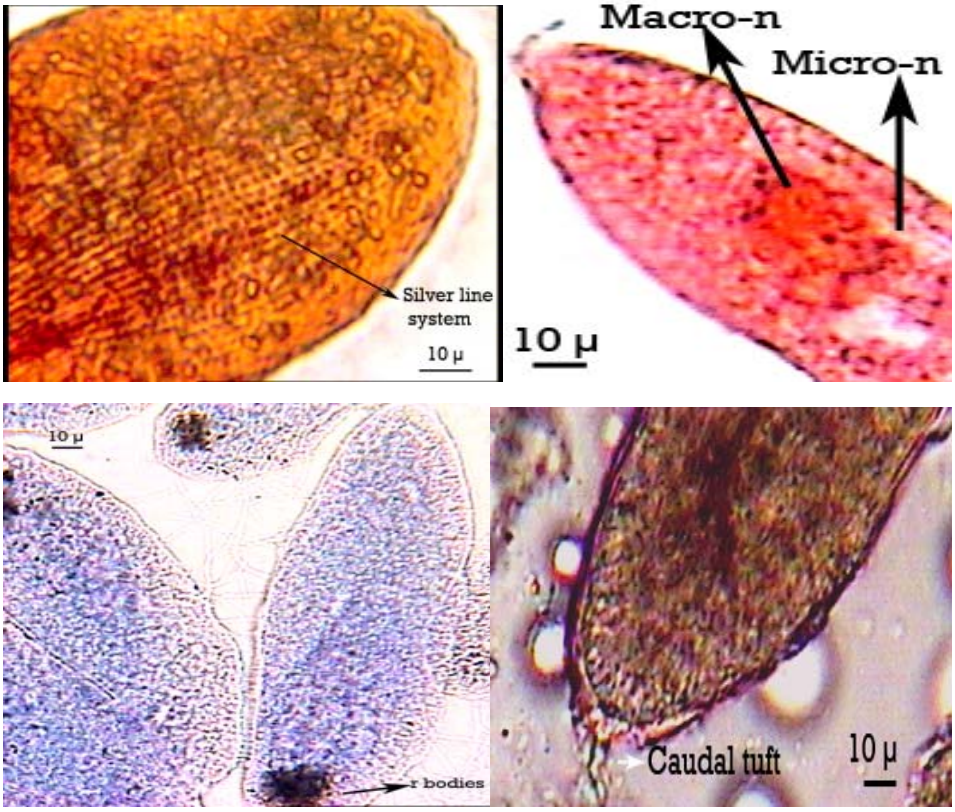
تهیه محیط کشت غنی شده مخمر: پس از دستیابی به دمای بهینه رشد *P. caudatum* نوبت به تهیه محیط کشت غنی شده مخمر رسید تا تأثیر دما و مواد اضافه شده به محیط کشت مخمر به طور همزمان بررسی شود. برای تهیه محیط کشت غنی شده مخمر به ازای ۱ لیتر محیط کشت معمولی مخمر، (۰/۲ g) $MgCl_2$، (۰/۲ g) $CaCl_2$ و (g ۰/۰۰۴) ال-آرژینین به محیط افزوده شد (۱).

تحلیل آماری: کلیه داده ها با آنالیز واریانس (ANOVA) یکطرفه مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و با کمک تستهای *Post-hoc* مانند Tukey تفاوت بین گروهها مشخص و ضریب آلفا ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

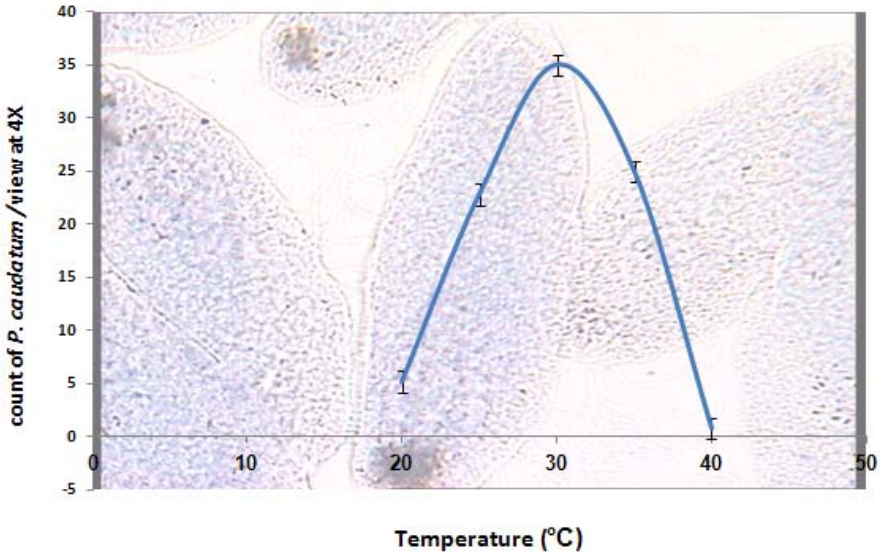
نتایج

تأثیر دماهای مختلف (۴۰، ۳۵، ۳۰، ۲۵ و ۲۰ درجه سانتی گراد) بر رشد *P. caudatum* : داده های مربوط به تأثیر دما بر رشد *P. caudatum* با آنالیز واریانس (ANOVA) یکطرفه مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت که با توجه نتیجه آزمون ($p<0/001$ و $F(4و20) = 596/244$) اختلاف گروهها کاملاً معنی دار است.

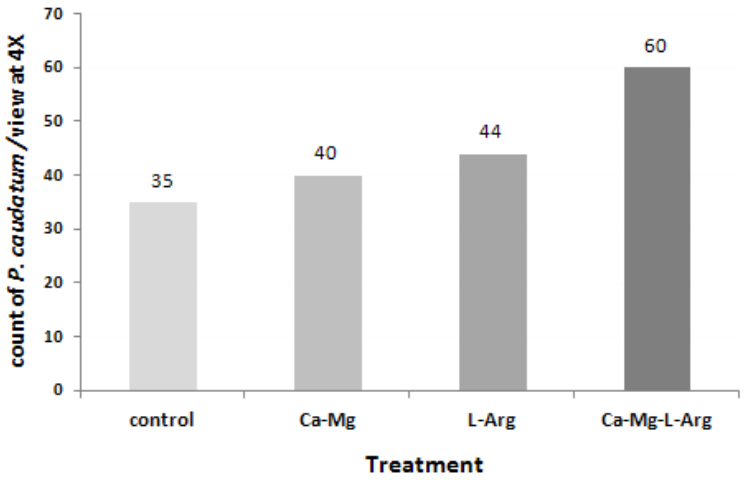
همان گونه که در نمودار ۲ نشان داده شده است رشد این حیوانات در ۳۰ درجه سانتی گراد ۴۸ ساعت پس از پاساژ در محیط کشت معمولی مخمر نسبت به سایر دماها افزایش قابل ملاحظه ای داشت، به طوری که دمای ۳۰ درجه سانتی گراد به عنوان دمای بهینه برای رشد *P. caudatum* در نظرگرفته شد.



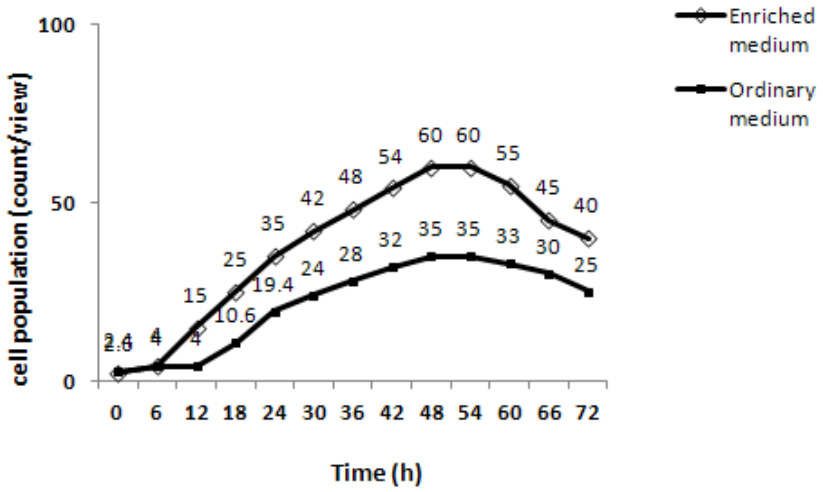
نمودار ۱: تشخیص *P. caudatum* با بررسی ویژگیهای مهم از جمله وضعیت و تعداد هسته ها، سیستم خطوط نقره، مژه های دسته دمی، اجسام کشنده، ابعاد بدن و ..انجام شد.



نمودار ۲: تعداد *P. caudatum* تحت ۴x (مطابق مندرجات بخش روشها) ۴۸ ساعت پس از پاساژ در دماهای ۲۰، ۲۵، ۳۰، ۳۵، ۴۰ درجه سانتی گراد. برای محاسبه تعداد کل این تک یاخته ها در ۱ میلی لیتر محیط کشت موجود در لام سدویک کافی است تعداد سلول را تحت منظر مورد مشاهده در ۶۶/۶۶ ضرب کرد. مطابق این نمودار تعداد این حیوانات در دمای ۳۰ درجه نسبت به سایر دماها بسیار بیشتر است.



نمودار ۳: تعداد *P. caudatum* تحت ۴x، ۴۸ ساعت پس از پاساژ در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد در محیط کشت مخمر حاوی غلظتهای مشخصی از $CaCl_2$, $MgCl_2$, L-Arg (ال-آرژینین) (مطابق مندرجات بخش روشها). حالت کنترل فاقد هر گونه ماده و فقط محیط کشت معمولی مخمر در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد است. تعداد کل سلولها در ۱ میلی لیتر محیط موجود در لام سدویک با ضرب کردن تعداد آنها تحت منظر ۴x در ۶۶/۶۶ به دست آمد.



نمودار ۴- تعداد *P. caudatum* تحت ۴x (مطابق مندرجات بخش روشها) طی ۷۲ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد در محیط کشت معمولی مخمر و محیط کشت غنی شده مخمر. تعداد کل تک یاخته ها در ۱ میلی لیتر محیط موجود در لام سدویک با ضرب کردن تعداد آنها تحت منظر ۴x در ۶۶/۶۶ به دست آمد.

تأثیر یونها و اسید آمینه در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد بر رشد *P. caudatum* : ابتدا داده های مربوط به تأثیر یونها و اسید آمینه با آنالیز واریانس (ANOVA) یکطرفه مورد تجزیه وتحلیل قرار گرفت که با توجه به نتیجه آزمون اختلاف گروهها ($F(۳ و ۱۶) = ۲۴۶/۱۴۰$ و $p<۰/۰۰۱$) کاملاً معنی دار است. همانگونه که از نمودار ۳ دریافت می شود با اضافه کردن یونهای Ca^{2+} و Mg^{2+} و اسید آمینه ال-آرژینین به محیط کشت معمولی مخمر در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد نسبت به حالت کنترل که فاقد این عوامل افزودنی و در واقع محیط کشت معمولی مخمر

بوده، افزایش قابل ملاحظه ای در تعداد سلولها ۴۸ ساعت پس از پاساژ صورت گرفته است. گرچه تأثیر یونها به تنهایی بر روی رشد سلولها در مقایسه با تأثیر اسید آمینه ال-آرژینین به ظاهر یکسان به نظر می رسد، ولی در واقع از نظر آماری برای محیط حاوی یونها نسبت به حالت کنترل و برای محیط حاوی ال-آرژینین نسبت به حالت کنترل اختلاف معنی دار وجود دارد. همچنین افزودن توأم ال-آرژینین و یونها به محیط کشت معمولی مخمر باعث افزایش بیشتر تعداد سلولهای *P. caudatum* نسبت به محیط کشت معمولی مخمر (حالت کنترل) می شود .بنابراین بیشترین جمعیت سلولی را در واحد حجم می توان در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد و در محیط کشت $CaCl_2$+ $MgCl_2$+L-Arginine گزارش کرد و این محیط را می توان محیط کشت غنی شده مخمر نامید.

منحنی رشد *P. caudatum* : نمودار ۴ منحنی رشد *P. caudatum* را شامل چهار مرحله نشان می دهد. مرحله اول از زمان صفر تا ۱۲ ساعت بعد از کشت ادامه دارد که در این مرحله سرعت رشد و تکثیر سلولها نسبتاً پایین است (فاز تأخیر). مرحله دوم از این ساعت تا ۴۸ ساعت بعد از کشت را شامل می شود که طی آن سرعت رشد به بالاترین حد (رشد لگاریتمی) می رسد. در مرحله سوم که از این لحظه تا ۵۴ ساعت بعد از کشت ادامه دارد سرعت رشد صفر بوده و در تعداد سلولهای *P. caudatum* در واحد حجم محیط کشت تفاوتی ایجاد نمی شود که می توان این مرحله را مرحله سکون یا فاز ثابت از منحنی رشد نامید. در مرحله چهارم که از ۵۴ ساعت تا ۷۲ ساعت بعد از کشت را شامل می شود رشد منفی است، یعنی تعداد سلولها در واحد حجم محیط کشت رو به کاهش می گذارد. همان گونه که از نمودار ۴ قابل مشاهده است، از لحاظ وجود مراحل چهارگانه رشد، دو منحنی موجود در این نمودار با یکدیگر تفاوتی ندارند، اما نکته قابل توجه این است که منحنی محیط غنی شده نسبت به منحنی محیط کشت معمولی مخمر به سمت بالا جا به جا شده است که این واقعیت نشان دهنده تأثیر بیشتر محیط کشت غنی شده مخمر بر رشد و تکثیر سلولهای *P. caudatum* است.

بحث

این پژوهش به منظور بررسی تأثیر دما و عوامل معدنی و آلی بر رشد و تکثیر *Paramecium caudatum* در محیط کشت مخمر انجام شد. تأثیر طیف دمایی ۴۰-۲۰ درجه سانتی گراد و غنی سازی محیط کشت معمولی مخمر با افزودن عوامل معدنی (یونهای Ca^{2+} و Mg^{2+}) و آلی (اسید آمینه ال-آرژینین به عنوان مولد نیتریک اکساید) بر رشد و تکثیر این تک یاخته مطالعه شد. مطابق یافته های این تحقیق رشد جمعیت *P. caudatum* در محیط کشت معمولی مخمر در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد ۴۸ ساعت پس از پاساژ نسبت به سایر دماها افزایش قابل ملاحظه ای داشت. در اثر غنی کردن محیط کشت مذکور با یونهای Ca^{2+} و Mg^{2+} (به نسبتهای مندرج در قسمت روشها) و به ویژه پس از افزودن اسید آمینه ال-آرژینین افزایش فوق العاده بیشتر جمعیت *P. caudatum* نسبت به محیط کشت معمولی مخمر تحت همان دمای بهینه مشاهده شد. همچنین منحنی رشد این جانوران تک سلولی تحت دمای بهینه نشان داد که رشد و تکثیر این تک یاخته دارای چهار مرحله است. مقایسه منحنی رشد این جانوران تحت دمای بهینه در محیط کشت غنی شده نسبت به محیط کشت معمولی نیز تأثیر فوق العاده بیشتر محیط کشت غنی شده نسبت به محیط کشت معمولی بر میزان رشد و تکثیر *P. caudatum*را منعکس نمود.

در تفسیر این نتایج باید اشاره کرد که رشد و تکثیر *P. caudatum* شدیداً تحت تأثیر عوامل محیطی مانند دما قرار دارد (۱۱). مطالعه Malvin و همکاران (۲۰۰۳) (۱۱) همچنین نشان داد که سیستم نیتریک اکساید در این میکروارگانیسم نقش مؤثری را در تنظیم حرارت (thermoregulation) ایفا می کند. پژوهش یاد شده به علاوه نشان داد که مهار سیستم مذکور موجب کاهش

جمعیت این موجودات می شود. همان محقق قبلاً (۱۲) با بررسی تأثیر متقابل فیزیولوژی تنفس و تنظیم دمای بدن این ارگانیسم دریافته بود که با القای مهار در واکنشهای اکسیداتیو دمای مطلوب این حیوان به 28.3 ± 0.3 تغییر می یابد و او این امر را برای سازگاری موجود با شرایط هیپوکسیک ضروری دانست. در این پژوهش با بررسی تأثیر طیف دمایی نسبتاً وسیعی بر رشد و تکثیر *P. caudatum* در ظروف پتری در دار که شرایط تنفسی را به حالت هیپوکسیک نزدیک می کند نتیجه قابل قبول و مطابق با پژوهش یاد شده به دست آمد.

در باب غنی کردن محیط کشت با توجه به اینکه *P. caudatum* می تواند محیطهای آلوده حاوی مواد شیمیایی از قبیل کلرید سدیم، کربنات پتاسیم، نیترات آمونیوم، سولفات منیزیوم، ارتو فسفات آهن و استات سرب را در طیف غلظتی وسیعی از ۱ تا ۱۰۰۰۰ میلی گرم بر لیتر تحمل کند (۳و۴)، طبیعتاً با افزودن این عوامل به محیط کشت موجود مورد نظر ارزش تغذیه ای محیط کشت بالا می رود. مضافاً اینکه مژه داران نقش ویژه ای در اکوسیستم (۳) دارند و می توان آنها را نیز در ردیف تجزیه کنندگان و عوامل مؤثر بر چرخه و گردش مواد در طبیعت دسته بندی کرد. همچنان که تأثیر این جانوران در پاکسازی و تصفیه فاضلابها و پس آبهای شهری و صنعتی (۶، ۷، ۸ و ۹)، بر کسی پوشیده نیست و بر همین اساس است که شناخت گونه های مختلف تک یاختگان، به خصوص مژه داران، جهت بررسی برهمکنش این جانوران با محیط زیست در راستای کاهش آلودگیهای زیست محیطی، حفاظت از محیط زیست و احیای جنگلها یک ضرورت جدی به نظر می رسد. چرا که آلودگی محیط زیست از مسائل عمده ای است که امروزه قسمت اعظم تلاش برنامه ریزان اجتماعی را به خود اختصاص داده است. سایر مستندها (۱۰و۱۴) با اشاره به مطالعات تک یاخته شناسان رشد تک یاختگان مژه داری مانند *Paramecium* را در محیطهای غنی از مواد آلی در حال اکسید شدن و غنی از نیتریت ها بسیار چشم گیر قلمداد کرده اند و این تحقیق نیز با بهره مندی از این اطلاعات به بررسی تأثیر افزودن عوامل معدنی (یونها) و آلی (اسید آمینه مولد نیتریک اکساید) به محیط کشت مصنوعی (مخمر) این تک یاخته پرداخت و نتیجه مؤید آن است که تأثیر محیط مغذی غنی شده کاملاً معنی دار است. به این ترتیب این نوع غنی سازی محیط کشت مخمر می تواند اثر قابل ملاحظه ای بر روی رشد و تکثیر *P. caudatum* بر جای گذارد. این نتیجه می تواند دستیابی پژوهشگران را به *P. caudatum* سریع الوصول، پر تعداد و بسیار آسان نماید. اهمیت این امر آن وقت آشکار می شود که بتوان برای شناخت مکانیسمهای بیولوژیک به جای مطالعات *In vitro* در میکروارگانیسم ها به ویژه انواع پروکایوت به مطالعه مستقیم سلولهای حیوانی در شرایط *In vivo* روی آورد. مسلماً مطالعات اخیرالذکر نه تنها از نظر هزینه بسیار مقرون به صرفه خواهد بود بلکه نتایج مستندتری به دست خواهد داد که برای انسان کاربردهای ارزنده ای خواهد داشت.

در یک نتیجه گیری کلی محیط کشت مخمر را که از جمله محیطهای کشت مصنوعی *P. caudatum* است، می توان به شکل غنی شده تحت دمای مطلوب برای رشد و تکثیر بسیار بالای *P. caudatum* به کار برد.

تشکر و قدردانی: این پژوهش با حمایت معاونت پژوهشی و مرکز تحقیقات نوروفیزیولوژی دانشگاه شاهد انجام شده است و بدین ترتیب تقدیر و قدردانی به عمل می آید.

منابع

۱. حقیقی، ع و رضاییان، م. ۱۳۷۷. کشت و نگهداری *آنتامبا هیستولیتیکا* در محیط کشت سرم اسب، رینگر و نشاسته برنج (HSr+s). مجله علوم پزشکی کرمان، دوره پنجم، شماره ۲، ص ۶۴-۶۰.

۲. فینلی، ب، جی. ۱۳۷۵. جانوران تک یاخته ای آبهای شیرین: راهنمای جمع آوری، جداسازی،کشت و تشخیص. منیژه کرمی (مترجم). انتشارات دانشگاه شاهد، تهران. ۱۱۳ صفحه.

3. Adl M. S., and Gupta V. V. S. R. (2006) Protists in soil ecology and forest nutrient cycling, *Ca J Forest Res* 36, 1805-1817.
4. Apostol S. (1973) A bioassay of toxicity using Protozoa in the study of aquatic environment pollution and its prevention. *Environ Res* 6, 365-72.
5. Clementi E. (1998) Role of nitric oxide and its intracellular signaling pathways in the control of Ca^{2+} homeostasis. *Biochem Pharmacol* 55, 713-718.
6. Curds C. R., and Cockburn A. (1970a) Protozoa in biological sewage-treatment processes. I. A survey of the protozoan fauna of British percolating-filter and activated-sludge plants. *Water Res* 4, 225-36.
7. Curds C. R., and Cockburn A. (1970b) Protozoa in biological sewage-treatment processes. II. Protozoa as indicators in the activated-sludge process. *Water Res* 4, 237-49.
8. Curds C. R. (1973) The role of protozoa in the activated-sludge process. *Am Zool* 13, 161-9.
9. Curds C. R. (1975) "Protozoa" in C. R. Curds and H. A. Hawkes (eds), Ecological Aspects of Used-Water Treatment. Academic Press, London.
10. Laybourn-Parry J. (1984) A Functional Biology of Free-Living Protozoa. Biddles Ltd, Guilford and King,s Lynn, U. K. Pages 218.
11. Malvin G. M., Cecava N., and Nelin L. D. (2003) Nitric oxide production and thermoregulation in *Paramecium caudatum*. *Acta Protozool* 42, 259-267.
12. Malvin, G. M., Havlen, P., Baldwin, C. (1994) Interactions between cellular respiration and thermoregulation in the *Paramecium*, *Am J Physiol* 267, R349-R352.
13. Prajer M., Fleury A., and Laurent M. (1997) Dynamics of calcium regulation in *Paramecium* and possible morphogenetic implication. *J Cell Sci* 110, 529-535.
14. Singh, Y. K. (2008) Teaching of zoology. A P H Publishing Corporation, New Delhi, pages 303.

Effect of temperature and organic & inorganic factors on growth and proliferation of *Paramecium caudatum*

Shahrokhi S.S.[1,2], Karami M.[1,2] and Kazemi B.[3]

[1] Neurophysiology Research Center, Shahed University, Tehran, I.R. of IRAN

[2] Biology Dept., Faculty of Basic Sciences, Shahed University, Tehran, I.R. of IRAN

[3] Cellular-Molecular Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, I.R. of IRAN

Abstract

Unicellular ciliates including *Paramecium caudatum* can be cultivated in yeast medium. In this research the effect of temperature and medium enrichment on growth and reproduction of the ciliate population was evaluated. The growth of the *P. caudatum* population in the ordinary yeast medium under a range of temperature from 20 to 40°C and enrichment of the medium using both the ions (Ca^{2+} and Mg^{2+}) and the L-Arginine were compared. Based on the results the population of the ciliate 48 h after the cultivation in the ordinary yeast medium increased at a significant level ($p<0.001$) under 30 ºC compared with those of other temperatures. Moreover, the enrichment of the medium with ingredients (Ca^{2+} and Mg^{2+}) especially after adding of L-Arginine under optimum temperature caused more increase in the population of the ciliate to that observed in the ordinary medium ($p<0.001$). The growth curve of *P. caudatum* in enriched medium under optimum temperature showed 4 phases. A comparison between growth curves of this with that of ordinary medium indicated much upward growth in the enriched one. According to this work an enriched yeast medium under the temperature of 30 ºC can be introduced as a suitable artificial medium for cultivation and proliferation of *P. caudatum*.

Keywords: *P. caudatum*, Optimum temperature, Yeast culture medium, Organic and inorganic factors, Growth curve