View metadata, citation and similar papers at core.ac.uk
brought to you by CORE
provided by Aquatic Commons

وزارت جهاد کشاورزی
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور – پژوهشکده آبزی پروری جنوب کشور

عنوان :

# بررسی امکان پرورش انبوه ریزجلبک نانوکلروپسیس اوکولاتا (*Nannochloropsis oculata*) در سیستم پرورش ستونی

مجری:
اسماعیل پقه

شماره ثبت
٤٤٢٩٠

**وزارت جهاد کشاورزی**
**سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی**
**موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور- پژوهشکده آبزی پروری جنوب کشور**

---

**عنوان پروژه : بررسی امکان پرورش انبوه ریزجلبک نانوکلروپسیس اوکولاتا (*Nannochloropsis oculata*) در سیستم پرورش ستونی**
**شماره مصوب پروژه : ۸۹۰۸٦-۱۲-۷٤-۲**
**نام و نام خانوادگی نگارنده/ نگارندگان : اسماعیل پقه**
**نام و نام خانوادگی مجری مسئول ( اختصاص به پروژه ها و طرحهای ملی و مشترک دارد ) : -**
**نام و نام خانوادگی مجری / مجریان : اسماعیل پقه**
**نام و نام خانوادگی همکار(ان) : جاسم غفله مرمضی ، مجتبی ذبایح نجف آبادی، فاطمه حکمت پور، سید جواد حسینی ملایری اصل**
**نام و نام خانوادگی مشاور(ان) : -**
**نام و نام خانوادگی ناظر(ان) : سیمین دهقان مدیسه**
**محل اجرا : استان خوزستان**
**تاریخ شروع : ۸۹/۱۰/۱**
**مدت اجرا : ۱ سال**
**ناشر : موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور**
**تاریخ انتشار : سال ۱۳۹٤**
**حق چاپ برای مؤلف محفوظ است . نقل مطالب ، تصاویر ، جداول ، منحنی ها و نمودارها با ذکر مأخذ بلامانع است .**

## «سوابق طرح یا پروژه و مجری مسئول / مجری»

**پروژه : بررسی امکان پرورش انبوه ریزجلبک نانوکلروپسیس اوکولاتا (*Nannochloropsis oculata*) در سیستم پرورش ستونی**

**کد مصوب : ۸۹۰۸۶-۱۲-۷٤-۲**

**شماره ثبت (فروست) : ٤٤۲۹۰ تاریخ : ۹۲/۱۱/۵**

**با مسئولیت اجرایی جناب آقای اسمعیل پقه دارای مدرک تحصیلی کارشناسی ارشد در رشته شیلات می‌باشد.**

**پروژه توسط داوران منتخب بخش اصلاح نژاد و تکثیر و پرورش آبزیان در تاریخ۹۲/۶/۱۸ مورد ارزیابی و با رتبه عالی تأیید گردید.**

**در زمان اجرای پروژه، مجری در :**

**ستاد □ پژوهشکده ■ مرکز □ ایستگاه□**

**با سمت کارشناس تکثیر و پرورش در پژوهشکده آبزی پروری جنوب کشورمشغول بوده است.**

| عنوان | « فهرست مندرجات » | صفحه |
|---|---|---|


چکیده ..... ۱
۱ - مقدمه و کلیات ..... ۳
۲ - مواد و روش‌ها ..... ۱۳
۱ – ۲: مواد غیر مصرفی ..... ۱۳
۲ – ۲: مواد مصرفی ..... ۱۳
۳ – ۲: ساخت کیسه های پلاستیکی ..... ۱۳
۴ – ۲: محل انجام آزمایش ..... ۱۴
۵– ۲: فراهم کردن آب مورد نیاز برای جلبکها ..... ۱۴
۶– ۲: ساخت محیط های کشت ..... ۱۵
۷– ۲: انتخاب ریزجلبک ..... ۱۷
۸– ۲: تیماربندی ..... ۱۸
۹– ۲: ثبت فاکتورهای فیزیکوشیمیایی ..... ۱۹
۱۰– ۲: تنظیم دوره نوری ..... ۱۹
۱۱– ۲: نمونه برداری و شمارش روزانه جلبک ها ..... ۲۰
۱۲– ۲: برداشت زیتوده تولیدی جلبک ..... ۲۱
۱۳– ۲: جمع بندی و تجزیه و تحلیل داده ها ..... ۲۳
۳ - نتایج ..... ۲۴
۱-۳: فاکتورهای فیزیکوشیمیایی ..... ۲۴
۲ – ۳: تراکم سلولی روز هشتم پس از کشت ..... ۲۵
۳ – ۳: تراکم سلولی در روز ۱۸ ام پرورش ..... ۲۵
۴-۳ : زیتوده خشک ..... ۳۱
۵ – ۳ : درصد ماده خشک ..... ۳۱
۶ – ۳ : زیتوده تر ..... ۳۲
۴ - بحث و نتیجه گیری ..... ۳۳
نتیجه گیری کلی ..... ۳۸
۵ - پیشنهادها ..... ۳۹
۱ – ۵ - پیشنهادهای مستخرج از این پژوهش ..... ۳۹
۲ – ۵ - پیشنهادهای پژوهشی ..... ۳۹
منابع ..... ۴۱
چکیده انگلیسی ..... ۴۳

| عنوان | « فهرست مندرجات » | صفحه |
|---|---|---|


چکیده ..... ۱
۱ - مقدمه و کلیات ..... ۳
۲ - مواد و روش‌ها ..... ۱۳
۱ – ۲: مواد غیر مصرفی ..... ۱۳
۲ – ۲: مواد مصرفی ..... ۱۳
۳ – ۲: ساخت کیسه های پلاستیکی ..... ۱۳
۴ – ۲: محل انجام آزمایش ..... ۱۴
۵– ۲: فراهم کردن آب مورد نیاز برای جلبکها ..... ۱۴
۶– ۲: ساخت محیط های کشت ..... ۱۵
۷– ۲: انتخاب ریزجلبک ..... ۱۷
۸– ۲: تیماربندی ..... ۱۸
۹– ۲: ثبت فاکتورهای فیزیکوشیمیایی ..... ۱۹
۱۰– ۲: تنظیم دوره نوری ..... ۱۹
۱۱– ۲: نمونه برداری و شمارش روزانه جلبک ها ..... ۲۰
۱۲– ۲: برداشت زیتوده تولیدی جلبک ..... ۲۱
۱۳– ۲: جمع بندی و تجزیه و تحلیل داده ها ..... ۲۳
۳ - نتایج ..... ۲۴
۱-۳: فاکتورهای فیزیکوشیمیایی ..... ۲۴
۲ – ۳: تراکم سلولی روز هشتم پس از کشت ..... ۲۵
۳ – ۳: تراکم سلولی در روز ۱۸ ام پرورش ..... ۲۵
۴-۳ : زیتوده خشک ..... ۳۱
۵ – ۳ : درصد ماده خشک ..... ۳۱
۶ – ۳ : زیتوده تر ..... ۳۲
۴ - بحث و نتیجه گیری ..... ۳۳
نتیجه گیری کلی ..... ۳۸
۵ - پیشنهادها ..... ۳۹
۱ – ۵ - پیشنهادهای مستخرج از این پژوهش ..... ۳۹
۲ – ۵ - پیشنهادهای پژوهشی ..... ۳۹
منابع ..... ۴۱
چکیده انگلیسی ..... ۴۳

## چکیده

پرورش ریزجلبک نانوکلروپسیس اوکولاتا (*N. oculata*) در شرایط دمای آب بیشتر از ۲۷ درجه سانتی گراد (از اواسط خرداد ماه تا اواخر شهریور در شرایط استان خوزستان – بندرامام خمینی «ره»)، عملاً امکان پذیر نیست در صورتیکه در این فصل برای تغذیه روتیفرهای پرورشی و افزودن به تانک های پرورش لاروی در مراکز تکثیر ماهیان دریایی هنوز به ریزجلبک نیاز است. لذا باید تمهیدی اندیشیده شود تا این گونه در آن فصل پرورش یابد. بدین منظور پرورش باید در شرایط کنترل شده از لحاظ دمایی و داخل سالن و در حجم هایی که بتواند نیاز کارگاه را برطرف کند، انجام یابد. این پروژه به منظور بررسی امکان پرورش انبوه این گونه ریزجلبک در سیستم ستونی با استفاده از کیسه های پلاستیکی و در داخل سالن در حجم های ۱۰۰ لیتری تعریف شد که در آن تاثیر دو نوع محیط کشت (کانوی (والن) و TMRL) و سه دوره نوری مختلف مورد بررسی قرار گرفت. کشت ها از یک ذخیره جلبکی مشترک در بخش استوک بخش غذای زنده شروع شد و ابتدا در کشتهای دو لیتری (ارلن های شیشه ای) و با استفاده از محیط کشت کانوی گسترش داده شدند و سپس در بخش بینابینی در بشکه های ۱۵ لیتری (با استفاده از محیط کشت کانوی) کشت داده شدند تا حجم مورد نیاز جلبک مادر برای کشت کیسه های پلاستکی فراهم گردد. رشد ریزجلبک ها در کشتهای کیسه های پلاستیکی به مدت ۱۸ روز دنبال شد و هر روز تراکم تمام کشت ها بدست می آمد. در پایان کار ریزجلبک ها داخل کیسه ها رسوب داده شد و رسوب بدست آمده جهت محاسبه زیتوده تر و خشک برداشت شده و به آزمایشگاه منتقل شد.

نتایج نشان داد که هر چند پرورش این ریزجلبک تحت این شرایط امکان پذیر می باشد ولی تراکم سلولی آن بعد از ۸ روز پرورش به حداکثر به حدود ۳/۴۴ ± ۲۲/۰۰ میلیون سلولی در سی سی (در محیط کشت کانوی– دوره نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی) رسید و این میزان بعد از ۱۸ روز حداکثر به ۴/۰۲ ± ۲۶/۵۸ میلیون سلول در سی سی (در محیط کشت کانوی– دوره نوری ۲۴ ساعت روشنایی) بود، هر چند این تراکم حد قابل قبول برای پرورش روتیفر بود ولی آنقدر قابل توجه نبود که بتوان این روش (با شرایط این پروژه) را بعنوان جایگزین کشت های بیرون سالن کرد و تنها می توان در شرایط ضروری از این روش استفاده کرد. همچنین نتایج این پروژه نشان داد که تیمارهای مختلف محیط کشت و دوره های نوری اختلاف معنی داری را در میزان تراکم های بدست آمده نشان نداد ($P> 0.05$) هر چند میزان درصد ماده خشک بدست آمده در کشت های حاوی محیط کشت TMRL به طور معنی داری ($P> 0.05$) از کشت های حاوی محیط کشت کانوی (والن) بالاتر بود ولی مقدار زیتوده تر بدست آمده ی بالاتر در کشت های حاوی محیط کشت کانوی آنرا جبران کرده و در نهایت مقدار ماده خشک بدست آمده علی رغم اینکه در کشت های حاوی TMRL بیشتر بود ولی اختلاف معنی داری با کشت های حاوی محیط کشت کانوی نداشت ($P> 0.05$)، دوره های نوری بکار رفته در این مطالعه تاثیر معنی داری بر هیچ یک از پارامترهای مورد بررسی نشان نداد ($P> 0.05$).

در نهایت و با توجه به نتایج بدست آمده در این مطالعه می توان اینگونه نتیجه گرفت که ریزجلبک نانوکلروپسیس اوکولاتا را با استفاده از کیسه های پلاستیکی و در داخل سالن با دوره نوری حداقل ۱۲ ساعت روشنایی: ۱۲ ساعت تاریکی و محیط کشت TMRL می توان پرورش داد.

کلمات کلیدی: ریزجلبک، نانوکلروپسیس اوکولاتا، کیسه های پلاستیکی، دوره نوری، محیط کشت.

## ۱ - مقدمه و کلیات

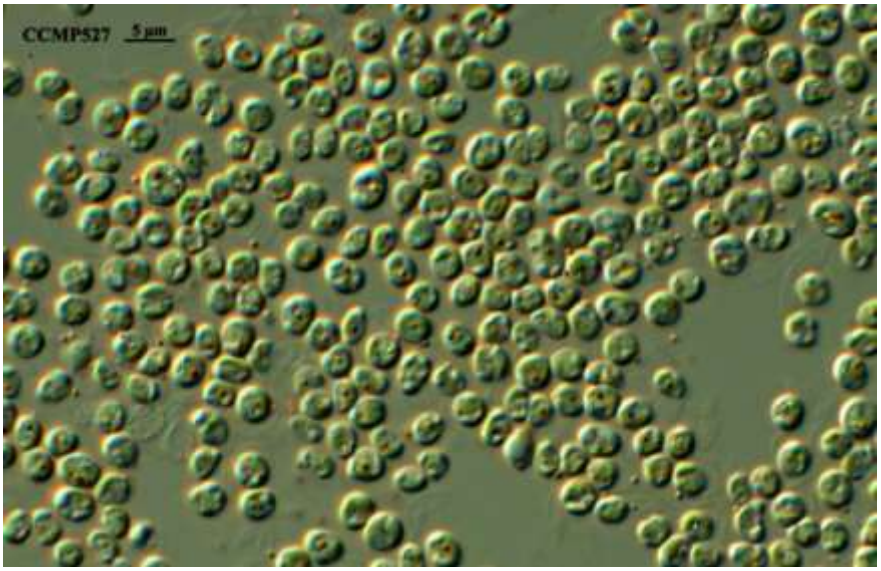
پرورش آبزیان در گذشته به این شکل بوده است که ماهیان، میگوها و سایر آبزیان را از محیط طبیعی صید کرده و در استخرها یا مخازن اقدام به اهلی سازی و پرورش آنها می کردند و معمولاً این آبزیان صید شده در اندازه هایی بودند که توانایی مصرف انواع غذاها را داشتند. اما در خلال دهه های اخیر، صنعت پرورش آبزیان از رشد قابل توجه ای برخوردار شده است، بطوریکه صدها مرکز تکثیر و پرورش انواع آبزیان در سراسر دنیا ایجاد شده و سالانه میلیونها لارو و بچه ماهی در این مراکز تولید شده و پرورش داده می شوند. امروزه معمولاً پرورش لارو در شرایطکاملاً کنترل شده انجام می شود و شرایط پرورش نیز در هر مرحله متفاوت از سایر مراحل می باشد. پرورش در مرحله لاروی به دلیل حساسیت زیاد لاروها، اندازه کوچک، تکامل ناقص فیزیولوژیکی و مورفولوژیکی از جمله مشکل ترین بخشهای این صنعت را به خود اختصاص می دهد (حسینی و جلالی، ۱۳۸۸) توسعه صنعت آبزی پروری بدون کاربرد غذاهای زنده بویژه آنهایی که در مراحل اولیه زندگی لاروها استفاده می شوند همچون ریزجلبک ها، روتیفر، آرتمیا، دافنی و سایر ارگانیسم ها امکانپذیر نبوده است. علی رغم تمامی تلاشهای صورت گرفته جهت بهبود جیره های غذایی مصنوعی یا تجاری، تولید ارگانیسم های غذایی زنده همچنان به عنوان یکی از مهمترین بخشها در آبزی پروری می باشد.

دسته ای از لاروهای آبزیان پس از جذب کیسه زرده بدون اینکه نیازمند به غذای زنده باشند، توانایی مصرف جیره های غذایی تجاری را دارند مثل برخی از آزادماهیان. دسته دوم لاروهایی هستند که پس از مصرف ذخایر زرده به علت ناقص بودن و عدم تکامل سیستم گوارشی توانایی تغذیه از جیره های غذایی مصنوعی را ندارند و از این رو الزاماً نیازمند به تغذیه از ارگانیسمهای زنده می باشند تا زمانی که سیستم گوارشی آنها تکامل یافته و بتوانند غذاهای مصنوعی را مصرف کنند (حسینی و جلالی، ۱۳۸۸) مانند لارو ماهیان دریایی.

در پرورش لارو ماهیان دریایی (از جمله لارو ماهیان دریایی تکثیر یافته در ایستگاه تحقیقاتی ماهیان دریایی بندرامام خمینی«ره») بلافاصله پس از جذب کیسه زرده لازم است که لارو این ماهیان با استفاده از غذای زنده مناسب و مقوی که در عین حال متناسب با اندازه دهان آنها نیز باشد تغذیه شوند که این غذا در بیشتر مواقع و در بیشتر مراکز تکثیر ماهیان دریایی، روتیفر می باشد. در چند روز اولیه زندگی لارو ماهیان دریایی (بویژه در مورد گونه های شانک، صبیتی و هامور) اندازه دهان آنها بسیار کوچک است و تنها می تواند غذاهای بسیار کوچک (زیر ۸۰ میکرون) را بگیرد. در ایران (ایستگاه تحقیقاتی ماهیان دریایی بندرامام خمینی«ره») از روتیفر *Brachionus rotundiformis* بدین منظور استفاده می شود که اصطلاحاً S-type (یا نوع کوچک small type) نیز خوانده می شود، البته در چند روز اولیه عمر لارو ماهیان از روتیفر تازه از تخم بیرون آمده (بچه یا baby) استفاده می شود و در ادامه و تا روز حدود ۲۵ از عمر لارو ماهی با مخلوطی از اندازه های مختلف روتیفر (روتیفر مخلوط یا Mix) تغذیه آنها ادامه پیدا می کند و از آن پس لاروها با ناپلی تازه هچ شده آرتمیا (تا روز ۴۵ ام از عمر لارو) و از روز ۳۵ ام از عمر لارو بتدریج به سمت استفاده از غذای دستی (پلیت) سوق داده می شود.

برای پرورش روتیفر روشهای مختلفی وجود دارد و برای تغذیه آنها در پرورش می توان از غذاهای مصنوعی، مخمر به تنهایی، ریزجلبک به تنهایی، مخلوطی از ریزجلبک و مخمر و یا مخلوطی از هر سه روش یاد شده استفاده کرد (Lavens & Sorgeloos, 1996) ولی بهترین غذا برای تغذیه آنها ریزجلبک می باشد اما بدلیل محدودیت های موجود در تولید ریزجلبک، معمولاً از ریزجلبک و مخمر برای تغذیه آنها استفاده می شود. همچنین از ریزجلبک در تانکهای پرورش لاروی ماهیان دریایی، به منظور فراهم کردن شرایط مطلوب محیطی نیز استفاده می شود (Lubzens et al., 1995 ; Fulks & Main, 1991 ; Lavens & Sorgeloos, 1996 ; Richmond, 2004 ). ریزجلبکی که برای این منظور استفاده می شود باید اندازه ای کوچک داشته باشد تا مناسب برای تغذیه روتیفر باشد و همچنین بتواند نیازهای غذایی روتیفر را بشکل مناسبی فراهم کند تا در ادامه با تغذیه لارو ماهیان دریایی از روتیفر این مواد مغذی به لارو انتقال یابد. یکی از مناسبترین ریزجلبک ها برای این منظور، ریزجلبک های جنس *Nannochloropsis*هستند، چرا که اندازه قطر آنها ۴-۲ میکرون و همچنین غیرمتحرک (Hibberd, 1981) است، همچنین سرشار از اسید چرب ایکوساپنتانوئیک (EPA) بوده، بعنوان منبعی برای اسیدهای چرب غیراشباع جیره غذایی مطرح هستند ( Chini-Zitell et al., 1999 ; Sukenik, 1999 ; Rocha et al., 2003; Zou et al., 2000 ; Wen &Chen, 2003 ). همچنین پرورش انبوه آن راحت می باشد و امکان تولید انبوه آن در شرایط مختلف وجود دارد.

ریز جلبک های جنس *Nannochloropsis*از رده Eustigmatophyceaeهستند که دارای شش گونه (*N. oculata , N. salina , N. gaditana, N. granulate, N. limnetica, N. oceanica*) هستند (Hibberd, 1981 ).




**شکل ۱ – ۱: تصویر ریزجلبک نانوکلروپسیس اوکولاتا (*N. oculata*) در زیر میکروسکوپ**

گونه *N. oculata*، گونه شاخص در بین آنها می باشد. گونه های این جنس اغلب در محیطهای دریایی شناخته شده اند اما همچنین در محیطهای آب شیرین و لب شور نیز یافت می شوند (Fawley & Fawley, 2007 ). همه

گونه ها تک سلولی و کوچک بوده (اندازه قطر آنها ۴-۲ میکرومتر) و غیرمتحرک (بدون تاژک) هستند (Hibberd, 1981 ).

پرورش انبوه نانوکلروپسیس در انواع مختلفی از تانک ها و استخرهای خارج سالن، کیسه های پلی اتیلن یا استوانه های فایبرگلاس ۵۰ تا ۵۰۰ لیتری که معمولاً داخل سالن نگهداری می شوند و انواع مختلفی از فتوبیورآکتورهای داخل و خارج سالن صورت می گیرد (Richmond, 2004 ). همچنین روشهای مختلفی از جمله پرورش مرحله ای (batch culture )، مداوم (continuous culture) و نیمه مداوم (semi-continuous culture) برای پرورش ریزجلبکها وجود دارد (Lavens & Sorgeloos, 1996) که راحتترین روش کشت، روش کشت مرحله ای (batch culture) می باشد.

Lavens و Sorgeloos (۱۹۹۶) شرایط پرورش برای گونه های مختلف ریزجلبک را اینگونه بیان کردند:

**جدول ۱ -۱: فاکتورهای فیزیکوشیمیایی مناسب برای کشت بسیاری از ریزجلبک های دریایی (بر گرفته از *Lavens & Sorgeloos, 1996*)**

| فاکتور | دامنه تحمل | دامنه مطلوب |
|---|---|---|
| دما (درجه سانتی گراد ) | ۱۶ – ۲۷ | ۱۸ – ۲۴ |
| شوری (قسمت در هزار ) | ۱۲ – ۴۰ | ۲۰ – ۲۴ |
| شدت نور (لوکس ) | ۱۰۰۰ - ۱۰۰۰۰ | ۲۵۰۰ - ۵۰۰۰ |
| pH | ۷ – ۹ | ۸.۲ – ۸.۷ |
| دوره نوری (تاریکی: روشنایی) (ساعت ) | | حداقل ۱۶:۸<br>حداکثر ۲۴:۰ |

طبق مشاهدات بعمل آمده در ایستگاه تحقیقاتی ماهیان دریایی بندرامام خمینی (ره)، این شرایط کمابیش برای جلبک *N. oculata*نیز صدق می کند. هر چند که مشاهده شده است که این گونه دماهای پایین تر از دمای یاد شده در جدول فوق را نیز تحمل کرده و رشد خود را در دماهای محدوده ۷ تا ۱۶ درجه سانتی گراد نیز داشته است، هر چند این رشد بسیار کند بوده است (پقه و همکاران، ۱۳۸۹) البته دمای بالاتر از ۳۱ درجه سانتی گراد نیز در کشتهای انبوه بیرون ثبت شده است در حالیکه در کشتهای داخل سالن کشتهای ریزجلبک معمولاً در دماهای بالاتر از ۲۷ درجه سانتی گراد مشکل پیدا می کنند. همچنین لازم به ذکر است که در شرایط خوزستان در فصل بهار و تابستان شدت تابش نور خورشید بر روی کشتهای ریزجلبک بیرون بسیار شدیدتر از دامنه تحمل ذکر شده می باشد(بالاتر از ۲۰۰۰۰ لوکس (دامنه قابل سنجش لوکسی متر موجود در ایستگاه) و این عامل و

دمای بسیار بالای فصل تابستان در خوزستان عملاً کشت این جلبک را در شرایط بیرون سالن در این فصل غیرممکن کرده است.

در ایستگاه تحقیقاتی ماهیان دریایی بندرامام خمینی (ره)، جلبک *N. oculata*، گونه اصلی مورد پرورش می باشد که هدف اصلی از پرورش آن، بهره برداری از آن برای تغذیه روتیفر می باشد و همچنین در تانکهای پرورشلاروی نیز به منظور ایجاد محیط همگن و ایجاد اثر آب سبز (green water effect) افزوده می شود. با توجه به امکانات موجود در ایستگاه، از روش کشت مرحله ای یا دسته ای (batch culture) برای کشت انبوه این گونه استفاده می شود. در این روش کشتهای جلبکی از یک دسته شروع می شود و این دسته به تدریج به ظروف کشت با حجم های بیشتر منتقل می شود تا در نهایت انبوهی از ریزجلبک مورد نظر را داشته باشیم و این کار با دسته های دیگر تکرار می شود. در این ایستگاه چون شرایط کارگاهی است، مراحل خالص سازی و کشتهای قبل از کشتهای دولیتری را نداریم و در واقع کشت هر دسته با استفاده از کشتهای ارلن دو لیتری شروع می شود. در زیر چکیده ای از این روش کشت آورده می شود:

**شکل۲-۱: مراحل کشت ریزجلبک در روش کشت توده ای در ایستگاه تحقیقاتی ماهیان دریایی بندرامام خمینی«ره»**

ابتدا باید آب مورد نیاز برای کشت این جلبک فراهم شود. همانطور که گفته شد بهترین شوری آب برای کشت این گونه، شوری ۲۵ – ۲۰ قسمت در هزار (Lavens & Sorgeloos, 1996)می باشد، که آزمایشات خود ما نیز گواه بر این بودند (پقه، گزارش نشده). از آنجا که شوری آب دریا همواره بیشتر از شوری یاد شده است (در خوریات مجاور ایستگاه تحقیقاتی ماهیان دریایی بندرامام خمینی (ره)، شوری آب در بیشتر روزهای سال بیشتر از ۴۵ قسمت در هزار می باشد )، لذا باید شوری آب کشت تا ۲۵ قسمت در هزار پایین آورده شود که این کار را با افزودن آب شیرین انجام می شود، سپس این آب با افزودن مقدار ppm ۳۰ کلر مورد ضدعفونی قرار می گیرد که در این حالت حدود ۲۴ ساعت تحت هوادهی نسبتاً شدید قرار می گیرد تا ضمن تاثیر کلر به تمام قسمت های آب مورد نظر، بتدریج مقداری از کلر موجود در آب نیز بپرد (چرا که کلر برای ریزجلبک ها یک ماده سمی است و اگر در آب موجود باشد باعث مرگ ریزجلبک کشت داده شده، خواهد شد )، سپس بودن یا نبودن کلر در آب را با افزودن چند قطره محلول ارتوتولیدن به نمونه آب گرفته شده، سنجیده می شود که شدت تغییر رنگ آب در اثر افزودن ارتوتولیدن میزان نسبی کلر را نیز نشان خواهد داد. در صورتی که پس از ۲۴ ساعت، هنوز در آب آماده شده، مقداری از ماده موثره کلر باقی مانده باشد، با افزودن تیوسولفات سدیم (یا هیپوسولفات سدیم) به آب (حداکثر به میزان نصف دوز کلر مصرفی یعنی در اینجا ppm ۱۵ )، مانده کلر در آب خنثی می شود. این آب برای بهره برداری در کشت ریزجلبک، بسته به اینکه این کشت کجا صورت می گیرد، مراحل دیگری را نیز سپری می کند. در آزمایشگاه کشت جلبک (phycolab) دو بخش کاملاً جدا از هم داریم. یک بخش در داخل سالن (indoor) که خود شامل زیربخش ذخیره سازی (stock) و زیربخش بینابینی است و یک بخش دیگر در خارج سالن (outdoor )، که در هر یک شرایط کشت جلبک تا حدودی متفاوت می باشد، در بخش ذخیره سازی یا استوک ظروف کشت کوچک (اغلب دو لیتر و کوچکتر) می باشد، شرایط کنترلی به لحاظ مراقبت از ورود آلودگیها به آن به شدت رعایت می شود چرا که در هر فایکولبی بخش استوک شروع زنجیره تولید ریزجلبک است و در صورت آلوده شدن، کل کشت ریزجلبکی یک کارگاه به خطر می افتد و به همین خاطر کلیه موارد مراقبتی (ضدعفونی آب ، ظروف، محیط کشت، ابزارهای مورد استفاده، دست کاربر، و ...) کاملاً رعایت گردد و حتی حدالمقدور از فیلتر هوا نیز استفاده گردد تا آلودگی از طریق هوا نیز منتقل نگردد. کشت استوک معمولاً در داخل اتاق نسبتاً کوچک و بسته ای صورت می گیرد که از ورود و خروج پرسنل غیرمرتبط با کار در آن باید با جدیت جلوگیری شود، منبع نوری مورد نیاز آن از طریق لامپهایی که نور سفید می دهند، فراهم می شود (لامپهای مهتابی).

آب مورد استفاده برای کشت ریزجلبک در بخش استوک پس از ضدعفونی اولیه با کلر و خنثی شدن با تیوسولفات سدیم، از فیلترهای سریالی (فیلتر ۳ تکه (پنبه، سنگ و ذغال فعال) تحت فشار) عبور داده می شود که پس از عبور از این فیلتر از مجاورت لامپ UV نیز عبور می کند تا با استفاده از فیلتر اجرام بزرگتر از دو میکرون آن گرفته شود و با عبور از مجاورت لامپ UV عمل ضدعفونی یک بار دیگر روی آن صورت گیرد (البته بهتر

است که کلر آب بعد از این مرحله خنثی گردد )، سپس این آب داخل ظروف کشت (در ایستگاه بندرامام ظروف کشت بخش استوک ارلن های دو لیتری و در بعضی موارد در ارلن های یک لیتری می باشد) ریخته می شود، در آن با فویل آلومینومی پوشانده می شود و با استفاده از اتوکلاو، در دمای ۱۲۱ درجه سانتی گراد، فشار ۱/۵ بار (حدود ۲۰ پاسکال) و به مدت ۲۰ دقیقه استریل می گردد، سپس این آب خنک شده و پس از خنک شدن به آن محلول غذایی (محیط کشت culture medium) افزوده می شود که طبق بررسی های بعمل آمده در مورد جلبک نانوکلروپسیس اوکولاتا، محیط کشت کانوی (Conway) مناسب‌تر می باشد (پقه و همکاران، گزارش نشده) و باز پس از این کار، ظروف کشت و آب داخل آن به مدت یک ساعت تحت تابش اشعه UV قرار می گیرند تا آلودگی احتمالی منتقل شده از طریق محیط کشت برطرف گردد، سپس ظروف کشت، به اتاق کشت (بخش استوک) منتقل شده، در جای خود در مجاورت لامپ‌های مهتابی قرار داده می شود و با افزودن مقداری جلبک مادر (با توجه به تراکم سلولی جلبک مادر حداقل ۱۰ درصد از حجم نهایی) طوریکه حداقل تراکم سلولی تراکم کشت ۱۵-۱۰ میلیون سلول در سی سی (در مورد جلبک نانوکلروپسیس اوکولاتا) در آن رعایت گردد، کشت داده می شود و با گذاشتن شیلنگ هواده با شدت هوادهی مناسب (طوریکه تلاطم خوبی را در کشت جلبک ایجاد بکند تا مانع از رسوب سلولهای جلبکی شود و همچنین آنقدر شدید نباشد که سلولهای جلبکی آسیب برساند) در مجاورت لامپ مهتابی گذاشته می شود تا حداقل یک هفته در این حالت بماند و در این مدت دوره تابش نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی برای آنها فراهم می گردد. پس از گذشت این مدت معمولاً تراکم سلولی ریزجلبک حدود ۱۰ برابر تراکم اولیه خواهد شد (یعنی در مورد نانوکلروپسیس اوکولاتا به تراکم ۱۵۰ – ۱۰۰ میلیون سلول در سی سی) و جلبکها برای برداشت آماده خواهند بود. از کشتها نمونه برداری شده، زیر میکروسکوپ به لحاظ آلودگی (از نظر زئوپلانکتونها و فیتوپلانکتونهای دیگر) مورد بررسی قرار می گیرد و همچنین سلولهای جلبکی با کمک لام نئوبار شمارش شده، تراکم آنها تعیین می شود و از بین کشتها، مناسبترین آنها (کشتی که آلودگی نداشته و در عین حال از تراکم بهتری نیز برخوردار باشد) انتخاب شده و برای کشت مجدد در بخش استوک استفاده می شود و بقیه برای استفاده در کشتهای بخش بینابینی برداشت می شوند.

آب مورد نیاز برای ریزجلبک در بخش بینابینی نیز مطابق آنچه در مورد بخش استوک گفته شد از فیلتر سریالی و مجاورت لامپ UV عبور داده می شود و در داخل سالن (بخش بینابینی) در درون یک تانک (بسته به میزان مصرف در حجمهای ۳۰۰ لیتری یا بیشتر از آن) جمع می شود. از آنجا که معمولاً دمای بیرون و داخل سالن در بیشتر روزهای سال متفاوت است، بهتر است ابتدا بگذاریم که دمای این آب با دمای داخل سالن همدما شود. در اینجا بهتر است که کلر آب مورد نیاز در این مرحله و درست دقایقی قبل از استفاده خنثی گردد. ظروف کشت در بخش بینابینی از تنوع زیادی برخوردار است ولی بدیهی است که از ظروف کشت بخش استوک بزرگتر باشد، که معمولاً از بشکه های ۱۰ تا ۲۰ لیتری ، کیسه های پلاستیکی در حجمهای مختلف، استوانه های شیشه

ای یا فایبرگلاس با حجمهای مختلف استفاده می شود. در ایستگاه بندرامام در این بخش از بشکه های پلاستیکی شفاف ۱۵ لیتری استفاده می شود. برای کشت حتماً لازم است که ابتدا ظروف کشت کاملاً تمیز و ضدعفونی (با استفاده از محلول آب و کلر) شده باشند. برای کشت بشکه های بینابینی بهترین حالت این است که جلبک مادر به مقداری در بشکه ها ریخته شود تا تراکم اولیه کشت ۱۰ – ۷ میلیون سلول در سی سی (در مورد ریزجلبک نانوکلروپسیس اوکولاتا) فراهم گردد، بدیهی است که هر چه تراکم کشت بیشتر باشد، در نتیجه در زمان مشابه تراکم برداشت نیز بیشتر خواهد بود. برای کشت بشکه ها از جلبک های برداشت شده از بخش استوک استفاده می شود و برای کشت هر بشکه محتوی جلبک یک ارلن دو لیتری برداشت شده از بخش استوک استفاده می شود و باقی مانده فضای بشکه کشت را با استفاده از آب فوق که از خنثی بودن کلر آن اطمینان داریم پر می کنیم و پس از افزودن مقدار لازم از محیط کشت که در ایستگاه بندرامام خمینی در بخش بینابینی نیز از محیط کشت کانوی استفاده می شود (البته برای صرفه جویی در هزینه ها، نسبت به بخش استوک از مواد شیمیایی ارزان قیمت تری برای ساخت آنها استفاده می شود )، بشکه ها را روی قفسه های مربوطه در مجاورت لامپهای مهتابی که وظیفه تامین شدت نور لازم را بعهده دارند گذاشته، پس از قرار دادن شیلنگ هواده در درون آنها، در آنها بسته می شود و بدین شکل حداقل یک هفته می مانند، در این جا نیز دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی در شبانه روز برای آنها مهیا می شود. پس از گذشت حداقل یک هفته (بسته به دمای محیط ممکن است این مدت بیشتر شود، یعنی میزان دمای محیط کمتر باشد دوره کشت جلبک تا رسیدن به شکوفایی طولانی تر می شود )، از کشتها نمونه برداری می شود و اگر تراکم آنها به حد قابل قبول رسیده باشد (در مورد جلبک نانوکلروپسیس اوکولاتا حداقل ۴۰ میلیون سلول در سی سی) این کشتها برداشت شده و برای کشت در ظروف کشت بزرگتر (یا در بخش بینابینی یا در بخش بیرون سالن) مورد استفاده قرار می گیرند. همانطور که قبلاً گفته شد در بخش بینابینی از ظروف بزرگتر از آنچه در ایستگاه بندرامام استفاده می شود نیز می توان استفاده کرد مثل ظروف فایبرگلاس یا پلاستیک شفاف، کیسه پلاستکی شفاف در حجم های بالاتر و حتی از تانکهای با حجمهای بالای یک تن تا حتی ۲۰ تنی (البته با استفاده از لامپهایی که شدت نور بسیار بالاتری را می توانند فراهم کنند) و همچنین از فتوبیورآکتورها، که قطعاً شرایط ومراحل کشت متفاوت خواهد بود بویژه در صورت استفاده از ظروف حجمهای بالا، استفاده از محیط کشت کانوی مقرون به صرفه نخواهد بود و حتماً باید از محیط کشتهای ارزان قیمت تر مثل TMRL استفاده شود. همچنین ما در ایستگاه بندرامام تجربه ای را با موفقیت بدست آورده ایم که از خود بشکه های شکوفا شده در بخش بینابینی می توان برای گسترش کشتهای بینابینی استفاده کرد بدین صورت که محتوای جلبکی هر بشکه را در ۳ تا ۴ بشکه مشابه تقسیم کرده و کشت را مطابق دستورالعمل فوق انجام داد (البته بهترین حالت زمانی بدست می آید که بشکه ای که جلبک داخل آن بعنوان جلبک مادر استفاده می شود، قبلاً با استفاده از جلبک برداشت شده از استوک کشت داده شده باشد ، چرا که گسترشهای بعدی ضعیف و ضعیفتر می شوند ).

در بخش بیرون سالن (outdoor) حجم کشتهای جلبکی بسیار بیشتر از حجم کشتهای داخل سالن است و در هر کارگاهی بسته به میزان نیازشان از حجمها و تکنیکهای متفاوتی استفاده می شود که می تواند حجمهایی از حدود ۱۰۰ لیتر تا حجمهای بسیار بالا تا ۵۰۰۰۰ تن و حتی بیشتر را شامل شود ( Lavens & Sorgeloos, 1996 ; Richmond, 2004) و این ظروف کشت می تواند از تانکهای پلی اتیلن یا فایبرگلاس باشد تا تانکهای بتنی و حتی استخرهای خاکی (Lavens & Sorgeloos, 1996 ; Richmond, 2004 ).

در ایستگاه بندرامام کشت انبوه جلبک نانوکلروپسیس در بیرون سالن در تانکهای ۳۰۰ لیتری پلی اتیلنی، تانکهای ۳-۲ تنی فایبرگلاس و تانکهای ۱۰-۷ تنی بتنی انجام می شود. همانطور که مشاهده می شود حجمهای تانکهای مورد استفاده بیشتر از آن حدی است که بتوان آب مورد نیاز را از فیلترهای سریالی عبور داد و آب مورد استفاده تنها با استفاده از کلر ppm ۳۰ ضدعفونی می گردد و پس از انتقال این آب به تانکهای کشت و دقایقی قبل از کشت با استفاده از تیوسولفات سدیم (حداکثر ppm ۱۵) کلر باقیمانده در آن خنثی می گردد و به کمک ارتوتولیدن از خنثی بودن آب اطمینان پیدا می شود. البته لازم به ذکر است که برای تنظیم آب شور ۲۵ قسمت در هزار از آب شور دریایی استفاده می شود که قبلاً با استفاده از فیلتر شنی، فیلتر شده و تمیز است و همچنین آب شیرین از فیلترهای کیسه ای ۲ میکرونی عبور داده شده است. در مورد فراهم کردن آب مورد نیاز در تانکهای کشت ۱۰ – ۷ تنی (و بالاتر) می توان مستقیماً مراحل تنظیم شوری آب، کلر زنی و خنثی کردن کلر را در داخل خود آن تانک انجام داد و با اینکار علاوه بر ضدعفونی کردن آب عملاً تانک کشت و وسایل هواده را نیز ضدعفونی کرده ایم.

کشت جلبک در تانکهای بیرون سالن با تانکهای ۳۰۰ لیتری شروع می شود و جلبک مادر مورد نیاز برای کشت از داخل سالن و از بشکه های بخش بینابینی تامین می شود. کشت های بیرون باید طوری شروع شوند که ابتدا تراکم اولیه کشت اولیه در آنها (در مورد جلبک نانوکلروپسیس اوکولاتا) در حدود ۷-۵ میلیون سلول در سی سی باشد، لذا برای فراهم کردن این میزان با توجه به تراکم جلبک برداشتی از بینابینی لازم می شود که برای تلقیح جلبک مادر در تانک ۳۰۰ لیتری، تعداد ۲ تا ۴ بشکه جلبک بینابینی استفاده شود. تانکهای ۳۰۰ لیتری ابتدا آبگیری می شوند، سپس کلر موجود در آب خنثی می شود و پس از آن تعداد ۲ تا ۴ بشکه جلبک در داخل آن ریخته شده، محیط کشت مناسب به مقدار لازم به آنها افزوده می شود. با توجه به اینکه حجم کشتهای بیرون زیاد است، باید از محیط کشتی استفاده کرد که هزینه کمتری را در بر داشته باشد که در این ایستگاه از محیط کشت TMRL که با استفاده از مواد اولیه ارزان قیمت (فله ای) ساخته می شود، استفاده می گردد. البته در بعضی کارگاه ها ممکن است که تنها از کودهای شیمیایی نیتراته و فسفاته استفاده گردد.

برای کشت تانکهای ۳-۲ تنی نیز به همین ترتیب، ابتدا آبگیری می شوند و سپس کلر موجود در آب خنثی می شود و پس از اطمینان از عدم وجود کلر فعال در آب جلبک مادر به آنها اضافه می شود که این جلبک در واقع جلبکی است که از تانکهای ۳۰۰ لیتری بعد از رسیدن تراکم سلولی آنها به بالاتر از ۴۰ میلیون سلول در سی

سی برداشت شده اند. برای کشت این تانکها به ازای هر تن حجمی که دارند، محتوای جلبکی یک تانک ۳۰۰ لیتری مصرف می شود یعنی اگر تانک کشت ۲ تن باشد، باید از ۲ تانک ۳۰۰ لیتری و اگر تانک کشت ۳ تن باشد، از ۳ تانک ۳۰۰ لیتری استفاده شود. این تانکهای ۲ و ۳ تنی نیز خود برای کشت تانکهایی با حجم بالاتر (در این ایستگاه ۱۰-۷ تنی) استفاده می شود بدین صورت که بعد از انجام مراحل آبگیری، ضدعفونی و خنثی کردن کلر آب درتانکهای بتنی یاد شده، به ازای هر ۵ تن حجم تانک کشت مقدار یک تن از جلبک شکوفا شده تانکهای ۲و۳ تنی (معمولاً با تراکم بالاتر از ۴۰ میلیون سلول در سی سی) به آن تانکها افزوده می شود. بدین صورت عمل کشت انجام شده است. در تمام قسمتهای بیرون سالن از محیط کشت TMRL استفاده می شود که البته در کنار آن مقدار ویتامینهای لازم نیز اضافه می شود ولی می توان نسبت ویتامینها تا حد ۱۰ برابر نیز کمتر از نسبت استفاده شده در بخش استوک در نظر گرفت. همه تانکهای کشت بیرون به کمک شیلنگهای هوای متصل به سنگ هوا و یا سیستم لوله کشی، هوادهی می گردند طوریکه از رسوب سلولهای جلبکی جلوگیری نماید، همچنین هوای تزریق شده در تامین دی اکسید کربن لازم در روز و اکسیژن لازم در شب کمک می کند. دوره کشت در تمام تانکهای بیرون نیز مثل کشتهای داخل سالن ۷-۶ روزه می باشد و پس از آن برداشت شده و به مراحل بعدی انتقال داده می شود. در این ایستگاه آخرین مرحله از کشت جلبک، کشتهای جلبک در تانکهای بتنی ۷ تا ۱۰ تنی می باشد و پس از آن هنگامی که تراکم سلولی جلبک نانوکلروپسیس اوکولاتا در این تانکها به حدود ۲۰ تا ۲۵ میلیون سلول در سی سی رسید، برداشت شده و برای استفاده در بخش پرورش روتیفر و بخش پرورش لاروی به بخشهای یاد شده منتقل می شود و بدین صورت کار کشت یک دسته (batch) از ریزجلبک به پایان می رسد و این کار برای دسته های دیگر تکرار می شود.

شرایط کشت جلبک در تانکهای بیرون کاملاً شرایط طبیعی بوده و تقریباً امکان اعمال هیچگونه کنترلی بر روی آنها نمی باشد. در استان خوزستان، شرایط برای کشتهای جلبک در بیرون سالن در ماههای اسفند تا اواخر اردیبهشت کاملاً مناسب بوده و تقریباً تا ۱۵ خرداد نیز شرایط دمایی امکان کشت را می دهد ولی از کیفیت کشتها بسیار کاسته می شود و در ماههای تابستان تقریباً اصلاً امکان کشتهای جلبکی در بیرون سالن وجود ندارد چرا که در آن زمان دمای آب به راحتی به بالای ۳۲ درجه سانتی گراد می رسد و این در حالی است که این جلبک و تقریباً همه جلبکهای پرورشی دمای بالاتر از ۲۷ درجه سانتی گراد را در طولانی مدت تحمل نمی کنند (Lavens & Sorgeloos, 1996 ; Richmond, 2004; Barsanti & Gualtieri, 2006؛ حسینی و جلالی، ۱۳۸۸). این امر زمانی مشکل ساز می شود که لازم باشد در این فصول تولید انبوه ریزجلبک ادامه داشته باشد مثلاً در مورد ماهی هامور (یکی از گونه های تکثیرشده در ایستگاه بندرامام)، فصل تخمریزی آن طوری است که معمولاً تا پایان تیرماه تولید انبوه ریزجلبک لازم می شود که عملاً تولید آن با کیفیت خوب در آن فصل (خوزستان) امکانپذیر نیست و اگر بنا باشد که کار تکثیر این گونه و گونه هایی با فصل تکثیر مشابه آن (مثل سی باس، سوکلا و...) در استان خوزستان انجام شود برای تولید ریزجلبک در آن فصل فکر دیگری غیر از تولید انبوه آن در بیرون سالن

اندیشیده شود. یکی از راهکارهایی که بسیاری از نقاط دنیا مورد توجه قرار گرفته است، تولید انبوه ریزجلبک در داخل سالن و در شرایط کنترل شده می باشد تا بتوان با کنترل دمای محیط به تولید ریزجلبک در حجم مورد نیاز در این فصول دست یافت.

**شکل ۳ – ۱: استفاده از کیسه های پلاستیکی (محافظت شده با توری های پلاستیکی) در داخل سالن (عکس از اینترنت)**

همانطور که قبلاً گفته شد محیط کشت مورد استفاده در داخل سالن برای کشت ریزجلبک نانوکلروپسیس اوکولاتا، محیط کانوی می باشد که محیط کشت نسبتاً گرانقیمتی است و بویژه اگر کشتها در حجمهای زیاد صورت گیرد، هزینه تولید را افزایش خواهد داد ولی محیط کشت TMRL ، محیطی ارزان قیمت است که در حجم های بالا می تواند جایگزین مناسبی باشد که البته لازم بود که استفاده از آن در محیطهای محروم از تابش مستقیم خورشید آزموده شود.

## ۲ - مواد و روش‌ها

### ۱ – ۲: مواد غیر مصرفی

ارلن دولیتری ، لامپ مهتابی، شلنگ هوا، pH متر و دما سنج، پلاستیک تیره، پلاستیک شفاف (جهت ساخت کیسه های کشت )، دستگاه پرس (جهت دوخت کیسه های کشت )، میکروسکوپ، لام نئوبار، شمارشگر، ظروف نمونه برداری، پیپت، چراغ، شوری سنج، توری پلاستیکی (جهت ساخت محافظ دور کیسه های کشت)، بشکه های ۱۰ و ۱۵ لیتری، تانک ۳۰۰ لیتری،

### ۲ – ۲: مواد مصرفی

آب شور و شیرین، کلر، تیوسولفات سدیم، ارتوتولئیدن، مواد شیمیایی جهت ساخت محیط های کشت (نیترات پتاسیم، ارتوفسفات سدیم، نمک EDTA سدیم، اسید بوریک، کلرید آهن، کلرید منگنز، کلرید روی، کلرید کبالت، سولفات مس، مولیبدات آمونیوم، ویتامین تیامین ($B_1$)، ویتامین D-Biotin ، ویتامین سیانوکوبالامین ($B_{12}$).

### ۳ – ۲: ساخت کیسه های پلاستیکی

برای ساخت کیسه های پلاستیکی از پلاستیک های شفاف رولی دولایه استفاده شد. ابتدا طول و قطر لازم برای ساخت کیسه هایی با حجم ۱۰۰ لیتر محاسبه شد و با در نظر گرفتن قطر ۳۵ سانتی متر برای استوانه های کشت پلاستیکها با طولی بیشتر از مقدار مورد نظر برش داده شدند و با استفاده از دستگاه اتو پرس کیسه های کشت ساخته شدند. طول کیسه ها مقداری بیشتر در نظر گرفته شد تا فضای اضافی روی کشت های جلبکی وجود داشته باشد و از آن فضا نیز برای بستن و مهار کردن کیسه های کشت استفاده شود.

برای سرپا نگه داشتن این کیسه ها لازم بود که چارچوبی تهیه شود تا آنها را علاوه بر سرپا نگه داشتن از کشیدگی و متورم شدن آنها جلوگیری کند و در عین حال موجب پاره شدن آنها نگردد. برای اینکار با استفاده از توریهای پلاستیکی با قطر الیاف حدود ۴ میلی متر و قطر چشمه حدود ۵ سانتی متر چارچوبی بصورت استوانه ای با قطر دهانه ۳۵ سانتی متر ساخته شد. طوریکه کیسه های پلاستیکی را داخل آنها قرار داده و جهت کشت استفاده شدند. همچنین با توجه به اینکه در این آزمایش یکی از پارامترهای مورد بررسی دوره نوری بود، جهت تنظیم دوره های نوری از کیسه های پلاستیکی سیاه رنگ بصورت دولایه استفاده شد طوریکه این کیسه ها در ساعت مقرر به دور کیسه های مورد نظر پیچانده می شدند. با استفاده از دستگاه نورسنج میزان عبور نور از کیسه ای تیره بررسی شد که این بررسی حاکی از این بود که میزان عبور نور از این کیسه ها بسیار ناچیز و قابل اغماض بود.

## ٤ – ۲: محل انجام آزمایش

این آزمایش در بخش پرورش جلبک ایستگاه تحقیقاتی ماهیان دریایی بندر امام خمینی«ره»و در داخل سالن سرپوشیده که مجهز به دو دستگاه کولر (یک دستگاه پنجره ای و یک دستگاه دو تکه) بود، صورت گرفت. این محل در کشت جلبک بعنوان بخش بینابینی چرخه تولید ریزجلبک نانوکلروپسیس اوکولاتا در سیستم کشت دسته ای (batch culture) استفاده می شد که سکوها و چارچوبی برای کشت کیسه های استوانه ای در آن تعبیه شده بود. برای تامین نور لازم از لامپهای مهتابی استفاده شد که بصورت ردیفی در وسط سکوی کشت تا ارتفاع حدود ۲ متر کار گذاشته شده بود. همچنین لوله کشی و شلنگ کشی های لازم برای هوادهی در محل سالن از قبل فراهم بود که متصل به سیستم مرکزی هوادهی کل کارگاه بود.

البته شایان ذکر است که کشتهای مادر اولیه جلبک مورد نیاز برای کشت تیمارهای آزمایشی در داخل ارلن های دو لیتری و در بخش استوک بخش جلبک و در شرایط کاملاً استریل صورت گرفت.

در محل آزمایش امکانات و مواد لازم برای تنظیم شوری آب، استریل کردن آب و ظروف کشت، شمارش جلبک ها و ساخت محیط های کشت فراهم بود.

کارهای مربوط به مرحله بعد از برداشت (سانتریفیوژ، جدا کردن بیوماس تر، خشک کردن و محاسبه بیوماس خشک) در آزمایشگاه ژنتیک و آزمایشگاه تغذیه پژوهشکده آبزی پروری جنوب کشور در اهواز انجام شد.

## ٥– ۲: فراهم کردن آب مورد نیاز برای جلبکها

برای پرورش ریزجلبک نانوکلروپسیس اوکولاتا شوری مناسب در حدفاصل ۲۰ تا ۲۵ قسمت در هزار می باشد (Richmond, 2004 ؛ Lavens & sorgeloos, 1996 و پقه و همکاران، گزارش نشده )، لذا در این آزمایش نیز برای کشت ریزجلبک ها، آب با شوری ۲۵ قسمت در هزار استفاده شد که برای تهیه آن شوری آب دریا با استفاده از آب شیرین فیلتر شده تا شوری مورد نظر پایین آورده شد. پس از تنظیم شوری آب، به منظور ضدعفونی کردن این آب، کلر با دوز ۳۰ ppm به آن اضافه شد و این آب بعد از عبور دادن از فیلتر ۳ مرحله ای و مجاورت لامپ UV در ظروف کشت (کیسه های پلاستیکی) مقدار لازم (حدود ۹۰ لیتر) آبگیری شد و همزمان هوادهی آنها شروع شد تا ضمن تاثیر کلر بر آب و ضدعفونی کردن آن، کیسه های پلاستیکی هم ضدعفونی گردند. هوادهی آنها به مدت ۲۴ ساعت ادامه داشت، بعد از این مدت ابتدا وجود و یا عدم وجود کلر در آب کشت ها با استفاده از ارتوتولئیدن سنجیده شد و از آنجا که هنوز در آب تمامی کیسه های کشت مقداری کلر باقی مانده بود، با استفاده از تیوسولفات سدیم (با دوز ۱۵ ppm) کلر باقیمانده آن خنثی گردید و سپس یک بار دیگر برای اطمینان بیشتر وجود یا عدم وجود کلر در آن سنجیده شد و بدین ترتیب آب برای کشت جلبکها آماده گردید.

## ٦– ۲: ساخت محیط های کشت

در این آزمایش دو نوع محیط کشت کانوی (Conway) و TMRL مورد مطالعه قرار گرفت. محیط کشت کانوی محیطی است که بصورت معمول در ایستگاه تحقیقاتی ماهیان دریایی بندرامام خمینی«ره»در کشتهای داخل سالن(بخش ذخیره و بخش بینابینی) مورد استفاده قرار می گیرد و محیط کشت نسبتاً گرانقیمتی است که فرمول آن به قرار زیر است:

**جدول ۲ – ۱: فرمول ساخت محیط کشت کانوی (اقتباس از *Lavens & Sorgeloos, 1996* با حذف سیلیکات )**

| محلول **A** | |
|---|---|
| نیترات پتاسیم یا نیترات سدیم | ۱۰۰ گرم |
| نمک EDTA سدیم | ۴۵ گرم |
| ارتوفسفات سدیم | ۲۰ گرم |
| اسید بوریک | ۳۳/۶ گرم |
| کلرید آهن | ۱/۳ گرم |
| کلرید منگنز | ۰/۳۶ گرم |
| محلول B | ۱ میلی لیتر |
| حجم با استفاده از آب مقطر به ۱۰۰۰ سی سی رسانده می شود. | |

| محلول **B** | |
|---|---|
| کلرید روی | ۲/۱ گرم |
| سولفات مس | ۲ گرم |
| کلرید کبالت | ۲ گرم |
| مولیبدات آمونیوم | ۰/۹ گرم |
| حجم با استفاده از آب مقطر به ۱۰۰ سی سی رسانده می شود. | |

| محلول ویتامین | |
|---|---|
| تیامین ($B_1$) | ۲۰۰ میلی گرم |
| سیانوکوبالامین ($B_{12}$) | ۱۰ میلی گرم |
| دی – بیوتین* (D-Biotin) | ۱۰ میلی گرم |
| حجم با استفاده از آب مقطر به ۱۰۰۰ سی سی رسانده می شود. | |

*توضیح اینکه در محلول ویتامین فرمول اصلی محیط کشت کانوی، ویتامین دی-بیوتین وجود ندارد ولی طبق مطالعات انجام شده (پقه و همکاران، گزارش نشده) حضور این ویتامین تاثیر معنی دار در بهبود افزایش تراکم جلبک نانوکلروپسیس اوکولاتا دارد و لذا در فرمول آن اضافه شد.

روش استفاده از این محیط (اگر طبق فرمول فوق ساخته شود) بدین صورت است که از هر یک از محلول های A و محلول ویتامین مقدار یک سی سی به ازای هر یک لیتر آب شور مورد استفاده برای کشت جلبک استفاده می شود.

محیط کشت TMRL محیط کشتی است که ترکیبی ساده دارد و معمولاً برای کشتهای انبوه بیرون سالن استفاده می شود و معمولاً می توان آن را با مواد اولیه ارزان قیمت تهیه کرد و فرمول آن به قرار زیر می باشد.

**جدول ۲-۲: فرمول ساخت محیط کشت *TMRL* (اقتباس از *Lavens & Sorgeloos, 1996* ).**

| محیط کشت **TMRL** | |
|---|---|
| نیترات پتاسیم یا نیترات سدیم | ۱۰۰ گرم |
| ارتوفسفات سدیم | ۲۰ گرم |
| کلرید آهن | ۳ گرم |
| مخلوط ویتامین | به مقدار مورد نیاز برای کشت ۱۰۰۰ لیتر جلبک * |
| حجم با استفاده از آب مقطر به ۱۰۰۰ سی سی رسانده می شود. | |

*البته می توان مقدار ویتامین مورد استفاده را تا یک پنجم نیز کاهش داد.

روش استفاده از این محیط کشت (در صورت رعایت نسبتهای فوق) بدین صورت است که از آن ترکیب به ازای هر لیتر آب کشت جلبک، مقدار یک سی سی از آن اضافه می گردد، لذا برای کشت یک متر مکعب جلبک لازم است که یک لیتر از محیط فوق استفاده شود.

البته شایان ذکر است اگر جلبکهای مورد کشت از دیاتومه ها باشند باید ترکیب سیلیکات نیز به هر دوی این فرمولها اضافه گردد.

هر یک از محیط های کشت فوق در این آزمایش با حل کردن مواد لیست شده در فوق در آب مقطر، به کمک حرارت دادن ساخته شد. بدین ترتیب که ابتدا مقداری آب داخل ارلن دولیتری ریخته آنرا روی شعله قرار دادیم. سپس با استفاده از ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۰۱ گرم مواد مورد نیاز را به مقدار لازم توزین شد و تک تک به داخل آب اضافه شد و صبر کردیم تا هر یک از مواد در اثر حرارت و تکان دادن آب بصورت کامل حل گردد و سپس ماده بعدی به آن اضافه گردید و این روند تا حل کردن آخرین ماده ادامه یافت. سپس در گوشه ای گذاشته شد تا کاملاً خنک گردد. بعد از خنک شدن آن مقادیر ویتامین مورد نیاز توزین گردید و به این محیط ها اضافه گردید تا در نهایت در هر یک از محیط های فوق فقط یک محلول کامل داشته باشیم. حال این محیط ها برای استفاده در کشت های جلبکی آماده بودند.

### ۷– ۲: انتخاب ریزجلبک

این مطالعه بر روی ریزجلبک نانوکلروپسیس اوکولاتا (*N. oculata*) صورت گرفت. این گونه، گونه ای است که در حال حاضر در ایستگاه تحقیقاتی ماهیان دریایی بندرامام خمینی«ره»به منظور تغذیه روتیفرهای پرورشی و همچنین استفاده در تانکهای لاروی مورد پرورش قرار می گیرد. در این ایستگاه همیشه مقدار قابل توجه ای از این جلبک در بخشهای مختلف (استوک، بینابینی و کشتهای بیرون) فایکولب وجود دارد و طبق شرایط کشت موجود، کشتهای قسمت استوک با توجه به تمهیدات بکار رفته در آن قسمت، کشتهای تمیز و عاری از آلودگی می باشند. همچنین همیشه مقداری جلبک تمیز نیز در یخچال در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری می شود. برای انتخاب جلبک مادر مناسب برای شروع این آزمایش، کشتهای موجود در استوک (ارلن های دولیتری) به دقت زیر میکروسکوپ بررسی شدند و از آنها مناسبترین جلبک که عاری از هر گونه آلودگی بود انتخاب شد و ابتدا لازم بود در همان بخش استوک به تعداد و حجم لازم رسانده شوند. از آنجا که تعداد کشتهای آزمایش ۲۴ کیسه ۱۰۰ لیتری بود و برای کشت هر یک حداقل ۱۰ لیتر جلبک مناسب لازم بود، لذا ابتداً در بخش استوک این جلبکانتخاب شده در تعداد ۶ ارلن دیگر گسترش داده شد که این کشتها خود بعد از ۷ روز پرورش وقتی که به تراکم حدود ۱۳۰ میلیون سلول در سی سی رسیدند برداشت شده و هر یک در تعداد ۵ ارلن دولیتری دیگر گسترش داده شدند و بدین ترتیب تعداد کل کشت های گسترش داده شده از ریزجلبک ارلن اولیه به ۳۰ ارلن دولیتری رسیدند که اینها نیز بعد از ۷ روز پرورش برداشت شده و به بخش بینابینی انتقال داده شدند و در داخل بشکه های ۱۵ لیتری (که با استفاده از آب حاوی کلر شستشو و ضدعفونی شده بودند) کشت شدند، یعنی هر یک از ارلن های دو لیتری مورد نظر در داخل یک بشکه ۱۵ لیتری کشت شدند و این کشتها بعد از ۷ روز پرورش، برداشت شدند و از میان آنها بشکه های ریزجلبک مناسب انتخاب شده، ابتدا داخل تانک ۳۰۰ لیتری پلی اتیلنی که قبلاً با استفاده از کلر کاملاً استریل شده بود، ریخته شد و به شدت هوادهی شدند تا جلبکی کاملاً همگن و یکنواخت داشته باشیم، سپس از این جلبک نمونه گیری شد و با استفاده از میکروسکوپ و لام نئوبار شمارش گردید و تعیین تراکم شد که تراکم آن به طور میانگین حدود ۶۴ میلیون سلول در سی سی بود. سپس از این جلبک همگن مقدار ۱۰ لیتر جلبک به همه کیسه های پلاستیکی ۱۰۰ لیتری که قبلاً آبگیری شده بود و حدود نیم ساعت قبل از کشت کلر موجود در داخل آب آنها خنثی شده بود، افزوده شد و بدین ترتیب همه کشت ها مقدار برابری از جلبک مادر با تراکم یکسان دریافت کردند. برای اطمینان از یکسان بودن تراکم کشت از آنها نمونه برداری شده و زیر میکروسکوپ شمارش گردید. میانگین تراکم کشت در کیسه های پلاستیکی حدوداً برابر با ۶/۱۴۶ میلیون سلول در سی سی بود.

**شکل ۱ - ۲: مراحل مختلف کشت و ظروف استفاده برای کشت ریزجلبک در این مطالعه (ارلن های دولیتری، بشکه های ۱۵ لیتری پلاستیکی شفاف و کیسه های پلاستیکی محافظت شده با چارچوب ساخته شده از توری پلاستیکی)**

## ۸- ۲: تیماربندی

در این آزمایش تاثیر دو فاکتور دوره های نوری و محیط کشت بر تولید جلبک نانوکلروپسیس اوکولاتا مورد بررسی قرار گرفت. دوره های نوری مورد بررسی عبارت بودند از ۲۴ ساعت روشنایی – صفر ساعت تاریکی ؛ ۱۶ ساعت روشنایی – ۸ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی – ۱۲ ساعت تاریکی و محیط های کشت های مورد بررسی عبارت بودند از محیط کشت کانوی (Conway) و محیط کشت TMRL (طبق فرمول های ذکر شده در فوق ). بدین ترتیب در این آزمایش ۶ تیمار داشتیم و برای هر تیمار ۴ تکرار در نظر گرفته شد که بدین ترتیب جمعاً ۲۴ کشت صورت گرفت. برای چیدمان کشت های یاد شده از طرح کاملاً تصادفی استفاده شد که چیدمان آنها به شکل شماره (۲-۲) بود.

**شکل ۲ – ۲ : چیدمان براساس طرح کاملاً تصادفی تیمارها و تکرارهای مختلف در سالن پرورش ریزجلبک**

## ۹– ۲: ثبت فاکتورهای فیزیکوشیمیایی

در این آزمایش شوری آب برای کل کشت ثابت و ۲۵ قسمت در هزار بود که با افزودن آب شیرین به آب شور دریا تنظیم شد. در طول دوره هر روز راس ساعت مشخص (۱۰ صبح) فاکتورهای pH و دمای همه کشتها با استفاده از دستگاه pH متر قابل حمل مارک HANNA مورد سنجش قرار گرفت. شدت نور لازم توسط لامپهای مهتابی تامین شد که شدت نور آنها با لوکسی متر (نورسنج) اندازه گیری شد و در محدوده ۱۰۰۰ تا ۲۰۰۰ لوکس قرار داشت.

## ۱۰– ۲: تنظیم دوره نوری

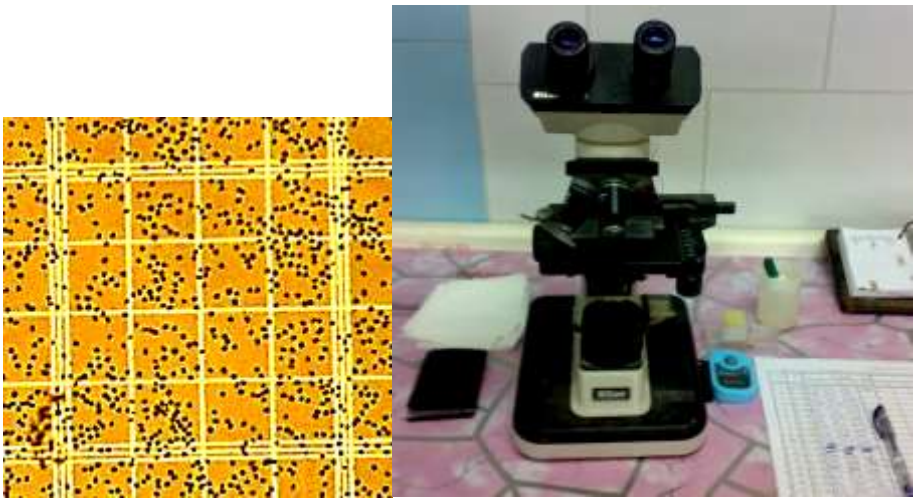
همانطور که قبلاً گفته شد در این آزمایش سه دوره نوری مختلف مورد بررسی قرار گرفت که همه این کشتها در داخل سالن و در مجاورت ردیفهای لامپهای مهتابی قرار داده شدند. جهت تنظیم دوره های نوری مختلف

بدین صورت عمل شد که لامپهای داخل سالن بصورت ۲۴ ساعته روشن بود و جهت ایجاد ساعتهای تاریکی در تیمارهایی که دوره تاریکی داشتند از پلاستیک سیاه رنگ ضخیم بصورت دولایه استفاده شد، بدین صورت کهراس ساعت مقرر (دوره تاریکی در طول شب ایجاد می شد) این پلاستیک سیاه دور تا دور کیسه های پلاستیکی کشت، کشیده می شد و به خوبی به کمک ریسمان بسته می شد. این پلاستیک تیره طوری کشیده میشد که حتی از سمت بالایی کشت ها هم نوری به درون کشت های جلبکی نفوذ نکند.

**شکل ۵ – ۲: استفاده از پلاستیک های مشکی (دو لایه) برای جلوگیری از نفوذ نور جهت تنظیم دوره های نوری**

## ۱۱– ۲: نمونه برداری و شمارش روزانه جلبک ها

در ابتدای دوره کشت، قبل از کشت جلبک ها در داخل کیسه های پلاستیکی و بعد از مخلوط کردن جلبک های بدست آمده از ظروف کشت ۱۵ لیتری، از مخلوط حاصل نمونه برداری شد و در زیر میکروسکوپ نوری با عدسی شی ای ۱۰ و با استفاده از لام نئوبار شمارش گردید و تراکم جلبک محاسبه گردید که تراکم جلبک مادر استفاده شده برای کشت کیسه های پلاستیکی حدوداً برابر با ۶۴ میلیون سلول در سی سی بود که با توجه به نسبت ۱ به ۱۰ استفاده شده از آن برای کشت کیسه های پلاستیکی، تراکم اولیه کشت این کیسه ها باید برابر با ۶/۴ میلیون سلول در سی سی شود جهت اطمینان از صحت این تراکم از کیسه های کشت نمونه برداری شد و شمارش گردیدکه تراکمهای شمارش شده بطور میانگین برابر با ۶/۱۴۶ میلیون سلول در سی سی بود که نزدیک به تراکم محاسباتی بود.



**شکل ٦ - ۲: نمایی از ابزارهای لازم برای شمارش و نمای لام نئوباردر منطقه شمارش در زیر میکروسکوپ نوری**

البته شایان ذکر است در مراحل کشت قبل از کشت اصلی (کیسه های پلاستیکی) نیز میزان تراکم ریزجلبکها شمارش و محاسبه می گردید. در طول دوره پرورش جلبک هر روز راس ساعت ۱۱ صبح از همه کشتها نمونه برداری می شد و در زیر میکروسکوپ نوری شمارش شدند. برای دقت عمل بیشتر در شمارش تعداد ۵ مربع از ۲۵ مربع منطقه شمارش لام شمارش گردید (شکل ۶ - ۲) و با توجه به روش شمارش از فرمول زیر برای محاسبه تراکم سلولی جلبک در هر سی سی استفاده شد.

$$\text{تراکم سلولی جلبک در هر سی سی} = N \times ۵ \times ۱۰^{۴}$$

که در آن N تعداد شمارش شده در زیر میکروسکوپ می باشد.

**شکل ۷ – ۲: شمارش ریزجلبک ها در زیر میکروسکوپ نوری با استفاده از لام نئوبار**

## ۱۲– ۲: برداشت زیتوده تولیدی جلبک

ابتدا از همه کشتها نمونه برداری شد و در زیر میکروسکوپ نوری شمارش گردید و تعیین تراکم گردید.

برای برداشت کردن بیوماس جلبک تولیدی بهترین روش سانتریفیوژ کردن کشتهای جلبکی است ولی از آنجا که به سانتریفیوژی که بتواند این حجم جلبک را تغلیظ کرد دسترسی نبود، ابتدا با استفاده از سود سوز آور (با دوز ppm ۱۵۰) کشتهای جلبکی رسوب داده شدند. روش کار بدین صورت بود که چون حجم کشتها برابر با ۱۰۰ لیتر بود برای ساختن محلول ppm ۱۵۰ سود سوزآور برای هر یک از کشتها مقدار ۱۵ گرم پودر سود سوزآور وزن شد و در کیسه های کشت اضافه شد و به مدت ۱۵ دقیقه هوادهی شدند تا این محلول در تمام حجم کشت پخش شده تاثیر خود را بگذارد. سپس هوادهی متوقف شد و کشتها به مدت ۲۴ ساعت رسوبدهی شدند. پس از آنکه سلولهای جلبکی کاملاً در ته کیسه ها ته نشین شد از بخش شفاف کیسه ها نمونه برداری شد و مقدار جلبک باقیمانده در آن شمارش و محاسبه گردید، سپس لایه رویی (شفاف) از کشت ها زدوده شد و رسوب حاصل از کیسه ها برداشته شد و داخل بشکه های ۱۰ لیتری تمیز ریخته شد و سپس در داخل این بشکه ها نیز چند ساعت راکد گذاشته شد و بعد از رسوب سلولهای جلبکی دوباره جداکردن آب از لایه رسوب انجام شد و بدین ترتیب هر یک از کشتها در حجم های حدود ۱ تا ۳ لیتر تغلیظ شد و این حجم جهت سانتریفیوژ کردن و خشک کردن و بدست آوردن بیوماس استفاده شد.

شایان ذکر است قبل از استفاده از این روش برای جدا کردن جلبک ها، این کار بصورت آزمایشی انجام شد و از جلبکی که بدین صورت غلیظ شده بود جهت بررسی زنده بودن یا نبودن آن، برای کشت مجدد در ظروف ۱۵ لیتری استفاده شده بود و مشاهده گردید که این کشتها رشد کردند و در زمان معمول به تراکم بالای ۶۰ میلیون سلول در سی سی رسیدند و نشان داد که این جلبک ها هنوز زنده بودند. بدین صورت تصمیم گرفته شد که از این روش برای تغلیظ و جدا کردن جلبک ها استفاده شود.

جلبک های تغلیظ شده به آزمایشگاه تغذیه پژوهشکده آبزی پروری جنوب کشور منتقل شدند و ابتدا از هر یک از کشت ها (از جلبک های غلیظ شده آنها) تعداد سه نمونه هر یک به مقدار ۱۰ سی سی برداشت شده، با استفاده از دستگاه سانتریفیوژ با دور ۲۰۰۰ دور در دقیقه و به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند.

سپس نمونه ها از دستگاه خارج شده و ابتدا لایه رویی که شفاف بود دور ریخته شد و لایه زیرین با استفاده از قاشقک از لوله های آزمایش خارج شده و با استفاده از ترازوی با دقت ۰/۰۰۰۱ گرم در شرایط فضای بسته توزین شدند، سپس این نمونه داخل آون گذاشته شده و در دمای ۱۰۵ درجه سانتی گراد خشک شده دوباره در همان شرایط توزین گردیدند تا نسبت بیوماس خشک به بیوماس تر بدست آید.

بقیه جلبک های غلیظ برداشت شده از کشت های مختلف با استفاده از دستگاه خشک کن، خشک شدند و زیتوده خشک بدست آمد و با استفاده از ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۰۰۰۱ گرم توزین شدند و با توجه به نسبت بیوماس خشک بدست آمده به بیوماس تر (شرح داده شده در فوق) مقدار بیوماس تر بدست آمده از هر یک از کشت ها محاسبه گردید.

**شکل ۸ – ۲: مراحل رسوب دهی ریزجلبکها و سانتریفیوژ کردن آنها در آزمایشگاه**

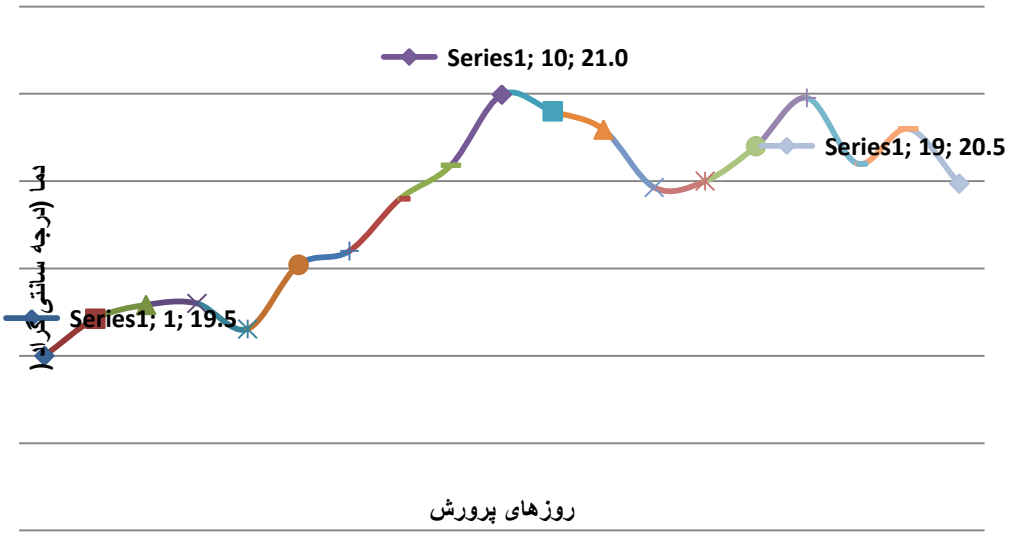
## ۱۳– ۲: جمع بندی و تجزیه و تحلیل داده ها

داده های جمع آوری شده با استفاده از بسته نرم افزاری Excelجمع بندی شده، محاسبات اولیه و رسم نمودارها توسط همان نرم افزار صورت گرفت. جهت آزمودن آماری از بسته نرم افزاری SPSS19و روش آماری آنالیز واریانس دوطرفه (two-way ANOVA) استفاده شد و برای مقایسه میانگینها در بین تیمارهای مختلف از آزمون دانکن (Duncan) در سطح اطمینان ۹۵ درصد استفاده شد. شایان ذکر است که در کاربرد اعداد مربوط به تراکم سلولی جلبک و رسم نمودار رشد جلبکی ابتداً از آن اعداد لگاریتم در مبنای ۱۰ گرفته شد و سپس مراحل بعدی محاسبات بر روی آنها صورت گرفت.

## ۳ – نتایج

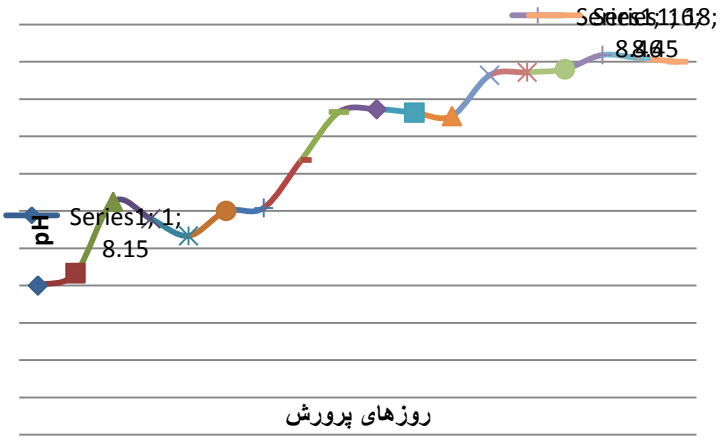
### ۱-۳: فاکتورهای فیزیکوشیمیایی

میانگین دما برای کل دوره پرورش برابر با ۰/۴۶ + ۲۰/۴۱ درجه سانتی گراد بود و از حداقل ۱۹/۷۰ تا حداکثر ۲۱/۰۰ درجه سانتی گراد بود و روند تغییرات آن در دوره پرورش مطابق شکل ۲-۲ بود.




**شکل ۱- ۳: نمودار تغییرات دما (درجه سانتی گراد) در طول دوره پرورش ریزجلبک**

میانگین pH برای کل دوره پرورش برابر ۰/۱۰ + ۸/۳۵ و از حداقل ۸/۱۷ تا حداکثر ۸/۴۶ متغیر بود و روند تغییرات آن در دوره پرورش مطابق شکل ۱-۳ بود.




**شکل ۲- ۳: نمودار تغیراتpH در طول دوره پرورش ریزجلبک**

## ۲ – ۳: تراکم سلولی روز هشتم پس از کشت

نتایج آنالیز واریانس دوطرفه برای تراکم سلولی بدست آمده در روز هشتم پس از کشت نشان داد که دوره نوری و محیط کشت تا این روز بر میزان تراکم سلولی ریزجلبک نانوکلروپسیس اوکولاتا تاثیر معنی دار داشت ($P> 0.05$) و بیشترین تراکم سلولی در تیمار سوم (محیط کشت کانوی با ۲۴ ساعت روشنایی) بدست آمد (۳/۴۴ ± ۲۲/۰۰ میلیون سلول در سی سی ). البته این میزان تنها با تراکم بدست آمده در تیمار ۵ (محیط کشت TMRLبا ۱۶ ساعت روشنایی) اختلاف معنی دار داشت ($P> 0.05$)و با بقیه تیمارها اختلاف معنی دار نداشت ($P> 0.05$)، خود این تیمار نیز بجز با تیمار ۳ با بقیه تیمارها اختلاف معنی دار نداشت ($P> 0.05$).

در بررسی تاثیر دوره روشنایی بر میزان تراکم سلولی در این روز مشخص شد که دوره های روشنایی بکار رفته در این مطالعه بر میزان تراکم سلولی جلبک نانوکلروپسیس اوکولاتا در این روز تاثیر معنی دار نداشت ( $P < 0.05$) هر چند به لحاظ عددی بیشترین میزان تراکم در دوره نوری ۲۴ ساعت روشنایی و صفر ساعت تاریکی بدست آمد (جدول ۱).

همچنین نتایج نشان داد که در همه دوره های نوری، تراکم سلولی جلبک در کشتهایی که در آنها از محیط کشت کانوی استفاده شده بود، بیشتر بود و به طبع به طور میانگین نیز تراکم سلولی در این محیط کشت بیشتر از محیط کشت TMRLبود هر چند دو عدد با یکدیگر اختلاف معنی دار نداشتند ($P> 0.05$) همچنین در هر دو محیط کشت بکار رفته بیشترین تراکم سلولی را در کشتهایی داشتیم که دوره روشنایی آنها ۲۴ ساعت روشنایی و صفر ساعت تاریکی بودند. هر چند در هر دو محیط کشت دوره های نوری تاثیر معنی داری بر میزان تراکم سلولی نداشت ($P> 0.05$).

در محیط کشت کانوی با افزایش دوره نوری بر میزان تراکم سلولی اضافه شد ولی در محیط کشت TMRL روند منظمی مشاهده نشد و با افزایش مدت تابش نور از ۱۲ ساعت به ۱۶ ساعت میزان تراکم سلولی ریزجلبک کمتر شد ولی با ۲۴ ساعته شدن دوره نوری بر میزان تراکم سلولی آن اضافه شد (جدول ۱– ۳).

## ۳ – ۳: تراکم سلولی در روز ۱۸ ام پرورش

نتایج تقریباً مشابه ای نیز در تراکمهای بدست آمده در روز ۱۸ ام پرورش بدست آمد با این تفاوت که در این روز هیچ یک از متغیرهای مورد بررسی تاثیر معنی داری بر میزان تراکم سلولی ریزجلبک نانوکلروپسیس اوکولاتا نداشت ($P> 0.05$) هر چند در تیمارهای مختلف روند تقریباً مشابه ای با تراکم سلولی روز هشتم پرورش مشاهده شد. در این روز نیز کمترین تراکم سلولی در تیمار ۵ بدست آمد ولی بیشترین تراکم سلولی در تراکم یک (محیط کشت کانوی و دوره روشنایی ۱۲ ساعت) با اختلاف ناچیزی از تیمار ۳ بدست آمد هر چند هر دو مورد کمترین و بالاترین عدد تراکم اختلاف معنی دار با هیچ یک از تیمارهای دیگر نداشت ($P> 0.05$).

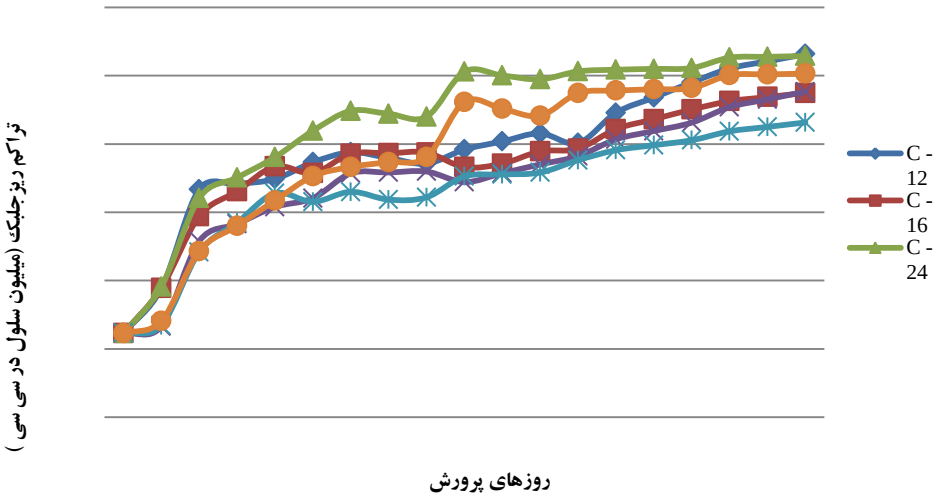
نکته جالب توجه در این روز این بود که در هر دو محیط کشت کمترین میزان تراکم سلولی در تیمارهایی بدست آمد که دوره روشنایی ۱۶ ساعت روشنایی و تاریکی ۸ ساعت در آنها بکار رفته بود و به طبع در طور میانگین نیز در همین تیمار دوره نوری کمترین میزان تراکم بدست آمد هر چند با دو دوره نوری دیگر اختلاف معنی داری مشاهده نشد ($P> 0.05$) و در کل نیز بیشترین میانگین تراکم سلولی در بین دوره های مختلف نوری در تیمار دوره نوری ۲۴ ساعت روشنایی – صفر ساعت تاریکی بدست آمد. هر چند اختلاف بسیار ناچیزی با تیمار دوره نوری ۱۲ ساعت روشنایی – ۱۲ ساعت تاریکی داشت.

**جدول ۱ - ۳: میانگین شاخصهای تراکم سلولی، زیتوده تر و خشک و درصد ماده خشک ریزجلبک نانوکلروپسیس اوکولاتا (*Nannochloropsis oculata*) در تیمارهای مختلف**

| تیمار | تراکم روز ۸ $*10^6$ cells/ml | تراکم روز ۱۸ $*10^6$ cells/ml | زیتوده خشک ( گرم ) | درصد ماده خشک | زیتوده تر (گرم ) |
|---|---|---|---|---|---|
| Conway 12L:12D | ۱۸/۵۷ ± ۲/۹۵$^{ab}$ | ۲۶/۵۸ ± ۴/۰۲$^{a}$ | ۸۹/۵۵ ± ۴/۶۱$^{ab}$ | ۵/۶۲ ± ۰/۶۸$^{b}$ | ۱۶۱۱/۸۸ ± ۲۴۱/۳۶$^{a}$ |
| Conway 16L:8D | ۱۹/۳۷ ± ۱/۰۴$^{ab}$ | ۲۳/۷۴ ± ۲/۸۰$^{a}$ | ۸۲/۰۰ ± ۱۰/۵۴$^{b}$ | ۵/۷۵ ± ۰/۱۹$^{b}$ | ۱۴۳۰/۳۹ ± ۲۳۰/۳۷$^{ab}$ |
| Conway 24L:0D | ۲۲/۰۰ ± ۳/۴۴$^{a}$ | ۲۶/۴۴ ± ۰/۴۹$^{a}$ | ۸۶/۶۱ ± ۱۰/۳۳$^{ab}$ | ۶/۵۸ ± ۰/۶۶$^{b}$ | ۱۳۱۷/۰۸ ± ۸۴/۰۵$^{abc}$ |
| TMRL 12L:12D | ۱۷/۹۸ ± ۲/۵۲$^{ab}$ | ۲۳/۸۳ ± ۲/۸۰$^{a}$ | ۹۰/۹۰ ± ۴/۵۳$^{ab}$ | ۹/۳۵ ± ۱/۲۱$^{a}$ | ۹۸۶/۴۱ ± ۱۷۲/۰۴$^{c}$ |
| TMRL 16L:8D | ۱۶/۱۰ ± ۴/۸۱$^{b}$ | ۲۱/۵۸ ± ۱/۵۰$^{a}$ | ۸۹/۰۷ ± ۱/۶۱$^{ab}$ | ۹/۱۹ ± ۰/۵۸$^{a}$ | ۹۷۲/۹۲ ± ۶۴/۹۸$^{c}$ |
| TMRL 24L:0D | ۱۹/۰۴ ± ۲/۶۷$^{ab}$ | ۲۵/۱۵ ± ۲/۸۷$^{a}$ | ۹۹/۶۴ ± ۱۳/۸۵$^{a}$ | ۹/۵۱ ± ۲/۳۴$^{a}$ | ۱۱۰۸/۰۷ ± ۳۶۵/۵۸$^{bc}$ |

**±SD میانگین: اعداد در یک ستون با حروف متفاوت دارای اختلاف معنی دار هستند ($P> 0.05$).**

همچنین در همه دوره های نوری، کشتهایی که با محیط کشت کانوی کشت داده شده بودند تراکم سلولی بیشتر نسبت به کشتهای کشت داده شده با محیط کشت TMRL داشتند و بطور میانگین نیز محیط کشت کانوی وضعیت بهتری را نسبت به محیط کشت TMRL در افزایش تراکم سلولی این جلبک داشت (جدول ۱– ۳).



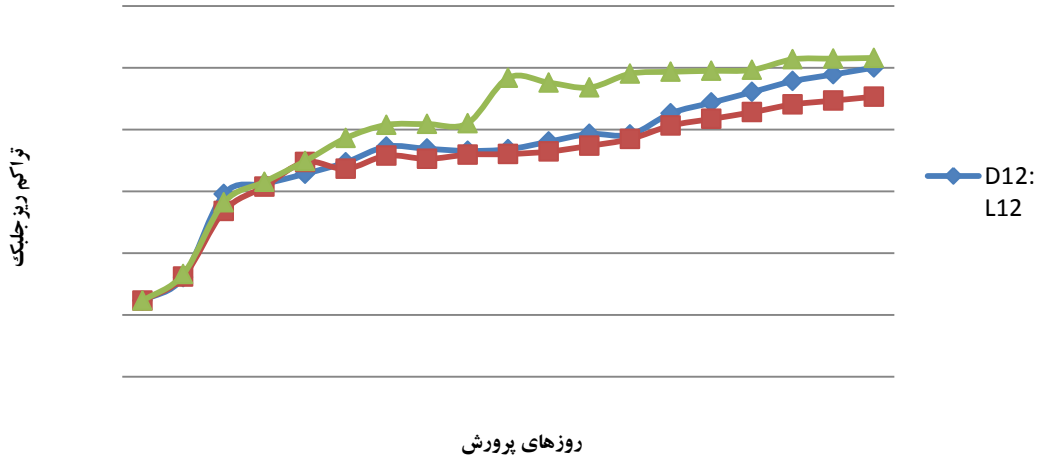

**شکل ۳– ۳: افزایش تراکم سلولی ریزجلبک نانوکلروپسیس اوکولاتا** (*N. oculata*) **در تیمارهای مختلف طی روزهای کشت**

مشاهده نمودار افزایش تراکم سلولی این جلبک در تیمارهای مختلف (شکل ۳– ۳) نشان داد که در اکثر این تیمارها بعد از ۵ – ۴ روز پرورش، افزایش تراکم سلولی در آنها بسیار کند بوده و عملاً وارد مرحله ایستا شده بودند. مثلاً در تیمار ۳ (محیط کشت کانوی – روشنایی ۲۴ ساعته) که در تمام طول دوره پرورش بجز روز ۱۸ ام بیشترین تراکم سلولی را داشت، در روز ششم بعد از کشت تراکم سلولی حدود ۲۲/۴۳ میلیون سلول در سی سی کاهش یافت ولی در ادامه افزایش تراکم کندی را در پیش گرفت و درنهایت در روز ۱۸ ام بعد از کشت به تراکم حدود ۲۶/۴۴ میلیون سلول در سی سی رسید. روند کمابیش مشابه ای نیز در بقیه تیمارها مشاهده شد که همه اینها نشان دهنده این موضوع بود که تقریباً بعد از روز ششم کشت نگهداشتن کشت ها مقرون به صرفه نیست و بهتر است در آن روز برداشت شوند.

**جدول ۲ - ۳: میانگین شاخصهای تراکم سلولی، زیتوده تر و خشک و درصد ماده خشک ریزجلبک نانوکلروپسیس اوکولاتا (*Nannochloropsis oculata*) در دوره های نوری مختلف**

| تیمار | تراکم روز ۸ *$10^6$ cells/ml | تراکم روز ۱۸ *$10^6$ cells/ml | زیتوده خشک ( گرم ) | درصد ماده خشک | زیتوده تر (گرم ) |
|---|---|---|---|---|---|
| 12L:12D | ۱۸/۲۷ ± ۲/۵۶[a] | ۲۵/۰۱ ± ۳/۳۸[a] | ۹۰/۲۳ ± ۴/۱۵[a] | ۷/۴۹ ± ۲/۲۲[a] | ۱۲۹۹/۱۵ ± ۳۹۰/۵۲[a] |
| 16L:8D | ۱۷/۹۷ ± ۳/۳۶[a] | ۲۲/۶۶ ± ۲/۳۳[a] | ۸۵/۵۴ ± ۷/۷۷[a] | ۷/۴۷ ± ۱/۹۲[a] | ۱۲۰۱/۶۶ ± ۲۹۲/۷۵[a] |
| 24L:0D | ۲۰/۵۲ ± ۳/۲۶[a] | ۲۵/۸۰ ± ۱/۹۷[a] | ۹۳/۱۲ ± ۱۳/۰۵[a] | ۸/۰۴ ± ۲/۲۲[a] | ۱۲۱۲/۵۸ ± ۲۶۳/۴۲[a] |

±SD میانگین: اعداد در یک ستون با حروف متفاوت دارای اختلاف معنی دار هستند (P> 0.05).




**شکل ٤ – ۳: افزایش تراکم سلولی ریزجلبک نانوکلروپسیس اوکولاتا (*N. oculata*) در دوره های نوری مختلف طی روزهای کشت**

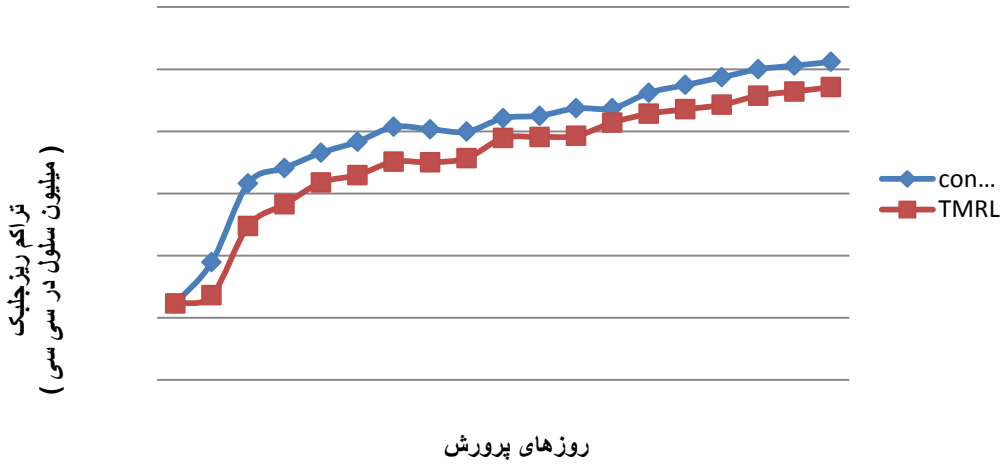
هرگاه نمودار افزایش میانگین تراکم سلولی این جلبک در محیط کشت و دوره های نوری مورد مطالعه در این پژوهش به تنهایی مشاهده گردد نیز روند تقریباً مشابه ای در هر دو محیط کشت و هر سه دوره نوری مشاهده می شود (شکل های ۴ – ۳ و ۵ – ۳).

البته تجربیات و مطالعات مختلف ثابت کرده است که این جلبک به تراکمهای بسیار بالاتر از این نیز در شرایط کشت دیگر می رسد و یکی از علت های این کمی تراکم سلولی و این روند نمودار تراکم شاید روش و ظرف کشت بدلیل کمتر شدن نفوذ نور لامپ مهتابی پس از آنکه کشت ها تا حدودی افزایش تراکم یافتند باشد چرا که با افزوده شدن بر میزان تراکم سلولی ریزجلبک ها از میزان نفوذ نور در آنها کاسته می شود.

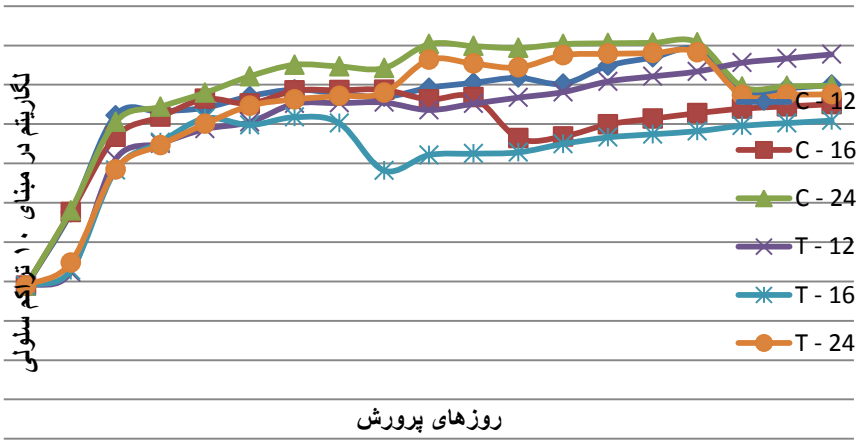
**جدول ۳ - ۳: میانگین شاخصهای تراکم سلولی، زیتوده تر و خشک و درصد ماده خشک ریزجلبک نانوکلروپسیس اوکولاتا (*Nannochloropsis oculata*) در محیط های کشت مختلف**

| تیمار | تراکم روز ۸ *$10^6$ cells/ml | تراکم روز ۱۸ *$10^6$ cells/ml | زیتوده خشک ( گرم ) | درصد ماده خشک | زیتوده تر (گرم ) |
|---|---|---|---|---|---|
| Conway | ۱۹/۹۸ ± ۲/۸۷$^a$ | ۲۵/۵۹ ± ۲/۸۲$^a$ | ۸۶/۰۵ ± ۸/۴۰$^a$ | ۵/۹۸ ± ۰/۶۶$^b$ | ۱۴۵۳/۱۲ ± ۲۱۴/۹۰$^a$ |
| TMRL | ۱۷/۸۵ ± ۳/۱۸$^a$ | ۲۳/۵۵ ± ۲/۶۷$^a$ | ۹۳/۲۰ ± ۸/۸۱$^a$ | ۹/۳۵ ± ۱/۳۶$^a$ | ۱۰۲۲/۴۷ ± ۲۱۴/۵۳$^b$ |

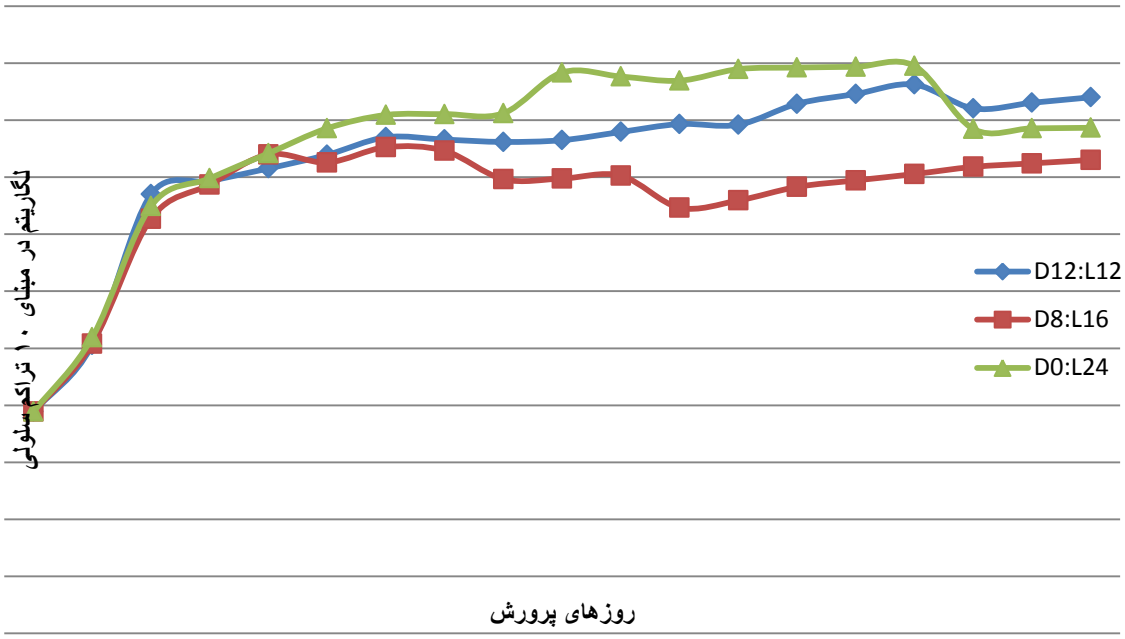
±SD میانگین: اعداد در یک ستون با حروف متفاوت دارای اختلاف معنی دار هستند (P> 0.05).



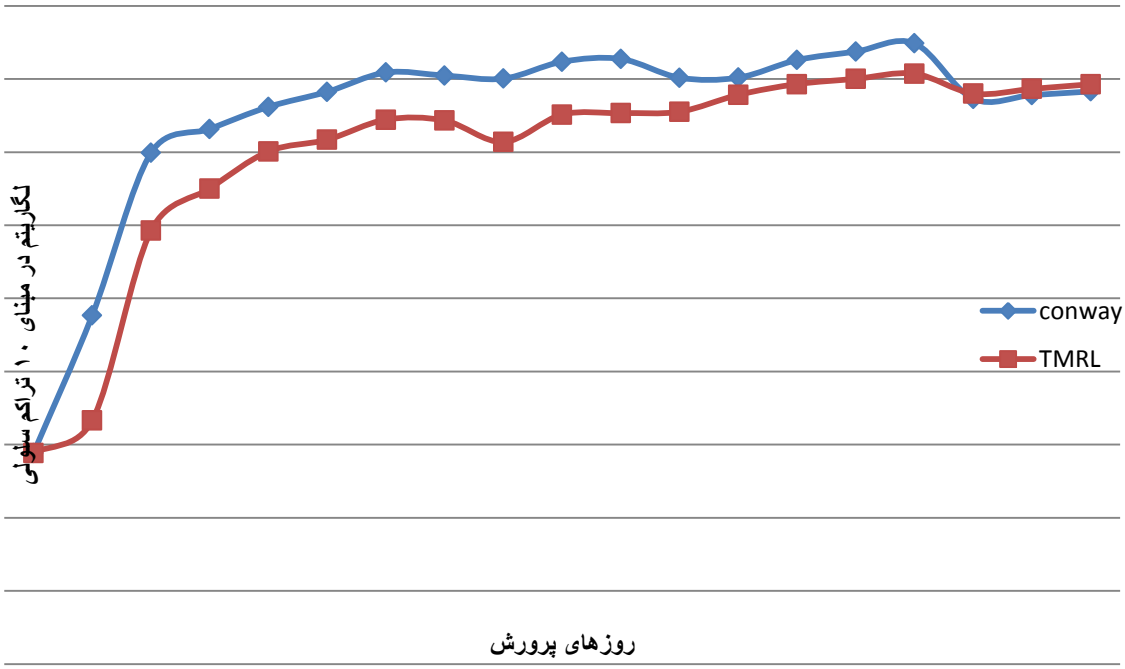

**شکل ۵ – ۳: افزایش تراکم سلولی ریزجلبک نانوکلروپسیس اوکولاتا (*N. oculata*) در محیطهای کشت مختلف طی روزهای کشت**




**شکل ٦ -۳: افزایش لگاریتمی تراکم سلولی ریزجلبک نانوکلروپسیس اوکولاتا (*N. oculata*) در تیمارهای مختلف**




**شکل ۷-۳: افزایش لگاریتمی تراکم سلولی ریزجلبک نانوکلروپسیس اوکولاتا (*N. oculata*) در دوره های نوری مختلف**




**شکل ۸-۳: افزایش لگاریتمی تراکم سلولی ریزجلبک نانوکلروپسیس اوکولاتا (*N. oculata*) در محیط کشت های مختلف**

شکلهای ۶ -۳ ، ۷ – ۳ و ۸ – ۳ نمودار لگاریتمی رشد ریزجلبک نانوکلروپسیس اوکولاتا را در تیمارهای مختلف، دوره های مختلف نوری و محیط کشت های مختلف نشان می دهد، همانطور که از نمودارها مشهود است رشد ریزجلبک نانوکلروپسیس اوکولاتا در ستونهای پلاستیکی داخل سالن در روزهای ششم تا هفتم وارد مرحله ایستا شد و از آن پس افزایش قابل توجه ای در نمودار رشد آن دیده نشد. البته همانطور که از نمودارها مشخص است در طول ۱۸ روز پرورش رشد ریزجلبک هرگز وارد مرحله مرگ یا سقوط نشد.

## ٤-۳- زیتوده خشک

نتایج بدست آمده نشان داد که بیشترین زیتوده خشک در تیمار ۶ (محیط کشت TMRL – روشنایی ۲۴ ساعته) به میزان ۱۳/۸۶ ± ۹۹/۶۴ گرم در ۱۰۰ لیتر کشت جلبک بدست آمد که البته تنها با مقدار زیتوده خشک بدست آمده برای تیمار ۲ (محیط کشت کانوی – دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی: ۸ ساعت تاریکی) اختلاف معنی دارنشان داد که در این تیمار کمترین میزان زیتوده خشک بدست آمد که خود این مقدار نیز تنها با تیمار ۶ اختلاف معنی دار داشت ($P> 0.05$) و با بقیه تیمارها اختلاف معنی دار نداشت ($P> 0.05$). در این مطالعه مشاهده شد که بعد از ۱۸ روز پرورش ریزجلبک نانوکلروپسیس اوکولاتا و بدست آمدن تراکم های در محدوده ۲۱/۵۸ تا ۲۶/۵۸ میلیون سلول در سی سی مقدار ماده خشک در محدوده ۰/۸۲ تا ۱/۰۰ گرم در هر لیتر از کشت های جلبکی بدست آمد. همچنین مشاهده شد که در هر یک از محیط کشت های مورد استفاده، دوره های نوری تاثیر معنی داری بر مقدار ماده خشک بدست آمده نداشت ($P> 0.05$) و به طور میانگین بیشترین میزان زیتوده خشک در دوره نوری ۲۴ ساعت روشنایی بدست آمد، هرچند با مقادیر بدست آمده در دیگر دوره های نوری اختلاف معنی دار نداشت ($P> 0.05$). همچنین جدول ۲ -۳ نشان می دهد که در هر یک از دوره های نوری، مقدار زیتوده خشک بدست آمده در محیط کشت TMRL بیشتر از میانگین زیتوده خشک بدست آمده در کشتهای کشت داده شده با محیط کشت کانوی بود. این علی رغم این بود که میانگین تراکم سلولی ریزجلبک ها در کشتهای استفاده شده از محیط کانوی بیشتر بود.

## ۵ – ۳ – درصد ماده خشک

مشاهده شد که به رغم اینکه تیمارهای حاوی محیط کشت کانوی در تمام طول دوره کشت از میانگین تراکم سلولی بیشتری نسبت به تیمارهای حاوی محیط کشت TMRLبرخوردار بود، در مورد زیتوده خشک بدست آمده نتایج عکس بود و میانگین درصد ماده خشک بدست آمده از تیمارهای حاوی محیط کشت TMRLبیشتر از درصد ماده خشک بدست آمده در تیمارهای حاوی محیط کشت کانوی بود طوریکه در همه دوره های نوری درصد ماده خشک در کشتهای حاوی محیط کشت TMRLبطور معنی داری بیشتر از کشتهای حاوی محیط کشت کانوی بود. بیشترین درصد ماده خشک در تیمار ۶ (محیط کشت TMRLو روشنایی ۲۴ ساعته ۲۴L:۰D)

بدست آمد که با مقادیر بدست آمده در دیگر تیمارهای محیط کشت TMRL (تیمارهای ۴ و ۵) اختلاف معنی دار نداشت (P > 0.05) ولی از مقادیر بدست آمده در همه تیمارهای حاوی محیط کشت کانوی به معنی داری (P> 0.05) بیشتر بود. همچنین اختلاف معنی داری در بین مقادیر میانگین درصد ماده خشک بدست آمده در دوره های نوری مختلف در محیط کشت کانوی نیز مشاهده نشد (P> 0.05) این امر نشاندهنده این بود که دوره های نوری به تنهایی بر میزان درصد ماده خشک تاثیر معنی دار ندارند (P> 0.05) هر چند در هر دو محیط کشت استفاده شده بیشترین میزان درصد ماده خشک در کشتهایی بدست آمد که از دوره روشنایی ۲۴ ساعته: صفر ساعت تاریکی (24L:0D) برخوردار بودند. اما درصد ماده خشک بدست آمده در همه دوره های نوری به طور معنی داری (P> 0.05) تحت تاثیر محیط کشت قرار دارد. این اختلاف در حدی بوده است که محیط کشت TMRL علی رغم تولید زیتوده تر کمتر، نسبت به محیط کشت کانوی زیتوده خشک بیشتری تولید کرده است.

## ٦ – ۳ – زیتوده تر

نتایج نشان داد که بیشترین زیتوده تر در تیمار یک (محیط کانوی – روشنایی ۱۲ ساعته: تاریکی ۱۲ ساعته) بدست آمده و این مقدار با مقادیر بدست آمده در سایر دوره های نوری محیط کشت کانوی اختلاف معنی دار نداشت (P > 0.05) ولی بطور معنی داری (P> 0.05) از مقادیر بدست آمده در تیمارهای دیگر حاوی محیط کشت TMRLبیشتر بود. همچنین مشاهده شد که در هر دوی محیط های کشت اختلاف معنی داری بین مقادیر بدست آمده در دوره های نوری مختلف مشاهده نشد (P> 0.05) ولی در تمام دوره های نوری مقدار زیتوده تر بدست آمده در کشتهای حاوی محیط کشت کانوی بیشتر از کشتهای حاوی محیط کشت TMRLبود که در بیشتر آنها (بجز دوره روشنایی ۲۴ ساعته) در بقیه موارد این اختلاف معنی دار بود (P> 0.05)و این نشان می دهد که در اینجا نیز دوره های نوری مختلف بطور مستقل بر زیتوده تر تاثیر معنی دار نداشت (P> 0.05)، ولی تاثیر محیط کشت استفاده شده بر این شاخص معنی دار (P> 0.05) بود (جداول ۱– ۳ ، ۲– ۳ و ۳– ۳).

## ٤ - بحث و نتیجه گیری

یکی از مشکلاتی که همیشه در پرورش ریزجلبک نانوکلروپسیس اوکولاتا در ایستگاه تحقیقاتی ماهیان دریایی بندرامام خمینی«ره»با آن روبرو بودیم، پرورش ریزجلبک در ماههای گرم سال (تقریباً از اواسط خرداد به بعد) در بیرون سالن و بصورت انبوه بود چرا که دمای هوا و در نتیجه دمای کشت های ریزجلبکی در خارج از سالن بیشتر از ۲۷ درجه سانتی گراد می شود (اطلاعات ثبت شده در ایستگاه از سالهای ۱۳۸۵ تا ۱۳۹۱) و حتی در اواسط تیرماه تا دمای ۳۲ درجه سانتی گراد نیز ثبت شده است و این دما فراتر از دمای مطلوب برای رشد و تکثیر این ریزجلبک است و به شدت از حداکثر تراکم ممکنه ای که این ریزجلبک بدان می رسد کاسته می شود و موارد سقوط و مرگ جلبکی در این دما بشدت زیاد می شود. این در حالی است که برای تکثیر گونه های دریایی بومی مثل ماهی هامور معمولی (یکی از گونه های اصلی مورد تکثیر در این ایستگاه) لازم است که تقریباً تا اواخر تیر ماه این ریزجلبک را داشته باشیم هر چند از حجم مصرف ریزجلبک بطور قابل توجه ای کاسته می شود. یکی از گزینه های جایگزین، پرورش این ریزجلبک در داخل سالن و در شرایط کنترل شده از لحاظ دمایی بوده است.

نتایج بدست آمده از این مطالعه نشان داد که این گونه ریزجلبک را می توان در داخل سالن و در داخل کیسه های پلاستیکی شفاف (به شکل استوانه هایی به قطر ۳۰ تا ۳۵ سانتی متر) پرورش داد هر چند که بعد از ۷ روز پرورش حداکثر تراکم بدست آمده ۳/۴۴ ± ۲۲/۰۰ میلیون سلول در سی سی بود و با نگهداری کشت ها تا روز ۱۸ ام نیز تراکم سلولی از ۴/۰۲ ± ۲۶/۵۸ میلیون سلول در سی سی فراتر نرفت که این امر بدین معنی است که نمی توان جهت کشت این گونه ریزجلبک، کشت آن در داخل سالن را روش مناسبی برای جایگزین کردن کشت های انبوه در شرایط بیرون سالن در نظر گرفت و تا جایی که شرایط جوی امکان می دهد کشت آنها در بیرون سالن صورت گیرد و در زمانهایی که کشت آنها در خارج سالن امکان پذیر نیست و احتیاج به کشتهای ریزجلبکی در فصول گرم سال وجود دارد می توان از گزینه کشت آنها در داخل سالن و در کیسه های پلاستکی تحت شرایط سالن کشت ریزجلبک ایستگاه تحقیقاتی ماهیان دریایی بندرامام خمینی«ره»استفاده کرد. چرا که کشتهای داخل سالن ریزجلبک هنگامی مقرون به صرفه هستند که بتوان آنها را با تراکمهای بسیار بالاتری نسبت به کشتهای انبوه بیرون سالن پرورش داد ولی در این پروژه تراکم بدست آمده بعد از ۸ روز در حدود تراکمهای معمول بدست آمده در کشت های ۱۰ تنی تانکهای بتنی بیرون سالن ایستگاه در شرایط مطلوب آب و هوایی بود هر چند پرورش در داخل سالن این برتری را نسبت به کشت های بیرون سالن دارد که در شرایط آب و هوایی که امکان کشت بیرون وجود ندارد، می توان در داخل سالن کشتهای جلبکی را داشت. البته در صورت فراهم کردن شرایط مطلوبتر به لحاظ فنی می توان انتظار داشت که به تراکم های بالاتری دست یافت.

کشت انبوه ریزجلبکهای مختلف در شرایط داخل سالن در انواع مختلفی از ظروف از جمله کیسه های پلاستیکی (Lavens & Sorgeloos, 1996 ، Richmond, 2004 )، ستونهای شیشه ای و شیشه ای نشکن، فایبرگلاس شفاف و در حجم ها و قطرهای مختلف (Richmond, 2004) در دنیا متداول است. قطر این استوانه ها از ۱۰ سانتی متر (Cook, 1950) تا ۵۰ سانتی متر ( Richmond, 2004) و با ارتفاع بسیار متغیر گزارش شده است. ستونهای استوانه ای شکل عمودی با ارتفاع ۲ تا ۲/۵ متر و قطر ۳۰ تا ۵۰ سانتی متر ساخته شده از فایبرگلاس شفاف بصورت گسترده ای در مراکز تکثیر به منظور تولید ریزجلبک مورد نیاز برای تغذیه صدفهای دوکفه ای و لارو ماهیان دریایی مورد استفاده قرار می گیرد (Richmond, 2004 ). در اکثر مطالعات مقایسه ای انجام شده کشتهای جلبکی گونه های مختلف داخل سالن در سیستم های ستونی، میزان تولید روزانه در واحد حجم در آنها نسبت به کشتهای بیرون سالن بیشتر بوده است ، البته لازم به ذکراست در تمام آنها قطر سیلندرها بسیار کم بوده است (Miyamoto et al., 1988 ; Cohen & Arad, 1989 ; Garcia Camacho et al., 1999) پرورش انبوه ریزجلبک نانوکلروپسیس اوکولاتا از دیرباز در کیسه های پلی اتیلنی یا سیلندرهای فایبرگلاس ۵۰ تا ۵۰۰ لیتر که معمولاً در داخل سالن در مجاورت نور مصنوعی قرار می گرفتند صورت می گرفته است (Fulks & Main, 1991). چندین مشکل در این روش کشت مشاهده شده است از جمله تراکم سلولی و تولید کم و مستعد آلودگی بودن (Boro-Witzka, 1997). این کیسه های پلی اتیلنی اغلب بصورت بسیار ساده ای با استفاده از پلاستکیهایی با ضخامت ۰/۲ میلی متر و قطر ۳۰ تا ۵۰ سانتی متر ساخته می شدند که در طولهای مختلفی بریده شده و کف آنها مسدود و آب بندی می شده است که با استفاده از حبابهای هوا مخلوط می شدند. این کشتها معمولاً تراکم پایینی از ریزجلبک نانوکلروپسیس

(۲۵ تا ۱۲۵ میلی گرم در لیتر در روز) تولید می کردند (Fulks & Main, 1991) که نتایج مشابه ای نیز در کشتهای این مطالعه بدست آمد ( ۴۵/۵۶ تا ۵۵/۳۶ میلی گرم در لیتر در روز در کشتهای مختلف ). البته با استفاده از تکنیکهای جدید میزان تولید در سیلندرهای داخل سالن را توانسته اند بصورت قابل توجه ای (۱/۵ گرم در لیتر در روز) افزایش دهند و تا غلظت ۷ گرم در لیتر رسانده اند (Chini Zittelli et al., 2006).

نتایج این مطالعه نشان داد که هیچ یک از دوره های نوری بکار گرفته شده تاثیر معنی داری بر همه پارامترهای مورد بررسی نداشت ($P > 0.05$) ولی به لحاظ عددی بالاترین مقدار تراکم سلولی (هم در روز هشتم پرورش و هم در روز هجدهم پرورش) در دوره نوری ۲۴ ساعت روشنایی: صفر ساعت تاریکی بدست آمد، همچنین نتایج مشابهی نیز از لحاظ زیتوده خشک و درصد ماده خشک بدست آمد، هر چند از نظر زیتوده تر بیشترین میزان در تیمار دوره نوری ۱۲ ساعت روشنایی: ۱۲ ساعت تاریکی بدست آمد ولی چون درصد ماده خشک در تیمار ۲۴ ساعت روشنایی: صفر ساعت تاریکی بیشتر از تیمار فوق بود در نهایت مقدار زیتوده خشک بدست آمده در تیمار ۲۴ ساعت روشنایی: صفر ساعت تاریکی بیشتر از بقیه بود. این امر می رساند که این ریزجلبک (نانوکلروپسیس اوکولاتا) را در دوره های نوری ۱۲ ساعت روشنایی: ۱۲ ساعت تاریکی تا ۲۴ ساعت روشنایی:

صفر ساعت تاریکی می توان کشت داد بدون اینکه این تغییر در مدت زمانهای تابش اثر سویی بر شاخصهای رشد آن داشته باشد و در نتیجه با توجه به ملاحظات اقتصادی و صرفه جویی در مصرف برق با توجه به نتایج این مطالعه دوره نوری ۱۲ ساعت روشنایی: ۱۲ ساعت تاریکی را برای پرورش این گونه ریزجلبک مناسب ذکر کرد. چنین دوره نوری از طرف Rocha و همکاران (۲۰۰۳) برای کشت گونه دیگری از این جنس ریزجلبک (گونه *Nannochloropsisgaditana*) مورد استفاده قرار گرفته است. این در حالی است که برخی منابع دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی: ۸ ساعت تاریکی را برای کشت ریزجلبک های مختلف توصیه کرده اند (حسینی و جلالی، ۱۳۸۸ ؛El-DinMohammadyetal.,2005؛Lavens&Sorgeloos,1996) هر چند بکار بردن حداکثر ۲۴ ساعت روشنایی نیز در مورد بسیاری از ریزجلبک ها بلامانع ذکر شده است (Richmond, 2004 ؛Lavens & Sorgeloos, 1996) و حتی بعضاً افزایش در میزان روشنایی باعث افزایش در تولید ریزجلبک ها شده است (Richmond, 2004). البته عنوان شده است که بهتر است یک دوره تاریکی حداقل ۸ ساعته برای تجدید قوای ریزجلبک به منظور رشدو تکثیر مناسبتر در روز بعد به کشت های ریزجلبکی داده شود (حسینی و جلالی، ۱۳۸۸ ؛ Lavens & Sorgeloos, 1996 ؛ Barsanti & Gualtieri, 2006 ) و حتی Barsanti&Gualtieri (۲۰۰۶) معتقد هستند که بسیاری از گونه های ریزجلبک تحت تابش مداوم نور رشد مناسبی ندارند و ایشان دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی: ۸ ساعت تاریکی را حداکثر دوره روشنایی مناسب دانسته و حتی دوره های نوری ۱۴ ساعت روشنایی: ۱۰ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی: ۱۲ ساعت تاریکی را نیز برای کشت این ریزجلبک ها مناسب دانسته است. البته همانطور که قبلاً ذکر شد نتایج این مطالعه نشان داد که دوره نوری ۲۴ ساعت روشنایی: صفر ساعت تاریکی نه تنها تاثیر سویی بر پارامترهای مورد بررسی نداشت، بلکه تا حدی نیز نسبت به بقیه دوره های نوری وضعیت بهتری را نیز نشان داد، هر چند این افزایش در شاخصها معنی دار نبود ($P > 0.05$ ). امینی خوئی (۱۳۸۹) تاثیر دوره های مختلف نوری را در شدت های متفاوت نور بر ریزجلبک کلرلا ولگاریس (*Chlorlla vulgaris* )آزمودند و طبق نتایج آنها در تمام شدت های نوری بیشترین تراکم سلولی مربوط به دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی: ۸ ساعت تاریکی (در مقایسه با ۱۶D:۸L و ۱۲D:۱۲L) بدست آمد که هم از لحاظ تراکم بدست آمده و هم از لحاظ زیتوده تولید شده در بین دوره های نوری مختلف در شدت های نوری با یکدیگر اختلاف معنی دار داشتند ($P> 0.05$)، همچنین شمس و همکاران (۱۳۸۳) کمترین میزان رشد ریزجلبک *Skeletonemacostatum* را در دوره نوری ۱۸D:۶L در مقایسه با تیمارهای دیگر (۰D:۲۴L ؛ ۶D:۱۸L و ۱۲D:۱۲L) در تمامی شدت های نوری مطالعه شده بدست آوردند.

در مطالعه امینی خوئی و همکاران (۱۳۸۹) کشت های جلبکی کلرلا بعد از ۷ روز تمام تیمارها وارد مرحله ایستا شدند و میزان تراکم آنها در روز هفتم در محدوده ۲۰ میلیون سلول در سی سی تا ۹۰ میلیون سلول در سی سی و مقدار زیتوده بدست آمده (بعد از روز دهم) در محدوده حدود ۰/۶۷ گرم تا ۲/۰۵ گرم در لیتر متغیر بود. در مطالعه حاضر مقدار زیتوده بدست آمده از کشت های ریزجلبک نانوکلروپسیس اوکولاتا از حداقل ۰/۸۲ تا

حداکثر ۱/۰۰ گرم در لیتر (بعد از ۱۸ روز پرورش) در تیمارهای مختلف متغیر بود. باید توجه داشت که کشتهای امینی خوئی و همکاران (۱۳۸۹) داخل ارلن های یک لیتری صورت گرفت بود. Renaud و Parry (۱۹۹۴) مقدار زیتوده خشک بدست آمده از کشتهای ریزجلبک نانوکلروپسیس اوکولاتا را برای کشتهای با تراکم ۲۰ تا ۲۶ میلیون سلول در سی سی در محدوده ۰/۰۶ تا ۰/۱۳ گرم و Hodgson و همکاران (۱۹۹۱) برای کشت های همین گونه با تراکم ۲ تا ۴ میلیون سلول در سی سی مقدار زیتوده خشک را ۰/۰۲ گرم در لیتر و Zou و همکاران (۲۰۰۰) مقدار زیتوده خشک بدست آمده از کشت های نانوکلروپسیس اوکولاتا با تراکم $۱۰^{۷} \times$ ۱۹۰۰ – ۱۰۰۰ سلول در سی سی را ۴۰/۶ تا ۶۷/۳ گرم در لیتر گزارش کردند.

در مقایسه تاثیر دو محیط کشت بکار رفته در این پژوهش (کانوی و TMRL) مشاهده شد که علی رغم اینکه در تمام دوره های نوری و همچنین در میانگین کل کشت ها، تراکم و همچنین زیتوده تر بدست آمده ریزجلبک نانوکلروپسیس اوکولاتا در کشت های حاوی محیط کشت کانوی بیشتر بود، بعلت اینکه درصد ماده خشک بدست آمده در کشت های حاوی محیط TMRLبصورت معنی داری ($P> 0.05$) بیشتر بود، میزان میانگین ماده خشک بدست آمده از کشت های حاوی محیط TMRLبیشتر از تیمارهای کشت داده شده با محیط کشت کانوی بود و از آنجا که هدف از تولید ریزجلبک در آبزی پروری دریایی استفاده از آنها به منظور تغذیه آبزیان پرورشی می باشد، لذا با توجه به نتایج این مطالعه محیط کشت TMRLبرای کشت این گونه مناسبتر از محیط کشت کانوی تشخیص داده شد و از آنجا که ساخت این محیط کشت نسبت به محیط کشت کانوی ارزان تر و راحت تر است، بهتر است برای کشت انبوه ریزجلبک نانوکلروپسیس اوکولاتا از این محیط استفاده شود بویژه در مرحله ای که قرار است کشت انبوه ریزجلبک برداشت شده، به منظور تغذیه روتیفر استفاده شوند. البته همانطور که قبلاً هم گفته شد کشتهای انبوه خارج از سالن واقع در ایستگاه تحقیقاتی ماهیان دریایی بندرامام خمینی«ره»به علت ارزانی و راحتی ساخت محیط کشت TMRLاز آن استفاده می شد و نتایج این تحقیق نشان داد که این محیط علاوه بر ارزانتر و راحت تر بودن، تولید درصد ماده خشک بیشتری نیز در این ریزجلبک می کند و از آنجا که از نظر تراکم سلولی کشت های ریز جلبک موجب اختلاف معنی داری نشد برای این گونه کشت ها کاملاً قابل استفاده است. البته این مطالعه نشان داد که این محیط کشت را با موفقیت می توان در کشت های انبوه داخل سالن نیز به کار گرفت و با این کار صرفه جویی قابل توجه ای درهزینه ها کرد. البته تاثیر بکار بردن این محیط کشت (TMRL) در کشت های حجم کم باید مورد بررسی قرار گیرد، چرا که در اینگونه ظروف کشت تراکم سلولی ریزجلبک ها بسیار بیشتر از ظروف کشت بزرگتر می گردد و ممکن است در تراکم های بالا تاثیرات محیط کشت ها بشکل دیگری باشد. هر دو محیط کشت به کار رفته در این پژوهش از محیط کشت هایی است که در منابع مختلف برای ریزجلبک های دریایی معرفی شده است (Lavens & Sorgeloos, 1996 ؛ Barsanti & Gualtieri, 2006 ؛ Richmond, 2004؛ حسینی و جلالی، ۱۳۸۸ ؛ پقه و همکاران، ۱۳۸۹ ). البته برای کشت گونه های مختلف جنس نانوکلروپسیس از محیط F/2 گیلارد نیز استفاده شده است (Roch et al., 2003) هر

چند مطالعات خود ما نشان داد که در کشت های با حجم کم (ارلن های دو لیتری و کمتر) محیط کشت کانوی (والن) برای این ریزجلبک بطور معنی داری بهتر از محیطگیلارد و ساتو بود (پقه و همکاران، ۱۳۹۱) و تجربیات بدست آمده در ایستگاه تحقیقاتی ماهیان دریایی بندر امام خمینی«ره»نیز حاکی از بهتر بودن محیط کشت کانوی نسبت به گیلارد در کشت های با حجم ۱۵ – ۱۰ لیتر بخش بینابینی بود و لذا استفاده از این محیط کشت به جای محیط کشت گیلارد در این ایستگاه معمول شد. نتایج این مطالعه نیز حاکی از این بود که می توان محیط کشت ارزان قیمت TMRL را در کشت های ریزجلبک نانوکلروپسیس اوکولاتا داخل سالن، جایگزین محیط کشتهای گیلارد و کانوی که هر دو آنها محیط کشت های گران قیمت هستند، کرد. البته بهتر است تاثیر این محیط های کشت بر کیفیت غذایی ریزجلبک نانوکلروپسیس اوکولاتا به ویژه از نظر تاثیر بر اسید های چرب غیراشباع (مانند EPA و DHA) مورد بررسی قرار گیرد.

## ۵- نتیجه گیری کلی

با توجه به نتایج بدست آمده در این مطالعه می توان اینگونه نتیجه گرفت که اولاً استفاده از کیسه های پلاستیکی شفاف (آن گونه که در این پژوهش بکار گرفته شد) بعنوان جایگزینی برای کشت های توده ای بیرون سالن گزینه مناسبی نیست و بهتر است در مدت زمانی که شرایط کشت جلبک به لحاظ دمایی، شدت نور و .... در بیرون سالن مهیا است، این ریزجلبک را در تانکهای بیرون سالن کشت داد تا بتوان با هزینه کمتری و با بهره بردن از تابش طبیعی آفتاب که در جنوب کشور موهبتی خدادادی برای پرورش ریزجلبک است، کشت داد. ولی اگر در حالتی که در شرایط آب و هوایی اجازه کشت در بیرون سالن را ندهد، مثلاً از اواسط خرداد ماه تا اواخر شهریور (در شرایط استان خوزستان – بندر امام خمینی«ره»که به منظور تکثیر گونه ماهی هامور هنوز ریزجلبک نانوکلروپسیس لازم است می توان از روش کشت ستونی در داخل سالن با به کار بردن کیسه های پلاستیکی استفاده کرد و در حد محدودی این ریزجلبک را تولید کرد.

این مطالعه نشان داد که دوره های نوری مختلف تاثیر معنی داری بر تولید ریزجلبک ندارد و در صورت لزوم به صرفه جویی انرژی برق می توان از دوره نوری ۱۲ ساعت روشنایی: ۱۲ ساعت تاریکی برای کشت ریزجلبک نانوکلروپسیس اوکولاتا استفاده کرد.

در مورد محیط کشت مناسب از بین دو محیط کشت مورد مطالعه باید گفت که محیط کشت TMRL برای کشت در این سیستم مناسب است چرا که زیتوده خشک بیشتری نسبت به کشت های حاوی محیط کشت کانوی (والن) تولید کرد و علاوه بر آن ساخت این محیط کشت بسیار ارزان قیمت تر از محیط کشت کانوی (والن) (به جدول فرمول محیط کشت ها توجه شود) و همچنین ساختن آن نیز راحت تر از محیط کانوی (والن) می باشد. پس اینگونه می توان بیان کرد که:

ریزجلبک نانوکلروپسیس اوکولاتا (*Nannochloropsisoculata*) در داخل سالن در سیستم ستونی با استفاده از پلاستیک شفاف قابل کشت بوده و برای کشت آن می توان از محیط کشت TMRL و دوره نوری ۱۲ ساعت روشنایی: ۱۲ ساعت تاریکی استفاده کرد.

## ٦- پیشنهادها

### ٦ - ١ - پیشنهادات مستخرج از این پژوهش

- در شرایط ضروری ریزجلبک نانوکلروپسیس اوکولاتا (*N. oculata*) را با استفاده از کیسه های پلاستیکی در سیستم ستونی در حجم های حدود ۱۰۰ لیتر پرورش داد ولی نمی توان این روش را به عنوان جایگزینی برای کشت این گونه در تانکهای بیرون سالن تلقی کرد.
- برای کشت ریزجلبک نانوکلروپسیس اوکولاتا (*N. oculata*) در سیستم ستونی می توان از تمام دوره های نوری مورد بررسی در این تحقیق استفاده کرد ولی اگر ملاحظات اقتصادی مدنظر باشد بهتر است از دوره نوری ۱۲ ساعت روشنایی: ۱۲ ساعت تاریکی استفاده کرد.
- همچنین برای کشت ریزجلبک نانوکلروپسیس اوکولاتا (*N. oculata*) در سیستم ستونی با توجه به ارزانتر بودن محیط کشت TMRL و همچنین راحت تر بودن ساخت آن، می توان از این محیط کشت استفاده کرد.

### ٦ - ٢ - پیشنهادات پژوهشی

- بهتر است تاثیر دوره های نوری و محیط کشت های مختلف بر ترکیب شیمیایی و همچنین کمیت و کیفیت اسیدهای آمینه و اسید های چرب ریزجلبک نانوکلروپسیس اوکولاتا بررسی گردد.
- کشت این ریزجلبک در سیستم ستونی داخل سالن در ستون های ساخته شده از مواد دیگر (مثل فایبرگلاس شفاف و شیشه های نشکن) و در قطرهای کمتر مورد بررسی قرار گیرد.
- اثر متقابل شدت نورها و دوره های نوری مختلف بر فاکتورهای رشد و ترکیب بیوشیمیایی این ریزجلبک مورد بررسی قرار گیرد.

## تشکر و قدردانی

از تمامی همکاران بویژه مهندس شاپور کاه کش، مهندس نوید طهماسبی، مهندس محسن ادهمی، مهندس محمد سنجری که در انجام این پروژه صادقانه ما را کمک کردند ، همچنین از جناب آقای دکتر مرمضی که مشاورت این پروژه و خانم دکتر دهقان که نظارت این پروژه را بعهده داشتند، کمال تشکر را کرده برای همه این عزیزان آرزوی موفقیت می کنیم.

## منابع


۱. امینی خوئی، ز. ؛ سیف آبادی، س. ج. و رمضانپور، ز. ۱۳۸۹. اثر شدت و دوره های نور بر رشد و زیتوده میکروجلبک *Chlorella vulgaris*. مجله علمی شیلات ایران. سال نوزدهم. شماره ۳. پائیز ۱۳۸۹. صفحات ۱۱ تا ۲۰.

۲. پقه، ا. ؛ رنجبر، ا. ؛ کاهکش، ش. و ذبایح نجف آبادی، م. ۱۳۸۹. نمودار رشد ریزجلبک نانوکلروپسیس اوکولاتا (*Nannochloropsis oculata*) در کشت های استوک و کشتهای بیرون (Outdoor). مجله علوم آبزیان. سال اول. پیش شماره ۲. صفحات ۹ تا ۱۸.

۳. حسینی، س.ع. و جلالی، م.ع. ۱۳۸۸. کاربرد غذای زنده در پرورش آبزیان. دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان. ۱۹۴ ص.

۴. شمس، ل. ؛ سیف آبادی، س. ج. ؛ متین فر، ع. و ابراهیم زاده، ح. ۱۳۸۳. مطالعه میزان رشد دیاتومه *Skeletonemacostatum* تحت تاثیر رژیمهای مختلف نوری. مجله علمی شیلات ایران. سال سیزدهم، شماره ۲. تابستان ۱۳۸۳. صفحات ۱۱۷ تا ۱۲۶.

5. Barsanti, L. and Gualtieri, P. 2006. Algae: Anatomy, Biochemistry and Biotechnology. CRC press. London, Taylor & Francis Group. 301 pp.
6. Borowitzka, M. A. 1999. Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters. , J. Biotechnol. , vol. 70, pp. 313-321.
7. Chini-Zattelli, G. ; Pastorelli, R. and Tredici, M. R. 2006. A Modular flat panel photobioreactor (MFPP) for indoor mass cultivation of *Nannochloropsis* sp. Under artificial illumination. J. chem. Tech. & Biotech. Vol. 81 (6), pp. 1049-1056 (published online).
8. Chini-Zitelli, G. ; Lavista, F. ; Bastianini, A. ; Rodolfo, L. ; Vincenzini, M. and Tredici, M. R. 1999. Production of eicosapentaenoic acid by *Nannochloropsis* sp. Cultures in outdoor tubular photobioreactors. Journal of Biotechnology. Vol. 70, pp. 299-312.
9. Cohen, E. Arad (Malis), S. 1989. A closed system for outdoor cultivation of porphyridium biomass. Vol. 18, pp. 59-67.
10. Cook, P. M. 1950. Large-Scale culture of chlorella. In: The culturing of Algae (eds J. brnel, G. W. prescott & L. H. Tiffany), pp. 53-75. Charles F. Kettering foundation, yellow springs, Ohio.
11. El-Din Mohammady, N. G. ; Chen, Y. c. ; Aly El-Mahady, A. R. and Mohammad, R. F. 2005. Physiological responses of the eustigmatophyceae *N. salina* to aqueous diesel puel pollution. Oceanologia, vol. 47 (1), pp. 75-92.
12. Fawley, K. P. and Fawley, M. W. 2007. Obeservation on the diversity and ecology of freshwater *Nannochloropsis* (Eustigmatophyceae), with descriptions of new taxa. Protist. Vol. 158, pp. 325-336.
13. Fulks, W. and Main, K. L. 1991. Rotifer and Microalgae culture systems. Proceedings of a U. S. – Asia workshop. Honolulu, Hawaii, January 28-31. 1991, 364 pp.
14. Garcia Camacho, F. ; Contreraz Gomez, A. ; Acien Fernandez, F. G. ; Fernandez Sevilla, J. & Molina Grima, E. 1999. Use of concentric-tube airlift photobioreactors for microalgal outdoor mass cultures. Enzyme. Microb. Technol., vol. 24, pp. 165-172.
15. Hibberd, D. J. 1981. Notes on the taxonomy and nomenclature of the algae classes Eustigmatophyceae and Tribophyceae (synonym Xanthophyceae). Journal of the Linnean Society of London, Botany. Vol. 82, pp. 93 – 119.
16. Hodgson, P. A. ; Henderson, R. j. ; Sargent, J. R. and Leftley, J. W. 1991. Patterns of variation in the lipid class and fatty acid composition of *Nannochloropsis oculata* (eustigmatophyceae) during batch culture. 1. The growth cycle. J. Appl. Phycol. , vol. 3, pp. 169-181.
17. Lavens, p. & Sorgeloos, p. 1996. Manual on the production and use of live food for aquaculture. FAO Fisheries Technical paper. No. 361, FAO, Rome. 305 pp.
18. Lubzens, E. ; Gibson, O. ; Zmora, O. & Sukenik, A. 1995. potential advantages of frozen algae (*Nannochloropsissp*.) for rotifer (*Brachionus plicatilis*) culture. Aquaculture, vol. 133, pp. 295-309.

19. Miyamoto, K. ; Wable, O. & Benemann, J. R. 1988. Vertical tubular reactor for microalgae cultivation. Biotechnol. Lett., vol. 10, pp. 703-708.
20. Pagheh, E. ; Ghafleh Marammazi, J. and Zabayeh Najafabadi, M. 2012. Effect of salinity and culture media on the concentration increasment of *N. oclata* algae. First international larviculture conference in Iran. 11-12 December 2012 , Karaj – IRAN. Pp. 512-517.
21. Renaud, S. M. and Parry, D. L. 1994. Microalgae for use in troical aquaculture. II: Effect of salinity on growth, grass chemical composition and fatty acid composition of three species of marine microalgae. J. Appl. Phycol. ,vol. 6 , pp. 347-356.
22. Richmond, A. 2004. Handbook of Microalgal culture: Biotechnology and applied phycology. Blakwell publishing, Oxford, 566 pp.
23. Rocha, J. M. S. ; Garcia, J. E. C. & Heniques, M. H. F. 2003. Growth aspect of the marine microalgae *Nannochloropsis gaditana*. Biomolecular Engineering. Vol. 20 , pp. 237 – 242.
24. Sukenik, A. 1999. Production of eicosapentaenoic acid by the marine eustigmatophyceae *Nannochloropsis*. In chemicals from microalgae, (Cohen, Z. , ed.) pp. 41-56. London, taylor & Francis Ltd.
25. Wen, Z. Y. and Chen, F. 2003. Heterotrophic production of eicosapentaenoic acid by microalgae. Biotechnology Adances, vol. 21, pp. 273-294.
26. Zou, N. ; Zhong, C. W. ; Cohen, Z. and Richmond, A. 2000. Production of cell mass and eicosapentaenoic acid (EPA) in ultrahigh cell density cultures of *Nannochloropsis sp.* (eustigmatophyceae). Eur. J. Phycol. Vol. 35, pp. 127-133.

## Abstract

The presnt study has been carried out to evaluate the *Nannochloropsis oculata* culture performance in 100L columnar plastic bags under two chemical media (TMRL and CONWAY) and 3 light regimes in the controlled conditions. Algae used for the experiment has been provided through culture of primitive stock and by transferring it to 2 L glassy erlenmeyer and 15 L plastic containers (as intermediate stage) using CONWAY media respectively. Daily evaluation of algae concentration was carried out during the 18 days culture period. At the end of the study produced algae has been sedimented to be used for evaluation of the dried matter and algae biomass. Results of the study showed that the concentration of the algae culture was $22\pm3.34\times10^{6}$ cells. $ml^{-1}$, at $8^{th}$ day, and reached the concentration of $26.58\pm4.02\times10^{6}$ cells. $ml^{-1}$ at the final day of the culture course. Although the results revealed the possibility of achievement of acceptable concentration for the *N.oculta* by the method adopted in the present study, but the achievement was not such favourable to be considered as an altenative for the common method. Nevertheless it could be considered as an alternative for the constrained situations. Moreover according to the results there was no significant algae concentration difference between light regimes ($P>0.05$). Similar results were observed for the interaction effect of chemical media and light regimes. Meanwhile the ratio of dried matter obtained from algae under the TMRL media was significantly ($P<0.05$) higher than that obtained from CONWAY media, but reversed results were observed for algae biomass. Light regimes were not significantly ($P>0.05$) affect the algae production. Finally it could be concluded that the *N.oculata* algae could be successfully cultured in plastic columnar bags under the controlled conditions but the method adopted in the present study could be applicable in the improper conditions.

**Key words:** Micoalgae, *Nannochloropsis oculata*, columnar plastic bags, light regimes, chemical media

**Ministry of Jihad – e – Agriculture**
**AGRICULTURAL RESEARCH, EDUCATION & EXTENSION ORGANIZATION**
**IRANIAN FISHERIES RESEARCH ORGANIZATION – South Aquaculture Research Center**

---

**Project Title : Feasibility of mass cultivation on *Nannochloropsis oculata* microalgae in tubular culture system**
**Approved Number: 2-74-12-89086**
**Author: Esmaeil Pagheh**
**Project Researcher : Esmaeil Pagheh**
**Collaborator(s) *:* Jasem Ghafleh Marammazi, Mojtaba Zabayeh najafabadi, Fatima Hekmatpour, S.J.Hosseini malayeriasl**

**Advisor(s): –**

**Supervisor: S.Dehghan mediseh**
**Location of execution : Khozestan province**
**Date of Beginning : 2011**
**Period of execution : 1 Year**
**Publisher : *Iranian Fisheries Research Organization***
**Date of publishing : *2015***
**All Right Reserved . No Part of this Publication May be Reproduced or Transmitted without indicating the Original Reference**

**MINISTRY OF JIHAD - E - AGRICULTURE**
**AGRICULTURAL RESEARCH, EDUCATION & EXTENSION ORGANIZATION**
**IRANIAN FISHERIES RESEARCH ORGANIZATION - South Aquaculture Research Center**

**Project Title :**

# Feasibility of mass cultivation on *Nannochloropsis oculata* microalgae in tubular culture system

**Project Researcher :**

***Esmaeil Pagheh***

**Register NO.**

***44290***