بسمه الله الرحمن الرحیم
موسسه تحقیقاتی علوم شیلاتی کشور
پژوهشکده آبزی پروری جنوب کشور – اهواز
ایستگاه تحقیقاتی ماهیان دریایی بندر امام خمینی (ره)

پرورش انبوه ریزجلبک نانوکلروپسیس اوکولاتا
(*Nannochloropsis oculata*)

نگارش: اسمعیل پقه

با همکاری : سید جواد حسینی- جواد منعم – مجتبی نجف آبادی

فهرست مطالب:

هدف:.....۴

دامنه:.....٤

مسئولیت:.....٤

پیشگفتار :.....٤

مقدمه: ٥

ویژگی های غذای مناسب برای تغذیه لاروها: ٥

معیارهای انتخاب غذاها برای لاروها: ٦

اهمیت غذای زنده در آبزی پروری:.....٦

- سه گروه اصلی غذای زنده: ۷

۱ – جلبکهای ریز (MICROALGAE):.....۷

۲ – روتیفر ها (ROTIFER): ۷

۳ – ناپلی آرتمیا:.....۷

ریز جلبک (MICROALGAE): ۸

گونه نانوکلروپسیس اوکولاتا (*NANNOCHLOROPSIS OCULATA*) ۱۱

طبقه بندی نانوکلروپسیس اوکولاتا..... ۱۲

مراحل رشد میکروالگها ۱۲

۱–مرحله القاء یا کند (LUG OR INDUCTION PHASE) (سازگاری): ۱۳

۲ – مرحله رشد سریع (لگاریتمی) (EXPONENTIAL PHASE): ۱۳

۳ – مرحله رشد با نسبت کاهنده (PHASE OF DECLINING GROWTH RATE): ۱۳

۴ – مرحله ساکن یا ایستا (STATIONARY PHASE): ۱۳

۵ – مرحله مرگ یا سقوط (DEATH OR CRASH PHASE): ۱۳

شرایط فیزیکی و شیمیایی ١٦

بخشهای مختلف فایکولب (آزمایشگاه غذای زنده):.....١٦

۱ – بخش آزمایشگاه ۱۶

۲ – بخش ذخیره سازی STOCK ۱۷

۳– بخش بینابینی ۱۷

۴ – بخش بیرونیOUT DOOR ۱۸

محیطهای کشت ریزجلبک.....۱۹

محیط کشت کانوی یا والن ۲۰
محیط کشت F/2 گیلارد ۲۱
محیط کشت ساتو..... ۲۲
محیط کشت TMRL (جهت کشتهای بیرون سالن) ۲۲

روشهای مختلف کشت انبوه:.....۲۳

کشت دسته ای یا دوره ای (BATCH CULTURE) ۲۳
کشت مداوم (CONTINUOUS CULTURE) ۲۵
کشت نیمه مداوم (SEMI-CONTINUOUS CULTURE)..... ۲۷

فراهم کردن آب مورد نیاز:.....۲۸

تنظیم شوری آب مورد نیاز..... ۲۸
ضدعفونی کردن آب شور مورد استفاده برای کشت ریزجلبک:..... ۳۱

مراحل کشت در روش کشت انبوه (BATCH CULTURE):.....۳۲

بخش استوک : ۳۲
بخش بینابینی : ۳۴
بخش بیرونی:..... ۳۶

شمارش جلبک:.....۳۸

هدف:

پرورش ریزجلبک نانوکلروپسیس اوکولاتا در مراکز تکثیر ماهیان دریایی به منظور تامین غذای لازم برای پرورش روتیفر (که خود غذای اصلی برای پرورش لارو ماهیان دریایی می باشد) و همچنین جهت ایجاد اثر آب سبز (green water effect) و محیط همگن در آب تانکهای پرورش لاروی صورت می گیرد. این دستورالعمل با هدف کمک به افرادی که به پرورش این ریزجلبک تمایل دارند تهیه شده است که در آن سعی شده است به زبان ساده روش کشت و پرورش انبوه این ریزجلبک طبق ساده ترین روش برای پرورش ریزجلبکها (پرورش انبوه دوره ای یا batch culture) و مطابق با روش مورد استفاده در ایستگاه تحقیقاتی ماهیان دریایی بندر امام خمینی (ره) شرح داده و در اختیار علاقمندان قرار گیرد.

دامنه:

ریزجلبک نانوکلروپسیس اوکولاتا را می توان جهت استفاده در مراکز تکثیر ماهیان دریایی، مراکز تکثیر میگو که در آنها پرورش روتیفر صورت می گیرد، مراکز تکثیر و پرورش صدفها، جهت استفاده در تولید محصولات بهداشتی و آرایشی و یا دارویی و خوراکی و برای تولید سوخت زیستی پرورش داد. این دستورالعمل می تواند در این زمینه راهنمای عملی در اختیار پرورش دهندگان قرار دهد. البته این دستورالعمل می تواند برای پرورش دیگر ریزجلبک های دریایی که شرایط مشابه ای با ریزجلبک نانوکلروپسیس دارند نیز مورد استفاده قرار گیرد.

مسئولیت:

مسئولیت انجام این دستورالعمل با مسئولان، کارشناسان و تکنسینهای بخش پرورش ریزجلبک در مراکز یاد شده فوق خواهد بود.

پیشگفتار :

این نوشــتار قصــد ندارد اطلاعات کلی در مورد انواع ریزجلبکها و پرورش و اســتفاده از آنها به خواننده بدهد، بلکه این نوشتار تنها راهنمایی برای کشت و پرورش انبوه ریزجلبک نانوکلروپسیس اوکولاتا (*Nannochloropsis oculata*) و استفاده از آن در مراکز تکثیر ماهیان دریایی است. سعی شده است که مراحل کار کشت این ریزجلبک به ترتیب آورده شود طوریکه خواننده اعم از اینکه تحصیلات شیلاتی داشته باشد یا تنها فردی علاقمند به این کار باشد، بتواند با پیش رو گذاشــتن این نوشــتار و با پیگیری مراحل نوشــته شــده در آن، این ریزجلبک (و ریزجلبکهای مشــابه آن) را پرورش دهد و استفاده کند.

مقدمه:

موفقیت هر عمل پرورش ماهی، سخت پوستان و صدفها (در کل آبزیان) وابسته به فراهم بودن یک منبع آماده لارو یا بذر (seed) آبزی مورد نظر است تا بتوان آنها را تا اندازه بازاری پرورش داد. بهرحال لارو آبزیان پرورشی به هر روش که بدست بیایند برای پرورش بسیاری از آنها (کپورماهیان، ماهیان دریایی، سخت پوستان و صدفها و ...) بهره گرفتن از غذای زنده در مقاطعی از زندگی آنها (بویژه دوره آغازین زندگی آنها) لازم و ضروری است و چه در غیر اینصورت عمل پرورش در همان ابتدا با شکست روبرو گردد.

تا دهه ۱۹۷۰ تولید ماهیان دریایی و میگو تقریباً منحصراً به صید انگشت قد وحشی برای ذخیره سازی ثانویه و ادامه رشد در استخرها، تانکها و قفسها تکیه داشت. اهلی کردن بسیاری از گونه های آبزی دریایی و لب شور تنها طی سه، چهار دهه اخیر میسر شده است، بهرحال، بعد از آن تولید کنترل شده لارو از مولدین اسیر یا به عبارت دیگر تولید در مراکز تکثیر لارو و انگشــت قد (fry) به عمل عادی برای بســیاری از گونه های آبزی پرورش تبدیل شــد. میلیاردها لارو آبزیان (مثل صدفهای دو کفه ای، میگوهای خانواده پنائیده، آزاد ماهیان، سی با سهای اروپایی، ...) بطور جدی در مراکز تکثیر سرا سر جهان تولید می شوند.

پرورش لارو عموماً تحت شرایط کنترل شده در مراکز تکثیر صورت می گیرد و معمولاً به تکنیکهای پرورش مخصوص نیاز دارد که بطور عادی از نرســریهای متعارف و شــیوه های پرورابندی متفاوت اســت، و مخصــوصــاً مرتبط با تکنیکهای کشاورزی، استراتژیهای تغذیه ای و کنترل میکروبی است. دلیل اصلی این امر آن است که لارو در حال رشد معمولاً بسیار کوچک، بشدت حساس و شکننده بوده و عموماً به لحاظ فیزیولوژیکی کاملاً تکامل یافته نیستند. برای مثال، اندازه کوچک آنها (و اندازه کوچک دهان)، عدم تکامل کامل ارگانهای حسی، (مثلا چشمها و گیرنده های شیمیایی) و دستگاه گوارش، برای انتخاب غذای مناسب و استفاده از آن در طی دوره تغذیه آغازین فاکتورهای محدودکننده هستند.

بچه ماهیان هنگام زایش کیسه زرده دارند که تغذیه آغازین از آن است و هنگامی که ۲/۳ (دو سوم) کیسه زرده جذب شــد ماهی شــروع به تغذیه مختلط (mixed feeding) می کند، یعنی لارو علاوه بر تغذیه از کیســه زرده باید غذای دیگری از بیرون را نیز دریافت نماید. این هنگام حســاســترین زمان تغذیه اســت که اگر در این هنگام به اندازه کافی غذای مناسب برای لارو فراهم نباشد با مرگ ومیر فراوانی روبرو خواهیم شد. که معمولاً در دوره های آغازین رشد و نمو همه لاروهای آبزیان باید به اجبار از غذای زنده استفاده گردد.

ویژگی های غذای مناسب برای تغذیه لاروها:

۱ – اندازه مناسب داشته باشد: چرا که لارو اولیه ماهیان، سخت پوستان و صدفها عموماً بسیار کوچک بوده و لذا دارای دهانی کوچک هستند و همچنین توانایی کوچک کردن غذای خشک را ندارند و نیاز به غذای زنده دارند، پس غذای مورد استفاده برای آنها باید دارای اندازه ای بسیار کوچک باشد تا لارو با دهان کوچک خود بتواند آنرا گرفته و وارد دستگاه گوارش تکامل نیافته خویش کند. لارو میگو حدود ۴۰۰ میکرون طول دارد و نیاز به غذای بسیار ریز (در حد ۵ تا ۵۰ میکرون – جلبک) دارد البته با رشد آبزی می توان از غذاهای درشتر استفاده نمود. لارو قزل آلا و خاویاری بزرگتر است و میتوان از غذای زنده بزرگتری برای تغذیه آنها استفاده کرد (باید توجه داشت که تقریباً لارو همه ماهیان چه دریایی و چه آب شیرین در مراحل اولیه زندگی از زئوپلانکتونها تغذیه می کنند)، لارو ماهیانی مانند هامور، شانک، صبیتی و حلوا سفید – که در ایستگاه تحقیقاتی ماهیان دریایی بندر امام خمینی (ره) تکثیر می شوند – حدوداً اندازه ای در حد ۵۰۰ تا ۱۰۰۰ میکرون داشته و برای تغذیه آغازین آنها لازم است از غذای زنده با اندازه ۴۰ تا ۶۰ میکرونی از گروه زئوپلانکتونها استفاده گردد (روتیفر – مرحله baby).

۲- ترکیب غذا باید منا سب با شد: در دوران لاروی د ستگاه گوارش در ماهیان دریایی هنوز تکامل لازم را نیافته ا ست بسیاری از آنزیمها در آنها تر شحه نمی شوند و بدیهی ا ست که موجود نمی تواند غذاهایی را دریافت نماید که برای هضم آنها احتیاج به آن آنزیمها دارد پس باید ترکیب غذا مناسب دستگاه گوارش تکامل نیافته آنها باشد، غذاهای زنده که در طبیعت غذای طبیعی این لاروها را تشکیل می دهند بهترین گزینه برای این منظور هستند.

۳ – رنگ منا سب: اندامهای گیرنده های نوری، بویایی و چ شایی در لاروها هنوز تکامل نیافته ا ست و لذا پیدا کردن غذا برای آنها مشکل است که غذایی با رنگ مناسب می تواند به لاروها در یافتن غذا کمک کند.

٤ – تحرک دا شته با شند: با توجه به اینکه پیدا کردن غذا برای لارو آبزیان م شکل ا ست، دا شتن تحرک در غذا امتیاز بسیار مناسبی ا ست که ایجاد جلب توجه می کند و باعث پیدا شدن بهتر غذا می نماید که بدیهی ا ست که این خصوصیت را تنها می توان در موجودات زنده یافت.

با توجه به مطالب فوق به صورت چکیده می توان گفت که:

لاروها نیاز به غذایی دارند که ساده هضم شود و کوچک باشد، در غذاها سیستم خود هضمی (اتولیز) موجود باشد (که معمولا در غذاهای زنده وجود دارد، ولی در غذاهای م صنوعی اینطور نی ست)، همه مواد مغذی را دا شته با شد که د رمورد غذاهای زنده صادق است.

معیارهای انتخاب غذاها برای لاروها:

۱ – از نظرپرورش دهنده: قابل د سترس با سد از لحاظ هزینه اقت صادی با شد، به سادگی فراهم شود (به سادگی قابل پرورش و افزایش زیتوده باشد)، تنوع بالایی داشته باشد.

۲ – از نظر موجود :

فیزیکی: خلوص، قابلیت دسترسی، قابلیت پذیرش

شیمیایی: قابلیت هضم، نیازهای انرژیتیک را برآورده کند، نیازهای مواد معدنی را نیز تامین کند.

اهمیت غذای زنده در آبزی پروری:

الگوی انسان در هر کاری طبیعت است، هرچه بتوانیم در کارهایمان به طبیعت نزدیکتر شویم تولید بهتر خواهیم داشت. هنوز اطلاعات دقیقی در مورد نیازهای غذایی ماهیان وجود ندارد که بتوانیم غذای مصـــنوعی مناســـب بســـازیم که تمام نیازهای غذایی ماهیان (به ویژه در دوران لاروی و ابتدایی زندگی آنها) را برآورده بکند ولی غذای طبیعی بصـــورت طبیعی می تواند تمام این نیازها را برآورده کند، چرا که این ماهیان در طبیعت به غذاهای طبیعی سـازگار شـدند. باید غرایز طبیعی ماهیان را مد نظر دا شته با شیم، غذای زنده باب طبع ماهیان و سخت پو ستان ا ست. همچنین غذای زنده ایجاد تحرک و سـلامت می کند، دنبال کردن و تعقیب کردن غذا در آبزیان پرورشـی ایجاد نشـاط و تحرک و سـلامتی می کند و خوردن غذای زنده برای آبزیان پرورشی لذت بخش است.

ویژگیهایی که غذای زنده را برای استفاده در تغذیه آغازین لارو آبزیان پرورشی مناسب می کند عبارتند از:

۱ – هضم و جذب آنها آسان است.

۲ – در لارو ایجاد مقاومت در مقابل عوامل بیماریزا و استرسهای محیطی می کند.

۳ – تولید آنها آسان بوده و قیمت مناسب دارند.

۴ – منبع مناسبی برای تامین میکروالمنتها، اسیدهای چرب و اسیدهای آمینه ضروری و سایر مواد مغذی هستند.

۵ – رشد کافی گنادهای تناسلی و قابلیت تولید نسل بیشتر را باعث می شوند (چراکه دارای اسیدهای چرب تنظیم شده ای هستند که این تنظیم شده بدن آنها باعث افزایش باروری لاروها در آینده می شود).

۶ – همچنین به هنگام استفاده توام غذای زنده و غذای کنسانتره، به هضم و جذب غذای کنسانتره کمک می کند.

- سه گروه اصلی غذای زنده:

غذاهای زنده از تنوع بالایی برخوردار بوده که می توان از میان آنها به باکتریها ، مخمرها ، قارچها ، گیاهان (میکروفیتها (فیتوپلانکتونها) و ماکروفیتها (گیاهان آبزی و گیاهان خشـــکی زی))، انواع مختلف از جانوران آبزی (کوپه پودها، روتیفرها، آرتمیا، گامارو سها، کرمها، و....) اشاره کرد. در این میان سه گروه غذای زنده اصلی وجود دارد که به صورت بسیار گسترده ای در مراکز تکثیر و پرورش آبزیان پرورشی مورد استفاده قرار می گیرد، که عبارتند از:

۱ – جلبکهای ریز (microalgae):

اندازه ای در محدوده ۲ تا ۲۰ میکرومتر دارند، عمدتاً برای صـدفها (در تمام مراحل زندگی) و لارو میگوها و لارو ماهی و زئوپلانکتونهایی مثل روتیفر، آرتمیا و کوپه پودها مورد اســـتفاده قرار می گیرد. لارو میگو در مرحله زوا از جلبکهای ریز تغذیه می کنند.

۲ – روتیفر ها (Rotifer):

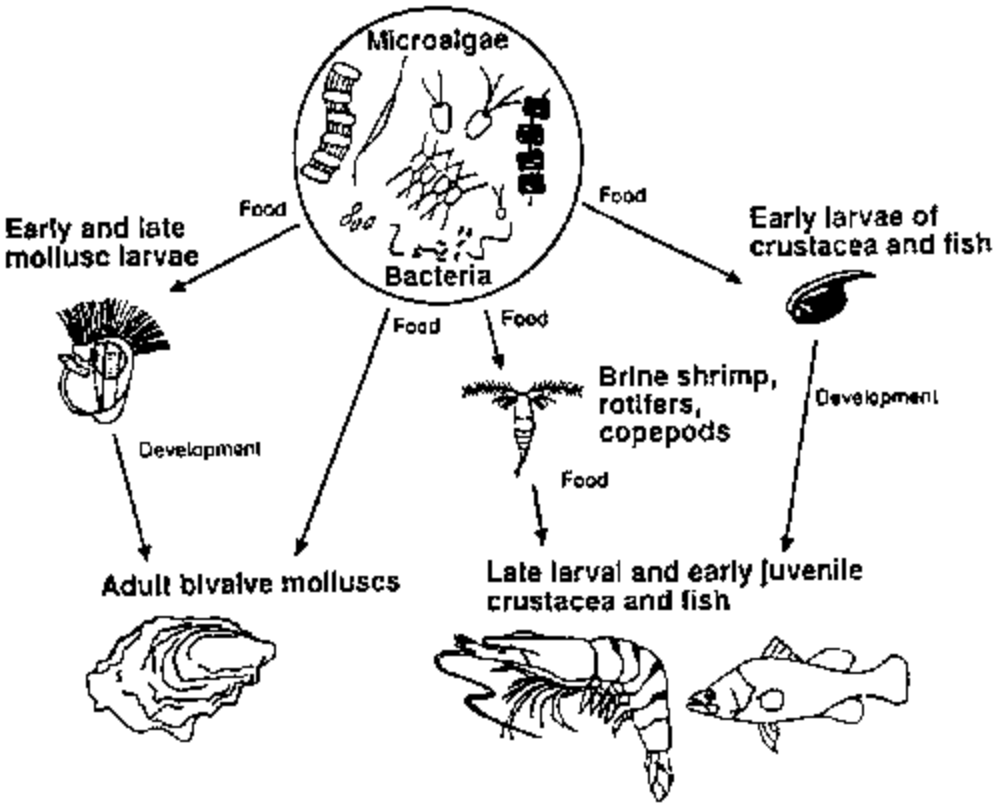
اندازه ای حدود ۴۰ تا ۳۵۰ میکرومتر دارند. عمدتاً برای میگوها و ماهیان دریایی م صرف دارد. در کپورماهیان و ماهیان خاویاری در استخرها وقتی لاروها به استخرهای خاکی انتقال داده می شود سعی می گردد که با تمهیداتی نظیر سمپاشی و کودهی میزان روتیفرها در استخرها را افزایش دهند .

۳ – ناپلی آرتمیا:

اندازه ای حدود ۴۰۰ تا ۸۰۰ میکرومتر دارد. عموماً برای سخت پوستان (میگوها در مراحل مایسیس و پست لاروی میگوهای پرورشی) و ماهیان (آب شیرین، ماهیان خاویاری و ماهیان دریایی) و ماهیان آکواریومی مورد استفاده می باشد و استفاده بسیار گسترده ای از آن در کارگاههای تکثیر آبزیان پرورشی می شود. همچنین از آرتمیا بالغ (بیوماس آرتمیا) نیز در تغذیه آبزیان پرورشی، چه بصورت زنده و چه بصورت فرآوری شده بصورت گسترده ای استفاده می شود.

ریز جلبک (Microalgae):

در منابع آبی فیتوپلانکتونها اساس زنجیره غذایی هستند که در پرورش لارو بسیاری از آبزیان مثل سخت پوستان، ماهیان دریایی و صدفها از جلبکها استفاده می شود و در تغذیه روتیفر و کوپه پود و آرتمیا هم کاربرد فراوان دارد و پرورش آنها بدون حضور جلبکها تقریباً امکان پذیر نیست.



شکل ۱: نقش محوری ریزجلبک در تغذیه لارو آبزیان پرورشی (در منابع آبی ریزجلبک شروع زنجیره غذایی هستند که به ماهیان و موجودات درشتر و در نهایت به انسانها ختم می شود)

همه گونه های ریزجلبک برای رشد و بازماندگی لاروها مناسب نیستند و برای همین براساس معیارهایی انتخاب می شوند و آن معیارها عبارتند از:

۱ – **اندازه سلول**: باید متناسب با اندازه دهان آبزی مصرف کننده باشد.

۲ – **قابلیت تولید انبوه**: به راحتی و با کمترین هزینه در کمترین زمان ممکن بتوان به زیتوده بالایی از آنها دست یافت.

۳ – قابلیت هضم آنها: باید دستگاه گوارش آبزی مصرف کننده توان هضم و جذب آنها را براحتی داشته باشد، یعنی اینکه آنها قابلیت هضم بالایی داشته باشند.

٤ – قابلیت پذیرش آنها: علاوه بر موارد فوق جلبک ها باید مقبول آبزی م صرف کننده با شند و آبزی آنها بعنوان غذای مناسب و باب طبع بپذیرد.

گونه های مختلفی از جلبکهای ریز بدین منظور پرورش داده می شوند(بیش از ۴۰ گونه ریز جلبک جداشده و در تغذیه لارو انواع مختلف گونه های آبزی مورد استفاده قرار می گیرد) که از مهمترین آنها می توان به جنسهای زیر اشاره کرد.

۱ – *Chaetoceros*

۲ – *Skeletonema*

این دو گونه از دیاتومه ها (diatoms) هستند.

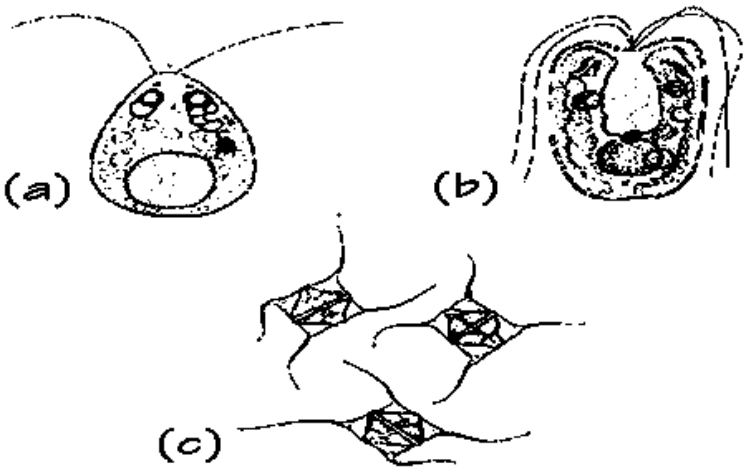
۳ – *Isochrysis*

۴ – *Tetraselmis*

۵ – *Chlorella*

۶ – *Nannochloropsis*

که این چهار جنس اخیر جزء دسته نانوپلانکتونها هستند.



شکل-۲: برخی گونه های ریزجلبکهای دریایی مورد استفاده در آبزی پروری (a) Tetraselmis spp.، (b) Dunaliella spp. و (c) Chaetoceros spp

جدول-۱: گونه های ریزجلبکهایی را که در دنیا مورد پرورش و استفاده در آبزی پروری قرار می گیرد را نشان می دهد (Richmond, 2004).

ردیف	نام ریزجلبک	موارد کاربرد
A	**Bacillariophyceae**	
A1	*Skeletonema costatum*	B, D
A2	*Thalassiospira pseudonana*	B, A, D
A3	*Phaeodactylum triconutum*	B, A,D,C,F
A4	*Chaetoceros mulleri*	B, A,D,C,F
A5	*Chaetoceros affinis*	B, A, D, F
A6	*Chaetoceros calcitrans*	B, A, D, F
A7	*Cylindrotheca closterium*	B
A8	*Bellerochea polymorpha*	D
A9	*Actinocyclus normanii*	D
	Nitzschia closterium, N. paleacea	
A10,11	*Cyclotella nana*	F
A12		F
B	**Haptophyceae**	
B1, 2	*Isochrysis affinis galbana , I. tahiti*	B, A, D, C, F
B3	*Pseudoisochrysis paradoxa*	A, D, C
B4	*Dicrateria sp.*	D
B5	*Cricosphaera elengata*	D
B6	*Coccolithus huxleyi*	D
B7	*Olisthodiscus luteus*	I
B8,9	*Pavlova lutheri, P. pinguis*	A, D, F, G
C	**Chrysophyceae**	
C1	*Pyramimonas virginica*	A, D
C2	*Micromonas pussila*	D
D	**Chryptophyceae**	
D1	*Chryptomonas*	D
D2	*Rhodomonas salina*	A, D
D3	*Chroomonas salina*	D
E	**Xanthophyceae**	
E1	*Olisthodiscus luteus*	D
F	**Cyanophyceae**	
F1	*Spirulina (Arthrospira) platensis*	B, D, F, G
G	**Chlorophyceae**	
G1	*Tetraselmis suecica*	B,A,D,E,F,G
G2	*Chlorella sp.*	A,C,F,G,I
G3,4	*Scenedesmus obliquus, S. quadricauda*	I,G,F
G5	*Dunaliella tertiolecta*	D,F,G
G6	*Chlamydomonas khaki*	A,D,I,G,I
G7	*Chlorococcum sp*	D
G8	*Brachiomonas submarina*	D
G9	*Spongiococcum excentricum*	A
H	**Eustigmatophyceae**	
H1,2	*Nannochloropsis oculata , N. gaditana*	D, G, H

A: bivalve mollusc larvae	لارو صدفهای دوکفه ای
B: penaeid shrimp larvae	لارو میگوهای خانواده پنائیده
C: freshwater prawn larvae	لارو میگوهای آب شیرین
D: bivalve mollusc postlarvae	پست لارو صدفهای دوکفه ای
E: abelone larvae	لارو صدف آبه لون
F: brine shrimp	آرتمیا (میگوی آب شور)
G: marine rotifers	روتیفرهای دریایی
H: saltwater copepods	کوپه پودهای آب شور
I: freshwater zooplankton	زی شناوران جانوری آب شیرین

در ایستگاه تحقیقات شیلاتی بندر امام خمینی – ماهشهر گونه های مورد استفاده عبارتند از:

۱ – گونه نانوکلروپسیس اوکولاتا (*Nannochloropsis oculata*)

که این گونه، گونه اصلی مورد پرورش و استفاده جهت تغذیه روتیفر و ایجاد اثر آب سبز (green water effect) در آب تانکهای پرورش لاروی ماهیان دریایی در ایستگاه می باشد. گونه نانوکلروپسیس اوکولاتا (*N. oculata*) گونه ای است بسیار ریز به اندازه ۴– ۲ میکرون که به منظور تغذیه روتیفر گونه ای بسیار مناسب، بویژه در مراکز تکثیر ماهیان دریایی می باشد. این گونه سبز رنگ و غیرمتحرک می باشد.

۲- گونه آیزوکرازیس گالبانا (*Isochrysis galbana*)

این گونه در فصل تکثیر ماهیان دریایی جهت غنی سازی و رفع بعضی کمبودهای گونه قبلی مورد استفاده قرار می گیرد.گونه آیزوکرازیس گالبانا (*I. galbana*) اندازه بزرگتر از نانوکلروپسیس اوکولاتا داشته (۷ – ۴ میکرون) و قهوه ای رنگ بوده و تا حدودی بدلیل داشتن سه تاژک دارای تحرک می باشد. با توجه به اندازه درشت تر نسبت یه ریزجلبک نانوکلروپسیس اوکولاتا و همچنین داشتن تاژک و تحرک، تراکم پذیری بسیار کمتری نسبت به ریزجلبک نانوکلروپسیس اوکولاتا دارد.

گونه نانوکلروپسیس اوکولاتا (*Nannochloropsis oculata*)

گونـه هـای این جنس اغـلب در محیـطهای دریـایی شناخته شده اند اما همچنین در محیطهای آب شیرین و لب شور نیز یافت می شــوند (Fawley & Fawley 2007) همه گونه ها تک ســلولی و کوچک بوده (اندازه قطر آنها ۴-۲ میکرومتر) و غیر متحرک ه ستند(Hibberd 1981)، نانوکلروپ سیس اغلب به عنوان غذای روتیفر و (همچنین در ایجاد شرایط مطلوب محیـطی اثر آب سـبز (green water effect) تانـکهای لاروی، در کارگاههای تکثیر ماهیان دریایی) مورد ا ستفاده قرار می گیرد (Fulks & Main, 1991 ; Lubzens et al., 2003) چرا که آنها سر شار از ا سید چرب ایکوســاپنتائنوئیک (EPA: eicosapentaenoic acid) هســتند. همچنین آنها بعنوان منبعی برای تامین اســیدهای چرب چند غیر اشــباع جیره غذایی مطرح هســتند (Chini-Zitelli et al., 1999; Rocha et al., 2003) همچنین نانوکلروپســیس بعنوان منبع خوبی از پیگ ماند ههای قا بل اســت فاده مان ند کلروف یل a، زاگزانتین (zeaxanthin) ، کانتاگزانتین (canthaxanthin) و آستاگزانتین (astaxanthin) شناخته می شوند (Rocha et al., 2003). پرورش انبوه نانوکلروپسیس در انواع مختلفی از تانکها و استــخرهای خارج سالـن، کیسه های پلی اتیلن یا ا ستوانه های فایبرگلاس ۵۰ تا ۵۰۰ لیتری که معمولاً داخل سالن نگهداری می شوند و انواع مختلفی از فتوبیورآکتورهای داخل و خارج ســالن صــورت می گیرد (Richmond 2003) همچنین روشــهای مختلفی از جمله پرورش مرحله ای (batch cultur) مداوم (cotinuous) و نی مه مداوم (semicotinuous)، برای پرورش ریزجلبک ها وجود دارد (Lavens & Sorgeloos, 1996).

طبقه بندی نانوکلروپسیس اوکولاتا

ریز جلبکهای جنس *Nannochloropsis* از رده Eustigmatophyceae هســتند که دارای شــش گونه می باشند (۱۹۸۱). Hibberd ,گونه شاخص در بین آنها *Nannochloropsis oculata* است. طبقه بندی این گونه و گونه های جنس *Nannochloropsis* عبارتند از:

Domain:	Eukaryota
Superphylum:	Heterokonta
Phylum:	Ochrophyta
Class:	Eustigmatophyceae
Family:	Eustigmataceae
Genus:	*Nannochloropsis* (Hibbert, 1981)
Species:	*N. gadiata*
	N. granulate
	N. limnetica
	N. oceanic
	N. oculata
	N. salina

مراحل رشد میکروالگها

برای جلبکها پنج مرحله رشد قابل تشخیص است که بدین قرار می باشد:

۱-مرحله القاء یا کند (lug or induction phase) (سازگاری):

در این مرحله به دلیل سازگار شدن به شرایط جدید بعد از انتقال به محیط کشت مایع، افزایش در تعداد سلولها به کندی صورت می گیرد. این مرحله بسته به نوع جلبک و شرایط محیطی ممکن است ۱۲ تا ۲۴ ساعت طول بکشد. همچنین این حالت در هنگامی که کشتهای جلبکی به ظروف کشت بزرگتر انتقال داده می شوند نیز ممکن است پیش بیاید.

۲ – مرحله رشد سریع (لگاریتمی) (exponential phase):

با عبور از مرحله رشد کند و با سازگاری پیدا کردن جلبک به شرایط کشت جدید، یک جهش قابل توجه در تکثیر جلبک بوجود می آید و تراکم آن در کشتهای جدید به شدت افزایش می یابد طوری که (در مورد جلبک نانوکلروپسیس اوکولاتا) در طی کمتر از ۷ روز تراکم از کمتر از ۱۰ میلیون سلول در سی سی به بیش از ۱۰۰ میلیون در سی سی در ظروف کشت ارلنهای یک و دو لیتری و شرایط استاندارد کشت، می رسد.

۳ – مرحله رشد با نسبت کاهنده (phase of declining growth rate):

هنگامی که مواد مغذی، نور، pH، دی اکسید کربن یا دیگر فاکتورهای فیزیکی و شیمیایی برای رشد محدود می شوند تقسیم سلولی کاهش می یابد. در این مرحله ریزجلبک هنوز افزایش تراکم دارد ولی این افزایش تراکم با سرعت کمتری نسبت به مرحله قبل صورت می گیرد و در نتیجه شیب خط در نمودار رشد کمی کاهش می یابد.

٤ – مرحله ساکن یا ایستا (stationary phase):

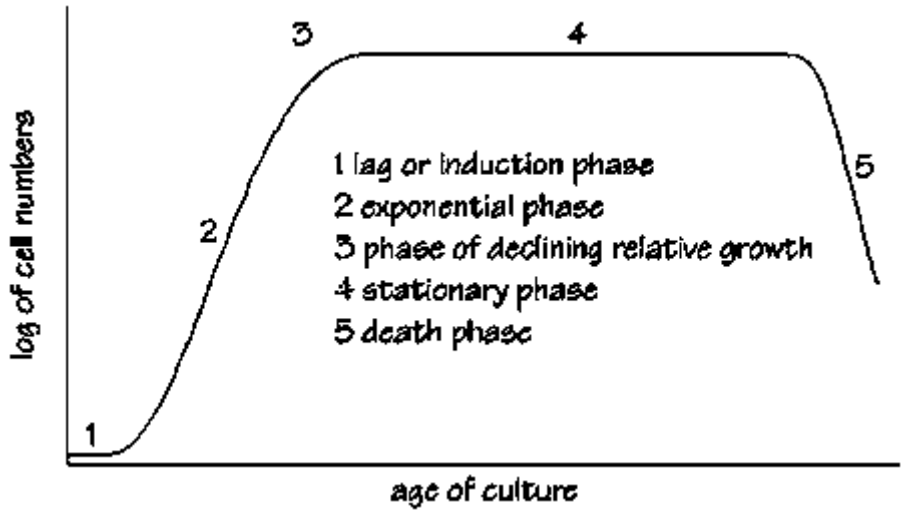
در این مرحله تقریباً تعداد سلولها ثابت می یابد. نه آنکه جلبکها تقسیم سلولی نداشته باشند بلکه تعداد سلولهای اضافه شده تقریباً مساوی با تعداد سلولهایی است که می میرند. این مرحله بسته به شرایط محیطی به ویژه دمای کشتها، ممکن است زمان بسیار زیادی طول بکشد.

۵ – مرحله مرگ یا سقوط (death or crash phase):

در مرحله آخر، بعلت کاهش کیفیت آب و مواد مغذی سلولها شروع به مرگ سریع کرده از تراکم سلولها به شدت کاهش می شود. این مرحله تقریباً عکس مرحله دو می باشد. البته کمتر پیش می آید که تراکم سلولی در محیط به صفر برسد و حتی با گذشت زمان بیشتر و تجزیه لاشه سولهای مرده ممکن است که یک شکوفایی دیگر را شاهد باشیم.

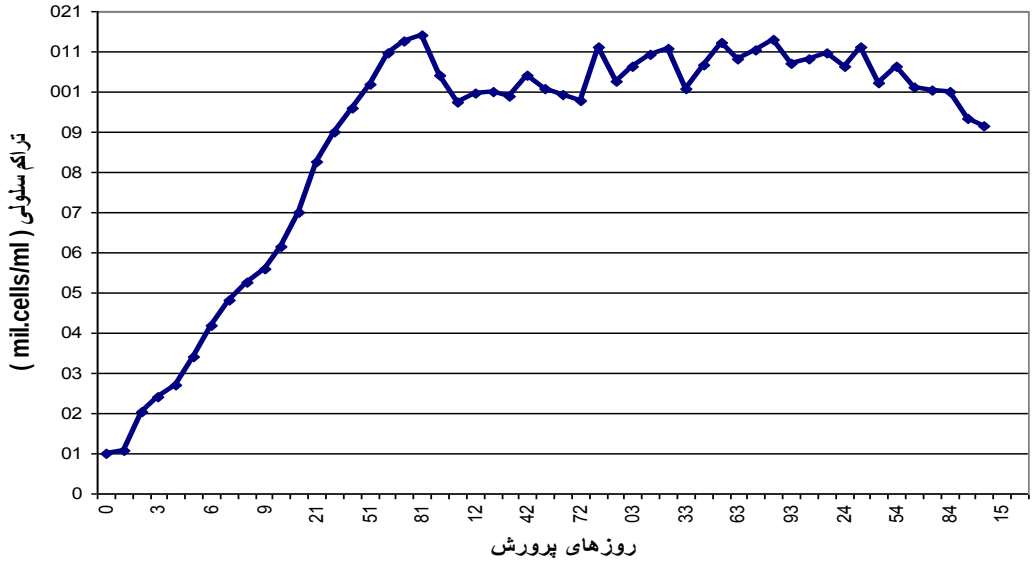
بهترین زمان برای برداشت مرحله سوم یا مرحله رشد با نسبت کاهنده (phase of declining growth rate) است. چرا که در این مرحله هم به ریزجلبک به اندازه کافی وقت داده شده است که افزایش تراکم دهد و هم اینکه آنقدر دیر نشده که کیفیت ریزجلبک پایین آمده باشد.

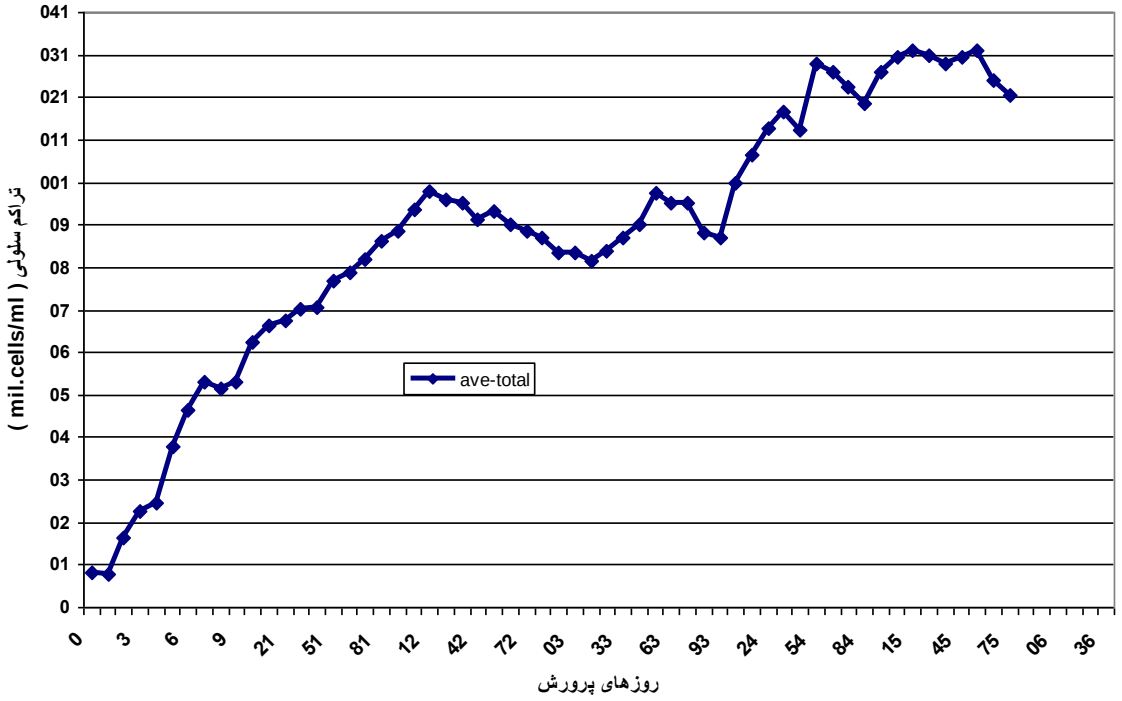
البته لازم به ذکر است که این نمودار رشد ریزجلبک شدیداً به نوع ریزجلبک، شرایط فیزیکوشیمیایی (pH، شدت و دوره نور، میزان مواد مغذی و بویژه دما) و همچنین نوع ظرف کشت و حجم کشت بستگی دارد و بسته به این پارامترها ممکن است هم به لحاظ حداکثر تراکمی که ریزجلبک می تواند به آن دست پیدا کند و هم زمان رسیدن به مراحل مختلف فرق بکند. ولی فارغ از همه این عوامل شکل کلی نمودار رشد ریزجلبکهای مختلف از الگوی کلی زیر پیروی می کند و تنها ممکن است کشیدگی یا ارتفاع آن متفاوت باشد و یا در بعضی از گونه ها بعضی از مراحل به راحتی قابل تشخیص نباشد.



شکل -۳: نمودار رشد جلبک در مراحل پنج گانه رشد. شکل الگویی کلی که در بسیاری از منابع بدون ذکر ایام پرورش و تراکم و حتی گونه جلبک آورده می شود.

مثلا در مطالعه ای که بر روی ریزجلبک نانوکلروپسیس اوکولاتا در ایستگاه تحقیقاتی ماهیان دریایی بندر امام خمینی (ره) صورت گرفته است، هم در کشتهای داخل استوک درون ارلنهای دو لیتری و هم در تانکهای ۳۰۰ لیتری در شرایط کشت بیرون بعد از حدود ۶۰ روز این ریزجلبک به مرحله ۵ (مرگ) نرسید (البته در تمام این مدت دما برای کشتهای داخل در حدود ۲۰ درجه سانتی گراد و برای کشتهای ۳۰۰ لیتری بیرون دما کمتر از ۱۷ درجه سانتی گراد (فصل زمستان) بود). لازم به ذکر است که در شرایط فصل تابستان و در گرمای بالای ۲۷ درجه سانتی گراد (دمای کشتهای ریزجلبک) رشد ریزجلبک نانوکلروپسیس اوکولاتا در شرایط کشت بیرون بسیار محدود می شود و با بالاتر رفتن دمای هوا و در نتیجه دمای کشت ریزجلبکی مراحل رشد این جلبک به سرعت طی می شود و حتی در مدتی کمتر از ۵ روز به مرحله مرگ یا سقوط برسند در حالیکه هنوز تراکم آنها به ۱۰ میلیون سلول در سی سی هم نرسیده باشد و در حالی است که در فصل زمستان در تانکهای ۳۰۰ لیتری کشت ریزجلبک نانوکلروپسیس اوکولاتا در بیرون تراکم حدود ۲۰۰ میلیون در سی سی (البته بعد بیش از ۳۰ روز) ثبت نموده ایم. در زیر نمودار رشد جلبک نانوکلروپسیس در کشتهای داخل استوک و شرایط بیرون آورده شده است. این نمودار در فصل زمستان بدست آمده و قطعاً در شرایط دیگر متفاوت خواهد بود پس آنرا نمی توان به عنوان الگوی رشد این جلبک در نظر گرفت.





شکل -٤: نمودارهای رشد ریزجلبک ناوکلروپسیس اوکولاتا در شرایط آزمایشگاهی و در ارلن های دو لیتری (شکل بالا) و کشتهای بیرون در تانکهای ۳۰۰ لیتری (شکل پایین) با اعداد واقعی تراکم سلولی نسبت به روزهای کشت.

البته لازم به ذکر است که وقتی از این تراکمهای ریزجلبک لگاریتم بر مبنای ۱۰ گرفته شود و پس از آن نمودار آنها رسم شود، شکل نمودار مانند نمودار تیپیک رشد ریزجلبکها خواهد بود.

شرایط فیزیکی و شیمیایی

کمیت و کیفیت غذا، نور ، pH ، تلاطم ، شوری و دما مهمترین پارامترهایی هستند که رشد جلبک به آنها بستگی دارد (Lavens & Sorgeloos, 1996).

پارامتر	محدوده	مناسبترین
دما (سانتی گراد)	۱۶ – ۲۷	۲۰ – ۲۴
شوری (گرم بر لیتر)	۱۲ – ۴۰	۲۰ – ۲۵
شدت نور (لوکس)	۱۰۰۰ – ۱۰۰۰۰	۲۵۰۰–۵۰۰۰
pH	۷ – ۹	۸/۲ – ۸/۷
دوره نوری:	حداقل ۱۶ ساعت روشنایی : ۸ ساعت تاریکی حداکثر ۲۴ ساعت روشنایی : ۰ ساعت تاریکی	

بخشهای مختلف فایکولب (آزمایشگاه غذای زنده):

یک فایکولب از بخشهای زیر تشکیل شده است :

۱ – بخش آزمایشگاه

در آزمایشگاه باید ابزاری مانند میکروسکوپ نوری به همراه لام و لامل معمولی و لام نئوبار، ترازوی دیجیتال با (با دقت ۰/۰۱ گرم)، آون، اتوکلاو، هود مجهز به لامپهای UV، دستگاه تقطیر، هیتر، دماسنج، نورسنج، pH متر، شیشه ها و لوله های آزمایش و مواد شیمیایی لازم برای ساختن محیطهای کشت ریزجلبک و مواد شیمیایی لازم برای ضدعفونی کردن آب و لوازم موجود باشد. در این بخش محیط های کشت و مواد شیمیایی لازم تهیه می شود، همچنین شمارش جلبکها (تعیین تراکم جلبکها در میلی لیتر)، تهیه آب مقطر، اتوکلاو کردن، UV و استریل کردن در این بخش صورت می گیرد.

شکل-٤: تصویر آزمایشگاه و لوازم موجود در آن در فایکولب ایستگاه تحقیقاتی ماهیان دریایی بندر امام خمینی (ره)

۲ – بخش ذخیره سازی stock

این بخش همانگونه که از اسمش مشخص است جهت نگهداری از ریزجلبکهای خالص تدارک دیده شده است. معمولاً ریزجلبکهای خالص (حا صل از ک شتهای آگار یا خالص شده به رو شهای دیگر) در لوله های آزمایش ۱۰ سی سی و در شرایطی استریل داخل یخچال نگهداری می شود، البته ریزجلبکها را می توان در حجمهای بیشتر نیز داخل یخچال نگهداری کرد. همچنین در این قسمت کشتهای اولیه ریزجلبکهای خالص بصورت تک گونه ای در داخل ارلن های دو لیتری پرورش و نگهداری می گردد، و تا وقتی که بتوان این کشـــتها را خالص نگهداری کرد می توان از این ک شتها برای ک شت دادن ارلنهای دیگر بخش ا ستوک ا ستفاده کرد. همچنین در مراکزی که علاوه بر پرورش جلبک عمل خالص سازی جلبکها را انجام می دهند، اینکار نیز در قسمت آزمایشگاه و استوک صورت می گیرد.

شکل-٦: بخش استوک یا ذخیره و کشتهای ریزجلبک نانوکلروپسیس اوکولاتا موجود در آن در فایکولب ایستگاه تحقیقاتی ماهیان دریایی بندر امام خمینی (ره)

۳- بخش بینابینی

این بخش مرحله بعد از بخش ا ستوک ا ست که در آن جلبکها در داخل ب شکه های ۱۰ تا ۱۵ لیتری یا ا ستوانه های پلاستیکی تا ۱۰۰ لیتر کشت داده می شوند.

به این سه بخش مجموعا بخش داخلی یا in door گفته می شود که در آن می توان میزان دما، شدت نور و دوره نوری را تحت کنترل داشت.

شکل ۷- بخش بینابینی فایکولب، بشکه های ۱۵ لیتری (سمت راست) و استوانه های پلاستیکی (سمت چپ) در فایکولب ایستگاه تحقیقاتی ماهیان دریایی بندر امام خمینی (ره)

٤ – بخش بیرونی out door

این بخش در محیط بیرون و در فضای آزاد واقع شده است که ریزجلبکها در این بخش و در ایستگاه تحقیقاتی ماهیان دریایی بندر امام خمینی (ره) در تانکهای ۳۰۰ لیتری، ۳ تنی و ۷ تنی کشـــت داده می شـــوند. در این بخش میزان دما و نور شرایط طبیعی موجود بوده و خارج از کنترل پرسنل است. البته لازم است که تانکهایی نیز برای تنظیم شوری آب مورد نیاز برای کشت ریزجلبکها تدارک دیده شود.

لازم به ذکر است که هر کارگاه و مرکزی بسته به مقدار حجم نیاز به ریزجلبک خود و روش کشت ریزجلبک از ظروف و تانکهای کشت با حجم های متفاوت استفاده نماید و حتی کشت این ریزجلبکها در تانکها و استخرهای بسیار حجیم و حتی استخرهای خاکی با وسعت چند هکتار نیز در برخی از نقاط دنیا متداول است.

شکل ۸- بخش بیرون سالن (outdoor) و تانکهای ۳۰۰ لیتری پلی اتیلنی، ۳ تنی فایبرگلاس و ۷ تنی بتنی در فایکولب ایستگاه تحقیقاتی ماهیان دریایی بندر امام خمینی (ره)

محیطهای کشت ریزجلبک

مواد غذایی و عناصر مورد نیاز برای فعالیت ریزجلبکها از طریق محیهای کشت (محلولهای غذایی) که با توجه به نیازهای غذایی جلبکها فرمول بندی و ساخته شده اند تامین می گردد. فسفات، نیترات، منیزیوم و کلسیم از عناصری هستند که به میزان زیاد (macronutrient) و آهن، منگنز، روی، مولوبدیوم و مس به میزان کمتری (micronutrient) برای رشد و تکثیر جلبکها لازم هستند (S. A. H. Abidi et al, 1998). بر این اساس محیطهای کشت مختلفی ساخته و معرفی شده که مواردی که در این ایستگاه مورد استفاده قرار می گیرد، عبارتند از:

۱ – محیط کشت کانوی (CONWAY medium)
۲ – محیط کشت گیلارد (Guillard s medium)
۳ – محیط کشت ساتو (Sato medium)
۴ – محیط کشت TMRL

محیطهای کشت ۱ تا ۳ جهت کشت ریزجلبک در بخش استوک و بینابینی مورد استفاده قرار می گیرد که براساس مطالعات صورت گرفته در حال حاضر از محیط کشت کانوی (CONWAY) برای کشت ریزجلبک در بخش استوک و بینابی مورد استفاده قرار می گیرد ولی برای کشت ریزجلبک در بخش بیرونی (Outdoor) از محیط کشت TMRL استفاده می شود، البته می توان برای کشتهای بخش بینابینی نیز از محیط کشت TMRL استفاده کرد.

در زیر فرمول محیط کشتهای کانوی یا والن (Conway or Walne)، ساتو (mSato) و F/2 گیلارد (F/2 Guillard) که برای کشتهای استوک و ظروف کشت کم حجم استفاده می شود و محیط کشت TMRL که برای کشتهای بیرون سالن و تانکهای کشت با حجم بالا استفاده می شود آورده شده است. البته لازم به ذکر است که این فرمولها تنظیم شده می باشند.

CONWAY OR WALNE S MEDIA

Solution A:

Potassium nitrate .....100 g
Sodium ortho-phosphate ..... 20 g
EDTA (Na) .....45 g
Boric acid .....33.4 g
Ferric chloride.....1.3 g
Manganese chloride..... 0.36 g
Solution B ..... 1 ml

حجم را با استفاده از آب مقطر به یک لیتر برسانید.

Solution B:

Zinc chloride……..2.1 g
Cobalt chloride…….…… 2.0 g
Copper sulphate…….……2.0 g
Ammonium molybdate …… 0.9 g

حجم را با استفاده از آب مقطر به ۱۰۰ میلی لیتر برسانید.

Solution C: (vitamin mix)

Vitamin B1 ……..200 mg
Vitamin B12 ……... 10 mg
D-Biotin ……. 10 mg

حجم را با استفاده از آب مقطر به یک لیتر برسانید.

میزان اســتفاده: به ازای یک لیتر کشــت ریزجلبک یک میلی لیتر از محلول A و یک میلی لیتر از محلول C (محلول ویتامین) افزوده می شود.

لازم به ذکر ا ست که برای کشت دادن ریزجلبک نانوکلروپسیس اوکولاتا نیازی به افزودن سیلیکات به محیط کشــت وجود ندارد ولی اگر بخواهیم دیاتومه ها (مانند کیتوســیروس) را کشــت بدهیم علاوه بر محلولهای فوق باید محلول سیلیکات سدیم نیز به کشت های ریزجلبکی اضافه شود که بدین ترتیب عمل می شود که ابتدا مقدار ۴۰ گرم سیلیکات سدیم را در یک لیتر آب مقطر حل می کنیم و سپس در هنگام کشت دیاتومه ها از این محلول مقدار ۲ سی سی به ازای هر لیتر از کشت دیاتومه اضافه می گردد.

محیط کشت F/2 گیلارد

این محیط کشت از معروفترین محیطهای کشتی است که برای بسیاری از ریزجلبکها مورد استفاده قرار می گیرد.

Sulation A:

NaNO3 ……. 75 g
NaH2PO4 …… 5 g
Na2SiO3 …….. 30

حجم را با استفاده از آب مقطر به یک لیتر برسانید.

محلول فلزات کمیاب :

CuSO4 ……. 1 g/100 ml D.W.
ZnSO4 ……. 2.2 g/100 ml D.W.
CoCl2 ……... 1 g/100 ml D.W.
MnCl2 …… 18 g/100 ml D.W.
NaMoO4 …… 0.6 g/100 ml D.W.

بهتر این ا ست که هر یک از مواد فوق (فلزات کمیاب) جداگانه ساخته و نگهداری شود و به هنگام افزودن محلول فلزات کمیاب به محلول B محیط کشت F/2 گیلارد از هر یک از محلول های فوق مقدار ۵ میلی لیتر به محلول B اضافه گردد. چرا که اگر همه اینها با هم ترکیب گردند و یک محلول ساخته شود مواد در آن بخوبی حل نشده تشکیل رسوب خواهند داد و لذا به این ترتیب مقداری از مواد لازم از دسترس خارج خواهد شد.

Sulation B

FeCl3 ..... 3.15 g
Na EDTA ..... 4.36 g
محلول فلزات کمیاب ..... 5 ml

حجم را با استفاده از آب مقطر به یک لیتر برسانید

Vitamin mix F/2محلول ویتامین

vit. B1 کلرید تیامین …….. 200 mg
Vit. B12 سیانوکوبالامین …… ……..……10 mg
Vit. D- Biotin …….. 10 mg

حجم را با استفاده از آب مقطر به یک لیتر برسانید.

نحوه استفاده از محیط کشت F/2:

از هر یک از محلولهای A ، B و محلول ویتامین یک سی سی به ازای یک لیتر آب دریا آماده کشت ا ضافه می گردد.

محیط کشت ساتو

mSATO CULTURE MEDIA

Solution A:

Na2NO3…….. 100 g
NaHCO3…….. 168 g
NaH2PO4 + 2H2O …….…… 10 g

حجم را با استفاده از آب مقطر به یک لیتر برسانید.

Solution B:

Na2 EDTA ……3 g
ZnCl2 ……..0.03 g
CoCl2 . 6H2O……..80 mg
FeCl2 . 6H2O ……..0.24 g
CuSO4 . 5H2O ……4 mg
MnCl2 . 4H2O ……0.27 g
H3BO3……3.44 g

حجم را با استفاده از آب مقطر به یک لیتر برسانید.

Vitamin mix

می توان از فرمول محلول ویتامین F/2 گیلارد (که برای محیط کانوی نیز همان فرمول داده شد) استفاده کرد.

طرز استفاده از محیط کشت mSATO:

از هر یک از محلول ها مقدار یک سی سی به ازای یک لیتر آب شور آماده برای کشت ریزجلبک اضافه می گردد.

نکته:

لازم به ذکر اســـت که در مطالعاتی که در مورد اثر محیط های فوق بر میزان رشـــد و افزایش تراکم ســـلولی ریزجلبک نانوکلروپسیس اوکولاتا صورت گرفت مشاهده گردید که بهترین محیط جهت پرورش این ریزجلبک محیط کشت کانوی می باشد که مطالعات دیگران نیز آنرا تائید می کند.

محیط کشت TMRL (جهت کشتهای بیرون سالن)

Potassium nitrate ..... 100 g/ton sea water
Sod. Orthophosphate..... 10 g/ton sea water
Feric chloride ..... 3 g/ton sea water
+ vitamin mix

تذکر: جهت کشتهای بیرون بعلت گرانی محیط کشتهای قبلی از محیط کشت TMRL استفاده می گردد.

لازم به ذکر است که برای ساختن محیط TMRL ترکیبات فوق در یک لیتر آب حل میشوند و سپس برای کشت یک مترمکعب ریزجلبک در بیرون سالن ا ستفاده می گردد که البته می توان این ترکیب را با غلظت دو برابر نیز تهیه نمود تا حجم استفاده را به نصف کاهش داد.

در مورد محلول ویتامینی که به این محیط ا ضافه می گردد لازم به ذکر ا ست که میزان ویتامین ا ستفاده شده کمتر از میزان استفاده آن برای بخشهای استوک و بینابینی بوده و به این صورت عمل می گردد:

ابتدا محلول ویتامین را به این صورت و جداگانه تهیه می کنیم :

vit. B1 کلرید تیامین ..... 2 g/ 100 ml (dist w.)

Vit. B12 سیانوکوبالامین ..... 0.1 g/ 100 ml (dist w.)

Vit. D- Biotin ..... 0.1 g/ 100 ml (dist w.)

سپس از هر کدام از این محلول ها مقدار ۰/۲۵ سی سی به ازای یک لیتر (یک تن کشت جلبک) محیط TMRL فوق ا ضافه می گردد. (۵ سی سی به ازای ۱۰ لیتر محیط TMRL با غلظت دو برابر که برای کشت ۲۰ تن جلبک قابل ا ستفاده ا ست یا در واقع ۵ سی سی به ازای ۲۰ تن کشت جلبک). مشاهده می گردد که میزان ا ستفاده ویتامین برای کشتهای بیرون بسیار کمتر از میزان استفاده آن در بخش استوک و بینابینی است. همچنین لازم است بیان گردد که علی رغم اینکه جهت کشتهای بینابینی از محیط کانوی استفاده می گردد، میزان محلول ویتامین استفاده شده برای آن نصف مقدار ا ستفاده ویتامین در بخش ا ستوک می با شد. البته لازم به ذکر ا ست که در مطالعه ای مشخص شد که در کشتهای بینابینی تفاوت معنی داری در ا ستفاده از محیط کشت کانوی و یا TMRL وجود ندارد و لذا به منظور کاهش در هزینه ها می توان از مخیط کشت TMRL در کشتهای بینابینی و ظروف کشت ۱۰ تا ۱۵ لیتری استفاده کرد (پقه و همکاران، ۱۳۹۴).

روشهای مختلف کشت انبوه:

ریزجلبکهای در دنیا به روشهای مختلفی کشت داده می شوند که مهمترین آنها عبارتند از:

۱ – کشت دسته ای یا دوره ای (batch culture)

۲ – کشت مداوم (continuous culture)

۳ – کشت نیمه مداوم (semi-continuous culture)

در ایستگاه تحقیقاتی ماهیان دریایی بندر امام خمینی (ره) و بسیاری از مراکز تکثیر ماهی و میگو روش کشت انبوه دسته ای یا دوره ای مورد استفاده قرار می گیرد که ذیلاً بصورت مختصر تشریح می گردد.

کشت دسته ای یا دوره ای (batch culture)

عبارت است از دنبال کردن دوره رشد ریزجلبکها در مراحل مختلف و در نهایت برداشت آنها هنگامی که جمعیت ریزجلبکی به حد ماگزیمم و یا نزدیک ماگزیمم رسیده باشد.

جلبکها بعد از خالص سازی ابتدا در داخل لوله های آزمایش (test tube) (با حجم کمتر از ۱۰ سی سی) کشت داده و در داخل انکوباتور در دمای ۲۴ درجه سانتی گراد نگهداری می شوند، پس از گذشت ۲ تا ۳ هفته ، هنگامی که به اندازه کافی رشد (افزایش تراکم) داشتند آنها را در ظروف بزرگتر (ارلن های ۵۰ تا ۱۰۰ سی سی) انتقال داده و شرایط رشد آنها فراهم می گردد (در این مراحل هوادهی لازم نیست و تنها هر روز آنها را باید تکان داد تا بر روی جداره ظروف رسوب نکنند). پس از گذشت ۱۰ تا ۱۵ روز، هنگامی که به میزان کافی شکوفا شدند آنها در ظروف بزرگتر (ارلن های شیشه ای ۱ یا ۲ لیتری) انتقال داده می شوند و شرایط رشد آنها فراهم می گردد (در این مرحله لازم است که کشتها هوادهی شوند تا هم ضمن تامین دی اکسید و اکسیژن لازم، با ایجاد تلاطم مناسب، از رسوب جلبک بر جداره ظروف جلوگیری به عمل آید)پس از گذشت ۷ تا ۱۰ روز (بسته به شرایط دمایی و نوری) از کشت این کشتها به میزان کافی شکوفا شده و آماده برداشت خواهند بود.

مراحل فوق تماماً در بخش آزمایشگاه و استوک انجام می شود و هنگامی که تراکم آنها به حد کافی افزایش یافت (در مورد ریزجلبک نانوکلروپسیس ۸۰ تا ۱۵۰ میلیون سلول در میلی) آنها را برداشت کرده یا جهت کشت مجدد در بخش استوک و یا جهت کشت در بینابینی مورد استفاده قرار می گیرد.

در مورد کشت مجدد در استوک باید توجه داشت که حجم ریزجلبکی که به کشت های جدید اضافه می گردد باید به میزانی باشد که حداقل تراکم ۷ تا حداکثر ۲۰ میلیون سلول در میلی لیتر بدست آید که در این صورت پس گذشت ۷ تا ۱۰ روز بسته به تراکم اولیه کشت تراکم کشتها به ۸۰ تا ۱۵۰ میلیون در میلی لیتر خواهد رسید. مشاهده می شود که با یک بار خالص سازی و تهیه ۲ لیتر ریزجلبک خالص تک گونه ای می توان از همان نمونه جهت کشتهای جدیدتر و زیاد کردن ریزجلبکها اقدام نمود. لازم به ذکر است که در بخش استوک برای گونه نانوکلروپسیس اوکولاتا در این کارگاه از محیط کشت کانوی استفاده می شود.

جهت کشت ریزجلبک در بخش بینابینی بهتر این است که از خروجی بخش استوک برای تلقیح در داخل بشکه های پلاستیکی۱۰ تا ۱۵ لیتری استفاده نمود، برای اینکار هر ارلن ۲ لیتری با جلبک شکوفا شده خروجی از بخش استوک را داخل یک بشکه ۱۵ لیتری ریخته و فضای خالی را با آبی که شوری آن تنظیم شده و گندزدایی شده پر می کنند و پس از افزودن محیط کشت به میزان لازم (در این مرحله نیز بهتر است همان محیط کشتی استفاده شود که در بخش استوک مورد استفاده قرار می گیرد و در این کارگاه در بخش استوک و بینابینی از محیط کشت کانوی استفاده می شود ولی میزان ویتامین مورد استفاده برای کشتهای بینابینی کمتر از بخش استوک می باشد، البته برای صرفه جویی در هزینه ها می توان در بخش بینابینی از محیط کشت TMRL که با مواد ارزان قیمت ساخته است نیز استفاده کرد) و با فراهم کردن شرایط هوادهی آنها در مجاورت روشنایی قرار می دهند تا پس از گذشت ۷ تا ۱۰ روز به تراکم مورد نظر برسد (کشت در این مرحله طوری خواهد بود که تراکم اولیه حدود ۵ تا ۷ میلیون سلول در میلی لیتر فراهم گردد و هدف در این مرحله رساندن تراکم ریزجلبکها به حدود ۵۰ میلیون سلول در میلی لیتر است)، آنها را برداشت نموده جهت استفاده در کشت بیرون انتقال داده می شود.

همانطور که قبلا ذکر شد کشتهای بیرون از کشتهای تانک ۳۰۰ لیتری شروع می شود و جهت کشت ریزجلبک در تانکهای ۳۰۰ لیتری به ازای هر تانک افزودن ۳ بشکه جلبک شکوفا شده در آن لازم است، برای تامین مواد غذایی لازم برای ریزجلبکها در کشتهای بیرون بدلیل مسائل مالی از محیط کشت TMRL استفاده می گردد. ۵ تا ۷ روز پس از تلقیح ریزجلبک در تانکهای ۳۰۰ لیتری (با تراکم اولیه ۳ تا ۵ میلیون سلول در میلی لیتر) کشتها شکوفا خواهند شد یعنی به تراکم حدود ۳۰ تا ۴۰ میلیون در میلی لیتر در مورد نانوکلروپسیس اوکولاتا می رسد، البته لازم به ذکر است که تراکم

سلولی ریزجلبکهای نانوکلروپسیس اوکولاتا در این تانکها با نگهداری طولانی مدت تر در شرایط استاندارد کشت به حدود ۱۵۰ تا ۲۰۰ میلیون سلول در سی سی هم می رسد و آماده برداشت و انتقال به مرحله بعد خواهد بود.

برای کشت مرحله بعد (مرحله ۳ مترکعبی) لازم است که به ازای هر تانک ۳ مترکعبی، تعداد ۳ تانک ۳۰۰ لیتری جهت تلقیح استفاده شود طوری که تراکم اولیه کشت حدود ۳ تا ۵ میلیون سلول در میلی لیتر فراهم گردد، بقیه کارها مشابه مرحله قبلی بوده و ۵ تا ۷ روز پس از تلقیح ریزجلبک، کشتها شکوفا خواهند شد (تراکم حدود ۳۰ تا ۴۰ میلیون در میلی لیتر) و آماده برداشت و انتقال به مرحله بعد خواهد بود. البته اگر شرایط محیطی اجازه بدهد و مشکلی از این بابت (به ویژه از نظر دمایی) نباشد می توان آنها را به مدت بیشتری نگهداری کرد و در تراکمهای سلولی بالاتری برداشت کرد. در این ایستگاه موفق به برداشت این ریزجلبک با تراکمهای بیشتر از ۱۲۰ میلیون سلول در سی سی در این مرحله شده ایم.

برای کشت مرحله بعد (مرحله ۷ مترکعبی) لازم است که به ازای هر تانک ۷ مترکعبی، حدود ۱/۵ مترکعب ریزجلبک حاصل از کشتهای ۳ مترکعبی جهت تلقیح استفاده شود طوری که تراکم اولیه کشت حدود ۳ تا ۵ میلیون سلول در میلی لیتر فراهم گردد، بقیه کارها مشابه مرحله قبلی بوده و ۵ تا ۶ روز پس از تلقیح جلبک، کشتها شکوفا خواهند شد (تراکم بالاتر از ۲۰ میلیون در میلی لیتر) و آماده برداشت و انتقال به بخش روتیفر خواهد بود. البته در شرایط مناسب محیطی و نگهداری مدت زمان بیشتر می توان این ریزجلبک را با تراکم بیشتر از ۴۰ میلیون سلول در میلی لیتر نیز برداشت کرد.

با توجه به مطالب فوق و با فرض اینکه روزانه حدود ۱۰ مترکعب برای تغذیه روتیفر و حدود ۲ مترکعب برای بخش پرورش لاروی لازم خواهد بود پس لازم است که روزانه حداقل دو تانک ۷ مترکعبی و یک تانک ۳ مترکعبی و ۳ تانک ۳۰۰ لیتری و ۹ بشکه ۱۵ لیتری و ۱۰ ارلن دولیتری جلبک نانوکلروپسیس کشت داده شود. البته این در شرایطی خواهد بود که هیچ گونه خرابی در کشتها پیش نیاید، در صورتی که همیشه احتمال خرابی کشتهای ریزجلبکی خواهد بود و باید پیش بینی لازم برای خرابی احتمالی صورت گیرد.

شکل ۹ مراحل کشت جلبک به روش کشت دسته ای (batch culture) را به صورت شماتیک نشان می دهد.

کشت مداوم (continuous culture)

در روش کشت مداوم سعی می شود تراکم کشتهای جلبکی در نزدیکی حد نهایی رشد (فاز سوم) نگهداری شوند. بدین صورت که به داخل کشتهای جلبکی بصورت مداوم آب دریای بارورشده پمپ می گردد و همزمان با آن کشت افزایش می یابد.

دو نوع کشت مداوم قابل تشخیص است:

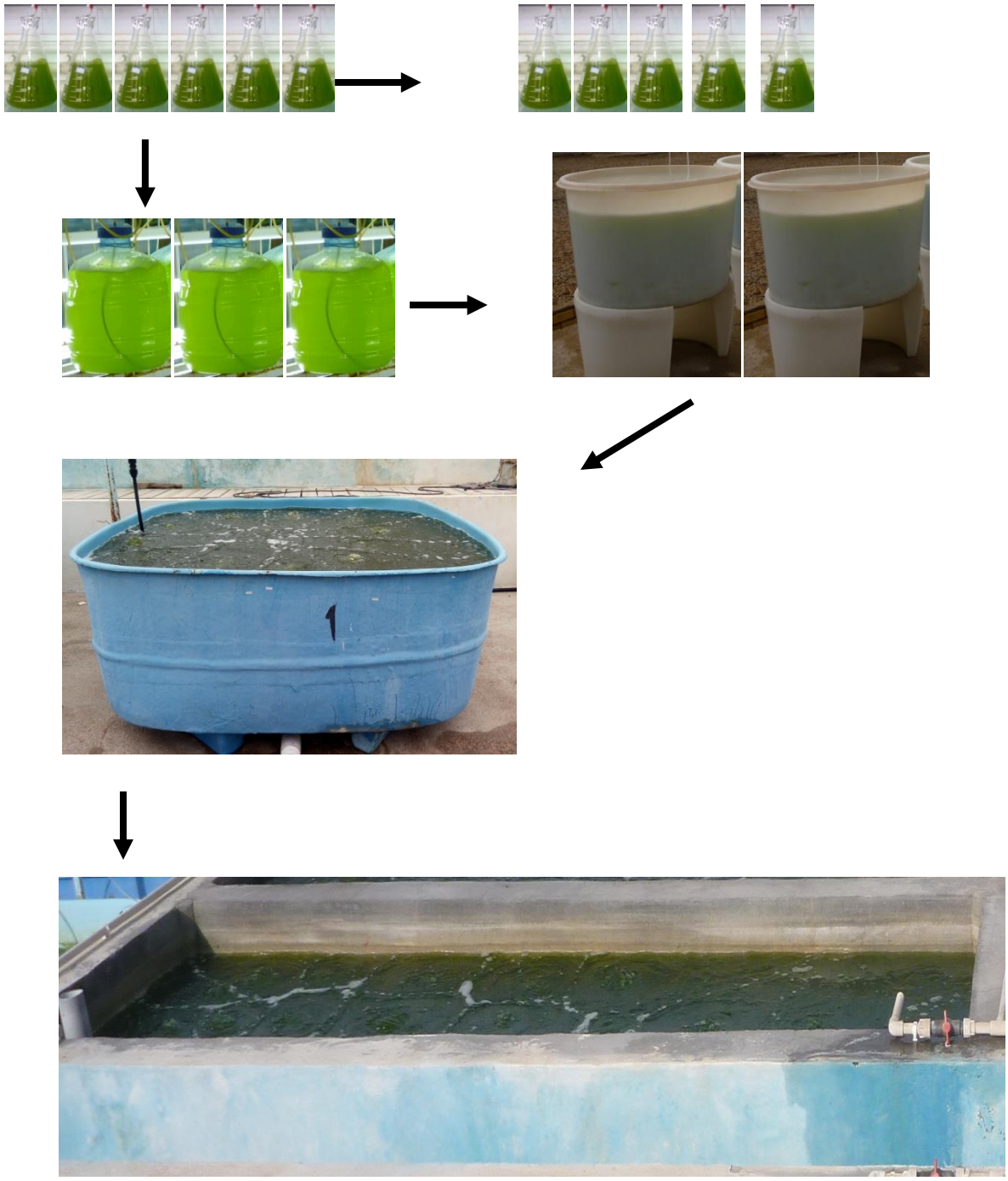
الف – کشت turbidostat

که در آن تراکم ریزجلبکها بوسیله رقیق کردن کشت توسط آب تازه محیط کشت خورده بوسیله یک سیستم اتوماتیک در سطح اولیه نگهداری می شود. یعنی هنگامی که تراکم ریزجلبکها در تانکهای (ظروف) کشت به حد مورد نظر رسید به همان میزانی که از ظرف کشت ریزجلبک برداشت می شود، به داخل ظرف کشت آب شور تازه تریت شده که در آن به مقدار لازم محیط کشت ریخته شده اضافه می گردد. این کار تا هر وقت که شرایط اجازه دهد انجام می شود.

ب – کشت یکنواخت (پی در پی) (chomostat culture)

که در آن جریانی از محیط کشت تازه در یک نسبت تعیین شده بصورت یکنواخت وارد کشت می شود، مواد مغذی محدود کننده (مانند نیترات) در یک نسبت ثابت اضافه می شود و در این روش سرعت رشد ثابت می ماند نه تراکم سلولی.

در این روش تراکم سلولی ریزجلبک در ظرف ک شت به تدریج افزایش می یابد و وقتی به حد مطلوب ر سید بردا شت می شود.



شکل ۹- تصویر مراحل کشت ریزجلبک نانوکلروپسیس اوکولاتا در فایکولب ایستگاه تحقیقاتی ماهیان دریایی بندر امام خمینی (ره)

برای کشتهای مداوم بهتر است از سیتمهای اتوماتیک مانند فتوبیورآکتورها استفاده شود تا احتمال آلودگی در آنها به حداقل برسد. یک نمونه از فتوبیورآکتورها، فتوبیورآکتورهای مارپیچ هستند که به یک طرف آن شیرتخلیه و صل است و سمت دیگر آن به یک منبع آب دریای ضدعفونی شده غنی شده با محلول غذایی است، هر گاه که با باز کردن شیر تخلیه مقداری از آن برداشت می شود از سمت دیگر آب دریای غنی شده وارد سیستم می شود. کشتهای ریزجلبکی بصورت مداوم داخل سیستم در مقابل نور (آفتاب یا مصنوعی) و در محیط بسته لوله های شفاف کشت در حال گردش هستند تا از رسوب ریزجلبکها در دیواره لوله های کشت جلوگیری کند.

شکل ۱۰- کشت مداوم ریزجلبکها با استفاده از فتوبیورآکتورها

کشت نیمه مداوم (semi-continuous culture)

این روش کشت بدین صورت است که قسمتی از کشت بعد از رسیدن به حد مطلوب از نظر تراکم سلولی، برداشت می شود و بلافاصله بوسیله آب گندزدایی شده (کلرزده و خنثی شده) کشتها آبگیری می شوند تا به حد حجم اولیه برسد و به میزان لازم به آنها محلول غذایی افزوده می گردد تا به حد اولیه غنی سازی شود، کشت دوباره رشد می کند، قسمتی دوباره برداشت می شود و .... .

کشت نیمه مداوم ممکن است داخل ساختمان یا خارج سالن صورت گیرد و دوره آن معمولاً غیر قابل پیش بینی است. در روش کشت نیمه مداوم بدین علت که تمام کشت برداشت نمی شود و از همان مانده جلبک جهت کشت بعدی استفاده می گردد، رقبا، شکارچیان، آلودگیها و سرانجام متابولیتها افزایش خواهد بود. از آنجایی که کشت به طور کامل برداشت نمی شود، کشت نیمه مداوم محصول بیشتری نسبت به کشت انبوه (batch culture) در یک تانک هم سایز تولید خواهد نمود.

فراهم کردن آب مورد نیاز:

معمولاً مراکز تکثیر ماهیان دریایی و یا میگو در مجاورت دریا ساخته می شوند و آب مورد نیاز خود را از دریا و یا خوریات متصل به دریا می گیرند. این آب از دریا به استخرهای آرامش پمپاژ شده پس از توقف ۲۴ ساعته و رسوب مواد معلق درشت در آن، با استفاده از فیلتر شنی فیلتر می شوند و پس از آن با استفاده از کلر و یا اشعه UV ضدعفونی می شوند و پس از خنثی کردن کلر باقی مانده قابل استفاده خواهد بود. البته معمولاً شوری آب دریا و یا خوریات از شوری مطلوب برای پرورش ریزجلبکها متفاوت است و قبل از استفاده از آن باید شوری آن در حد مطلوب تنظیم شود.

تنظیم شوری آب مورد نیاز

شوری مناسب برای کشت خیلی از ریزجلبکهای دریایی از جمله ریزجلبک نانوکلروپسیس اوکولاتا در محدوده ۲۰ تا ۲۵ قسمت در هزار است و اگر شوری آبی که در اختیار داریم از این محدوده خارج است بهتر است که شوری آن در این محدوده تنظیم شود.

دو حالت ممکن وجود داشته باشد:

حالت اول اینکه ممکن ا ست شوری آب مورد ا ستفاده از این محدوده کمتر با شد که در این حالت بهترین گزینه برای تنظیم شوری استفاده از نمک دریا می باشد بدین ترتیب که ابتدا با استفاده از شوری سنج چشمی یا دیجیتال مقدار شوری آب مورد استفاده را می سنجیم و مقدار کمبود آن را محاسبه می کنیم، سپس به مقدار کمبود آن نمک دریا که آنرا به راحتی می توان از ا ستخر های تولید نمک که اقدام به تولید نمک دریایی غیر ت صفیه می کنند تهیه کرد، با توجه به حجم آب مورد نظر ا ضافه می کنیم و با هم زدن آن نمک ا ضافه شده را در آب حل می کنیم. معمولاً نمکی که از ا ستخر های نمک تولید می شود همراه با آلودگی است که لازم است پس از حل کردن این نمک در آب ابتدا آنها را از فیلترهای مناسب (می توان از فیلترهای کی سه ای ۲ میکرونی ا ستفاده کرد) عبور می دهیم و سپس ادامه کار آماده سازی آب را روی آنها انجام می دهیم.

البته آبی که شوری آن پایینتر از شوری مورد نیاز است را می توان تا هنگام رسیدن به شوری مطلوب زیرآفتاب گذاشت تا با تبخیر شدن مقداری از آب، شوری باقی مانده آب در حد مطلوب تنظیم شود که البته این کار وقت گیر خواهد بود و همیشه باید حجم زیادی آب بدین منظور باید در زیرآفتاب نگهداری شود. البته یک بارندگی بی موقع می تواند موجب هدر رفتن زحمات شود.

حالت دوم حالتی ا ست که شوری آب در د سترس از شوری آب مطلوب برای پرورش ریزجلبک بی شتر ا ست. در این حالت برای تنظیم شوری آب در محدوده مورد نیاز (ppt ۲۵-۲۰) از آب شیرین (یا آب با شوری پایینتر از این حد) استفاده می شود. ابتدا با ا ستفاده از شوری سنج چ شمی یا دیجیتال شوری آب در د سترس سنجیده می شود و سپس مقدار آب شیرین مورد نیازی که باید به این آب اضافه شود تا شوری در محدوده مطلوب تنظیم شود محاسبه می گردد و این آب به آب شور اضافه می شود که در این حین مخلوط حاصل باید با استفاده از هوادهی شدید متلاطم گردد تا آب شور و شیرین خوب با هم مخلوط شوند.

آبی که در ایستگاه تحقیقاتی ماهیان دریایی بندر امام خمینی (ره) از خوریات کناری آن بدست می آید در بیشتر روزهای سال شوریی بیشتر از ۴۵ قسمت در هزار دارد که این شوری اصلاً برای کشت ریزجلبک نانوکلروپسیس اوکولاتا مناسب نیست و باید شوری آن حداقل تا ۲۵ قسمت در هزار تعدیل شود.

در زیر روش محاسبه برای تنظیم شوری آب آورده می شود:

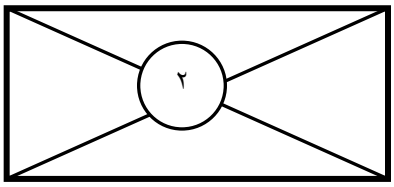
فرض کنید که شوری آب دریای در دسترس ۴۵ قسمت در هزار (مانند خوریات بندرامام خمینی) باشد و آب شیرین با شوری صفر قسمت در هزار نیز در اختیار داشته باشیم و شوری مورد نیاز برای پرورش ریزجلبک نانوکلروپسیس اوکولاتا را ۲۰ قسمت در هزار در نظر بگیریم. دو روش وجود دارد تا محاسبه کنیم از هر یک از آبهای شور و شیرین چه حجمی باید مصرف شود و با هم ترکیب بشوند تا شوری مورد نظر بدست آید، وجود دارد.

روش اول مشابه روش محاسبات در برآورد مقادیر مواد غذایی مختلف با درصد های مثلاً پروتئین مختلف برای فراهم کردن درصد پروتئین خاص در جیره ای که قرار است بسازیم می باشد. بدین ترتیب که :

ابتدا یه مســـتطیلی را در نظر می گیریم و در محل تلاقی دو قطر آن عدد شـــوری مورد نیاز (در اینجا ۲۰ppt) را می نویسیم و گوشه بالایی سمت چپ مستطیل عدد شوری آب اول (آب شور دریا) (در اینجا S_1=۴۵ppt) و در گوشه پایینی سمت چپ آن عدد شوری آب دوم (شوری) (در اینجا S_2=۰ppt) را می نویسیم. حال عدد وسط مستطیل (۲۰) را در مسیر قطر مستطیل از اعداد سمت چپ کم می کنیم و عدد حاصل را در امتداد قطر در گوشه سمت راست مستطیل می نویسیم یعنی در مثال فوق با کم کردن عدد ۲۰ از ۴۵ حاصل که عدد ۲۵ می شود را در گوشه پایینی سمت راست می نویسیم و حاصل تفریق ۲۰ از ۰ می شود ۲۰- که در اینجا باید قدر مطلق این عدد یعنی ۲۰ را در گوشه بالایی سمت راست مستطیل می نویسیم. حالا دو عدد در سمت راست مستطیل داریم (۲۰ در گوشه بالا و عدد ۲۵ در گوشه پایین) که این دو عدد با هم جمع می شوند که حاصل این جمع در این مثال عدد ۴۵ می شود (در مثال فوق که شوری یکی از آبها صفر قسمت در هزار بود حاصل جمع دو عدد سمت راست برابر با شوری آب دیگر می شود ولی همیشه این گونه نخواهد بود چرا که همیشه آب صفر قسمت در هزار در دسترس نیست و ممکن است شوری آب دوم عددی غیر از صفر باشد که در این صورت دیگر حاصل جمع اعداد سمت راست برابر با شوری آب اول نخواهد بود)، حالا هر یک از اعداد سمت راست را جداگانه به عدد حاصل جمع (۴۵) تقسیم می شود و درصد آن محاسبه می گردد. در مثال فوق عدد گوشه بالایی سمت راست که ۲۰ است در عدد ۴۵ تقسیم می شود و جواب حاصل (۰/۴۴۴۴) را در عدد صد ضرب می کنیم که حاصل آن عدد ۴۴/۴۴ درصد می شود که این بدین معنی است که ۴۴/۴۴ درصد از حجم آب مخلوط باید از آبی باشد که عدد شوری آن مقابل آن عدد یعنی در امتداد طول مستطیل قرار دارد، باشد یعنی در این مثال ۴۴/۴۴ درصد از حجم نهایی مقدار آبی که می خواهیم با شوری ۲۰ قسمت در هزار بسازیم باید از آب شور ۴۵ قسمت در هزار تامین شود و بقیه آن آب (در اینجا ٪ ۵۵/۵۶=۴۴/۴۴-۱۰۰) باید از آب دوم (در اینجا از آب شیرین) تامین شود.

در زیر شکل شماتیک محاسبه درصد آبهای مورد نیاز از هر یک از آبهای یک و دو (با شوری متفاوت) برای ساخت آب با شوری مورد نظر آورده می شود:

۴۵ (شوری آب دریا) ۰-۲۰=۲۰



۰ (شوری آب شیرین) ۴۵-۲۰=۲۵

۲۰+۲۵=۴۵

درصد آب شور مورد نیاز (۲۰ ÷ ۴۵)*۱۰۰=۴۴/۴۴٪

درصد آب شیرین مورد نیاز (۱۰۰ – ۴۴/۴۴=۵۵/۵۶) ٪ (۲۵ ÷ ۴۵)*۱۰۰=۵۵/۵۶

با داشتن درصد مورد نیاز از هر یک از دو آب با شوری مورد دسترس (آب شور دریا با شوری ۴۵ قسمت در هزار و آب شیرین با شوری صفر قسمت در هزار) و حجم مورد نیاز از آب با شوریی که می خواهیم بسازیم (۲۰ قسمت در هزار) می توانیم حجم مورد نیاز از هر یک از دو آب شـــور و شـــیرین را محاســـبه کنیم. مثلاً اگر در مثال فوق بخواهیم مقدار ۱۰ مترمکعب آب با شـوری ۲۰ قسـمت در هزار درسـت کنیم با ضـرب ٪۴۴/۴۴ در ۱۰ مترمکعب حاصـل می شـود ۴/۴۴۴ مترمکعب، یعنی اینکه ۴/۴۴۴ متر مکعب از ۱۰ مترمکعب آب نهایی باید از آب شـور با شـوری ۴۵ قسـمت در هزار تامین شود و بقیه که معادل ۵/۵۵۶=۴/۴۴۴ – ۱۰ متر مکعب خواهد بود باید از آب شیرین تامین شود. البته لازم به ذکر است که به جای حجم آب در روش فوق می توان ارتفاع آب را در نظر گرفت بدین معنی که ۴۴/۴۴ درصـــد از ارتفاع تانک تنظیم شوری آب را با آب شور ۴۵ قسمت در هزار و بقیه (یعنی ۵۵/۵۶ در صد) آنرا با آب شیرین پر کنیم و در عمل نیز بیشتر مواقع لازم می شود از ارتفاع استفاده شود. البته در استخرهای با حجم زیاد (استخرهای خاکی) می توان با تنظیم دبی آب ورودی شوری آب استخر را تنظیم کرد.

روش دوم به صورت زیر است:

اگر دو منبع آب یکی با شـــوری ۵۰ قســـمت در هزار و دیگری صـــفر قســـمت در هزار داریم و می خواهیم مقدار ۱۰ مترمکعب آب با شوری ۲۰ قسمت در هزار تهیه کنیم. طبق روش دوم محاسبه حجم مورد نیاز از هر یک از منابع آب فوق به قرار زیر است:

$S= 20$ ppt شوری آبی که باید تهیه شود

$V= 10\ m^3$ حجم آبی که باید با شوری ۲۰ قسمت در هزار تهیه گردد

$S_1= 50$ ppt شوری آب منبع یک

$S_2= 0$ ppt شوری آب منبع دو

$V_1=?$ حجم آب لازم از منبع یک (آب شور)

$V_2=?$ حجم آب لازم از منبع دو (آب شیرین)

$SV=S_1V_1 + S_2V_2$

$20*10=(50*V_1) + (0*V_2)$

$200=50V_1$

$V_1=200 \div 50 = 4\ m^3$ حجم آب مورد نیاز از منبع آب یک (آب شور ۵۰ قسمت در هزار)

$V_2=V - V_1 = 10 - 4 = 6\ m^3$ حجم آب مورد نیاز از منبع دو (آب شیرین با شوری صفر قسمت در هزار)

در مثال فوق مشاهده می شود که برای اینکه با استفاده از دو منبع آب با شوریهای ۵۰ و صفر قسمت در هزار (در برخی مواقع شوری آب خوریات بندر امام خمینی (ره) بیشتر از ۵۰ قسمت در هزار می باشد) مقدار ۱۰ متر مکعب آب با شوری ۲۰ قسمت در هزار تهیه کنیم لازم است که مقدار ۴ متر مکعب آب با شوری ۵۰ قسمت در هزار را با ۶ متر مکعب آب شیرین صفر قسمت در هزار لازم خواهد بود. بدیهی است که در صورتی که به جای آب شیرین صفر قسمت در هزار منبع آبی با شوری متفاوت داشته باشیم محاسبات متفاوت خواهد بود. همان طور که در مثالهای فوق مشهود است در ایستگاه تحقیقاتی ماهیان دریایی بندر امام خمینی (ره) که شوری آب خوریات آن بسیار بالا است، برای تنظیم شوری در حد ۲۰ قسمت در هزار آب شیرین زیادی لازم است که البته با توجه به اینکه در این منطقه آب شیرین به میزان لازم در دسترس می باشد مشکل خاصی ایجاد نمی کند ولی اگر در تامین آب شیرین مشکلاتی وجود داشته باشد تنظیم شوری آب مورد نیاز برای پرورش ریزجلبک در حد ۲۰ قسمت در هزار مشکل خواهد بود. لازم به ذکر است که این ریزجلبک را می توان در شوریهای

بالاتر از این (حتی در شوری ۴۵ قسمت در هزار) نیز می توان پرورش داد ولی سرعت افزایش تراکم سلولی و همچنین حداکثر میزان تراکم سلولی آن کمتر از حالتی خواهد بود که در شرایط شوری بهینه پرورش داده شوند، ولی مشکل اصلی هنگامی خواهد بود که از ریزجلبکی که در شوری بالا پرورش داده شده برای پرورش روتیفر استفاده شود چرا که بهترین میزان شوری آب برای پرورش روتیفر s-type (*Brachionus rotundiformis*) ۲۵ قسمت در هزار است و در شوریهای بالاتر از این از میزان افزایش جمعیت آنها شدیداً کاسته می شود و در آن شرایط تمهیداتی برای این مشکل اندیشیده شود.

ضدعفونی کردن آب شور مورد استفاده برای کشت ریزجلبک:

همانطور که گفته شد آب دریای مورد استفاده در ایستگاه تحقیقاتی ماهیان دریایی بندر امام خمینی (ره) پس از طی مرحله فیلتراسیون با فیلتر شنی با استفاده از مقدار ppm ۱۰ کلر ضدعفونی و قبل از ورود به سیستم لوله های انتقال آب ایستگاه با استفاده از تیوسولفات سدیم، کلر باقی مانده در آب خنثی می گردد. برای کشت ریزجلبک نیز از این آب استفاده می شود و برای تنظیم شوری آن از آب شیرین لوله کشی استفاده می شود، آب شیرین نیز مراحل ته نشینی مواد معلق و همچنین فیلتراسیون بوسیله فیلترهای کیسه ای را قبل از اضافه شدن به آب دریا جهت تنظیم شوری طی می کند. از آنجا که در بخش کشت ریزجلبک تمیز و ایزوله بودن کشتهای خالص ریزجلبکی از اهمیت ویژه ای برخوردار است، آب مورد استفاده برای کشت آنها با دوز بیشتری نسبت به آب مصرفی بقیه بخشهای ایستگاه کلرزنی می شود یعنی مقدار ppm ۳۰ کلر برای ضدعفونی کردن آن استفاده می شود. برای این منظور یک روز قبل از کشت ریزجلبک آب مورد نیاز با شوری ppt ۲۰ فراهم می گردد و در تانک تنظیم شوری ذخیره می شود، سپس مقدار ppm ۳۰ کلر (به ازای هر مترمکعب آب مقدار ۳۰ گرم کلر) به آن اضافه می شود و هواده آن با شدت نسبتاً زیادی فعال می ماند. حدود ۲۰ تا ۲۴ ساعت در این وضعیت نگهداری می شود که در این مدت در اثر هوادهی شدید کلر در کل حجم آب پخش شده اثر خود را می گذارد، این مقدار کلر در آب به قدری زیاد است که هیچ موجود زنده ای در این مقدار زنده نمی ماند، البته در این مدت مقداری از کلر آب در اثر هواددهی از آب خارج خواهد شد و پس از آن وجود یا عدم وجود کلر در آب با استفاده از ارتوتولئیدن سنجیده می شود که معمولاً پس از ۲۴ ساعت هنوز مقداری کلر در آب خواهد بود. این آب با استفاده از پمپ کف کش یا الکتروپمپ به تانکهای کشت بیرون (۳۰۰ لیتری، ۳ و ۷ مترمکعبی) منتقل می شود در حالیکه هنوز کلر دارد. این کار باعث می شود که کلر موجود در آب جداره داخلی تانکهای کشت را نیز ضدعفونی کند. البته می توان آب مورد نیاز برای کشت ریزجلبک در تانکهای ۷ تنی را مستقیماً داخل خود آنها تنظیم کرد و همانجا کلرزنی نمود. پس از انتقال به تانکهای کشت کلر موجود در آب با استفاده از مقدار حداکثر ppm ۱۵ (۱۵ گرم به ازای هر مترمکعب) خنثی می شود و پس از این کار برای کشت آماده می باشد.

برای کشتهای داخل سالن علاوه بر مراحل ضدعفونی فوق آب کلر خورده یک روز قبل از استفاده با عبور از فیلترهای سریالی سه مرحله ای (پنبه ای، سنگریزه ای و ذغالی) در تانکهای ۳۰۰ لیتری داخل سالن ذخیره می شود تا علاوه بر ضدعفونی بیشتر با توقف ۲۴ ساعته در داخل سالن از لحاظ دمایی نیز با کشتهای داخل سالن همدما شود چرا که در بندر امام خمینی (ره) به خاطر شرایط آب و هوایی تقریباً در تمام ایام سال بین داخل سالن و خارج سالن اختلاف دما وجود دارد و گاهی اوقات این اختلاف دما به اندازه ای زیاد است که در صورت کشت مسقیم ریزجلبک در آبی که تازه از بیرون به داخل منتقل شده باعث شوک دمایی در کشت می شود که می تواند برای کشت ریزجلبکی کشنده باشد. این آب پس از طی این مراحل جهت کشت ریزجلبک در بشکه های ۱۵ لیتری بخش بینابینی قابل استفاده خواهد بود.

ولی برای آماده کردن آب مورد نیاز برای کشت ریزجلبک در بخش استوک که حساس ترین بخش یک فایکولب است علاوه بر طی مراحل فوق لازم است که این آب یک بار دیگر و این بار با استفاده از اتوکلاو ضدعفونی گردد به این ترتیب

که ابتدا ظروف کشت بخش استوک (ارلن های یک یا دو لیتری) با آبی که مراحل فوق یعنی ضدعفونی با کلر، فیلتر سه مرحله ای و خنثی سازی با تیوسولفات سدیم را طی کرده، پر می شود (البته باید اندازه حجم ریزجلبک مادری قرار است به آن اضافه شود فضای خالی باقی بماند) و دهانه آن با استفاده از فویل آلومینیوم بسته می شود و داخل دستگاه اتوکلاو چیده می شود. باید دقت شود که در دستگاه اتوکلاو به خوبی بسته شود چرا که این دستگاه تحت فشار عمل کرده و در صورتی که در دستگاه خوب بسته نشده باشد موجب خروج بخار آب و یا خطرات احتمالی خواهد شد. دستگاه روی دمای ۱۲۱ درجه سانتی گراد، فشار ۱/۵ بار (حدود ۲۰ پاسکال) و مدت زمان ۱۵ تا ۲۰ دقیقه تنظیم می شود. حدود ۲ ساعت طول خواهد کشید تا کار اتوکلاو کردن آب به همراه ارلن های کشت تمام شود و پس از اینکه میزان فشار دستگاه تا حد صفر پایین آمد در دستگاه را باز کرده ارلن ها را از داخل آن در آورده در گوشه ای می گذاریم تا دمای آن تا حد دمای اتاق پایین بیاید. معمولاً ما ارلن هایی را که می خواهیم در روز خاصی کشت بدهیم روز قبل از آن اتوکلاو کرده و تا فردا صبح در گوشه ای می گذاریم تا در این مدت دمای آن به دمای اتاق برسد. پس از آن به این آب محلول های کشت(کانوی) اضافه می گردد و به مدت یک ساعت تحت تابش اشعه UV گذاشته می شود. این آب پس از طی مراحل فوق برای کشت ریزجلبک در بخش استوک آماده است.

مراحل کشت در روش کشت انبوه (batch culture):

بخش استوک :

پس از اینکه آب مورد نیاز برای کشت در ارلن های کشت بخش استوک که اتوکلاو شده بودند، خنک شدند به آنها محیط کشت کانوی (به میزان یک سی سی به ازای هر لیتر آب شور آماده کشت) اضافه می گردد و به مدت یک ساعت تحت تابش اشعه UV گذاشته می شود تا اگر در هنگام افزودن محیط کشت آلودگیی وارد ظرف کشت شده باشد با این کار برطرف گردد. البته می توان محیط کشت را قبل از اتوکلاو کردن آب به آن اضافه کرد که البته در این حالت محلول ویتامین را باید جداگانه آماده کرد و آنرا پس از خنک شدن آب به آن افزود، چرا که در حرارت بالا ساختار ویتامین تغییر می کند و ممکن است عملکرد خود را از دست بدهند.

با بررسی ریزجلبکهای بلوم کرده (شکوفا شده) داخل استوک زیر میکروسکوپ نوری از نظر آلودگی احتمالی و همچنین شمارش و تعیین تراکم آنها، استوک مناسب جهت کشت انتخاب می گردد.

ارلن ها بعد از اینکه به مدت یک ساعت تحت تابش اشعه UV بودند به قسمت استوک انتقال داده شده و از استوک انتخاب شده میزان ۴۰۰ – ۲۰۰ سی سی (بسته به تراکمی که ریزجلبک مادر دارد) به ازای هر دو لیتری افزوده می شود مقدار ریزجلبک اضافه شده به ظرف کشت جدید در این بخش باید طوری باشد که تراکم کشت ریزجلبک نانوکلروپسیس اوکولاتا حدود ۱۰ تا ۱۵ میلیون سلول در سی سی باشد. ارلنهای کشت در مجاورت لامپهای مهتابی که شدت نور لازم (۵۰۰۰ – ۲۰۰۰ لوکس) را فراهم می کنند گذاشته شده و شلنگ هوادهی را در داخل آن می گذاریم و به مدت ۷ – ۶ روز در این شرایط نگهداری می شود تا به حداکثر تراکم ممکنه برسند که در مورد ریزجلبک نانوکلروپسیس اوکولاتا این میزان حدود ۱۰۰ تا ۱۵۰ میلیون سلول در میلی لیتر است. پس از این مدت از ظروف کشت نمونه برداری شده زیر میکروسکوپ از نظر آلودگی بررسی شده و با استفاده از لام نئوبار شمارش شده تعیین تراکم می گردند که اگر به تراکم مناسب رسیده باشند برداشت می شوند. کشتهایی که از نظر تمیزی و تراکم مناسبترین حالت را دارند برای کشت مجدد در بخش استوک استفاده می شوند و بقیه کشتها جهت استفاده برای کشت دادن بشکه های ۱۰ تا ۱۵ لیتری بخش بینابینی به این بخش

انتقال داده می شوند. ظروف کشت با استفاده از آب گرم و مایع ظرفشویی شسته می شوند و با استفاده از آب کلر ضدعفونی می گردند و پس از آن با استفاده از آب مقطر (و یا آب شور ضدعفونی شده حاوی تیوسولفات) آب کشی می شوند تا برای استفاده مجدد آماده شوند. شلنگ های هواده نیز به خوبی شسته می شوند و تا زمان استفاده مجدد داخل آب حاوی کلر نگهداری می شوند و هنگام استفاده مجدد ابتدا با استفاده از آب حاوی تیوسولفات آب کشی می شوند تا کلر احتمالی چسبیده به جداره آنها خنثی شود.

لازم به ذکر است که بخش استوک حساسترین بخش یک فایکولب است و باید سعی شود که کشتهای ریزجلبکی در آن در شرایط کاملاً ایزوله کشت و نگهداری شود به خاطر همین باید ورود و خروج افراد به این بخش کاملاً کنترل شده باشد و از ورود افراد غیر مرتبط جلوگیری شود و فقط مسئول بخش وارد آن شود که وی نیز باید با رعایت تمام نکات کار در شرایط ایزوله وارد بخش شود. در هنگام ورود افراد از بیرون سالن به داخل سالن حتماً باید کفشهایی که بیرون به پا داشته اند را در بیاورند و پای خود را با استفاده از آب کلر ضدعفونی کرده با پوشیدن دمپایی های مختص داخل سالن این بخش شود و اگر بخواهد از زیربخشی وارد زیربخش دیگر بخش داخل سالن فایکولب شوند باید دمپایی خود را عوض کرده وارد گردند و اگر بخصوص بخواهند وارد بخش استوک شوند علاوه بر عوض کردن دمپایی لازم است که دستهای خود را ابتدا با استفاده از آب و صابون شستشو کرده و با اسپری کردن الکل دستهای خود را ضدعفونی کرده وارد بخش استوک شوند. در ضمن مسئول بخش باید قبل از دست زدن به هر یک از ظروف کشت دستهای خود را ضدعفونی کند. ظروف کشت، پیپت ها و سایر ظروف و ابزارهای مورد استفاده در بخش استوک حتماً باید با استفاده از اتوکلاو یا آون در حرارت بالا استریل شوند. برای سنجیدن دمای کشتهای ریزجلبکی بهتر است که به سنجیدن دمای اتاق کشت اکتفا نمود و تا جایی امکان دارد از وارد کردن دماسنج یا pHمتر به داخل کشتهای استوک خودداری شود و اگر لازم به چنین کاری بود پس از استفاده برای یک ظرف کشت و قبل از استفاده برای کشت دیگر حتماً باید با استفاده از اسپری الکل اتیلیک ۹۵ درصد ضدعفونی گردد.

مراحل کشت در بخش استوک به صورت خلاصه به قرار زیر است:

- تنظیم شوری آب در حد ۲۰ تا ۲۵ قسمت در هزار
- ضدعفونی کردن آب فوق با استفاده از ppm ۳۰ کلر
- فیلتر کردن آب با استفاده از فیلتر سه مرحله ای و ذخیره آن در تانکهای ۳۰۰ لیتری داخل سالن
- سنجش وجود یا عدم وجود کلر در آب پس از ۲۴ ساعت توقف تحت هوادهی با استفاده از ارتوتولئیدن
- خنثی کردن کلر آزاد موجود در آب (در صورت وجود کلر) با استفاده از تیوسولفات سدیم به میزان ppm ۱۵
- سنجش وجود یا عدم وجود کلر جهت اطمینان از خنثی شدن کلر آب
- آبگیری ظروف کشت (ارلن های یک یا دو لیتری)
- اتوکلاو کردن در دمای ۱۲۱ درجه سانتی گراد، فشار ۱/۵ بار و به مدت ۱۵ تا ۲۰ دقیقه
- خنک کردن آب (همدما با ریزجلبک مادر)
- افزودن محیط کشت کانوی (به میزان یک سی سی به ازای هر لیتر)
- قرار دادن تحت تابش اشعه UV به مدت یک ساعت
- افزودن جلبک مادر به ارلن های کشت (به میزان حداقل ۱۰ درصد حجم نهایی کشتها)
- انتقال به بخش استوک و قرار دادن روی قفسه ها در مجاورت لامپهای مهتابی
- فراهم کردن هواده

- توقف به مدت ۶ تا ۷ روز در شرایط فوق
- نمونه برداری از کشتها
- بررسی و شمارش ریزجلبکها در زیر میکروسکوپ و تعیین تراکم
- برداشت (کشت مجدد در استوک و یا انتقال به بخش بینابینی جهت کشت بشکه های ۱۰ تا ۱۵ لیتری)
- شستشو و ضدعفونی ظروف کشت و شلنگهای هوا جهت استفاده مجدد

شکل ۱۱- ارلن های دولیتری حاوی کشتهای ریزجلبک نانوکلروپسیس اوکولاتا در بخش استوک فایکولب ایستگاه تحقیقاتی ماهیان دریایی بندر امام خمینی (ره) (ارلن هایی که حاوی ریزجلبکهای کمرنگتر هستند کشتهای همان روز هستند و هر چه مدت زمان کشت بیشتر سپری شود کشتها پررنگتر هستند)

بخش بینابینی :

برای کشت دادن بشکه های ۱۰ تا ۱۵ لیتری در بخش بینابینی فایکولب از ریزجلبکهای کشت داده شده در ارلن های دو لیتری در بخش استوک استفاده می گردد. بدین صورت که کشت های ریزجلبکی در بخش استوک زیر میکروسکوپ نوری از لحاظ آلودگی بررسی شده و با استفاده از لام نئوبار شمارش شده تراکم آنها تعیین می گردد. تمیزترین کشتها از نظر آلودگی که در عین حال تراکم مناسبی نیز دارند برای کشت مجدد در بخش استوک نگهداری می شود و بقیه کشتها به بخش استوک منتقل می شود تا برای کشت دادن بشکه های ۱۰ تا ۱۵ لیتری استفاده شود. البته اگر کشتهای بخش استوک آلودگی شدیدی داشتند یا در اثر توقف طولانی مدت در بخش استوک دچار سقوط شده باشند حذف می گردند و از دمای روند کشت آنها جلوگیری می شود.

ارلن های منتقل شده به بخش بینابینی در بشکه های کشت ریخته می شوند طوریکه حداقل ۱۰ درصد حجم نهایی بشکه های کشت با ریزجلبک های مادر پر شود. باقی مانده حجم بشکه ها با آب شور ppt ۲۵-۲۰ که کلر آن خنثی شده پر می شود و با افزودن محیط کشت کانوی یا TMRL به مقدار یک سی سی به ازای هر لیتر آب شور و چسباندن برچسب تاریخ کشت روی قفسه ها و در مجاورت لامپهای مهتابی گذاشته می شود. شلنگ هواده که به انتهای آن گلوله سربی متصل است داخل آن گذاشته می شود و به همین ترتیب مدت ۶ تا ۷ روز در اتاق کشت بخش بینابینی که دمای آن در حد ۲۰ تا ۲۵ درجه سانتی گراد کنترل شده است توقف می کند. تراکم اولیه کشت در این بخش باید در محدوده ۷ تا ۱۰ میلیون سلول در میلی لیتر باشد البته بدیهی است که هر چه تراکم اولیه کشت بیشتر باشد در مدت زمان مشخص

تراکم بردا شت نیز بی شتر خواهد بود. پس از ۶ تا ۷ روز تراکم ک شتها در این بخش ب سته به تراکم اولیه ک شت و شرایط فیزیکو شیمیایی به حدود ۵۰ تا ۸۰ میلیون (در برخی موارد به تراکمهای بیشتر از این) خواهد رسید که بدین صورت بشکه های ک شت آماده بردا شت و انتقال به بخش بیرون سالن خواهد بود. بهتر ا ست که از این ک شتها قبل از بردا شت نمونه برداری کرد و از نظر آلودگی احتمالی و همچنین تراکم ریزجلبکی برر سی گردد تا در صورت بروز آلودگی شدید ک شتهای آلوده حذف شده از انتقال آلودگی به بخش های دیگر جلوگیری شود.

برای کشت بشکه ها در بخش بینابینی بهترین کار این است که از ریزجلبکهای پرورش یافته در بخش استوک استفاده شود ولی در برخی موارد که بنا به دلایلی با کمبود کشت در بخش استوک مواجه هستیم می توان از خود کشتهای بخش بینابینی برای گسترش کشت در این بخش استفاده کرد به این ترتیب که کشتهای مناسب که حاصل ادامه کشت بخش استوک بوده را انتخاب کرده و ریزجلبکهای داخل آن را در ۳ یا ۴ بشکه دیگر تقسیم کرده و بقیه مراحل کشت را طبق روش فوق انجام داد. البته لازم به ذکر است که دیگر از این کشتها که خود با استفاده از کشتهای بینابینی کشت داده شده اند برای کشت مجدد در بخش بینابینی نمی توان استفاده کرد چرا که کشتهای بعدی ضعیف خواهند شد و احتمال افزایش آلودگی در آنها خواهد بود.

مراحل کشت در بخش بینابینی به صورت خلاصه به قرار زیر است:

- تنظیم شوری آب در حد ۲۰ تا ۲۵ قسمت در هزار
- ضدعفونی کردن آب فوق با استفاده از ppm ۳۰ کلر
- فیلتر کردن آب با استفاده از فیلتر سه مرحله ای و ذخیره آن در تانکهای ۳۰۰ لیتری داخل سالنپ
- سنجش وجود یا عدم وجود کلر در آب پس از ۲۴ ساعت توقف تحت هوادهی با استفاده از ارتوتولئیدن
- خنثی کردن کلر آزاد موجود در آب (در صورت وجود کلر) با استفاده از تیوسولفات سدیم به میزان ppm ۱۵
- سنجش وجود یا عدم وجود کلر جهت اطمینان از خنثی شدن کلر آب
- ریختن ریزجلبکهای برداشت شده از بخش استوک به داخل بشکه های کشت
- افزودن محیط کشت کانوی یا TMRL (به میزان یک سی سی به ازای هر لیتر)
- پر کردن حجم باقی مانده بشکه با استفاده از آب شور آماده شده
- قرار دادن بشکه ها روی قفسه ها در مجاورت لامپ های مهتابی
- فراهم کردن هواده
- توقف به مدت ۶ تا ۷ روز در شرایط فوق
- نمونه برداری از کشتها
- بررسی و شمارش ریزجلبکها در زیر میکروسکوپ و تعیین تراکم
- برداشت (کشت مجدد در بینابینی و یا انتقال به بخش بیرون سالن جهت کشت تانکهای ۳۰۰ لیتری)

شستشو و ضدعفونی ظروف کشت و شلنگهای هوا جهت استفاده مجدد

شکل ۱۲- بشکه های ۱۰ و ۱۵ لیتری حاوی کشتهای ریزجلبک نانوکلروپسیس اوکولاتا در بخش بینابینی فایکولب ایستگاه تحقیقاتی ماهیان دریایی بندر امام خمینی (ره) (بشکه هایی که حاوی ریزجلبکهای کمرنگتر هستند کشتهای همان روز هستند و هر چه مدت زمان کشت بیشتر سپری شود کشتها پررنگتر هستند)

بخش بیرونی:

در فایکولب ایســـتگاه تحقیقاتی ماهیان دریایی بندر امام خمینی (ره) بخش بیرونی (outdoor) کشـــت ریزجلبک نانوکلروپسیس اوکولاتا شامل سه زیربخش است که به ترتیب عبارتند از تانکهای ۳۰۰ لیتری پلی اتیلنی، تانکهای ۳ تنی فایبرگلاس و تانکهای ۷ تنی بتنی.

پس از آنکه آب کلرزده به مدت ۲۴ ساعت هوادهی گردید این آب با عبور از فیلتر کیسه ای دو میکرونی در تانکهای ۳۰۰ لیتری ، ۳ تنی و ۷ تنی آماده کشت آبگیری می شود و در صورتیکه هنوز کلر داشته باشد به همان ترتیب قبل با استفاده از محلول تیو سولفات سدیم کلر آن خنثی می گردد. پس از خنثی شدن این آب آماده کشت دادن است که برای کشت دادن به این ترتیب عمل می شود:

برای کشت دادن تانکهای ۳۰۰ لیتری از ریزجلبکهای دو یا سه بشکه ۱۵ لیتری (بسته به تراکم ریزجلبکهای بشکه ۱۵ لیتری) پرورش یافته در بخش بینابینی فایکولب اســـتفاده می گردد. تراکم کشـــت ریزجلبک نانوکلروپســـیس اوکولاتا در تانکهای ۳۰۰ لیتری باید حدود ۷-۵ میلیون سلول در میلی لیتر باشد و اگر تراکم برداشتی ریزجلبکها در بشکه های ۱۵ لیتری کم باشد حجم مورد استفاده باید به میزانی باشد که بتواند این میزان تراکم کشت را فراهم کند. پس از افزودن این بشکه های ریزجلبک به تانک ۳۰۰ لیتری محیط کشت TMRL به میزان لازم افزوده می گردد (یک سی سی به ازای هر لیتر کشت ریزجلبک) و با مهیا کردن هوادهی به مدت ۷ – ۶ روز پرورش داده می شود تا به حداکثر رشد خود برسد که در مورد ریزجلبک نانوکلروپسیس اوکولاتا ۵۰ – ۴۰ میلیون سلول بر میلی لیتر می باشد، البته ما در برخی شرایط خاص و با توقف بیشتر از این مدت تراکم حدود ۲۰۰ میلیون سلول در هر میلی لیتر کشتهای ۳۰۰ لیتری داشته ایم.

برای کشت دادن هر تانک سه تنی از سه/۳ تانک ۳۰۰ لیتری (به ازای هر مترمکعب یک تانک ۳۰۰ لیتری) شکوفا شده استفاده می گردد البته لازم به گفتن نیست که این میزان بستگی به تراکم برداشت در تانکهای ۳۰۰ لیتری دارد و گاهی اوقات در صورتی که تراکم ریزجلبک برداشت شده از تانک ۳۰۰ لیتری زیاد باشد یک تانک ۳۰۰ لیتری هم برای کشت دادن تانک ۳ مترمکعبی کفایت می کند، در کل باید سعی شود که این تانکها نیز مانند تانکهای ۳۰۰ لیتری با تراکم اولیه حدود ۷-۵ میلیون سلول در میلی لیتر کشت داده شود و پس از افزودن محیط کشت TMRL و مهیا کردن هوادهی

باز به مدت ۷ – ۶ روز پرورش داده می شود تا به تراکم مورد نظر بر سد (تراکم ۴۰ – ۳۰ میلیون سلول بر میلی لیتر برای ریزجلبک نانوکلروپ سیس اوکولاتا که البته در شرایط ایده آل از نظر فیزیکو شیمیایی به ویژه از نظر دما با توقف بی شتر در این مرحله می توان آنرا در تراکمهای بالاتر نیز برداشت کرد).

برای کشـــت دادن هر تانک ۷ متر مکعبی بتنی مقدار ۱/۵ مترمکعب ریزجلبک شـــکوفای پرورش یافته در تانکهای ۳ مترکعبی ا ستفاده می گردد (اینجا نیز مانند تانکهای ۳۰۰ لیتری و ۳ مترکعبی تراکم ک شت اولیه ریزجلبک نانوکلروپ سیس اوکولاتا باید حدود ۷–۵ میلیون سلول در میلی لیتر با شد) و پس از افزودن محیط ک شت TMRL و مهیا کردن هوادهی باز به مدت ۶ – ۵ روز پرورش داده می شود تا به تراکم مورد نظر(تراکم بیشتر از ۲۵ – ۲۰ میلیون سلول بر میلی لیتر برای ریزجلبک نانوکلروپ سیس اوکولاتا) بر سد. در این هنگام ریزجلبک بردا شت شده و با ا ستفاده از پمپ کف کش به بخش روتیفر و لاروی انتقال داده می شود.

م شکل ا صلی در ک شتهای ریزجلبک در ف ضای باز غیر قابل کنترل بودن شرایط دمایی و نوری ا ست که این امر در شـرایط آب و هوایی اسـتان خوزسـتان پس اردیبهشـت ماه مشـکل بزرگی اسـت چرا که هم دمای هوا و در نتیجه دمای کشـتهای ریزجلبکی و هم شـدت تابش آفتاب افزایش می یابد که کم کم از دامنه تحمل آن خارج می شـود و از اواسـط تیرماه عملاً کشت این گونه ریزجلبکی در شرایط فضای باز غیرممکن می شود، البته با توجه به فضل تکثیر گونه هایی که در ایستگاه تحقیقاتی ماهیان دریایی بندر امام خمینی (ره) تکثیر می شوند (شانک زردباله و صبیتی که فصل تخمریزی آنها از اواخر اسفند شروع و تا اواسط اردیبهشت ادامه دارد و ماهی هامور معمولی که فصل تخمریزی آن از اواخر فروردین شروع و تا اوا سط تیرماه ادامه دارد)، در زمان تکثیر و پرورش لاروی گونه های شانک زردباله و صبیتی م شکل خا صی از لحاظ تولید ریزجلبک نانوکلروپ سیس اوکولاتا و در نتیجه تولید روتیفر پیش نمی آید ولی در ف صل تکثیر ماهی هامور این م سئله مشکل بزرگی ا ست و اگر کارگاهی قصد دا شته با شد در شرایط ا ستان خوز ستان و یا مناطقی با آب و هوای مشابه ا ستان خوزســتان که در خرداد و تیرماه دمای آب به بیش از ۲۷ درجه ســانتی گراد می رســد، باید برای پرورش انبوه این گونه ریزجلبک در داخل سالن و شرایط دمایی و نوری قابل کنترل تمهیداتی بیاندیشد. در این زمینه ا ستفاده از فتوبیورآکتورهای داخل سالن می تواند گزینه مناسبی باشد.

مراحل کشت در بخش بیرون (outdoor) به صورت خلاصه به قرار زیر است:

- تنطیم شوری آب در حد ۲۰ تا ۲۵ قسمت در هزار (ترجیحاً ppt ۲۰ چون در فضای باز در اثر تابش آفتاب آب کشتها تبخیر می شود و شوری آب بالاتر خواهد رفت، در حالیکه برای کشت دادن روتیفر شوری آب باید حدود ppt ۲۵ باشد)
- ضدعفونی کردن آب فوق با استفاده از ppm ۳۰ کلر
- سنجش وجود یا عدم وجود کلر در آب پس از ۲۴ ساعت توقف تحت هوادهی با استفاده از ارتوتولئیدن
- انتقال آب به تانکهای کشت (قبل از خنثی کردن کلر آن)
- خنثی کردن کلر آزاد موجود در آب (در صورت وجود کلر) با استفاده از تیوسولفات سدیم به میزان ppm ۱۵
- سنجش وجود یا عدم وجود کلر جهت اطمینان از خنثی شدن کلر آب
- افزودن ۳–۲ بشـکه ۱۵ لیتری ریزجلبک نانوکلروپسـیس اوکولاتای شـکوفا شـده به هر یک از تانکهای ۳۰۰ لیتری
- افزودن محیط کشت TMRL به میزان یک سی سی به ازای هر لیتر کشت
- قرار دادن هواده در داخل تانک

- توقف ۷-۶ روزه در شرایط فضای باز
- نمونه برداری و بررسی و شمارش و برآورد تراکم
- برداشت و انتقال به داخل تانکهای ۳ مترمکعبی جهت کشت
- مراحل کشـــت در تانکهای ۳ مترمکعبی و ۷ مترمکعبی نیز مانند مراحل فوق خواهد بود، فقط برای کشـــت تانکهای ۳ مترمکعبی ریزجلبکهای شکوفا شده در ۳-۲ تانک ۳۰۰ لیتری و برای کشت دادن هر تانک ۷ متر مکعبی مقدار ۱/۵-۱ مترمکعب از ریزجلبکهای پرورش یافته در تانکهای ۳ مترمکعبی استفاده می شود.
- برداشت از تانکهای ۷ مترمکعبی پس از شکوفا شدن و انتقال به بخش پرورش روتیفر و بخش پرورش لاروی جهت استفاده.

شکل ۱۳- ۳۰۰ لیتری و ۳ مترمکعبی (سمت راست) و تانکهای ۷ مترمکعبی بتنی (سمت چپ) حاوی کشتهای ریزجلبک نانوکلروپسیس اوکولاتا در بخش بیرون سالن فایکولب ایستگاه تحقیقاتی ماهیان دریایی بندر امام خمینی (ره)

شمارش جلبک:

آگاهی از میزان تراکم ریزجلبک به منظور برنامه ریزی جهت میزان تغذیه روتیفر و میزان حجم مصـرفی برای ایجاد اثر آب سـبز در تانکهای پرورش لاروی، همچنین برنامه ریزی جهت کشـت مجدد ریزجلبک در بخش فایکولب از نظر زمان کشت و میزان جلبک مادری که باید اضافه گردد تا حداقل تراکم کشت در بخشهای مختلف رعایت شده باشد لازم است.

همچنین در کارهای تحقیقاتی برای بررسـی اثر پارامترهای مختلف بر رشـد ریزجلبک، مطالعه افزایش تراکم سـلولی مهمترین پارامتری ا ست که باید برر سی گردد و اثر پارامترهای مورد آزمایش بر آن تعیین گردد تا شرایط بهینه برای ر شد جلبکها مشخص گردد.

شـمارش ریزجلبکها با اسـتفاده از میکروسـکوپ نوری و لام نئوبار صـورت می گیرد، همچنین ظروف نمونه برداری با حجم کمتر از ۵ سـی سـی برای نمونه برداری، شـمارشـگر (کانتر) دسـتی یا دیجیتال نیز برای دقت بیشـتر در شـمارش ریزجلبکها و قطره چکان مناسب جهت نمونه گذاری روی لام نئوبار لازم می شود.

شکل ١٤- وسایل مورد نیاز برای شمارش ریزجلبک

لام نئوبار:

لام نئوبار یا هماتو سیتومتر لامی ا ست که خط ک شی ها و شیارهای خاص خودش را دارد و در ا صل برای شمارش سلولهای خونی و باکتری ها از آن استفاده می شود ولی از آن می توان برای شمارش ریزجلبکهای تک سلولی نیز استفاده کرد.

شکل ١٥- تصویری از یک لام نئوبار همراه با لامل مخصوص خود

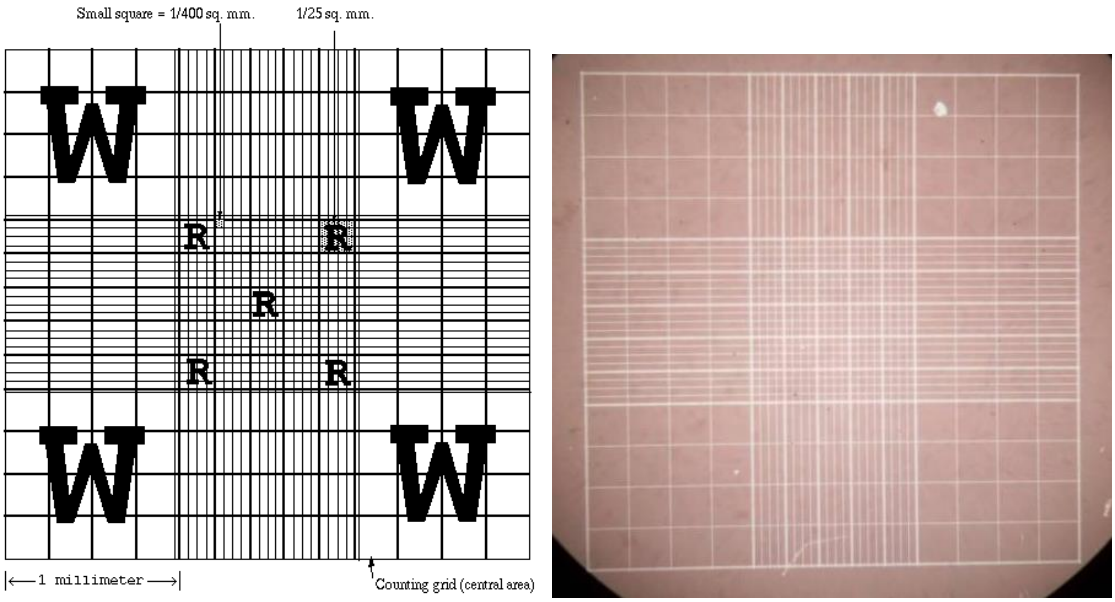
همانطور که در تصویر فوق دیده می شود لام نئوبار دارای چند شیار و دو منطقه خط کشی شده در دو سمت شیار افقی وسط لام است که از این خط کشی ها برای شمارش استفاده می شود.

شکل ١٦- پایه های نگهدارنده لام و محل خط کشی ها و محل نمونه گذاری در لام نئوبار

اولین کار در عملیات شمارش ریزجلبکها این است که محل خط کشی های لام نئوبار را در زیر میکروسکوپ پیدا کنیم. برای اینکار بهتر است قبل از گذاشتن نمونه روی ریزجلبک روی لام ابتدا آنرا در محل مخصوص خود در میکروسکوپ گذاشته و باید دقت شود که حدالمقدور محل تقریبی خط کشی ها در زیر عدسی شی ای قرار گیرد که برای این منظور از محل تابش نور میکروسکوپ کمک گرفت. سپس با استفاده از عدسی شی ای ۴* در میکروسکوپ به لام نگاه می کنیم و با استفاده از گردونه های بزرگ و کوچک بالا و پایین بر صفحه میکروسکوپ را بالا و پایین می کنیم تا وقتی که برای یک لحظه خط کشی های لام را مشاهده کردیم در آن نقطه آنرا ثابت گذاشته و با گردونه کوچک وضوح تصویر را بهتر می کنیم، تصویری که مشاهده می کنیم مانند تصویر شکل ۱۷ (سمت راست) خواهد بود. در ادامه باید محل خط کشی ها را در مرکز میدان دید (اصطلاحاً ساعت صفر) تنظیم کنیم، وقتی محل خط کشی در وسط میدان دید قرار گرفت، در صورت لزوم می توانیم درشت نمایی را با تغییر عدسی شی ای تغییر دهیم. معمولاً برای شمارش ریزجلبکهایی مانند نانوکلروپسیس اوکولاتا که اندازه آنها بسیار ریز (۲ تا ۴ میکرومتر) است لازم می شود که حداقل از عدسی شی ای ۱۰* (بزرگنمایی ۱۰۰ برابر) استفاده کنیم و حتی برخی ممکن است از بزرگنمایی ۴۰۰ برای این منظور استفاده کنند.

همانطور که در تصویر ۱۷ مشاهده می کنید خط کشی های لام نئوبار شامل ۹ مربع بزرگ است که ۵ مربع از آنها (مربع هایی که با حروف W و R در تصویر سمت چپ شکل ۱۷ مشخص شده اند) در شمارش ریزجلبکها و یا سلولهای خونی به کار گرفته می شود. منطقه W در اصل برای شمارش گلبولهای سفید خون و منطقه R برای شمارش گلبولهای قرمز خون استفاده می شود ولی در شمارش سلولهای ریزجلبک می توان از منطقه W برای شمارش سلولهای ریزجلبکی وقتی که تراکم آنها کم است (مانند وقتی که از آبهای طبیعی و تانکهای پرورش لاروی نمونه جهت شمارش ریزجلبک گرفته می شود) استفاده کرد (و همچنین از کلیت منطقه R) ولی اگر تراکم ریزجلبکها زیاد باشد (مانند وقتی که از تانکهای پرورش انبوه ریزجلبکها نمونه گرفته می شود) باید از منطقه R و با کمک گرفتن از مربع های متوسط و ریز آن برای شمارش استفاده شود. همانطور که در شکل ۱۷ مشخص است خود منطقه R به ۲۵ مربع متوسط تقسیم شده است که مساحت آن برابر با یک بیست و پنجم میلی متر است. هر یک از آنها نیز به ۱۶ مربع کوچکتر (با مساحت یک چهار صدم) تقسیم بندی شده اند. این مربع های اخیر و همچنین مربع های کوچکتر واقع در منطقه W در محاسبات شمارش ریزجلبکها نقشی نداشته و

تنها نقش کمک کننده در شمارش را دارند تا در زمان شمارش با کمک آنها مسیر شمارش را گم نکنیم و در نتیجه بتوانیم شمارش دقیق و درستی را داشته باشیم.



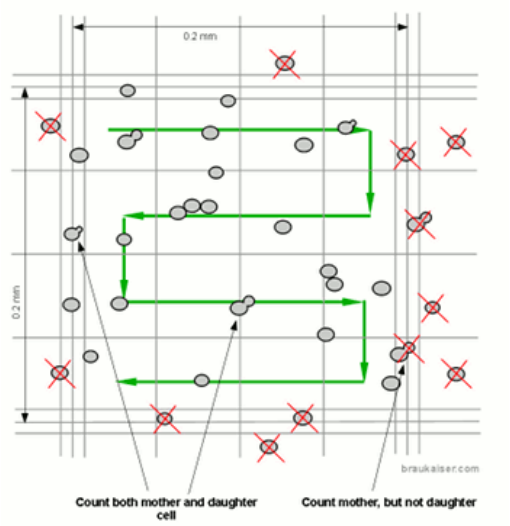
شکل ۱۷- تصویر منطقه خط کشی لام نئوبار در زیر میکروسکوپ عدسی ٤* (سمت راست) و طرح شماتیک آن (سمت چپ)

برای شمارش ریزجلبک ابتدا باید از کشتهای ریزجلبکی و یا منبع آبیی که قرار است ریزجلبکهای آن شمارش شود نمونه برداری شود. نمونه ها را در ظروف نمونه برداری ریخته و در مجاورت میکروسکوپ قرار می دهیم. قبل از اینکه نمونه را به لام نئوبار اضافه کنیم، لامل مخصوص این لام را در محل خودش روی منطقه خط کشی قرار می دهیم طوریکه مقداری از شیارهای عمودی لام از زیر لامل بیرون قرار گیرد. با استفاده از قطره چکان مقداری نمونه از ظرف برداشته و با دقت در محل شیاری که از زیر لامل بیرون مانده یک قطره نمونه می چکانیم، این نمونه به خاطر خاصیت کشسی که دارد به زیر لامل که فضایی یک میلی متری دارد، کشیده خواهد شد و بصورت یکنواخت در کل منطقه خط کشی پخش خواهد شد. مدتی را صبر می کنیم تا جریان آب در زیر لامل از حرکت باز ایستد. سپس لام را در زیر عدسی قرار داده و شروع به شمارش می کنیم.

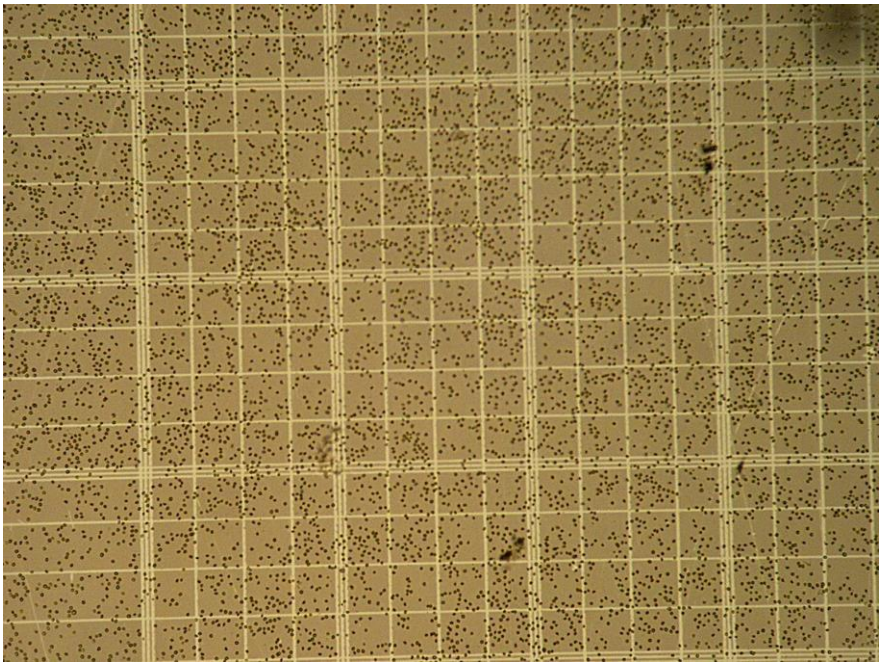
در خط کشی های لام نئوبار معمولاً دو نوع خط می بینیم، یکی خطهایی سه تایی است که شامل سه خط نزدیک به هم است که در نگاه اول ممکن است بصورت یک خط پررنگ دیده شود که این خط ها محدوده مربع های شمارش را مشخص می کنند که در واقع اضلاع مربع های بزرگ (منطقه W) و مربع های متوسط (۲۵ مربع متوسط منطقه R) را به این صورت می کشند. دیگری خطهای تک خطی هستند که مربع های کوچک داخلی مربع های منطقه W و منطقه R را با آن رسم می کنند که این مربع ها نقش کمکی در شمارش ریزجلبک دارند.

برای شمارش باید ابتدا مشخص کنیم که در کدام منطقه از خط کشی های لام نئوبار می خواهیم شمارش را انجام بدهیم. اگر در نگاه اول به نمونه مشاهده کردیم که تراکم ریزجلبکها نسبتاً کم است از مناطق W برای شمارش استفاده می کنیم ولی اگر میزان تراکم ریزجلبکها زیاد باشد باید از مربع های متوسط منطقه R برای این کار استفاده شود (شکل ۱۷).

در هر دو حالت شمارش را بصورت شکل ۱۸ انجام می دهیم و از مسیر پیشنهادی در شکل ۱۸ و یا مسیری مشابه آن برای دنبال کردن مسیر شمارش استفاده می کنیم طوری که مرتکب خطا نشویم. ریزجلبکهای درون مربع شمارش (مربع با اضلاع سه خطی) همگی شمارش می شوند ولی در مورد ریزجلبکهایی که روی اضلاع مربع شمارش قرار گرفته اند باید از این قرارداد پیروی کرد که ریزجلبکهایی که روی دو ضلع مربع شمارش قرار گرفته اند (مثلاً ضلع بالا و ضلع سمت چپ) را شمارش می کنیم و ریزجلبکهایی که روی دو ضلع دیگر قرار گرفته اند را شمارش نمی کنیم. البته باید دقت کرد که اگر قسمت بیشتری سلول ریزجلبکی خارج از ضلع مربع قرار گرفت دیگر آن سلول شمارش نشود.



شکل ۱۸- مسیر شمارش و ریزجلبکهایی که شمرده می شوند و آنهایی که شمارش نمی شوند



شکل ۱۹- نمایی از لام نئوبار و ریزجلبکهای نانوکلروپسیس اوکولاتا در زیر میکروسکوپ

محاسبه تراکم سلولی ریزجلبک:

تراکم ســـلولی ریزجلبکهای ریز بدلیل تراکم بالا (بخاطر ریز بودن آنها) در یک میلی لیتر تعیین می گردد و واحد آن cells/ml (یعنی تعداد سـلول در یک میلی لیتر) می باشـد که این مقدار بسـته گونه ریزجلبک می تواند بسـیار متفاوت باشد، مثلا در مورد ریزجلبک نانوکلروپسیس اوکولاتا این مقدار می تواند حتی تا ۲۲۰ میلیون سلول بر میلی لیتر نیز برسد (بطور معمول هنگامی که تراکم آن حدود ۱۰۰ میلیون سلول بر میلی لیتر که رسید این مقدار را حد ماگزیمم و زمان برداشت در کشتهای استوک تلقی می گردد) و این در حالی است که در مورد ریزجلبک آیزوکرازیس گالبانا تراکم ماگزیمم آن حدود ۴۰ میلیون سلول بر میلی لیتر می باشد. بطور کلی می توان انتظار داشت که هر چه اندازه قطر سلولی یک ریزجلبک بیشتر باشـد مقدار آن در یک میلی لیتر کمتر خواهد بود البته باید توجه داشـت در مورد بعضـی از ریزجلبکهای که بدلیل داشـتن تاژک متحرک هســتند (مانند جلبک آیزوکرازیس گالبانا) علی رغم داشــتن قطر ســلولی کم (۷-۴ میکرون) باز تراکم سلولی کم خواهد بود که این امر بدلیل داشتن تاژک و متحرک بودن ان می تواند باشد.

هنگامی که نمونه را از محیط آبهای طبیعی و یا تانکهای پرورش لاروی می گیریم از مناطق W (شـــکل ۱۷) و همچنین کل منطقه R (که معادل منطقه W است) برای شمارش استفاده می شود و کل ریزجلبکهایی که در آن مناطق قرار گرفته اند شمارش می شود و سپس میانگین آنها با تقسیم مجموع ریزجلبکهای شمارش شده در ۵ منطقه یاد شده به عدد ۵ (تعداد مناطق شمارش شده) عدد N را بدست می آوریم. برای محاسبه تراکم نمونه ریزجلبک در این حالت از فرمول زیر استفاده می کنیم.

$$\text{Algal cell density} = N*10^4$$

که در آن: N برابر با میانگین ریزجلبک شمارش شده در منطقه W است.

مثلاً اگر در شمارش یک نمونه ریزجلبک گرفته شده از تانک های پرورش در مناطق W و کل R اعداد زیر بدست آمده باشد:

۱۵، ۲۱، ۱۷، ۱۹ و ۲۳

ابتدا میانگین آنها را حساب می کنیم:

۲۳+۱۹+۱۷+۲۱+۱۵=۹۵

میانگین شمارش شده در منطقه شمارش ۹۵÷۵=۱۹

سلول در میلی لیتر ۱۹*۱۰^۴=۱۹۰۰۰۰

در این حالت میزان خطا برابر با ۱۰۰۰۰ عدد خواهد بود.

حالا اگر تراکم ریزجلبک بیشـــتر از حالت قبل باشـــد مثلاً نمونه را از تانکهای پرورش انبوه بیرون ســـالن ریزجلبک نانوکلروپسیس اوکولاتا گرفته شده باشد، شمارش آن با استفاده از روش فوق مشکل و وقت گیر خواهد بود. لذا می توان از منطقه شمارش R استفاده کرد. باید توجه داشته باشیم که در اصل باید کل منطقه شمارش R شمارش شود ولی چون تراکم زیاد است و شمارش کل منطقه وقت گیر و سخت است، می توان با شمارش ۵ مربع متوسط در منطقه R و تعمیم دادن عدد آن به کل منطقه که با ضـرب مجموع سـلولهای شـمارش شـده در ۵ مربع (N) در عدد ۵ صـورت می گیرد و

ضررب عدد حاصل در ضریب ۱۰۰۰۰ تراکم سلولی در نمونه ریزجلبک بدست می آید. با داشتن عدد N (در اینجا مجموع سلولهای شمارش شده در ۵ مربع متوسط منطقه R) و قرار دادن آن در فرمول زیر می توان به میزان تراکم سلولی ریزجلبک پی برد.

$$\text{Algal cell density} = N*5*10^4$$

عدد حاصل از این فرمول نشانگر تعداد سلول در یک میلی لیتر خواهد بود.

مثلاً اگر مجموع ریزجلبکهای شمارش شده در ۵ مربع متوسط برابر با ۲۰۰ عدد باشد با قرار دادن این عدد به جای N در فرمول فوق خواهیم داشت:

۲۰۰ * ۵ * ۱۰^۴ =۱۰۰۰۰۰۰۰ تراکم ریزجلبک (سلول در میلی لیتر)

در این حالت میزان خطای شمارش برابر با ۵۰۰۰۰ عدد خواهد بود.

ولی اگر تراکم ریزجلبک بسیار بالاتر باشد و شمارش ۵ مربع متوسط از ۲۵ مربع منطقه R مشکل و وقت گیر باشد می توان تنها به شمارش یکی از مربع های منطقه R (ترجیحاً مربع وسطی) اکتفا کرد و با استفاده از فرمول زیر که در آن N تعداد سلولهای ریزجلبکی شمارش شده در یک مربع متوسط می باشد، تراکم ریزجلبک مورد نظر را بدست آورد. از آنجا که تراکم پذیری ریزجلبک نانوکلروپسیس اوکولاتا بسیار زیاد است در بیشتر مواقع از این حالت برای شمارش و محاسبه تراکم آن استفاده می شود. البته باید توجه داشت که بهتر است برای دقت بیشتر در محاسبه تراکم ریزجلبک از شمارش ۵ مربع متوسط منطقه R استفاده شود.

$$\text{Algal cell density} = N*25*10^4$$

مثلاً اگر در شمارش یک مربع متوسط از ۲۵ مربع متوسط منطقه R تعداد ۴۵۰ = N سلول ریزجلبک شمارش شود تراکم ریزجلبک فوق به قرار زیر خواهد بود:

۴۵۰ * ۲۵ * ۱۰^۴ = ۱۱۲۵۰۰۰۰۰ تراکم ریزجلبک (سلول در میلی لیتر)

در این حالت میزان خطای شمارش برابر با ۲۵۰۰۰۰ عدد خواهد بود.

فهرست منابع:

- 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 .
- پقه، ا.؛ ذبایح نجف آبادی، م.؛ حکمت پور، ف. و حسینی، س. ج. ۱۳۹۲. بررسی امکان پرورش انبوه ریزجلبک نانوکلروپسیس اوکولاتا (*Nannochloropsis oculata*) در سیستم پرورش ستونی. مؤسسه تحقیقات شیلات ایران. ۶۷ صفحه

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.

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.

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.

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.

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.

Lubzens, E. ; Gibson, O. ; Zmora, O. & Sukenik, A. 1995 . potential advantages of frozen algae (*Nannochloropsis sp.*) for rotifer (*Brachionus plicatilis*) culture. Aquaculture, vol. 133, pp. 295-309.

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

Richmond, A. 2004 . Handbook of Microalgal culture : Biotechnology and applied phycology. Blakwell publishing, Oxford, 566 pp.

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.