



پرورش ریز جلبک نانوکروپسیس اوکولاتا (*Nannochloropsis oculata*)

اسماعیل بقیه *

1-مرکز تحقیقات ذخایر آبزیان آبهای داخلی گرگان

*آدرس الکترونیکی نویسنده مسئول: esmaeilpaghe@gmail.com

خلاصه

ریز جلبک‌ها در تکثیر و پرورش آبزیان پرورشی مانند صدف‌ها، میگوها و ماهیان دریایی نقش کلیدی دارند و حذف آن‌ها از چرخه تکثیر و پرورش برخی از گونه‌های یاد شده با توجه به عدم شناخت کافی در مورد نیازهای غذایی لارو آن‌ها امکانپذیر نیست و به نظر می‌رسد بهترین غذا به عنوان غذای اولیه در تغذیه لاروی بسیاری از گونه‌های مورد تکثیر در کارگاه‌های تکثیر آبزیان انواع غذای زنده باشد.

یکی از مهمترین آن‌ها ریز جلبک‌ها هستند که در برخی موارد به صورت مستقیم و در برخی موارد دیگر به طور غیرمستقیم مورد تغذیه لاروهای آبزیان پرورشی و در برخی موارد در کل دوران زندگی آن‌ها قرار می‌گیرد. یکی از پرکاربردترین گونه‌های ریز جلبک در آبزی پروری به ویژه در تکثیر ماهیان دریایی ریز جلبک نانوکروپسیس اوکولاتا (*Nannochloropsis oculata*) می‌باشد. ریز جلبک‌های جنس *Nannochloropsis* از رده *Eustigmatophyceae* هستند که دارای شش گونه می‌باشند، گونه شاخص در بین آن‌ها *Nannochloropsis oculata* است. گونه‌های این جنس اغلب در محیط‌های دریایی شناخته شده‌اند اما همچنین در محیط‌های آب شیرین و لب شور نیز یافت می‌شوند همه گونه‌ها تک سلولی و کوچک بوده (اندازه قطر آنها ۲-۴ میکرومتر) و غیر متحرک هستند. نانوکروپسیس اغلب به عنوان غذای روتیفر و (همچنین در ایجاد شرایط مطلوب محیطی اثر آب سبز (green water effect) تانک‌های لاروی، در کارگاه‌های تکثیر ماهیان دریایی) مورد استفاده قرار می‌گیرد، چرا که آن‌ها سرشار از اسید چرب ایکوساپنتائنوئیک (EPA: eicosapentaenoic acid) هستند. همچنین آن‌ها بعنوان منبعی برای تامین اسیدهای چرب چند غیراشباع جیره غذایی مطرح هستند، همچنین نانوکروپسیس بعنوان منبع خوبی از پیگمان‌های قابل استفاده مانند کلروفیل a، زاکسانتین (zeaxanthin)، کانتاکسانتین (canthaxanthin) و آستاگزانتین (astaxanthin) شناخته می‌شوند. پرورش انبوه نانوکروپسیس در انواع مختلفی از تانک‌ها و استخرهای خارج سالن، کیسه‌های پلی اتیلن یا استوانه‌های فایبرگلاس ۵۰ تا ۵۰۰ لیتری که معمولاً داخل سالن نگهداری می‌شوند و انواع مختلفی از فتوبیوراکتورهای داخل و خارج سالن صورت می‌گیرد. همچنین روش‌های مختلفی از جمله پرورش مرحله‌ای (batch cultur) مداوم (cotinuous) و نیمه مداوم (semicotinuous)، برای پرورش ریز جلبک‌ها وجود دارد. از میان روش‌های فوق ساده‌ترین و پرکاربردترین روش، روش کشت مرحله‌ای (batch culture) است که در ادامه روش کار تشریح می‌شود.

نمودار رشد

نمودار رشد ریز جلبک‌ها بصورت لگاریتمی است که شامل مراحل: سازگاری (رشد کند)، رشد لگاریتمی (سریع)، رشد با نسبت کاهشنده (دارای رشد ولی با سرعت کمتر)، مرحله ایستا یا سکون و مرحله سقوط یا مرگ. بسته به نوع ریز جلبک و شرایط فیزیکیوشیمیایی ظروف کشت دوره زمانی و حداکثر تراکم بدست آمده در این چرخه ممکن است متفاوت باشد ولی در ریز جلبک نانوکروپسیس اوکولاتا و در شرایط مناسب کشت، تقریباً 7 تا 8 روز طول می‌کشد تا چرخه رشد به مرحله سوم که بهترین مرحله برای برداشت است برسد. البته اگر قرار باشد از این کشت‌ها برای شروع کشت دیگری استفاده شود، بهتر از جلبک‌ها در نزدیک انتهای مرحله رشد لگاریتمی برداشت شده و به مرحله بعدی کشت منتقل شود و سعی شود از ریز جلبکی که وارد مرحله ایستا یا سکون شده است برای شروع کشت تازه استفاده نشود چرا که در این مرحله سلول‌های ریز جلبکی ضعیف شده‌اند.

همایش ملی تغذیه آبزیان با غذای زنده

National Conference on Nutrition and Live Food for Aquaculture



شرایط فیزیکی و شیمیایی پرورش ریزجلبک‌های دریایی (از جمله نانوکلوپسیس اوکولاتا)

فاکتور	محدوده قابل تحمل	محدوده بهینه
دما (سانتی‌گراد)	16 - 27	20 - 24
شوری (گرم بر لیتر)	40-12	25-20
شدت نور (لوکس)	10000-1000	5000-2000
pH	7 - 9	8/2 - 8/7
دوره نوری	حداکثر 24 ساعت روشنایی، صفر ساعت	حداقل 16 ساعت روشنایی، 8 ساعت تاریکی

بخش‌های مختلف یک فایکولب (آزمایشگاه کشت ریزجلبک) در روش کشت مرحله‌ای (batch culture)

در روش کشت مرحله‌ای بخش پرورش ریزجلبک باید شامل بخش‌های: آزمایشگاه، ذخیره‌سازی (استوک)، بینابینی و بیرون سالن باشد. آزمایشگاه محلی برای انجام کارهایی مانند ساخت محیط‌های کشت، شمارش کشت‌های ریزجلبکی و ... است. بخش ذخیره برای شروع چرخه تولید و همچنین ریزجلبک خالص تک گونه‌ای استفاده می‌شود که ظروف کشت با حجم‌های از 10 سی سی تا ارلن‌های 2 لیتری (در برخی موارد بیشتر) برای کشت و نگهداری استفاده می‌شود. در بخش بینابینی کشت‌های برداشتی از بخش استوک در ظروف با حجم بیشتر 10 تا 15 لیتری (در برخی موارد در کیسه‌های پلاستیکی با حجم‌های بیشتر) کشت داده می‌شود و در بخش بیرون سالن این کشت‌های ریزجلبکی در تانک‌های بزرگ پلی اتیلنی، فایبرگلاس یا بتنی کشت داده می‌شود و در نهایت از این بخش برداشت شده در بخش‌های پرورش روتیفر و پرورش لاروی مورد استفاده قرار می‌گیرد.

محیط کشت‌ها:

در پرورش ریزجلبک‌ها، محیط کشت به محلول‌های غذایی اطلاق می‌شود که مواد مغذی مورد نیاز برای فتوسنتز و تکثیر و رشد ریزجلبک‌ها را فراهم می‌کند که طی فرمول‌های موجود در محل آزمایشگاه ساخته شده مورد استفاده قرار می‌گیرد. در پرورش ریزجلبک نانوکلوپسیس اوکولاتا (و خیلی از ریزجلبک‌های دیگر) در کشت‌های با حجم کم (بخش استوک) از محیط کشت‌هایی مانند کانوی (والن) یا گیلارد و در کشت‌های با حجم زیاد (بخش‌های بینابینی و بیرون سالن) برای صرفه جویی در هزینه‌ها از محیط کشت TMRL (که با مواد ارزان قیمت فله‌ای ساخته می‌شود) و برخی موارد از کودهای نیتراته و فسفات استفاده می‌شود. البته لازم به ذکر است که برای گونه‌های مختلف ریزجلبک محیط کشت‌های تخصصی تعیین و فرموله شده است.

مراحل کشت در روش کشت مرحله‌ای (batch culture)

فراهم کردن آب مورد نیاز

با توجه به شوری آب مورد نظر (20-25 ppt) برای کشت ریزجلبک ابتدا باید آب مناسب فراهم گردد (جهت تنظیم شوری می‌توان از ترکیب آب شور دریا با آب شیرین استفاده کرد) و مراحل تصفیه فیزیکی آب و ضدعفونی آب با استفاده کلر (30ppm)، خنثی کردن کلر اضافه بعد از 24 ساعت با استفاده از تیوسولفات سدیم (15ppm) و برای کشت‌های داخل استوک اتوکلاو و لامپ UV انجام می‌شود و سپس برای کشت استفاده می‌شود.

کشت مرحله ای یا دسته ای (batch culture)

همایش ملی تغذیه آبزیان با غذای زنده

National Conference on Nutrition and Live Food for Aquaculture



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 لوله‌های آزمایش (test tube) (با حجم کمتر از 10 سی سی) کشت داده و در داخل انکوباتور در دمای 24 درجه سانتی‌گراد نگهداری می‌شوند، پس از گذشت 2 تا 3 هفته، هنگامی که به اندازه کافی رشد (افزایش تراکم) داشتند آن‌ها را در ظروف بزرگتر (ارلن‌های 50 تا 100 سی سی) انتقال داده و شرایط رشد آن‌ها فراهم می‌گردد (در این مراحل هوادهی لازم نیست و تنها هر از چند گاهی آن‌ها را باید تکان داد تا بر روی جداره ظروف رسوب نکنند). پس از گذشت 10 تا 15 روز، هنگامی که به میزان کافی شکوفا شدند آن‌ها در ظروف بزرگتر (ارلن‌های شیشه‌ای 1 یا 2 لیتری) انتقال داده می‌شوند و شرایط رشد آن‌ها فراهم می‌گردد (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 7 تا 10 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 می‌شود و هنگامی که تراکم آن‌ها به حد کافی افزایش یافت (در مورد ریزجلبک نانوکلوپ سیس 80 تا 150 میلیون سلول در میلی) آن‌ها را برداشت کرده یا جهت کشت مجدد در بخش استوک و یا جهت کشت در بینابینی مورد استفاده قرار می‌گیرد.

در مورد کشت مجدد در استوک باید توجه داشت که حجم ریزجلبکی که به کشت‌های جدید اضافه می‌گردد باید به میزانی باشد که حداقل تراکم 10 تا 20 میلیون سلول در میلی‌لیتر بدست آید که در این صورت پس گذشت 7 تا 10 روز بسته به تراکم اولیه کشت تراکم کشت‌ها به 80 تا 150 میلیون در میلی لیتر خواهد رسید. با یک بار خالص سازی ریزجلبک و یا تهیه مقداری جلبک خالص تک گونه‌ای می‌توان تا وقتی این کشت‌ها آلوده نشوند به کشت و گسترش آن‌ها ادامه داد. در بخش استوک معمولاً برای کشت در ظروف جدید میزان 10 درصد حجم نهایی جلبک مادر با تراکم مناسب تلقیح می‌شود. همیشه لازم است مقداری از ریزجلبک خالص را در یخچال و دمای 4 درجه سانتی‌گراد نگهداری کرد تا در صورت آلوده شدن کشت‌های ریزجلبکی به ریزجلبک‌های دیگر و یا زئوپلانکتون‌ها نمونه تمیز برای شروع مجدد داشته باشیم و نیاز به خالص سازی مجدد نداشته باشیم.

جهت کشت ریزجلبک در بخش بینابینی بهتر این است که از خروجی بخش استوک برای تلقیح در داخل بشکه‌های پلاستیکی شفاف 10 تا 15 لیتری استفاده نمود، برای اینکار هر ارلن 2 لیتری با جلبک شکوفا شده خروجی از بخش استوک را داخل یک بشکه 15 لیتری ریخته و فضای خالی را با آبی که شوری آن تنظیم و گندزدایی شده پر می‌کنند و پس از افزودن محیط کشت به میزان لازم و با فراهم کردن شرایط هوادهی آن‌ها در مجاورت روشنایی در داخل سالن و در دمای کنترل شده در حدود 20 تا 24 درجه سانتی‌گراد، قرار می‌دهند تا پس از گذشت 7 تا 10 روز به تراکم مورد نظر برسد (کشت در این مرحله طوری خواهد بود که تراکم اولیه حدود 5 تا 7 میلیون سلول در میلی لیتر فراهم گردد و هدف در این مرحله رساندن تراکم ریزجلبک‌ها به حدود 50 میلیون سلول در میلی لیتر است)، آن‌ها را برداشت نموده جهت استفاده در کشت‌های بیرون استفاده می‌شود.

کشت‌های بیرون از کشت‌های تانک 300 لیتری شروع می‌شود و جهت کشت ریزجلبک در تانک‌های 300 لیتری به ازای هر تانک افزودن 3 بشکه جلبک شکوفا شده در آن لازم است، 5 تا 7 روز پس از تلقیح ریزجلبک در تانک‌های 300 لیتری (با تراکم اولیه 3 تا 5 میلیون سلول در میلی لیتر) کشت‌ها شکوفا خواهند شد یعنی به تراکم حدود 30 تا 40 میلیون در میلی لیتر در مورد نانوکلوپسیس اوکولاتا می‌رسد. برای کشت مرحله بعد (مرحله 3 تنی) لازم است که به ازای هر تانک 3 تنی، تعداد 3 تانک 300 لیتری جهت تلقیح استفاده شود طوری که تراکم اولیه کشت حدود 3 تا 5 میلیون سلول در میلی لیتر فراهم گردد، بقیه کارها مشابه مرحله قبلی بوده و 5 تا 7 روز پس از تلقیح ریزجلبک، کشت‌ها شکوفا خواهند شد (تراکم حدود 30 تا 40 میلیون در میلی لیتر) و آماده برداشت و انتقال به مرحله بعد خواهد بود. برای کشت مرحله بعد (مرحله 7 تنی) لازم است که به ازای هر تانک 7 تنی، حدود 1/5 تن ریزجلبک حاصل از کشت‌های 3 تنی جهت تلقیح استفاده شود طوری که تراکم اولیه کشت حدود 3 تا 5 میلیون سلول در میلی لیتر فراهم گردد، بقیه کارها مشابه مرحله قبلی بوده و 5 تا 6 روز پس از تلقیح جلبک، کشت‌ها شکوفا خواهند شد (تراکم بالاتر از 20 میلیون در میلی لیتر) و آماده برداشت و انتقال به بخش روتیفر خواهد بود.

همایش ملی تغذیه آبزیان با غذای زنده

National Conference on Nutrition and Live Food for Aquaculture



شکل 1: شماتیک کشت ریز جلبک نانوکلوپسیس اوکولاتا در مراحل مختلف روش کشت دوره‌ای-دسته‌ای (batch culture) در ایستگاه تحقیقاتی ماهیان دریایی بندر امام خمینی (ره)

با توجه به مطالب فوق و با فرض اینکه روزانه حدود 10 مترمکعب (تن) ریزجلبک برای تغذیه روتیفر و حدود 2 مترمکعب برای بخش پرورش لاروی لازم داشته باشیم، پس روزانه به حداقل به 12 تن ریزجلبک نیاز خواهد بود که برای تامین این میزان باید هر روز 2 تانک 7 تنی، یک تانک 3 تنی، 3 تانک 300 لیتری، 9 بشکه 15 لیتری و 10 ارلن دو لیتری ریزجلبک نانوکلوپسیس اوکولاتا کشت داده شود. شکل فوق مراحل کشت جلبک به روش کشت دسته‌ای (batch culture) را به صورت شماتیک نشان می‌دهد.

شمارش ریزجلبک‌ها

قبل از برداشت ریزجلبک‌ها لازم است که از تراکم آن‌ها اطلاع داشته باشیم و برای این کار از کشت‌های ریزجلبکی نمونه گرفته می‌شود و با استفاده از لام نئوبار و میکروسکوپ نوری شمارش شده و با استفاده از فرمول‌های موجود تراکم آن‌ها بدست می‌آید. ریزجلبک نانوکلوپسیس ریزجلبکی بسیار تراکم پذیر است و در شرایط مطلوب کشت می‌تواند به راحتی تا تراکم حدود 220 میلیون سلول در سی سی (بدست آمده در ایستگاه تحقیقاتی ماهیان دریایی بندر امام خمینی (ره)) برسد.

همایش ملی تغذیه آبزیان با غذای زنده

National Conference on Nutrition and Live Food for Aquaculture



استفاده از ریز جلبک نانوکلوپسیس اوکولاتا در مراکز تکثیر ماهیان دریایی

در مراکز تکثیر ماهیان دریایی هدف اصلی از پرورش ریزجلبک، استفاده از آن‌ها در پرورش روتیفر (غذای آغازین لارو ماهیان دریایی) می‌باشد که بدین منظور این ریزجلبک با تراکم حداقل 12 میلیون سلول در سی سی در تانک‌های پرورش روتیفر اضافه شده و درون آن روتیفر با تراکم 100 تا 150 عدد در سی سی کشت داده می‌شود و در ادامه نیز با استفاده از همین ریزجلبک و همچنین مخمر نانوائی روند کشت آن ادامه می‌یابد و پس از 48 ساعت روتیفر با تراکم 400 تا 500 عدد در سی سی برداشت می‌شود. همچنین از این ریزجلبک برای ایجاد شرایط مطلوب پرورش لاروی در تانک‌های پرورش لارو ماهیان دریایی استفاده می‌شود بدین ترتیب که مقداری ریزجلبک به تانک‌های پرورش لاروی اضافه می‌شود طوری که در نهایت تراکم ریزجلبک موجود در تانک‌های پرورش لاروی 300 تا 500 هزار سلول در سی سی باشد و حداقل تا 20 روز بعد از آن هر روز در دو نوبت صبح و عصر میزان تراکم ریزجلبک در آن تانک‌ها روی عدد 300 تا 500 هزار تنظیم می‌شود بدین ترتیب که از آب تانک‌ها نمونه گرفته شده ریزجلبک باقیمانده در آن شمارش می‌شود و کمبود آن با افزودن ریزجلبک تازه تامین می‌شود.