تأثیر نوع محیط کشت بر روی رشد و میزان کلروفیل ریزجلبک *Nannochloropsis oculata* در فتوبیوراکتور لوله‌ای

محمد حسین ناصری[1*]، محمد کاظم خالصی[1]، سید علی جعفرپور[1]، ابوالقاسم اسماعیلی فریدونی[1] و قربانعلی نعمت‌زاده[2]

[1] ساری، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، گروه شیلات

[2] ساری، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، گروه زراعت

تاریخ دریافت: ۹۲/۱/۱۶ تاریخ پذیرش: ۹۲/۱۰/۱۸

چکیده

در مطالعه حاضر، رشد و میزان کلروفیل a ریزجلبک *Nannochlorpsis oculata*، با استفاده از دو نوع محیط کشت گیلارد و والن در دو دوره ۱۵ روزه بررسی گردید. تراکم سلولی، موجودی کلروفیل a و وزن خشک ریزجلبک در هر دو محیط، روزانه با ۳ تکرار اندازه‌گیری شد. تراکم سلولی و موجودی کلروفیل a در ریزجلبک رشدیافته در محیط والن به‌ترتیب در روز ۳ تا ۱۰ و ۲ تا ۱۵ (بجز روز ۱۴) بیشتر از محیط گیلارد بود ($P < 0.05$) ولی تراکم سلولی از روز ۱۰ تا ۱۵ در محیط گیلارد به طور معنی‌داری بیشتر از محیط والن ثبت شد. وزن خشک ریزجلبک در هر دو محیط کشت تا روز ۶ بالا رفت ولی از روز ۶ تا ۱۱ محیط والن وزن خشک ریزجلبک را بیشتر از محیط گیلارد افزایش داد و از روز ۱۱ تا ۱۵ برتری محیط کشت گیلارد مشاهده گردید ($P < 0.05$). میانگین نرخ رشد ویژه ریزجلبک در محیط والن (۰/۳ در روز) و در محیط گیلارد (۰/۲۵ در روز) بود. بیشترین میزان نرخ رشد ویژه (۰/۶ در روز) و کوتاه‌ترین زمان دو برابر شدن (۱/۱۵ روز) جمعیت ریزجلبک در محیط والن در ۳ روز ابتدایی دوره پرورش مشاهده شد. نرخ رشد در هر دو دوره پرورشی در ۳ روز پایانی منفی شد و زمان دو برابر شدن جمعیت در ۳ روز پایانی به بیشترین حد رسید. با توجه به نتایج بدست آمده، برتری محیط کشت والن مشاهده گردید.

واژه‌های کلیدی: *Nannochlorpsis oculata*، فتوبیوراکتور، کلروفیل a، گیلارد، والن

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۳۹۹۸۰۸۲۷۹، پست الکترونیکی:sohrabesmaeili70@gmail.com

مقدمه

در میان ارگانیسم های آبزی، ریزجلبک ها اهمیت بسیار زیادی دارند. ریزجلبک ها اساس زنجیره غذایی را در اکوسیستم های آبی تشکیل می دهند و در آبزی پروری نیز به عنوان غذای زنده برای رشد نرم تنان، میگو، ماهیان و زئوپلانکتون ها مورد استفاده قرار می گیرند (۹). این موجودات، میکروارگانیسم های فتوسنتزی پروکاریوت یا یوکاریوت می باشند که می توانند سریعا رشد و در شرایط سخت به علت ساختار تک سلولی یا چند سلولی ساده آنها براحتی زندگی کنند. امروزه استفاده از میکروجلبک ها به عنوان منبع غذایی، دارویی، استفاده در مواد آرایشی و بهداشتی، تولید سوخت دیزل و سوخت جت نیز روز به روز در حال گسترش است (۷).

نانوکلروپسیس (*Nannochloropsis*)، یک جنس از ریزجلبک های موجود در محیط زیست دریا می باشد که تقریبا ۶ گونه در آن شناسایی شده است (۱۴). گونه های موجود در این جنس بدلیل یوری هالین و یوری ترمیک بودن، قابلیت پرورش در آبهای لب شور و شیرین را نیز دارند (۱۲). از ویژگی های دیگر این ریزجلبک ها می توان

به کمبود کلروفیل c و b (عامل تفکیک این ریزجلبک با ریزجلبک های دیگر)، قابلیت ساخت انواع رنگدانه ها مثل آستاگزانتین ، زیزانتین و کانتاگزانتین، وجود اسیدهای چرب غیراشباع (HUFA) مثل EPA و آراشیدونیک اسید (AA) اشاره کرد (۵). از ریزجلبک های موجود در این جنس برای غنی سازی غذای زنده لارو ماهیان دریایی استفاده می شود (۱۹). اخیرا مطالعاتی در مورد تولید سوخت از این ریزجلبک ها نیز انجام شده است (۱۱).

یکی از چالش های اصلی پیش روی تولید محصول از ریزجلبک ها در مقیاس صنعتی، مشکلات مربوط به کشت آنها می باشد. به همین دلیل داشتن دانش فنی کشت پربازده ریزجلبک در مقیاس صنعتی می تواند هزینه های نهایی محصولات تولید شده از جلبک ها را تا حد زیادی کاهش دهد. امروزه از سیستم های مختلفی برای کشت ریزجلبک ها در حجم های متفاوت استفاده می شوند. یکی از این سیستم ها فتوبیوراکتور می باشد که در انواع مختلفی برای کشت متراکم ریزجلبک ها مورد استفاده قرار می گیرند (شکل ۱).

شکل ۱- روش‌های پرورش ریزجلبک

بعد از شناسایی گونه های مستعد ریزجلبک برای پرورش متراکم و همچنین بررسی تولید از لحاظ اقتصادی، نیاز به طراحی و بهینه سازی فتوبیوراکتور، یک ضرورت می باشد (۷). عوامل مختلفی در بهینه سازی عملکرد فتوبیوراکتور دخیل هستند که رعایت کردن آنها می تواند بر روی تولید، تأثیر زیادی داشته باشد. این عوامل عبارتند از: نور، درجه حرارت، کمیت و کیفیت محیط کشت، میزان دی اکسیدکربن، میزان اکسیژن محلول، میزان pH و گردش آب (۴).

تراکم سلول های ریزجلبک در محیط پرورش نسبت به محیط طبیعی بسیار بالا می باشد. بنابراین در محیط پرورش جلبک، کمیت و کیفیت مواد مغذی و شناخت محیط کشت مناسب برای پرورش هر گونه مورد نظر بسیار مهم می‌باشد (۲۶). دو نوع محیط کشت که به طور گسترده برای پرورش اغلب جلبک ها مورد استفاده قرار می گیرند عبارتند از: محیط کشت والن و محیط کشت گیلارد (f/2) (۱۷). به دلیل وجود مواد شیمیایی مختلف از لحاظ کیفی و کمی در این دو محیط کشت، در این پژوهش این دو محیط کشت برای پرورش جلبک نانوکلروپسیس (*Nannochloropsis oculata*) در فتوبیوراکتور ساخته شده مورد بررسی و مقایسه قرار گرفته اند.

مواد و روشها

کشت اولیه ریزجلبک: ابتدا ریزجلبک *N. aculata* در اتاق فایکولب گروه شیلات دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری در بطری‌های ۱/۵ لیتری که محتوای آب دریای خزر استریل شده و مقداری محیط کشت گیلارد (f/2) بود، کشت داده شد. ریز جلبک در دمای آب بین ۲۴ تا ۲۶ درجه سانتیگراد، در ظروف ۱/۵ لیتری هوادهی و در برابر تابش لامپ‌های فلورسنت (متوسط ۹۸۵ میکرومول

فوتون بر متر مربع در ثانیه) قرار گرفت (۲۷). هنگامی که پرورش ریزجلبک به مرحله رشد لگاریتمی رسید، حجم مشخصی از آن (۱ لیتر) از اتاق فایکولب به فتوبیوراکتور منتقل شد (۲۷). حجم آب برای کشت ریزجلبک ۱۰۰ لیتر و تراکم اولیه ریزجلبک در فایکولب ۳×۱۰^{۶} سلول در میلی لیتر بود و برای هر دو دوره آزمایش از ریزجلبک کشت شده در فایکولب به فتوبیوراکتور اضافه شد.

شرایط محیطی: این آزمایش در اواخر تابستان و اوایل پائیز با کمترین و بیشترین دمای محیط بین ۲۹ تا ۳۷ درجه سانتیگراد انجام شد. ریزجلبک نانوکلروپسیس می تواند این دامنه دمایی را تحمل کند (۸). در هر دوره دوهفته ای در فاصله زمانی ۵ روز محیط کشت به فتوبیوراکتور اضافه شد. منبع نور در فتوبیوراکتور بوسیله لامپ های فلورسنت تأمین شد که شدت آن به طور متوسط ۹۸۵ میکرومول فوتون بر متر مربع در ثانیه بود. بخشی از CO_2 مورد نیاز از طریق هوادهی و بخشی دیگر بصورت خالص بوسیله یک کپسول حاوی دی اکسید کربن که توسط یک شلنگ هوا به تانک فتوبیوراکتور متصل است، برای کاهش نوسانات pH محیط پرورش تزریق شد (۲۷). محیط های کشت گیلارد و والن براساس Lavens و Sorgeloos (۱۹۹۶) ساخته شدند.

نمونه‌برداری و بررسی نحوه رشد: بعد از معرفی ریزجلبک به فتوبیوراکتور، نمونه برداری به طور روزانه انجام، و وزن خشک (میلی گرم) و میزان کلروفیل a (میکروگرم/گرم وزن تر) به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر در سه تکرار اندازه گیری شد (۲۷).

شمارش سلولی: شمارش سلولی با استفاده از لام هماسیتومتر و با روش پیشنهاد شده توسط Lavens و Sorgeloos (۱۹۹۶) سه بار در روز انجام گردید.

اندازه‌گیری کلروفیل: نمونه های ۱۴ میلی لیتری با دور ۳۰۰۰ در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. بعد از سانتریفیوژ، بخش بالایی آب لوله آزمایش خالی شد. لوله های آزمایش حاوی ریزجلبک با فویل آلومینیم پوشانده شدند تا شرایط تاریکی ایجاد و کلروفیل حفظ شود. ۲ میلی لیتر متانول ۹۵ درصد به داخل لوله آزمایش ریخته و به مدت ۱ دقیقه تکان داده شد. بعد از استخراج کلروفیل، لوله های آزمایش دوباره با دور ۴۰۰۰ در دقیقه به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. سپس میزان کلروفیل a بوسیله دستگاه اسپکتروفتومتر UNICO مدل UV- 2150 در طول موج های ۶۳۰^{nm} تا ۷۵۰^{nm} اندازه گیری شد (۲۰).

داده های بدست آمده در فرمول زیر قرار گرفتند (۲۵):

$$\text{Chl a}\{\mu g/10\ ml\} = (11.6\ o.d._{664} - 1.31\ o.d._{645} - 0.14\ o.d._{630})\{\text{extract vol.(ml)/cuvette width(cm)}\}$$

وزن خشک: ۳ نمونه ۱۴ میلی لیتری از محیط پرورش به طور روزانه برداشت و سانتریفیوژ شدند. سپس با آب مقطر شسته گردیدند و به مدت ۱۶ ساعت در دمای ۱۰۵ درجه سانتیگراد قرار گرفتند (۱۰).

ضریب رشد ویژه (SGR): ضریب رشد ویژه با استفاده از رابطه زیر بدست آمد: (۱۶)

$$\mu = ln(C_1/C_0)/t_1\text{-}t_0$$

μ= ضریب رشد ویژه، C_1= تراکم ریزجلبک در انتهای دوره، C_0= تراکم ریزجلبک در ابتدای دوره، t_1= زمان انتهای دوره ، t_0= زمان ابتدای دوره

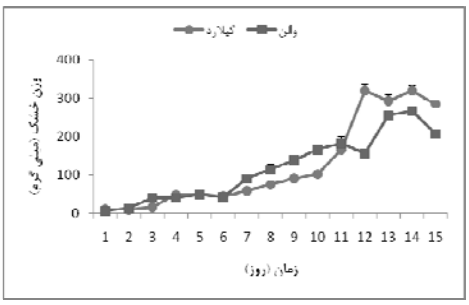
تعیین زمان دو برابر شدن: زمان دو برابر شدن جمعیت ریزجلبک *N. oculata* در طول دوره آزمایش بر طبق فرمول زیر محاسبه گردید (۱): $DT= \log_e 2/ SGR$

آنالیز آماری: در این پژوهش، داده های بدست آمده از شاخص های تراکم سلولی، میزان کلروفیل a و وزن خشک به صورت مقادیر میانگین همراه با خطای استاندارد بیان شدند. مقایسه میانگین ها با آزمون t-test در سطح معناداری ۰/۰۵ بوسیله نرم افزار SPSS انجام شد.

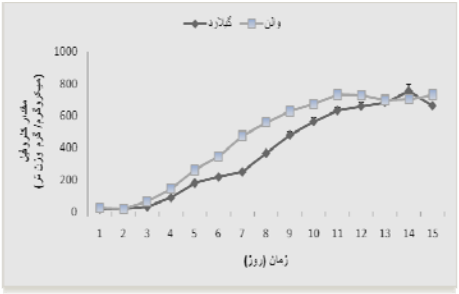
نتایج

همانطور که در شکل ۲ دیده می شود، میزان وزن خشک ریزجلبک *N.oculata* در روزهای اولیه آزمایش (۱ تا ۲) در هر دو محیط کشت گیلارد و والن رشد چندانی نداشت. پس از روز سوم روند صعودی میزان وزن خشک در محیط کشت والن دیده شد و با یک روز تأخیر در روز سوم روند صعودی رشد جلبک در محیط کشت گیلارد نیز مشاهده گردید. البته در هر دو محیط این روند صعودی تا حدود معینی (تقریبا معادل ۴۵ میلی گرم وزن خشک) رسیده و بعد در این نقطه ثابت شده و این روند رشد ثابت تا اواسط روز ششم آزمایش ادامه داشت. از روز ششم به بعد مجددا سیر صعودی رشد جلبک در هر دو محیط کشت ثبت گردید، با این تفاوت که از روز ۶ تا ۱۱، محیط والن وزن خشک ریزجلبک را به طور معنی داری ($P<0.05$) بیشتر از محیط گیلارد افزایش داد اما در نهایت در روز یازدهم روند رشد جلبک در هر دو محیط کشت با همدیگر تلاقی داشته و میزان زیست توده در هر دو محیط کشت به مقدار تقریبی ۹/۱±۱۸۰ میلی گرم بر مبنای وزن خشک رسید. از روز ۱۱ تا ۱۵ این روند کاملا بعکس شد، به عبارتی محیط کشت گیلارد وزن خشک ریزجلبک را به طور معنی داری ($P<0.05$) بیش از محیط والن بالا برد. براساس داده های موجود، حداکثر میزان رشد ریزجلبک در هر دو محیط کشت در روز چهاردهم آزمایش مشاهده گردید و از آن به بعد رشد روند کاهشی را نشان داد. نکته اینکه ریزجلبک در روز چهاردهم در محیط کشت گیلارد دارای رشد حداکثری (۱۳/۲۲±۳۳۰ میلی گرم) بیشتری نسبت به محیط کشت والن (۸/۵۸±۲۸۰ میلی گرم) برخوردار بود.

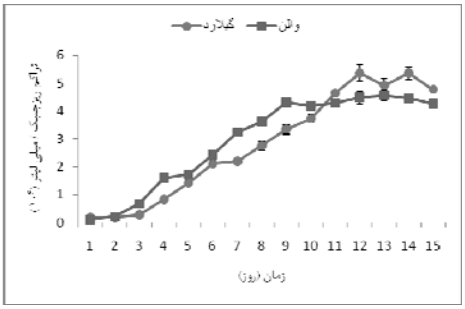
شکل ۳ مقدار کلروفیل a را در ریزجلبک *N.oculata* تغذیه شده با دو محیط کشت گیلارد و والن را نشان می‌دهد. از روز یک تا سوم آزمایش کلروفیل a در هر دو محیط روند ساکنی داشت. از روز سوم روند صعودی موجودی کلروفیل a ریزجلبک در هر دو محیط کشت گیلارد و والن آغاز شد و این روند به طور ثابت تا روز یازدهم ادامه داشت، با این تفاوت که از روز سوم تا یازدهم میزان کلروفیل a در ریزجلبک تغذیه شده با محیط کشت والن به طور معنی داری ($P<0.05$) بیشتر از ریزجلبک تغذیه شده با محیط کشت گیلارد مشاهده گردید که مقدار آن به‌ترتیب ۱۱/۶۶±۷۳۲ میکروگرم و ۱۷/۶۹±۶۳۴ میکروگرم بود.



شکل ۲- میانگین وزن خشک ۳ تکرار± SE (میلی گرم) در *N. oculata* کشت شده با دو محیط گیلارد و والن به مدت ۱۵ روز



شکل ۳- میانگین کلروفیل a ۳ تکرار ± SE (میکروگرم/گرم وزن تر) در *N. oculata* تغذیه شده با دو محیط کشت گیلارد و والن به مدت ۱۵ روز



شکل ۴- میانگین تراکم سلولی ۳ تکرار ± SE (در هر میلی لیتر) در *N. oculata* تغذیه شده با دو محیط کشت گیلارد و والن به مدت ۱۵ روز

روند صعودی موجودی کلروفیل a از روز دوازدهم برای ریزجلبک تغذیه شده با محیط کشت والن متوقف و وارد

مرحله کاهشی شد، درحالیکه ریزجلبک های تغذیه شده با محیط کشت گیلارد تا یک روز دیرتر وارد این مرحله شدند. موجودی کلروفیل a در محیط کشت والن در روز دوازدهم ۱۶/۸±۷۲۶ و در محیط کشت گیلارد در روز سیزدهم ۲۱/۷۹±۶۸۵ میکروگرم ثبت گردید. این در حالی بود که در روز سیزدهم نیز روند رشد ریزجلبک در هر دو محیط کشت با همدیگر تلاقی داشته و میزان کلروفیل a به میزان تقریبی ۱۳/۱۲±۶۹۲ میکروگرم در هر گرم وزن خشک رسید. در روز چهاردهم برای نخستین بار کلروفیل a در ریزجلبک تغذیه شده با محیط کشت گیلارد به طور معنی داری بیشتر (۴۰/۶۷±۷۵۴ میکروگرم) از ریزجلبک های تغذیه شده با محیط کشت والن (۱۴/۱±۷۰۱ میکروگرم) مشاهده گردید. از روز چهاردهم به بعد روند رشد ریزجلبک در مرحله ایستایی قرار گرفت. براساس داده‌های بدست آمده بیشترین موجودی کلروفیل a در ریزجلبک تغذیه شده با محیط کشت گیلارد مشاهده گردید که مقدار آن ۴۰/۶۷±۷۵۴ میکروگرم بود.

شکل ۴ چگونگی روند تراکم سلولی ریزجلبک *N.oculata* تغذیه شده با دو محیط کشت گیلارد و والن را نشان می دهد. از روز ۱ تا ۲ آزمایش، تعداد سلول ریزجلبک در محیط کشت والن افزایش چندانی نداشت و این روند در محیط کشت گیلارد تا روز سوم مشاهده گردید. به عبارتی تراکم سلولی در روز دوم در محیط کشت والن $۰/۲۲ \pm ۰/۰۱ \times ۱۰^{۶}$ و در روز سوم در محیط کشت گیلارد $۰/۲۸ \pm ۰/۰۱ \times ۱۰^{۶}$ سلول در میلی لیتر بود. سپس تراکم سلولی در هر دو محیط کشت یک سیر صعودی را نشان داد. این روند برای ریزجلبک تغذیه شده با محیط کشت والن تا روز نهم که مقدار آن به $۴/۳ \pm ۰/۱۱ \times ۱۰^{۶}$ در میلی لیتر رسید، ادامه داشت و پس از آن روند کاهشی رشد مشاهده گردید. از طرفی دیگر روند صعودی ریزجلبک های تغذیه شده با محیط کشت گیلارد که از روز سوم شروع شده بود تا روز دوازدهم که مقدار آن $۵/۳۶ \pm ۰/۳ \times ۱۰^{۶}$ در میلی لیتر ثبت گردید، ادامه داشت و پس از آن روند کاهشی رشد آغاز شد. این در حالی بود که تراکم سلولی *N.oculata* از روز دوم تا دهم آزمایش در محیط والن به طور معنی‌داری ($P < 0.05$) بالاتر از محیط گیلارد بود که مقادیر آن به ترتیب $۴/۱۸ \pm ۰/۰۲ \times ۱۰^{۶}$ در محیط کشت والن و $۳/۷۳ \pm ۰/۱۳ \times ۱۰^{۶}$ در میلی لیتر بود. در روز دهم نیز روند رشد در ریزجلبک های تغذیه شده در هر دو محیط کشت با همدیگر تلاقی داشت که تراکم سلولی در این روز به مقدار تقریبی $۳/۹۶ \pm ۰/۰۷ \times ۱۰^{۶}$ در میلی لیتر مشاهده گردید. داده های موجود تراکم سلولی را از روز دهم تا پانزدهم در ریزجلبک تغذیه شده با محیط کشت گیلارد به طور معنی داری ($P < 0.05$) بیشتر از محیط کشت والن نشان داد، در حالیکه روند رشد در هر دو محیط کشت وارد مرحله ایستایی شده بود. براساس داده های موجود، بیشترین تراکم سلولی در ریزجلبک تغذیه شده با محیط کشت گیلارد به مقدار $۵/۳۶ \pm ۰/۰۳ \times ۱۰^{۶}$ در میلی لیتر مشاهده گردید.

جدول ۱ نشان دهنده میانگین تراکم سلولی، نرخ رشد ویژه (SGR) و زمان دو برابر شدن جمعیت ریزجلبک *N.oculata* با گذشت هر سه روز از دوره پرورش می باشد. بر اساس آن، با گذشت زمان پس از روز دوم در ریزجلبک تغذیه شده با محیط والن و پس از روز سوم در ریزجلبک تغذیه شده با محیط کشت گیلارد (شکل ۴)، نرخ رشد ویژه در هر دو دوره پرورشی کاهش یافت، بطوریکه در ۳ روز پایانی، منفی شد و زمان دو برابر شدن جمعیت نیز با گذشت زمان افزایش یافت به گونه ای که در ۳ روز پایانی به بیشترین حد خود رسید. میانگین کل نرخ رشد ویژه در *N. oculata* تغذیه شده با محیط کشت والن (۰/۳ در روز) و در محیط کشت گیلارد (۰/۲۵ در روز) بود. بیشترین میزان نرخ رشد ویژه (۰/۶ در روز) در ریزجلبک های تغذیه شده با محیط کشت والن در ۳ روز ابتدایی دوره پرورش و کوتاهترین زمان دو برابر شدن جمعیت ریزجلبک *N. oculata* (۲/۲۴ روز) در ریزجلبک های تغذیه شده با محیط کشت گیلارد بود.

جدول ۱- میانگین تراکم سلولی ۳ تکرار ± SE، نرخ رشد ویژه و زمان دوبرابر شدن جمعیت ریزجلبک *N. oculata* پرورش داده شده در محیط کشت گیلارد و والن

محیط کشت	تراکم سلولی (10^6)	نرخ رشد ویژه (در فواصل ۳ روزه)	زمان دوبرابر شدن (در طول ۳ روز)
گیلارد	۰/۲۲±۰/۰۰۱	۰/۱۵ b	۴/۶۲ b
	۱/۴۵±۰/۰۲	۰/۳۱a	۲/۲۴ a
	۲/۷۷±۰/۲	۰/۱۴ c	۴/۹۵ b
	۴/۵۸±۰/۲۵	۰/۱۲ d	۵/۷۷ c
	۵/۰۲±۰/۱۲	-۰/۰۱	-
والن	۰/۳۴±۰/۰۲	۰/۶ a	۱/۱۵ a
	۱/۹۲±۰/۱۲	۰/۱۵ b	۴/۶۲ b
	۳/۷۲±۰/۰۷	۰/۱ c	۶/۹۳ c
	۴/۳۲±۰/۱۱	۰/۰۲ d	۳۴/۶۵d
	۴/۴۲±=۰/۱۴	-۰/۰۲	-

*اعداد منفی در محاسبه زمان دو برابر شدن استفاده نمی شوند

بحث

وزن خشک، موجودی کلروفیل a و تراکم سلولی ریزجلبک *N. oculata* در هر دو محیط کشت والن و گیلارد پس از روز سوم روند صعودی داشتند (شکل های ۲،۳،۴). صرف‌نظر از تأثیر جداگانه هر محیط کشت، وزن خشک و موجودی کلروفیل a ریزجلبک از روز ۲ تا ۱۵ بین ۲ تا ۳ برابر، و تراکم سلولی آن بین ۴ تا ۵ برابر در هر دو محیط افزایش یافتند. در مطالعه ای که توسط Banerjee و همکاران (۲۰۱۱) بر روی رشد و ترکیب بیوشیمیایی ریزجلبک‌های *Cheatoceros calcitrans* و *N. oculata* پرورش یافته در دو محیط باز و آزمایشگاهی انجام شد، در پارامترهای زیست توده، تراکم سلولی، میزان کلروفیل و نرخ رشد ویژه در هر دو گونه پرورش یافته نتایج مشابهی دیده شد. همانطور که شکل های ۲، ۳، و۴ نشان می دهند در روزهای اول و دوم پرورش، رشد قابل توجهی در ریزجلبک دیده نشد. اما نتیجه مشابهی در ریزجلبک *Isochrysis galbana* مشاهده گردید (۱۳). همچنین در مطالعات دیگری که توسط Sen و همکاران (۲۰۰۵) بر روی ریزجلبک *N. oculata* و شریعتی و یحیی آبادی (۱۳۸۰) بر روی ریزجلبک *Dunaliella salina* انجام دادند، این نتایج مشاهده شد. ظاهرا سلول ها در چند روز اول، به علت قرار داشتن در مرحله تأخیری یا آداپتاسیون خود را با شرایط جدید تطبیق می دهند و به عبارتی تنها رشد متابولیسمی آنها افزایش می یابد تا شرایط لازم را برای تکثیر در طی روزهای آینده کسب نمایند و تکثیر و ازدیاد سلولی مشاهده نمی شود (۱۷). از روز سوم تا روز دهم الگوی رشد وارد مرحله دوم یا رشد لگاریتمی شد و تعداد سلول ها به سرعت و با تصاعد هندسی افزایش یافت که نشان دهنده رشد و تکثیر مداوم سلول ها می باشد. شکل های ۳ و ۴ نشان می دهند که *N .oculata* از روز ۹ تا روزهای ۱۱و ۱۲ وارد مرحله کاهش رشد گردید و از روز ۱۲ تا روز ۱۵ وارد مرحله سکون شد. در این مرحله میزان جمعیت ثابت می ماند که به معنی توازن بین مرگ و میر ریزجلبک ها و تکثیر سلولی می باشد.

دو محیط کشت مورد استفاده در این پژوهش نتایج کم و بیش متفاوتی بروز دادند. در دو روز ابتدای آزمایش، بین دو محیط کشت از لحاظ وزن خشک، موجودی کلروفیل a و تراکم سلولی اختلافی مشاهده نشد. اما پس از آن، دو محیط از نظر وزن خشک ریزجلبک تا روز ششم (به استثنای روز سوم) تقریبا مشابه بودند، درحالیکه از روز ۶ تا ۱۱ آزمایش، محیط والن وزن خشک ریزجلبک را به طور معنی داری بیشتر از محیط گیلارد افزایش داد. از روز

۱۱ تا ۱۵ محیط کشت گیلارد وزن خشک ریزجلبک را به طور معنی داری بیش از محیط والن بالا برد (شکل۲). روند مشابهی نیز برای تراکم ریزجلبک از روز ۱۰ تا ۱۵ وجود داشت که برتری محیط گیلارد مشاهده گردید. نتایج مشابهی در مطالعه Gopinathan (۱۹۸۶) که اثر محیط کشت های مختلف را بر روی چند ریزجلبک بررسی کرده بود، دیده شد. همچنین در پژوهش Srinivasakumar و Rajashekhar (۲۰۰۹) پس از مقایسه دومحیط کشت گیلارد و والن بر روی رشد چندین گونه ریزجلبک، برتری محیط کشت والن مشاهده شد. اما در پژوهش Shah و همکاران (۲۰۰۳) با مقایسه سه محیط کشت گیلارد، ریکس میکس و محیط کشت ساخته شده توسط مؤسسه تحقیقات شیلاتی بنگلادش (BFRI) بر روی رشد *N. oculata*، محیط کشت گیلارد بهترین عملکرد را داشت. از آنجا که مقدار و اجزای تشکیل دهنده دو محیط کشت متفاوت است، بنابراین می تواند دلیلی برای مشاهده این تفاوت ها در وزن خشک، موجودی کلروفیل a و تراکم سلولی باشد. Shah و همکاران (۲۰۰۳) به بیشترین بیومس ریزجلبک *N. oculata* (۲۲×۱۰^{۵} سلول در میلی لیتر) در محیط کشت گیلارد در مقایسه با دو محیط کشت دیگر رسیدند، در حالیکه Lim (۱۹۹۱) به تراکمی بیشتر ($۲۰-۲۵\times۱۰^{۶}$ سلول در میلی لیتر) رسید، وقتی که از محیط کشت والن برای تغذیه ریزجلبک *N. oculata* استفاده گردید. علت اختلاف در این دو پژوهش همانطور که اشاره شد می تواند به دلیل وجود ترکیبات شیمیایی متفاوت در انواع محیط کشت باشد (۲۲). در آزمایشی که Converti و همکاران (۲۰۰۹) بر روی تأثیر درجه حرارت و نیتروژن بر روی رشد و میزان اسید چرب انجام دادند، کاهش میزان نیتروژن باعث کاهش رشد و افزایش اسید چرب در ریزجلبک *N. oculata* شد.

تأثیر معنی دار ($P < 0.05$) محیط کشت والن در افزایش بیشتر موجودی کلروفیل a سلولی از روز ۲ تا ۱۲ در مقایسه با محیط کشت گیلارد مشهود بود. برتری معنی دار محیط گیلارد در روز ۱۴ مشاهده شد ولی در روز ۱۵ دوباره محیط والن تأثیر بیشتری داشت (شکل ۳). به طور کلی، به استثنای روز ۱۴، محیط کشت والن موجودی کلروفیل a را در *N. oculata* به طور چشمگیری بالا برد. ثابت شده است که کمبود نیتروژن در محیط کشت ریزجلبک ها بر روی ترکیب رنگدانه ها مؤثر است. برای مثال در ریزجلبک *Parietochloris incise*، کمبود نیتروژن در محیط کشت به طور قابل توجهی باعث افزایش میزان کاروتنوئید و کلروفیل شد (۲۳). نتایج این مطالعه به دلیل وجود موجودی کلروفیل بیشتر در ریزجلبک های تغذیه شده با محیط کشت والن در اکثر روزهای پرورش نسبت به محیط کشت گیلارد و بیشتر بودن میزان ازت در محیط کشت والن (۱۰۰ به ۷۵ گرم)، با پژوهش Solovchenko و همکاران (۲۰۰۸) تطابق ندارد. محدودیت در مقدار سولفات می تواند باعث کاهش رشد و میزان کلرفیل در ریزجلبک *Dunaliella salina* شود (آقایی و شریعتی، ۱۳۸۵). در این مطالعه، با وجود مقدار متفاوت سولفات مس در هر دو محیط کشت بر روی میزان کلرفیل، چنین نتیجه ای مشاهده نشد.

تراکم سلولی *N. oculata* از روز ۲ تا ۱۰ در محیط والن به طور معنی داری بالاتر از محیط گیلارد بود و از روز ۱۰ تا ۱۵ محیط گیلارد تراکم ریزجلبک را به طور معنی داری نسبت به محیط والن افزایش داد. همچنین در ریزجلبک *I. galbana* بیشترین رشد (تراکم سلولی) به مدت ۹ روز در محیط کشت والن در مقایسه با سایر محیطها از جمله گیلارد گزارش گردید (۱۳) که با نتایج این تحقیق همخوانی دارد. به علاوه، تراکم سلولی در ریزجلبک *I. galbana* ($۳/۵\times۱۰^{۶}$) در روز ۸ کمتر از تراکم سلولی ریزجلبک *N. oculata* ($۴/۲\times۱۰^{۶}$) در این تحقیق بود.

رشد جلبک ها به طور کلی تابعی از میزان شدت نور، چگونگی تخلیه مواد مغذی، بالا رفتن pH با جذب کربن محیط و انباشتگی متابولیت های سلولی می باشد. به دنبال

افزایش تراکم سلولی، تخلیه محیط کشت به عنوان یکی از عوامل در مرحله سکون رشد منجر به کاهش میزان کلروفیل نیز می شود (۲). در این تحقیق نیز پس از روز دهم روند کم و بیش ثابتی در تراکم سلولی و موجودی کلروفیل برای هر دو محیط کشت مشاهده شد، هر چند که وزن خشک جلبک از روز ۱۰ تا ۱۴ روندی کم و بیش افزایشی داشت. میانگین نرخ رشد ویژه و زمان دو برابر شدن در کل دوره آزمایشی، در ریزجلبک تغذیه شده با محیط کشت گیلارد به ترتیب ۰/۲۵ در روز و ۲/۷۷ روز بود، در حالیکه این پارامترها در ریزجلبک تغذیه شده با محیط کشت والن به ترتیب ۰/۳ در روز و ۲/۳۱ روز بودند.

در این پژوهش ایجاد یک مانع در اواخر دوره رشد، سبب کاهش رسیدن نور به لوله های فتوبیوراکتور شد. بدین صورت که در زمان آزمایش بر روی دیواره داخلی لوله ها لایه نازکی که در دوره دوم (محیط کشت والن) بیشتر بود، پدیدار می شد و بین منبع نور و ریزجلبک قرار می گرفت که می توانست باعث کاهش شدت نور شود و در نهایت بر روی رشد تأثیرگذار باشد. برای مثال در ۵ روز پایانی آزمایش، پارامترهای رشد (شکل های ۲،۳،۴) ریزجلبک تغذیه شده با محیط کشت گیلارد به غیر از موجودی کلروفیل بیشتر از ریزجلبک تغذیه شده با محیط کشت والن بودند. این در حالیست که به دلیل وجود سدیم نیترات بیشتر در محیط کشت والن نسبت به محیط کشت گیلارد، طبیعتا باید پارامترهای تراکم سلولی، موجودی کلروفیل و وزن خشک در ریزجلبک های تغذیه شده با محیط کشت والن بیشتر از محیط کشت گیلارد باشد، زیرا افزایش نیترات تا حدی مشخص در محیط کشت باعث افزایش رشد در ریزجلبک *N. oculata* می شود (۱۱).

Abu-Rezq و همکاران (۱۹۹۹) گزارشی در مورد شرایط بهینه تولید برای ریزجلبک های *Nannochloropsis sp.*(Kuwaitian strain) ، *Tetraselmis suecica* و *Isochrysis sp.*(T-*iso*) ارائه دادند که بر طبق آن نرخ رشد ویژه برای این گونه ها به ترتیب ۰/۱۳– ۰/۱۱ ، ۰/۱۵– ۰/۱۴ و ۰/۱۴ در روز بودند که در این آزمایش میانگین نرخ رشد ریزجلبک *N. oculata* در کل دوره بیشتر بود. ولی بر طبق جدول (۱) نتایج اندازه گیری نرخ رشد در هر ۳ روز با گزارش Abu-Rezq و همکاران (۱۹۹۹) همخوانی دارد. علاوه براین، Sukenik و همکاران (۱۹۸۹) بیشترین نرخ رشد ویژه برای ریزجلبک *N. oculata* ، را ۰/۷ در روز گزارش کردند. نرخ رشد در ۳ روز اول این مطالعه در ریزجلبک های تغذیه شده با محیط کشت والن، ۰/۶ در روز و در محیط کشت گیلارد در ۳ روز دوم، ۰/۳۱ در روز بود که نزدیک به نرخ رشد ویژه در مطالعه Sukenik و همکاران (۱۹۸۹) می باشد.

مواد مغذی یکی از عوامل نرخ رشد متفاوت در گونه های مختلف ریزجلبک علاوه بر نور، CO_2، pH و یا دما می‌باشد (۱۶). به علاوه، نیاز به مواد مغذی خاص به مقادیر مناسب در رده های جلبکی مختلف ممکن است متفاوت باشد. این امکان وجود دارد که انواع ویتامین ها و عناصر کمیاب برای رشد سریع و تکثیر *N. oculata* در محیط والن بیشتر از گیلارد باشند. از طرف دیگر، احتمال دارد مقادیر بیشتری از مواد و عناصر حیاتی در محیط گیلارد موجود باشند، به طوری که مواد مغذی برای ریزجلبک در این محیط به مدت نسبتاً طولانی تری در دسترس بود تا پس از روزهای ۹ و ۱۰ (شکل های ۲ و ۴) تأثیر برتری را بروز دهد. به طور کلی، نیازهای جلبک ها به مواد مغذی می تواند مطلق، طبیعی، حداقل و یا بهینه باشد (۱۵). اگرچه بسیاری از محیط کشت ها برای پرورش انواع ریزجلبک درست شده اند ولی نمی توان ثابت کرد که یک محیط کشت خاص می تواند برای پرورش یک ریزجلبک بهترین باشد (۱۳).

براساس نتایج بدست آمده در این پژوهش می توان به این نتیجه رسید که در شرایط موجود این پژوهش، محیط

کشت والن برتر از محیط کشت گیلارد می باشد، در حالی که هر دو محیط کشت والن و گیلارد قابلیت استفاده برای کشت ریزجلبک *N. oculata* را دارند.

منابع

۱. آقایی، پ.، شریعتی، م. ۱۳۸۵. اثر کمبود سولفور بررشد سلولی، تولید بتاکاروتن، کلروفیل و فتوسنتز در جلبک *Dunaliella salina* جدا شده از مرداب شور گاوخونی اصفهان. مجله زیست شناسی ایران، جلد ۲۰، شماره ۲.

۲. حیدری، ص.، فرهادیان، ا.، محبوبی صوفیانی، ن. ۱۳۹۰. اثرات سطوح مختلف نیترات و آمونیوم در محیط کشت برای رشد جلبک سبز *Scenedesmus quadricauda* . نشریه ی شیلات، مجله ی منابع طبیعی ایران، ۱: ۴۰-۲۹.

۳. شریعتی، م. و یحیی آبادی، س. ۱۳۸۰. تأثیر غلظت های مختلف یون مس بر میزان رشد، رنگیزه های کلروفیل و بتاکاروتن، محتوای کلسیم و منیزیم درون سلولی در جلبک سبز تک سلولی *Dunaliella salina* ، مجله زیست شناسی ایران، ۱۱، ۴۶-۳۷.

۴. معصومی، س.ز.، یاوری، و.، کوچنین، پ. و سواری، ا. (۱۳۸۶) بررسی تأثیر رژیم نوری بررشد میکروجلبک *Tetraselmis suecica* در محیط کشت های ویتامینه و فاقد ویتامین، مجله پژوهش و سازندگی، ۷۴: ۱۳۹- ۱۳۰.

5. Abu-Rezq, T.S., Al-Musallam, L., Al-Shimmari, J., Dias, P., 1999. Optimum production conditions for different high-quality marine algae. Hydrobiologia 403:97–107.

6. Andersen, R.A., 2005. Algal culturing techniques. Academic Press, California.

7. Assaf Sukenik, Y. C. T. B., 1989. Regulation of fatty acid composition by irradiance level in the Eustigmatophyte *Nannochloropsis* sp. Journal of Phycology 25(4): 686-692.

8. Banerjee, S., Hew, W.E., Khatoon, H., Shariff, M., Yusoff, F.M., 2011. Growth and proximate composition of tropical marine *Chaetoceros calcitrans* and *Nannochloropsis oculata* cultured outdoors and under laboratory conditions. African Journal of Biotechnology 10(8): 1375-1383.

9. Barbosa, M.J.G.V., 2003. Microalgal photobioreactors: scale-up and optimisation. Ph.D. Thesis, Wageningen University, Wageningen, Netherlands.

10. Briassoulis, D., Panagakis, P., Chionidis, M., Tzenos, D., Lalos, A., Tsinos, C., Berberidis, K., Jacobsen, A., 2010. An experimental helical-tubular photobioreactor for continuous production of *Nannochloropsis* sp. Bioresource Technology 101:6768-6777.

11. Brown, M. R., 2002. Nutritional value of microalgae for aquculture. Quintana Roo, México.

12. Chiu, S.Y., Kao, C.Y., Tsai, M.T., Ong, S.C., Chen, C.H., Lin, C.S., 2009. Lipid accumulation and CO_2 utilization of *Nannochloropsis oculata* in response to CO_2 aeration. Bioresource Technology 100: 833- 838.

13. Converti, A., Casazza, A.A., Ortiz, E.Y., Perego, P., Borghi, D.M., 2009. Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production. Chemical Engineering and Processing: Process intensification 48: 1146-1151.

14. Fawley, K.P., Fawley, M.W., 2007. Observations on the Diversity and Ecology of Freshwater *Nannochloropsis* (Eustigmatophyceae) with Descriptions of New Taxa. Protist 158: 325-336.

15. Gopinathan C.P., 1986. Differential growth rates of micro-algae in various culture media. Indian Journal of Fisheries 33(4): 450-456.

16. Hibberd, D.J., 1981. Notes on the taxonomy and nomenclature of the algal classes Eustigmatophyceae and Tribophyceae (Synonym Xanthophyceae). Botanical Journal of the Linnean Society 82: 93-119.

17. Ketchum, B. H., 1939. The development and restoration of deficiencies the phosphorus and nitrogen composition of unicellular plants. 7. Cellular Compa p. Physiol 13: 362-373.

18. Kleivdal, H., Nordvik, S.M., Mork-Pedersen, T., Haugland, A., 2012. Microalgae as an omega- 3 rich feedstock – integrating CO_2 sequestration and aquafeed production, project final report, Uni Milijo, Nordhordl and Handverk –og Industrilag, Nofima, BTO. Wageningen.

19. Lavens, P., Sorgeloos, P., 1996. Manual on the production and use of live food for aquaculture. FAO Fisheries Technical paper. Gent.

20. Lim, L.C., Fulks, W., Main, K.L., 1991. An overview of live feeds production systems in Singapoor. The Oceanic Institute, Honolulu.

21. Lubzens, E., Gibson, O., Zmora, O., Sukenik, A., 1995. Potential advatages of frozen algae (*Nannochloropsis sp.*) for rotifer (*Brachionus plicatilis*) culture. Aquaculture 133:295-309.

22. Meeks, J.C., Castenholz, R.W., 1971. Growth and photosynthesis in an extreme thermophile, *Synechococcus lividus* (cyanophyta). Arch Mikrobiol 78:25–41.

23. Sen, B., Kocer, M.A.T., Alp, M.T., Erbas, H., 2005. Studies on growth of marine microalgae in bach culture: III.*Nannochloropsis oculata* (Eustigmatophyta), Asian Journal of Plant Sciences 4(6): 642- 644.

24. Shah, M.M.R., Alam, M.J., Islam, M.L., Khan, M.S.A., 2003. Growth performances of three microalgal species in filtered brackishwater with different inorganic media. Bangladesh J. Fish. Res 7(1): 69-76.

25. Solovchenko, A., Khozin-Goldberg, I., Didi-Cohen, S., Cohen, Z., Merzlyak, M., 2008. Effects of light and nitrogen starvation on the content and composition of carotenoids of the green microalga *Parietochloris incisa*. Russ. J. Plant Physiol 55: 455–462.

26. Srinivasakumar, K. P., Rajashekhar, M., 2009. The population abundance, distribution pattern and culture studies of isolated microalgal strains from selective sampling sites along the south east coast of India. African Journal of Biotechnology 8 (16): 3814-3826.

27. Strickland, J. D. H., Parsons, T. R., 1972. *A Practical Handbook of Seawater Analysis*. 2nd ed., Bull. Fish. Res. Bd. Can.

28. Tocquin, P., Fratamico, A., Franck, F., 2011. Screening for a low-cost *Haematococcus pluvialis* medium reveals an unexpected impact of a low N:P ratio on vegetative growth. Journal of Applied Phycology 1-10.

29. Wu, Z.C., Zmora, O., Kopel, R., Richmond, A., 2001. An industrial size flat plate glass reactor for mass production of *Nannochloropsis* sp. (Eustigmatophyceae). Aquaculture 195: 35-49.

The effect of culture media on growth and chlorophyll content of *Nannochloropsis oculata* in tubular photobioreactor

Naseri M.H.[1], Khalesi M.K.[1], Jafarpour S.A.[1], Esmaeili A.Gh.1[2], Nemat Zade Gh.A.[2]

[1] Fisheries Dept., Sari University of Agriculture Sciences and Natural Resources, Sari, I.R. of Iran

[2] Agronomy Dept., Sari University of Agriculture Sciences and Natural Resources, Sari, I.R. of Iran

Abstract

A major challenge for industrial microalgae production is cultivation problems. Photobioreactors with different volumes are one of the systems applied for microalgal mass cultivation. Following species identification, design and optimization of a photobioreactor are necessary. In the present study, growth (doubling time, cell density and dry weight) and chlorophyll *a* content of *Nannochloropsis oculata* were investigated using Guillard (f/2) and Walne media for two periods of 15 days. Cells density, chlorophyll *a* and dry weight of microalgae grown in both media were measured with three replications. The results showed significant influence ($P < 0.05$) of Walne than Guillard media from days 3 to 10, and from 2 to 15 (except day14), respectively. Cell density from days 10 to 15 showed significant influence ($P < 0.05$) of Guillard than Walne media. While dry weight (mg) increased in both media until day 6, Walne medium displayed higher weight increase than Guillard medium from days 6 to 11. Conversely, Guillard medium showed greater weight elevation than Walne medium from days 11 to 15. Specific growth rate (SGR) averaged 0.3 and 0.25 d^{-1} at Walne and Guillard media, respectively. *N. oculata* displayed a minimum doubling time of 1.5 day at Walne medium during the first 3 days of cultivation. Based on these results, excellence of Walne medium observed.

Key words: Guillard medium, *Nannochloropsis oculata*, Photobioreactor, Walne medium, Chlorophyll a