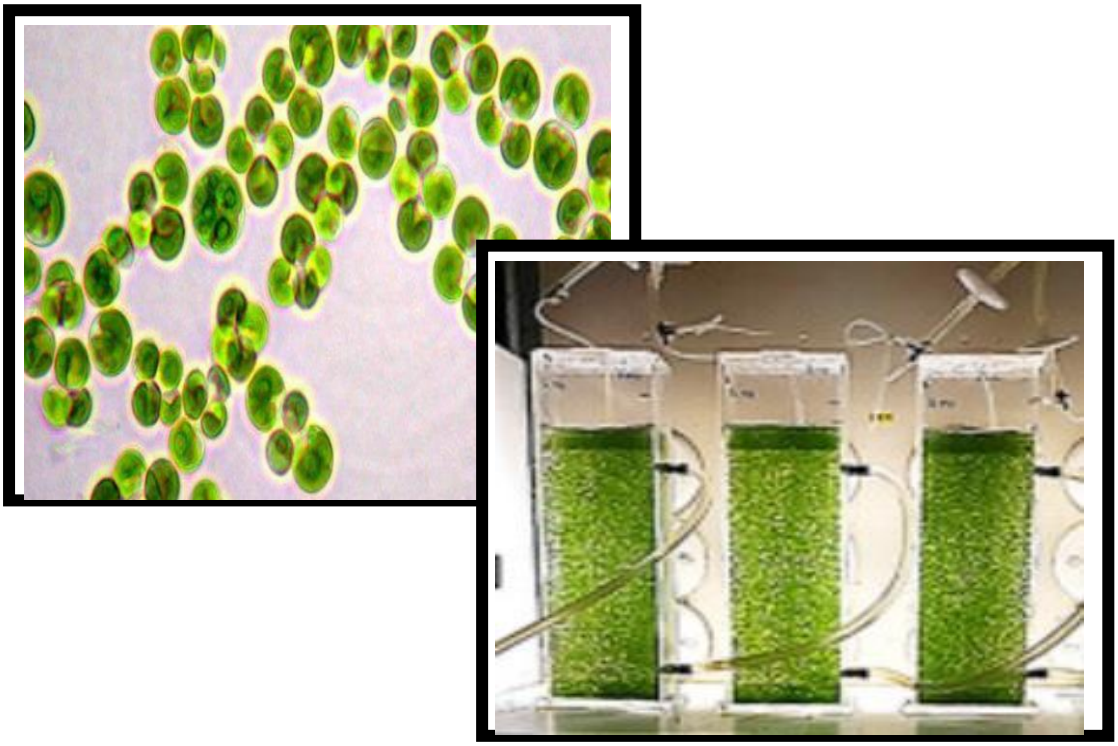
جمهوری اسلامی ایران

وزارت جهاد کشاورزی

سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی

موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور

پژوهشکده آبزی‌پروری آبهای داخلی



دستورالعمل کشت ریزجلبک

تهیه و تدوین:

رودابه روفچایی

امید ایمنی تملی

دستورالعمل فنی- ترویجی، سال ۱۴۰۰

ردیف		صفحه
۱	پیشگفتار	۳
۲	مقدمه	۳
۳	معرفی جلبک ها	۴
۴	سیستماتیک ریز جلبک ها	۵
۵	اهمیت جلبک ها	۶
۶	دامنه کاربرد و دلایل استفاده	۷
۷	عوامل موثر بر رشد ریز جلبک ها	۹
۸	شرایط و نحوه کشت ریز جلبک ها	۱۱
۹	معرفی انواع سیستم کشت ریز جلبک	۱۲
۱۰	کشت گلخانه ای	۱۷
۱۱	محیط کشت پرکاربرد و روش های خالص سازی	۲۱
۱۲	منابع	۲۶

۱ - پیشگفتار

کشت جلبک یک نوع کشت آبی است که شامل پرورش ذرات جلبک است. اکثر جلبک ها در محیط کشت های عمومی کشت داده می شوند. خانواده میکروجلبک ها (Micro algae) متعلق به فیتوپلانکتون ها، میکروفیت ها یا جلبک های پلانکتونی هستند. جلبک های ماکرو (Macro algae) درشت معمولا تحت عنوان جلبک دریایی یا خزه دریایی شناخته می‌شوند، همچنین دارای کاربردهای زیادی در مصارف صنعتی و تجاری هستند ولی باتوجه به اندازه و نیازهای خاص محیطی جهت رشد، نمی توانند به سرعت رشد کنند. کشت صنعتی و تجاری جلبک ها مصارف متعددی دارد، از قبیل تهیه غذا، اجزاء خوراکی، کود، بیوپلاستیک ها، رنگها، مواد خام شیمیایی، داروسازی و سوخت جلبکی و نیز می توانند بعنوان ابزاری در کنترل آلودگی استفاده شوند.

۲- مقدمه

ریزجلبک ها، نخستین گیاهان آلی تولید کننده اکسیژن فرآیندی که منجر به پیدایش اتمسفر میشود هستند .علاوه بر این جلبک ها مهمترین مصرف کنندگان دی اکسید کربن و نیز نخستین سطح از زنجیره غذایی اکوسیستم‌های آبی را تشکیل می‌دهند .از ریزجلبک ها میتوان برای تولید گسترده‌ای از متابولیتها مانند پروتئین، چربی، کربوهیدرات، کارتنوئیدها و یا ویتامینها برای سلامت، تغذیه و مواد افزودنی، مواد آرایشی و برای تولید انرژی استفاده کرد .از این نوع از جلبک ها همچنین

به‌منظور افزایش ارزش غذایی ،مواد غذایی و خوراک دام با توجه به ترکیب شیمیایی آنها می‌توان استفاده نمود همچنین آنها نقش بسیار مهمی در پرورش آبزیان دارند (Sahoo & Seckbach, ۲۰۱۵).

۳- معرفی جلبک ها :

جلبک ها را میتوان به هفت گروه اصلی تقسیم کرد که هر کدام اندازه، کارکرد و رنگ متمایز دارند .

انواع جلبک های مختلف عبارتند از (Sahoo : & Seckbach, ۲۰۱۵) :

- اوگلنوفیتا یا اوگلنوئیدها (Euglenophyta)
- کریسوفیتا یا جلبک طلایی قهوهای و دیاتومه‌ها (Chrysophyta)
- پروفیتا یا جلبک های قرمز (Pyrrophyta)

کلروفیتایا جلبک سبز (Chlorophyta) نظیر *Dunaliella* زیستگاه طبیعی این جلبک ها دریاچه ها و برکه های شور است .در ایران *Dunaliella* در دریاچه های ارومیه، مهارلو، گاوخونی و قم یافت می‌شود این جلبک می‌تواند شوری های تا حد اشباع را نیز تحمل نمایند . *Dunaliella* از نظر فیزیولوژیک بسیار منعطف بوده و به سرعت قابلیت انطباق با شرایط محیطی جدید

از جمله تغییرات غلظت شوری در محیط، تغییرات

شدت نور، دما و غلظت مواد معدنی محیط را بدست می آورد.

- رودوفیتا یا جلبک های قرمز(Rhodophyta)
- فائوفیتهاا یا جلبک های قهوه‌ای(Paeophyta)
- زانتوفیتا یا جلبک های زرد – سبز(Xanthophyta)

۴- سیستماتیک ریز جلبک های :

	فرمانرو	شاخه	رده	راسته	جنس و گونه
۱	**Plantae**	**Chlorophyta**	**Chlorophyceae**	**Chlamydomonadales**	*Heamatococcus Pluvialis , Dunaliella Tertiulecta, Dunaliella salina*
				Sphaeropleales	*Scenedesmus Obtusus, Scenedesmus sp. , Desmodesmus subspicarus*
			Chlorodendrophyceae	**Chlorodendrales**	*Tettraselmis Chuii, Tettraselmis Suecica*
			Trebouxiophycear	**Chlorellales**	*vulgaris ,Chlorella sp. Chlorella*
۲	**Chromista**	**Ocrophyta =Heterokonotophyta**	**Bacillariophyceae= Diatomeae**	**Thalassiosirales**	*Skeletonema costatum Chaetoceros Calcitrans*
			Eustigmatophyceae	**Eustigmatales**	*Nannochloropsis oculata*
		Haptophyta	**Coccolithophyceae= Prymnesiophycea**	**Isochrysidales**	*Isochrysis galbana*
۳	**Bacteria**	**Cyanobacteria= Cyanophyta**	**Cyanophiceae= phycobacteria**	**Oscillatoriales**	*Cyanothec sp. Oscillatoria sp., Spirulina platensis, Spirulina sp.*
				Nostocales	*Nostoc sp. Anabaena flos, Anabaena sp.*

Ruggiero et al., 2015

۵- اهمیت جلبک ها:

احتمالاً مهمترین کمک جلبک ها به محیط زیست ما، تولید اکسیژن از طریق فتوسنتز بوده و تقریبا نیمی از اکسیژن موجود در جو را تولید می کنند .طبق مقاله‌ای که در سال ۲۰۱۰ در مجله سوخت زیستی (Biofuels) منتشر شد، مشخص گردید که ذخایر نفتی کنونی تا حدی از ذخایر جلبک های باستانی مشتق شده‌اند، به طوری که تولید برخی از ذخایر نفتی بسیار قدیمی به سیانوباکترها نسبت داده میشود،اگرچه هنوز هویت تولیدکنندگان کاملا مشخص نیست .ذخایر نفتی جدیدتر احتمالاً از جلبک های کوکولیتوفوریدها ، یوکاریوتی سبز دریایی (Coccolithophorids) و سایر فیتوپلانکتونهای دریایی میکروسکوپی ناشی می‌شوند .تمام ذخایر نفتی جهان یک منبع محدودبه شمار می‌آیند و به آرامی با مصرف انسان تمام می‌شوند .در نتیجه، محققان به دنبال گزینه-های تجدیدپذیر به جای استفاده از نفت هستند . از دیگر مزایای مهم تولید ریز جلبک ها عبارتند از: عدم نیاز به منابع آب شیرین، -عدم نیاز به خاک حاصل خیز جهت کشت . قابلیت کشت در اشکال و سطوح مختلف افقی و عمودی و عدم نیاز به سطوح مسطح وسیع -عدم نیاز به انتظار طولانی و حداکثر دوره کشت ۱۴ روزه -عدم نیاز به میوه دهی جهت تولید محصول و قابلیت سریع عرضه محصول تولید شده به بازار -باتوجه به ذخیره سازی مقادیر بالای روغن(بعنوان منبع انرژی) در جرم خشک جلبک ها و حفظ دی اکسید کربن به عنوان ماده اصلی ذخیره شده در روغنها و سنگهای کربناته این گیاهان به ثبات سطح CO_2 جوی کمک می کنند که جلبک های سبز،

دیاتومه‌ها و سیانوباکتریها فقط برخی از گونه‌های جلبک های میکروسکوپی هستند که کاندیدهای خوبی برای تولید سوختهای زیستی محسوب میشوند (Sahoo & Seckbach, ۲۰۱۵).

۶- دامنه کاربرد و دلایل استفاده از ریز جلبک ها:

-غذای انسان انواع کلپ ها، کاهوی دریایی

-غذای آبزیان ریزجلبک هایی که امروزه بیشترین کاربرد را در صنایع آبزی پروری داردد عبارتند از گونه‌های

- *Chlorella*، *Tetraselmis*، *Isochrysis*، *Pavlova*، *Phaeodactylum*، *Chaetoceros*، *Nannochloropsis*، *Skeletonema* و *Thalassiosira*

- ریزجلبک هایی مانند *Dunaliella salina*، *Haematococcus pluvialis* و *Spirulina* sp.

نیز به عنوان منابع طبیعی رنگدانه ها، در مراکز پرورش میگو، ماهی آزاد و ماهیان زینتی مورد استفاده قرار می گیرد

-کاهش آلودگی و تصفیه پساب مزارع ماهی و میگو

-حفاظت از محیط زیست باهدف تثبیت ریز گردها ، تصفیه فاضلاب شهری(Lababpour,۲۰۱۶).

تولید دارو برخی از جلبک ها نظیر هماتوکوکوس که غنی از کاروتنوئیدهااست جهت تولید دارو و مصرف انسانی بکار می روند(Pienkos and Darzins,۲۰۰۹).

-مکمل های غذایی

-تولید آگار

-کود

-سوخت زیستی

-تولید سایر گیاهان

-دامداری

۷- عوامل موثر بر رشد ریز جلبک ها:

رشد یا پرورش ریز جلبک ها به معنای افزایش اندازه تک سلولها نیست بلکه به معنای افزایش تعداد سلولهاست که باا ندازه‌گیری دانسیته سلولها با گذشت زمان سنجیده می شود. رشد ریز جلبک ها به عوامل مختلفی بستگی دارد که مهمترین آنها عبارتند از (George *et al.*, ۲۰۱٤) :

- نوع ریز جلبک
- دانسیته کشت اولیه
- تکنولوژی تولید
- موقعیت جغرافیایی
- دما
- نور
- میزان شوری منبع آب مورد استفاده
- pH- محیط کشت
- اختلاط
- موادمغذی
- تبادل گاز

انتخاب هر کدام از سیستم های ذکر شده در بالا به‌منظور پرورش ریز جلبک ها، بستگی به پارامترهای زیادی دارد که

تعدادی از آنها عبارتند از:

۱- -هزینه سرمایه گذاری اولیه

۲- -زمین مورد نیاز

۳- -تولید روزانه

۴- ریسک آلودگی

۵- -تبخیر سطحی

۶- انرژی مورد نیاز

۷- هزینه های نگهداری

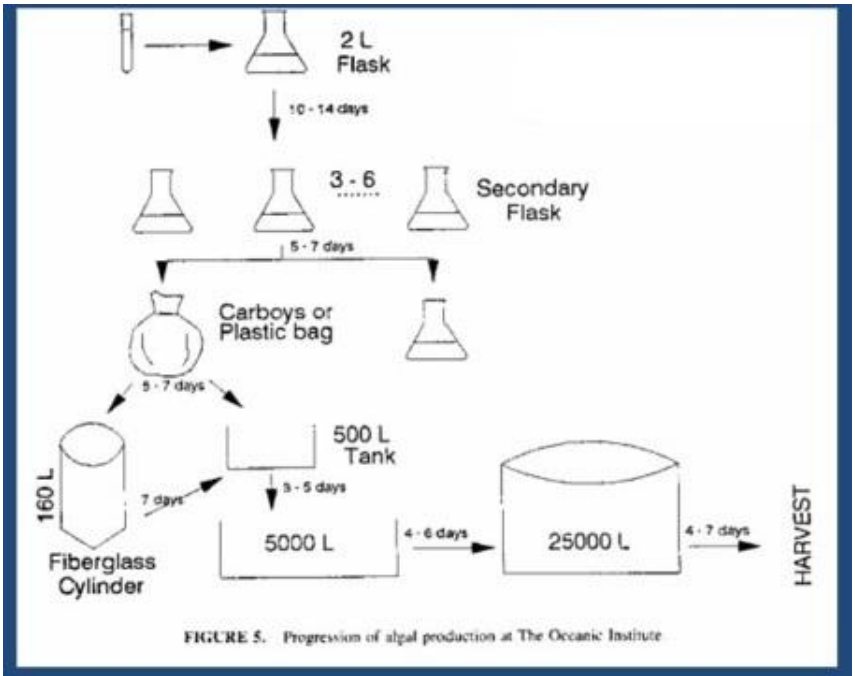
۸- -پایداری بهره وری (فصل ، دما ، نور و)...

۸- شرایط و نحوه کشت ریزجلبک ها :

- مهمترین پارامترهای تظیم رشد جلبکی شامل: کمیت و کیفیت غذایی، نور، pH، هوادهی، شوری و دما هستند.
- دما: بهترین دامنه دمایی برای رشد اکثر جلبک ها ۱۸-۲۴ درجه سانتیگراد می باشد
- شوری: شوری برای کشت و پرورش گونه های آب شور ضروری بوده و بهترین میزان شوری ۲۴-۲۰ گرم در لیتر می باشد .
- شدت نور: با توجه به عمل فتوسنتز جلبک ها نور عامل ضروری محسوب میشود شدت نور در گونه های مختلف متفاوت بوده و بین ۵۰۰۰-۲۵۰۰ لوکس متغیر می باشد . دوره نوری: این دوره معمولا بین ۲۴-۱۶ ساعت به ترتیب روشنایی ،تاریکی می باشد .
- ازجمله محیط کشت های مناسب برای جلبک عبارتند از: BG-۱۱ ،گیلارد، زاروک، زایندر. پس از اطمینان از خاص بودن نمونه وکشت آن میتوان برای استخراج ژنوم و نگهداری دراز مدت اقدام کرد (AL-Shandah *et al.*, ۲۰۱۸) .

۹- معرفی انواع سیستم کشت ریزجلبک و شیوه های تولید آن:

انواع مختلف سیستم های کشت جلبک وجود دارد که میتوان انواع سیستم Batch Culture کشت انبوه، سیستم Continues Culture کشت ادامه دار و سیستم Cemi Culture را نام برد.



کشت انبوه ریز جلبک

- شیوه های تولید ریز جلبک:

سیستمهای کشت ریز جلبک ها از نظر حجم کشت در محدوده ای بین ۱۰۰ لیتر (برای تولید ترکیبات آلی نشاندار یا ایزوتوپ های پایدار) تا بیشتر از ۱۰ به توان ۱۰ لیتر (کشت دونالیلا سالینا)قرار می گیرند .برای مقاصد تجاری در کنار سیستم های کشت ویژه که مقیاسی کوچک در حد کمتر از ۱۰۰۰ لیتر دارند.، استخرهای روباز ، استخرهای دارای بازوهای چرخان ، استخرهای با جریان سریع و کیسه های بزرگ نیز مورد استفاده قرار می گیرند.

عوامل مختلفی در انتخاب نوع سیستم کشت ریز جلبک ها نقش دارند که مهم ترین آنها شامل نوع ریز جلبک ، مواد غذایی ، میزان مصرف انرژی ، نوع محصول نهایی ، قیمت زمین و همچنین آب و هوای منطقه (برای کشت های روباز) می باشند . در زیر تعدادی از روش‌های کشت نامبرده شده و روش کیسه های پلاستیکی که مد نظر می باشد توضیح داده می شود(Milledge and Heaven, ۲۰۱۳).

۱- روشindoor

۲- سیستم های کشت روباز

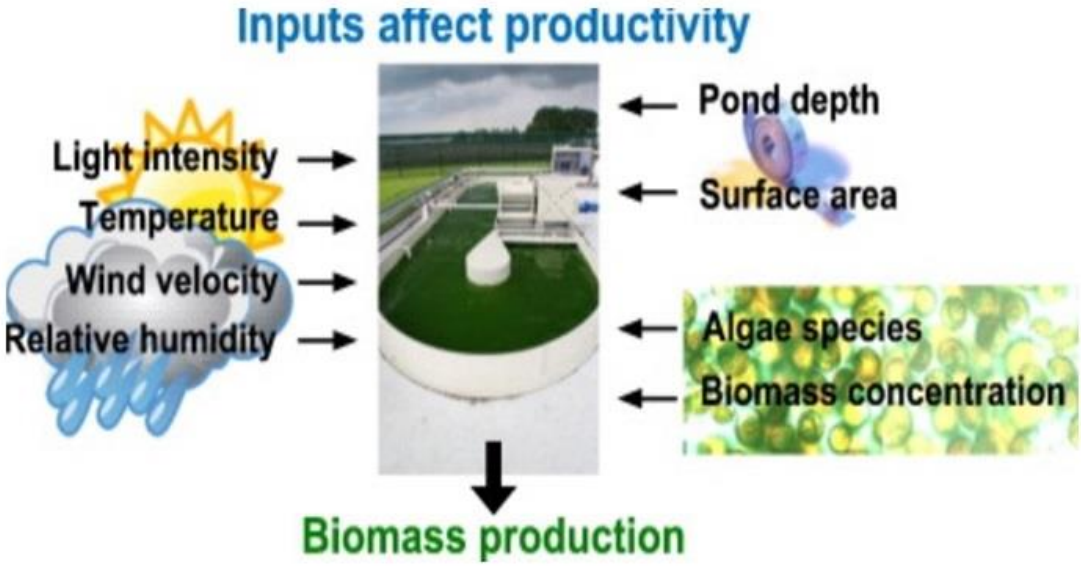
۳- دریاچه ها و استخرهای طبیعی

۴- سیستم های شیب دار

۵- استخرهای دارای بازوهای چرخان

۶- استخرهائی با جریان سریع

- سیستم کشت بسته : فیتو بیو رآکتور و فیتو بگ



شدت نور خورشید و دما ، وزش باد، رطوبت ، عمق استخر پرورشی سطح مقطع پرورش ، گونه انتخابی پرورش عوامل موثر در پرورش رویاز ریز جلبک

جمهوری اسلامی ایران
وزارت جهاد کشاورزی

سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی

موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور

پژوهشکده آبزی‌پروری آبهای داخلی

مراحل کاری که در فایکولب صورت می‌گیرد

- پاساژ گونه های موجود در آزمایشگاه در محیط مایع
- کنترل میزان خلوص گونه های پرورش
- جداسازی و خالص سازی از طریق سریال رقت مایع در لوله آزمایش
- نگهداری میان مدت در محیط آگار
- حفظ و نگهداری بعضی از گونه ها در دمای یخچال و روی میز خاموش

کشت در محیط مایع

سریال رقت در محیط مایع

کشت در محیط اگار

نگهداری در محیط یخچال

تجهیزات موجود در آزمایشگاه فایکولب

۱- میکروسکوپ اینورت مدل TE.300 NIkon

۲- اتاق uv ...مجهز به هود استریل

۳- دستگاه اتو کلاو حجم ۷۰ لیتری

۴- دستگاه اسپری درایر

۵- میکروسکوپ چشمی

۶- میز و استن کشت جلبک

۷- هواده مرکزی همراه با فیلتر

۸- دستگاه آب مقطر گیری

۹- محفظه استریل جلبک

۱۰ – هود آزمایشگاهی

هود آزمایشگاهی

میکروسکوپ اینورت

نمائی از اتاق UV

۱۰ - کشت گلخانه ای و چند منظوره:

- الف :تلقیح کشت از پیش آماده شده به درون کیسه ها و اضافه نمودن محیط کشت و تامین شرایط
- مطلوب از نظر نور، دما و...
- ب :دوره ۲۰ روزه برای رسیدن به مرحله برداشت(رسیدن جلبک به غلظت مناسب)
- پ :برداشت نصف مقدار جلبک موجود در کیسه ها
- ت : برگشت دادن ۹۰ % از محیط کشت به درون کیسه ها پس از برداشت جلبک آن و اضافه نمودن ۱۰ % محیطکشت تازه به هر کیسه (Sahoo & Seckbach, ۲۰۱۵).

شرایط و نحوه کشت ریزجلبک هااز طبیعت :

- **جلبک های میکروسکوپی آب شیرین دردسترس (تالاب _ آبگیرها)**

ابتدا نسبت به جمع آوری نمونه های ریز جلبکی در مراکز تحقیقات شیلات کشور و سپس نسبت به جدا سازی و خالص سازی گونه های آب شیرین از منابع طبیعی چون تالاب ها و رودخانه های کشور اقدام میگردد و با استفاده از تکنیک های خالص سازی و روش پیپت پاستور گونه های جلبکی جداسازی و در محیط کشت تهیه شده اختصاصی از قبیل BG-۱۱ ، گیلارد(Gillard) ، زاروک (Zarrouk)، زایندر (Zainder) بصورت خالص کشت داده می‌شود. بسته به گونه مورد بررسی، نمونه های کشت داده شده در فاز رشدی مورد بررسی قرار گرفته و در صورت خالص بودن به ترتیب

به کشت در مخازن ارلن ۱۰۰، ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰میلی لیتر منتقل می‌شوند. در تمام طول مدت بررسی درجه حرارت (۲ ± ۲۵ درجه سانتیگراد) و شدت نور (۳۵۰ ± ۳۵۰۰ لوکس) ثابت نگهداشته خواهند شد. شمارش سلول های جلبکی توسط لام هموسیتو متر در دو مرحله اولیه و ثانویه انجام و میزان غلظت از طریق جذب و کدورت طیف نور به ترتیب با طول موجهای ۷۵۰ و ۴۵۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر مورد اندازه گیری قرار خواهد گرفت، سپس گونه خالص شده جهت نگهداری به محیط کشت آگار منتقل خواهد شد . بدین خاطر قبل از اتو کلاو، به ازای هر لیتر ۱۵ گرم اگار اضافه شده و بعد از اتوکلاو به پتری‌دیش منتقل می‌کنیم. از محیط مایع خالص شده ۱۰۰ میکرولیتر جهت ایجاد تک کلنی به پلیت منتقل کرده و به روش ضربدری کشت داده خوهد شد (George *et al.*, ۲۰۱٤).

این روش یکی از شیوه های تولید در سیستم کشت بسته است و از مزایای بیشتری نسبت به تولید در فیتوبیوراکتور های شیشه ای برخوردار است مثلا هزینه های تولید در آن به مراتب کمتر از فیتو بایوراکتورهای شیشه ای است .این سیستم به ویژه برای مقابله با معضل محدودیت زمین و سایر مشکلات سیستم‌های باز بکار گرفته شدند .این سیستم ها می توانند هم درفضاهای بسته و بااستفاده از نورمصنوعی وهم در فضاهای باز با بهره گیری از نورطبیعی کار کنند.این تکنولوژی دوره ای نیست و در کل سال کشت انجام می شود .تنها در صورت آسیب دیدن کیسه ها و میسر نبودن کشت مجدد بایستی کیسه ها تعویض شوند، در واقع در شرایط یکسان وقتی بهره وری در استخرها روزانه ۰ / ۱۵ گرم بر لیتر می باشد ، بهره وری‌در این سیستم می تواند به ۲ / ۱۵ گرم بر

لیتر و یا حتی بیشتر نیز برسد .در سیستم کیسه های پلاستیکی تولید در یک دوره ۲۰ روزه می تواند حتی به ۲ تا ۳ گرم ماده خشک در لیتر برسد . به ۰/۱۴ تا ۰/۱۷ در روز خواهد رسید.

کشت جلبک در محیط استرلیزه و شرایط مناسب انجام می گیرد و همچنین برای جداسازی یا خالص سازی میکروجلبک از میان سایر میکروارگانیسم ها می توان از روش های مختلف از قبیل روش های متوالی آگار(کشت جامد)، کشت متوالی، سانتریفیوژ و پی پت پاستور استفاده نمود که نیاز است تا مرحله خالص سازی در چند مرحله انجام گیرد. استوک خالص شده میکروجلبک در مرحله اول در شرایط کاملا استریل و در مجاورت شعله الکلی در لوله های آزمایش محتوی محیط کشت مورد نظر قابل انتقال می باشد و بعد از حدود ۷-۵ روز جهت تولید استوک بیشتر، قابل انتقال در ارلن های ۲۵۰ میلی لیتر و بعد از ۴ روز در ارلن ۵۰۰ میلی لیتر و یک لیتری می باشد تا استوک مورد نیاز جهت تولید نیمه انبوه میکروجلبک تهیه گردد. مراحل چهارگانه پرورش جلبک عبارت است از: انتقال جلبک از استوک جامد یا مایع به لوله های آزمایش ۵۰-۲۵ میلیلیتر ، انتقال لوله های ۵۰-۲۵ میلی‌لیتر به ظروف ۲۵۰ میلی‌لیتر ، انتقال ظروف ۲۵۰ میلی‌لیتر به ظروف ۱۵۰۰ میلی‌لیتر و انتقال ظروف ۱۵۰۰ میلی‌لیتر به ظروف ۱۰ لیتری. هر یک از مراحل چهارگانه کشت و پرورش جلبک ۵ تا ۷ روز زمان نیاز دارد یعنی در کل ۲۰ تا ۲۸ روز زمان لازم است(Milledge and Heaven, ۲۰۱۳).

نماتئی از کشت گلخانه ای میکروجلبک

۱۱- محیط کشت‌های پر کاربرد در پرورش ریز جلبک ها :

ماده شیمیائی مورد نظر	محیط کشت BG-11	محیط کشت زاروک	زایندر	F2
$Ca(NO_3)_2_4H_2O$	-	-	۰/۰۵۶ g	-
$NaHCO_3$	-	۱۶/۸g		-
$NaNO_3$	۱/۵g	۲/۵g	۳ g	۱۲/۳۵mg
KH_2PO_4	-	-	۰/۰۲۵g	۱/۱۲۵mg
K_2HPO_4	۰/۰۴g	۰/۵g	-	-
$MgSO_4_7H_2O$	۰/۰۷۵g	۰/۲g	۰/۰۲۵g	-
$CaCl_2_2H_2O$	۰/۰۳۶g	۰/۰۴g	-	-
NaCl	-	۱/۰g	۰/۳g	-
Na_2CO_3	۰/۰۲g	-	۰/۰۲۴ g	-
$Na_2SiO_3_9H_2O$	-	-	-	-
HCl (1 mol/L)	-	-	-	-
Na_2EDTA	۰/۰۰۱ g	۰/۰۸mg	۰/۱ g	-
	-	-	-	-
$FeCl_3_6H_2O$	-	-	۰/۰۹g	۰/۶۵۳۸mg
KOH	۰/۰۶۲g	-	-	-
H_3BO	-	-	-	-
$FeSO_4_7H_2O$	۰/۰۵g	-	-	-
$MnCl_2_4H_2O$	-	-	-	۰/.۰۴۹۴mg
$(NH_4)_6Mo_7O_{24}_4H_2O$	-	-	-	۰/۰۰۲۴mg
K_2SO_4	-	۱/۰g	-	-
Citric acid	۰/۰۰۶ mg	۰/۰۰۶ mg	۰/۰۰۶ mg	۰/۰۰۶ mg
Ferric ammonium citrate	۰/۰۰۶ mg	۰/۰۰۶ mg	۰/۰۰۶ mg	۰/۰۰۶ mg
Vitamin B12	۱/۰µg	۱/۰µg	۱/۰µg	۱/۰µg
Thiamine HCl	۰/۱ µg	۰/۱ µg	۰/۱ µg	۰/۱ µg
Biotine	۰/۱ µg	۰/۱ µg	۰/۱ µg	۰/۱ µg
Trace metal mix A5	۱ml	۱ml	۱ml	۱ml
Trace metal mix B6	۱ml	۱ml	۱ml	۱ml
pH	۷/۲	۷/۵	۷/۵	۷/۲
Total volume	۱L	۱L	۱L	۱L

Trace metal mix A5 Trace metal mix B6

Trace metal mix B6			Trace metal mix A5	
	۲۲/۹۶g	NH4NO3	۲/۸۶g	H3BO3
	۹۶/۰۰g	K2Cr2(SO4)4_24H2O	۱/۸۱g	MnCl2_4H2O
	۴۷/۸۵g	NiSO4_7H2O	۰/۲۲g	ZnSO4_7H2O
	۱۷/۹۴g	Na2SO4_2H2O	۰/۳۹g	NaMoO4_2H2O
	۴۰/۰۰g	Ti(SO4)3	۰/۰۷۹g	CuSO4_5H20
			۴۹/۴g	Co(NO3)2_6H2O
		Distilled water	۱L	Distilled water
Guillard, 1975	Miller , 1978	George et al., 2014	George et al., 2014	Refrence

متناسب با نوع جلبک روش خاصی برای خالص سازی نیاز است از جمله روش های خالص سازی میتوان به موارد زیر اشاره کرد:

۱۲-روش خالص سازی توسط کشت در پلیت:

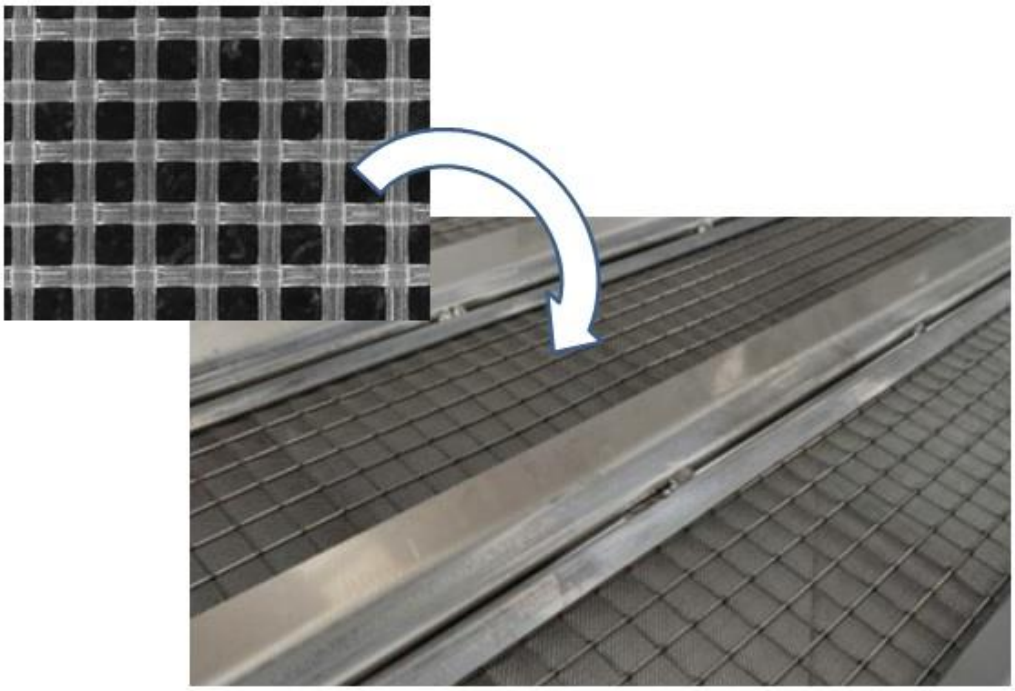
برای جلبک های تک سلولی آب‌های شیرین بهترین روش خالص سازی استفاده از کشت پلیت می‌باشد.در این روش ابتدا تحت شرایط استریل از نمونه سری رقت تهیه می شود سپس از رقت‌های $۱۰^{-۴}$ تا $۱۰^{-۱۰}$ توسط لوپ نمونه گیری شده و درپلیت حاوی محیط کشت جامد به صورت خطی کشت می‌شود. محیط کشت های جامد حاوی محیط کشت نمکی مخصوص آن جلبک به همراه ۱/۵٪ پودر آگار است. پس ازکشت جلبک پلیت نمونه در انکوباتور با دوره نوری ۱۲ ساعت روشنایی ۱۲ ساعت تاریکی و دمای ۲۸ درجه‌سانتیگراد قرار داده می‌شود. پس از حدود ۱۴ روز کلنی ها بر روی پلیت ظاهر می شود. زمان، دما و دوره نوری انکوباسیون متناسب با جلبک مورد نظر می تواند متفاوت باشد.

سپس کلونی ها برای مشاهده، توسط لوپ در شرایط استریل برداشته شده و زیر میکروسکوپ مطالعه می شود. پس از اطمینان از رشد جلبک مورد نظر در پلیت نمونه برداشته شده و به محیط کشت مایع اختصاصی خود منتقل می‌شود بهتر است جهت اطمینان از خالص بودن نمونه جلبک قبل از انتقال آن به

کشت مایع چند دوره در کشت جامد پاساژ داده شود سپس به محیط مایع منتقل گردد (AL-Shandah *et al.*, ۲۰۱۸).

- مش های نایلونی با چشمه های کوچک:

جلبک های رشته‌ای مانند اسیلاتوریا و لینگبیا را می توان با استفاده از مش های نایلونی با منافذ ۲۵ تا ۳۰ میکرون خالص کرد. ابتدا نمونه در محیط کشت مناسب جلبک مد نظر تحت شرایط بهینه به مدت ۱۴ روز انکوبه می شود. سپس از صافی عبور داده شده و توسط محیط کشت استریل شسته می شود. جلبک پس از شستشو از روی صافی برداشته شده و به محیط کشت مایع مناسب منتقل می‌گردد (AL-Shandah *et al.*, ۲۰۱۸).



مش ۲۵ تا ۳۰ میکرونی جهت جدا سازی جلبک ها

منابع :

AL-Shandah, B., Al-Jabar,R., Trifa, K. J Farkha .۲۰۱۸. Isolation, Purification and Identification of Seven species of Algae in three drinking water plants supply springs in Sulaimani province and growth control of isolated algae by using some plant extract. Tikrit Journal of Pure Science,۲۳ (۱):۲٦-۳۷.

George, B., Pancha, I., Desai, C., Chokshi, K., Paliwal, C. ۲۰۱٤. Effect of different media composition, light intensity and photoperiod on morphology and physiology of freshwater microalgae *Ankistrodesmus falcatus*–A potential. Bioresource Technology,۱۷۱: ۳٦۷–۳۷٤.

Lababpour A. ۲۰۱٦. Potentials of the microalgae inoculant in restoration of biological soil crusts to combat desertification. Int J Environ Sci Technol, ۱۳:۲٥۲۱–۲٥۳۲.

Milledge, J., Heaven,S.۲۰۱۳. A review of the harvesting of micro-algae for biofuel production

Reviews in Environmental Science and Bio/Technology volume ۱۲: ۱٦٥–۱۷۸ .

Ruggiero,MA., Gordon,DF., Orrell,TM., Bailly,N., Bourgoin,T., Brusca, R., Cavalier-Smith,Th., Guiry,M., Kirk,P.۲۰۱٥. A Higher Level Classification of All Living Organisms. PLOS ONE ۱۰(٦): e ۰۱۳۰۱۱٤.

Sahoo,D., Seckbach,J. ۲۰۱٥. The Algae World.٥۸۱PP.