Archive of SID

تغـذیه آبزیـان
سال پنجم، شماره دوم،
پاییز و زمستان ۱۳۹۸

اثر محیط‌های کشت مختلف بر تولید ریزجلبک کلرلا (*Chlorella* sp.) با به کارگیری کودهای کشاورزی تجاری

غلامرضا رفیعی*، کامران رضایی توابع، نازنین معتمدی
گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، البرز

تاریخ دریافت: ۹۸/۰۳/۱۴ تاریخ پذیرش: ۹۸/۰۵/۱۵

چکیده
جلبک ها به عنوان غذای آغازین و نیز به عنوان غذای اصلی پلانکتون‌های جانوری مورد تغذیه لاروهای آبزیان در آبزی‌پروری نقش مهمی را ایفا می‌کنند و فرمول بندی ارزان محیط کشت آنها دارای اهمیت زیادی است. این پژوهش با هدف بررسی مقایسه تولیدی و اقتصادی محیط‌های کشت برای جلبک کلرلا انجام شد. در این تحقیق که دوره آن ۲۰ روزه بود، محیط کشت F/2 به عنوان تیمار شاهد در نظر گرفته شد و با چهار محیط کشت جدید با غلظت های ثابت شامل نسبت‌های مختلف ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰٪ محیط کشت کوپر که برای کشت گیاهان خشکی‌زی در روش آبکشت یا هایدروپونیک به‌کار می‌رود، با به‌کارگیری نمک‌های معدنی تجاری و اوره (کود) در بازار فرمول‌بندی و مقایسه شدند. جلبک کلرلا در محیط با غلظت ۲۵٪، نسبت به محیط F/2 نتایج عملکردی بهتری را نشان داد ($p<0/05$). بر اساس نتایج به دست آمده در این تحقیق، محیط کشت با غلظت ۲۵٪ برای ریزجلبک کلرلا، محیط کشت مناسب و بسیار مقرون به صرفه شناخته شد، زیرا علاوه بر افزایش تراکم جلبکی بیشتر در پایان دوره آزمایش، نسبت به محیط F/2، ۹۴٪ نیز هزینه کمتری را در بر داشت.

کلمات کلیدی: کلرلا (*Chlorella spp.*)، محیط کشت، نمک های تجاری کشاورزی، تولید زیست توده.

نویسنده مسئول: ghrafiee@ut.ac.ir

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

ریزجلبک ها، به علت تنوع زیاد و نیز تولید ترکیبات متنوع به‌خصوص زیست‌یار دارای ارزش اقتصادی و بهداشتی فراوانی هستند و در علم آبزی‌پروری تولید آنها به عنوان یک صنعت مهم برای تولید آبزیان پرورشی به‌خصوص در مرحله لاروی شناخته می‌شوند. این فتوسنتزکنندگان برخلاف گیاهان خشکی‌زی در بسیاری از منابع آبی شیرین تا شور کشت داده می‌شوند. حضور این گیاهان کوچک در جیره غذایی، به دلیل دارا بودن ترکیبات خاص مانند اسیدهای آمینه ضروری و تری‌گلیسریدها باعث افزایش تجمع تری‌گلیسرید و پروتئین در ماهیچه‌ها، بهبود مقاومت در برابر بیماری‌ها، کاهش نیتروژن خروجی به محیط، فعالیت‌های فیزیولوژیک و کیفیت لاشه در آبزیان می شوند. همچنین، جلبک‌ها به‌طور بالقوه می‌توانند جایگزین برخی از مواد خام معمول در غذای آبزیان شوند و یا مصرف آن‌ها را کاهش دهند. از مزایای دیگر ریزجلبک‌ها می‌توان به رشد آنها در طیف وسیعی از زیستگاه‌ها، تولید چند برابری زی‌توده در برخی از گونه‌ها نسبت به گیاهان، داشتن نیازهای تغذیه‌ای ساده و بالا بودن سرعت تقسیم آنها و توانایی تجمع متابولیت های مهم اشاره کرد که دسترسی به این مواد وابسته به صید ماهی و تولید پودر ماهی نیست (Chia et al. 20013).

جلبک‌ها به عنوان جایگزینی مناسب در جیره غذای آبزیان جای پودر و روغن ماهی در صنعت آبزی‌پروری پیشنهاد شده اند. معمولاً در تولید و پرورش روتیفر آب شیرین از جلبک‌های مختلفی از جمله *Chlorella vulgaris* و *Scenedesmus obliquus* به همراه مخمر نانوایی *Saccharomyces cerevisiae* استفاده می شود (Sarma et al. 2005). در روتیفرهای تغذیه شده با کلرلا با تراکم یک میلیون جلبک میزان اسیدهای آمینه ضروری بیشتری در مقایسه با غذای تجاری نشان داده شده است (Applebaum and Rønnestad, 2004).

استفاده از گروه‌های مختلف موجودات از جمله گیاهان، باکتری‌ها و ریزجلبک‌ها در تصفیه و ارتقای کیفیت پساب‌های آبزی‌پروری در مطالعات مختلف انجام شده است که از مزایای قابل توجهی برخوردار بوده‌اند (Lee and Lee, 2002). استفاده از ریزجلبک‌ها در کاهش سطوح مواد مغذی معدنی آب و افزایش ظرفیت اکسیژنی آب نتایج بسیار مطلوبی بر تنظیم کیفیت آب و کاهش اثرات مضر پساب‌های آبزی‌پروری نشان داده است (Sengupta et al. 2015). در برخی از مطالعات، از جلبک کلرلا و دیگر جلبک‌ها به عنوان بخش تروفی به صورت تلفیقی با گیاهان و باکتری‌ها در سازگان‌های زیستی مختلف و در یک سازگان واحد و یکپارچه به منظور ارتقای کیفیت پساب خروجی آبزی‌پروری استفاده شده است (Hargreaves, 2006).

تولید جلبک‌ها با توجه به مصرف نمک‌های آزمایشگاهی در فایکولب‌ها یا سالن‌های تکثیر ماهی، هزینه زیادی را در بر دارد (Imamoglu et al. 2007). هزینه‌های تولید بسیار بالای ریزجلبک از طریق فرمول‌های موجود محیط کشت، مانند F/2 (Guillard, 1975)، به‌خصوص بعد از کشت ریزجلبک در مقیاس وسیع خود را نشان می دهد، زیرا برای تولید انبوه ریزجلبک، از نمک هایی با درجه آزمایشگاهی یا آنالیتیک برای ساخت محیط کشت به‌خصوص در داخل سالن تولید مانند F/2، استفاده می‌شود که هزینه بالایی را در بر دارد. آماده سازی محیط رشد، بخش قابل توجهی از هزینه‌های اجرایی را در روند تولید لارو آبزیان پرورشی به‌خود اختصاص می‌دهد. گزارش شده است که ۴۰-۳۰٪ (حداکثر تا ۷۰٪) از هزینه‌های راه‌اندازی تفریخگاه‌های دریایی را می‌توان به کشت ریزجلبک نسبت داد (Jad-Allah El Nabris, 2012). برخی از جلبک‌ها با دارا بودن دیواره سلولی با هضم کم می‌توانند اثرات منفی در لارو ماهیان ایجاد کنند و یا آلوده شدن زی‌توده با عوامل ناخواسته مانند برخی قارچ‌ها و باکتری‌ها در فرآیند تولید نیز از مشکلات تولید این ریززیستمندان به‌حساب می‌آید. ثابت شده است که تغییرات فیزیولوژیک در جلبک به شرایط محیطی در حین رشد بستگی دارد (Chia et al. 2013). این رفتار را می‌توان یکی از ویژگی‌های مهم زیست‌فناورانه در صنعت تولید جلبک در نظر گرفت؛ یعنی دستکاری برای کنترل شرایط بیوشیمیایی و رشد، با تمرکز بر تولید ترکیبات خاص و بهره‌وری بالاتر، امکان‌پذیر است. بنابراین، فرمول‌بندی محیط کشت با کیفیت و ارزان را می‌توان استراتژی ارزشمندی برای تولید محصول از ریزجلبک‌ها به حساب آورد (Rahman Shah et al. 2017).

محیط کشت پایه برای پرورش جلبک‌های دریایی به‌طور کلی از آب دریا تشکیل شده است که توسط مواد معدنی یا مواد مغذی با درجه و کیفیت آنالیتیک یا آزمایشگاهی

www.SID.ir

Archive of SID

بهسازی می‌شود. اصطلاح "nutrient" به‌طور معمول برای هر عنصر یا ترکیب لازم برای رشد ریزجلبک به‌کار می‌رود. مواد مغذی شیمیایی با درجه‌بندی آزمایشگاهی، گران‌ترین ترکیبات لازم برای تولید محیط کشت جلبک هستند (Molina et al. 2003).

در طول چند دهه گذشته، مطالعات زیادی درباره توسعه فرمول‌های جدید برای کشت گونه‌های مختلف ریزجلبک و جایگزینی مواد معدنی با درجه آنالیتیک و به‌کارگیری کودهای کشاورزی به‌عنوان نوترینت انجام شده است (Coutteau, 1996; Valenzuela-Espinoza et al. 2013; Chia et al. 2013; Barakoni et al. 2015). لذا، برای کاهش هزینه‌های پرورش جلبک، فرمول‌بندی محیط کشت جلبک‌ها، مبتنی بر بهره‌گیری از کودهای کشاورزی ارزان، ضروری است. در این باره، بیان شده است که حفظ ارزش غذایی ریزجلبک‌های تولیدی با به‌کارگیری مواد معدنی کشاورزی، در مقایسه با مواد معدنی آزمایشگاهی، مانند F/2 را نباید نادیده گرفت (Valenzuela-Espinoza et al. 1999). در این راستا و با توجه به نیاز به فرمول‌های جدید برای کشت جلبک‌ها و اینکه شرایط محیطی مختلف، تنوع گونه ای و سویه‌های متفاوت می‌تواند بر تولید جلبک تأثیرگذار باشد. در مطالعه حاضر، امکان تولید جلبک دریایی کلرلا (*Chlorella* spp.)، با ارایه فرمول‌بندی جدید با استفاده از نمک‌های معدنی کشاورزی مانند اوره و کودهای ترکیبی و به‌کارگیری آنها به عنوان محیط کشت بررسی و با محیط کشت استاندارد F/2 مقایسه شدند.

مواد و روش‌ها

تهیه و افزایش کشت ریزجلبک‌های دریایی

گونه‌های ریزجلبکی به‌کار رفته در این مطالعه، گونه های کلرلا (*Chlorella* spp.) بودند. این ریزجلبک‌ها از پژوهشکده خلیج فارس وابسته به دانشگاه خلیج فارس بوشهر تهیه شد و به آزمایشگاه تکثیر و پرورش آبزیان دانشکده منابع طبیعی دانشگاه تهران واقع در کرج منتقل شد. برای افزایش استوک یا ذخیره اولیه، از ظرف پنج لیتری پلاستیکی به میزان سه لیتر آب نمک ۲۴ گرم در لیتر، تهیه شده از نمک دریایی خلیج فارس استفاده شد و هر ظرف به مدت یک شبانه روز در معرض هوادهی شدید، دمای ۲۳ درجه سانتی گراد و نور طبیعی اتاق قرار گرفت. محیط کشت F/2 (Guillard, 1975) بر اساس کتاب آبزی‌پروری پیشرفته در محیط‌های دریایی (Perumal et al. 2015)، با استفاده از نمک‌های آزمایشگاهی مرک تهیه و فرمول‌بندی شد و به ظرف وارد شد. در روز سوم از محیط‌های کشت ریزجلبک به میزان ۶۰ میلی لیتر برداشت شد و به هر لیتر محیط کشت جدید، تیمارها و تکرارها تلقیح شد و به مدت سه هفته کشت داده شد. از لامپ‌های LED نیز برای ثابت نگه داشتن شدت نور در حد ۲۵۰۰ لوکس استفاده شد. در طول دوره آزمایش از جلبک‌ها پنج بار نمونه‌برداری شد. در زمان استوک‌گیری، تعداد جلبک دارای تراکمی حدود $۵/۷ \times ۱۰^{۶}$ و در زمان ورود به تیمارها دارای تراکم $۰/۳۴۲ \times ۱۰^{۶}$ جلبک در هر میلی لیتر آب بود.

طرح آزمایش

این پژوهش دارای پنج تیمار با سه تکرار بود و آزمایش در قالب یک طرح کاملاً تصادفی انجام شد. محیط شاهد (تیمار ۱)، محیط F/2 تعیین شد. چهار تیمار دیگر بر اساس محیط کوپر تهیه شد (Rafiee et al. 2002). این محیط کشت برای تولید گیاهان خشکی‌زی به عنوان یک فرمول عمومـی برای کشت آبکشت یا هیدروپونیک به‌کار می‌رود. مقدار غلظت یون‌ها در محلول کوپر در جدول ۱ نشان داده شده است. در این محیط کشت نسبت بین یون‌ها ثابت است و این فرمول‌بندی در آب شیرین انجام می‌شود. تاکنون تحقیقی درباره فرمول‌بندی کشت جلبک‌های دریایی بر اساس این نسبت‌ها انجام نشده است. لذا، غلظت-های مختلف ۱۰۰٪ (تیمار ۲= $T_{100\%}$) ، ۷۵٪ (تیمار۳ = $T_{75\%}$)، ۵۰٪ (تیمار ۴ = $T_{50\%}$) و ۲۵٪ (تیمار ۵ = $T_{25\%}$) با استفاده از نمک‌های تجاری موجود در بازار (تهران، ایران) تنظیم و ساخته شدند (جدول ۳). پروفایل یونی کود الیت آبی رنگ به‌کار رفته در این بررسی نیز در آزمایشگاه تعیین شد. برای این کار، مقدار یک گرم از کود مورد نظر با افزودن حدود ۹۹۰ میلی‌لیتر به حجم رسانده شد و مشابه روش هضم مواد از طریق اتوآنالایزر مقدار غلظت یون‌های مختلف در آب اندازه‌گیری شد. سپس، بر اساس مقدار مصرف کود، درصد یون‌های موجود محاسبه شد (Rafiee and Saad, 2005) (جدول ۲). نمک‌ها و مواد به کار رفته در این مطالعه، با ترازوی آزمایشگاهی با دقت ۰/۰۱ میلی‌گرم وزن شدند. با توجه به کافی بودن مقدار برخی از عناصر در

www.SID.ir

Archive of SID

کود الیت، مقدار مصرف نمک‌های معدنی مختلف در هر تیمار تعیین شد (جدول ۳).

جدول ۱ غلظت عناصر تشکیل دهنده فرمول کوپر برای کشت گیاهان در روش آبکشت.

نوع ماده	فسفات	سولفات	کلسیم	منیزیم	سدیم	پتاسیم	نیتروژن	آهن	بور	مس	روی	منگنز
مقدار (mg/L)	۶۲	۸۰	۱۷۰	۵۰	۵۰	۳۰۰	۲۵۰	۱۲	۰/۰۱	۰/۳	۰/۱	۲

جدول ۲ درصد مواد تشکیل دهنده در یک گرم کود الیت آبی.

نوع ماده	فسفات	سولفات	کربنات	بی کربنات	کلسیم	منیزیم	سدیم	پتاسیم	نیترات	آهن	مس	بر	روی	نیتریت
درصد	۱۱/۳۹	۴/۱۳	۰	۸	۱۴	۳/۴۱۶	۳	۳۴	۱۹/۷	۰/۳	۰/۳	۱/۸۴	۰/۲	۰/۰۶

جدول ۳ مقدار گرم کودهای مصرفی برای ساخت تیمارهای مختلف (گرم در لیتر).

غلظت / نوع بارورکننده	تیمار ۲ ($T_{100\%}$)	تیمار ۳ ($T_{75\%}$)	تیمار۴ ($T_{50\%}$)	تیمار ۵ ($T_{25\%}$)
کود الیت آبی	۰/۵۰	۰/۳۷۵	۰/۲۵	۰/۱۲۵
دی آمونیوم فسفات	۰/۲۷۴	۰/۲۰۵۵	۰/۱۳۷	۰/۰۶۸۵
سولفات پتاسیم	۰/۲۰۹	۰/۱۵۶۷۵	۰/۱۰۴۵	۰/۰۵۲۲۵
سولفات آمونیوم	۰/۸۳۴	۰/۶۲۵۵	۰/۴۱۷	۰/۲۰۸۵
اوره	۰/۱۰۵	۰/۰۷۸۸۵	۰/۰۵۲۵	۰/۰۲۶۲۵

محلول ویتامین مصرفی با استفاده از ویتامین‌های انسانی گروه B (B کمپلکس و B_{12}) ساخته شد و به تمام تیمارها با توجه به دوز F/2 اضافه شد.

شرح آزمایش

مدت آزمایش بر اساس پیش آزمایش‌ها، ۲۰ روز در نظر گرفته شد. برای تعیین تراکم جلبکی و خصوصیات فیزیکی آب، پنج بار نمونه‌گیری انجام شد. پیش از تلقیح ریزجلبک-ها به محیط‌های کشت، ابتدا شوری توسط دستگاه شوری-سنج و pH با دستگاه pHمتر مدل (BANTE Instruments, Benchtop pH/mV Meter 210) ثبت شد و تغییرات از زمان ورود ریزجلبک تا زمان خروج آن‌ها به همین صورت به ثبت رسید. در پژوهش حاضر، هیچ کنترل حفاظت شده pH در مدت آزمایش انجام نشد. شوری آب در واحدهای آزمایش ثابت و حدود ۲۳ گرم در لیتر بود. روی درب هر ظرف پرورشی دو منفذ تعبیه شده بود که یکی از منافذ برای عبور لوله هواده و منفذ دیگر برای کاهش فشار و خروج هوا بود. در مدت ۲۰ روز، هیچ ماده مغذی به تیمارها وارد نشد و تغییری در خصوصیات سنجشی اعمال نشد. شمارش جلبک ها با نمونه‌گیری از آب و برداشت ۱۰ میکرولیتر نمونه با سمپلر (Labtron ۱۰ میکرولیتری، ساخت ایران) و قرار دادن نمونه روی لام نئوبار (Neubaure Improved Bright Line, Germany) زیر میکروسکوپ انجام شد.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

برای مقایسه میانگین متغیرها بین تیمارهای آزمایش از آنالیز واریانس یک طرفه (One-Way ANOVA) و با استفاده از نرم‌افزار SPSS (version, 17) استفاده شد. برای تعیین سطح معنی‌دار بودن در بین میانگین‌ها از تست دانکن استفاده شد. داده‌های pH ابتدا به غلظت H^+ تبدیل و بعد میانگین‌گیری و ارزیابی شد. رسم نمودارها با استفاده از نرم‌افزار اکسل ۲۰۱۶ انجام شد.

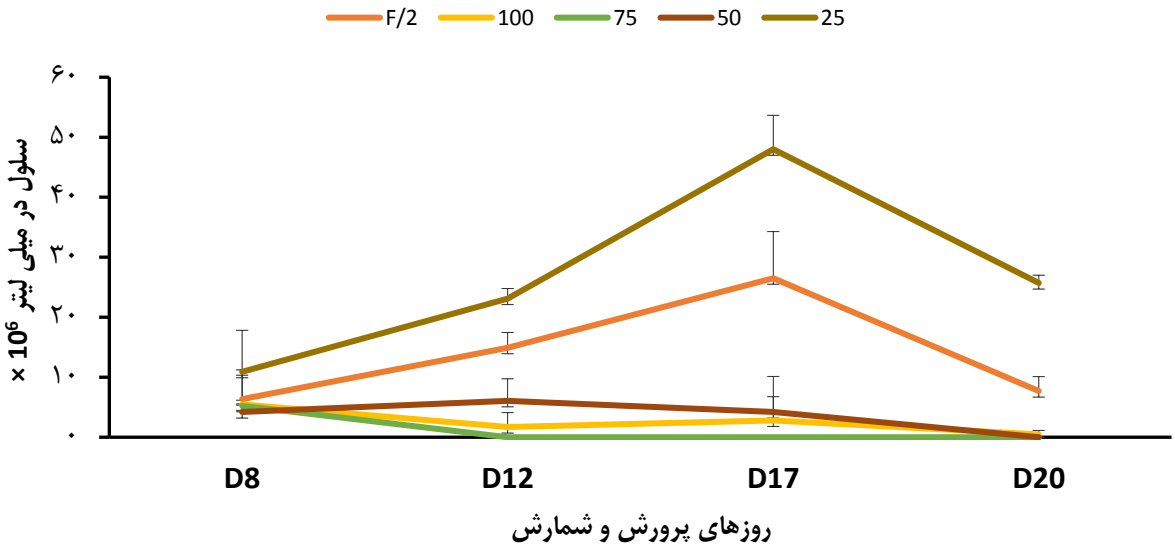
www.SID.ir

Archive of SID

نتایج

تولید زی‌توده در محیط کشت F/2 تفاوت معنی داری را در مقایسه با تیمارهای دیگر نشان داد ($p<۰/۰۵$). ریزجلبک کلرلا بیشینه تراکم را در تیمار ۲۵٪ (T_5) در روز هفدهم با تراکم ۱۰^{۶} × ۵/۶۶ ± ۱۰^{۶} × ۴۸/۰ سلول در میلی‌لیتر و گروه شاهد (F/2)، با تولید ۱۰^{۶} × ۷/۷۸ ± ۱۰^{۶} × ۲۶/۵ سلول در میلی‌لیتر داشت. این مقدار در تیمار ۲۵٪ بعد از روز هشتم همواره بیش از تیمار F/2 بود. تا روز دوازدهم تیمار ۵۰٪ (T_4) بعد از تیمار F/2 در رتبه سوم قرار داشت. با وجود این، بعد از ریزش یک تکرار آن تا شمارش در روز هفدهم، این جایگاه را نسبت به تیمار ۱۰۰٪ (T_2) حفظ کرد. یک تکرار تیمار ۱۰۰٪ تا روز بیستم و پایانی آزمایش همچنان باقی ماند (شکل ۱).

تراکم جلبک در روزهای هشتم (D_8)، دوازدهم (D_{12})، هفدهم (D_{17}) و بیستم (D_{20}) اختلاف معنی‌داری را در بین تیمارها نشان داد ($p<۰/۰۵$). از روز دوازدهم در تیمار ۲ و ۳ بعد از یک بلوم و ریزش ناگهانی در روزهای سوم تا هشتم، برابر با صفر در نظر گرفته شدند. در روز هفدهم نیز، یکی از تکرارهای تیمار ۴، دچار ریزش شد و در روز بیستم شمارش با سه تکرار شاهد (کد ۱)، یک تکرار کد ۲ و سه تکرار تیمار ۵ انجام شد (شکل ۱). میانگین تعداد سلول‌های شمارش شده در بین تیمارها در طول دوره آزمایش نشان دهنده اختلاف معنی‌دار است. این داده ها نیز نشان می‌دهد تعداد جلبک ها در تیمار ۲۵٪ بیش از تیمار شاهد یا F/2 است (جدول ۴).



شکل ۱ روند تغییرات تراکم سلولی (میانگین ± SD) × ۱۰^{۶}) ریزجلبک کلرلا در طول دوره پرورش در تیمارهای مختلف (بدون لگاریتم گیری از اعداد).

جدول ۴ تعداد سلول در میلی لیتر در تیمارهای ریز جلبک کلرلا در طول مدت آزمایش.

تیمارها	میانگین ± SD
۱	۱۳/۸۶۵ × ۱۰^{۶} ± ۰/۵۱۰۷۳۸ × ۱۰^{۶b}
۲	۲/۶۱ × ۱۰^{۶} ± ۰/۵۱۰۷۳۸ × ۱۰^{۶a}
۳	۱/۳۰۷۵ × ۱۰^{۶} ± ۰/۵۱۰۷۳۸ × ۱۰^{۶a}
۴	۳/۶۱۵ × ۱۰^{۶} ± ۰/۵۱۰۷۳۸ × ۱۰^{۶a}
۵	۲۶/۹۲۵ × ۱۰^{۶} ± ۰/۵۱۰۷۳۸ × ۱۰^{۶c}

حروف انگلیسی یکسان در بالای اعداد هر ردیف نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار در بین میانگین‌ها در سطح اعتماد ۰/۰۵ است.

www.SID.ir

Archive of SID

تغییرات pH

از روز دهم بعد از ورود جلبک تا روز بیستم، بین تیمار F/2، و دیگر تیمارهای ۲۵٪، ۵۰٪، ۷۵٪ و ۱۰۰٪ اختلاف معنی-داری مشاهده شد ($p<0/05$). در تیمار ۲۵٪ در زمان بیشینه تراکم، از روز اول تا روز بیستم میزان pH کاهش یافت. این میزان در هنگام بیشینه تراکم ۰/۳۶ ± ۷/۰۵ و در روز بیستم ۰/۲۸ ± ۶/۶۵ بود (جدول ۵). میزان pH، در دیگر تیمارها، از روز ورود جلبک تا دهم روند کاهشی داشت و از روز دهم با افزایش تراکم، میزان pH نیز تا روز دوازدهم افزایش داشت. میزان pH در تیمارهای ۵۰٪، ۷۵٪ و ۱۰۰٪ از زمان ریزش تا روز هفدهم تغییرات را نشان داد. در تیمار F/2، میزان pH در روز هفدهم یعنی بیشینه تراکم ۰/۰۰ ± ۸/۳۴ و در روز بیستم ۰/۰۲ ± ۸/۴۲ بود (جدول ۵).

جدول ۵ روند تغییرات pH در تیمارهای ریزجلبک *Chlorella* در طی مدت آزمایش (میانگین ± انحراف معیار).

زمان تیمار	روز شروع آزمایش	روز دهم	روز دوازدهم	روز هفدهم	روز بیستم
۱	۸/۴۵ ± ۰/۰۰^{e}	۸/۱۹ ± ۰/۱۲^{c}	۸/۳۲ ± ۰/۰۰^{c}	۸/۳۴ ± ۰/۰۰^{b}	۸/۴۲ ± ۰/۰۲**
۲	۷/۱۳ ± ۰/۰۴^{a}	۶/۸۰ ± ۰/۰۲^{a*} ریزش یک تکرار	۷/۴ ± ۰/۰۸^{ab} ریزش یک تکرار	۷/۳۰ ± ۰/۰۰^{a} ریزش یک تکرار	۷/۲۷ ± ۰/۰۰ ریزش یک تکرار
۳	۷/۳۹ ± ۰/۰۳^{b}	۶/۹۲ ± ۰/۰۳^{a} ریزش دو تکرار	۷/۱۷ ± ۰/۰۱^{a} ریزش دو تکرار	۷/۱۴ ± ۰/۱۴^{a} ریزش دوتکرار	-
۴	۷/۷۱ ± ۰/۰۴^{c}	۷/۵۳ ± ۰/۰۷^{b}	۷/۲۳ ± ۰/۲۶^{a}	۷/۲۴ ± ۰/۰۹^{a} ریزش یک تکرار	-
۵	۸/۱۷ ± ۰/۰۰^{d}	۷/۹۸ ± ۰/۰۰^{c}	۷/۸۱ ± ۰/۱۳^{bc}	۷/۰۵ ± ۰/۳۶^{a}	۶/۶۵ ± ۰/۲۸

*حروف انگلیسی یکسان در بالای اعداد در هر ستون نشان دهنده عدم اختلاف معنی دار در بین میانگین ها در سطح معنی داری ۰/۰۵ است.

** در تیمارهای ریزش داده شده، میانگین مربوط به یک یا دو تیمار یا دو شمارش محاسبه شده است.

بحث

نتایج این پژوهش نشان داد که تولید ریزجلبک های دریایی کلرلا با به‌کارگیری محیط کشت‌های استاندارد و فرمول-های جدید و با استفاده از غـلظت‌های مختلف نمک‌های تجاری کشاورزی امکان‌پذیراست. محیط کشت فرمول‌بندی شده با غلظتی از ۲۵٪ فرمول کوپر توانست کشت جلبک کلرلا را تضمین کند و جایگزین مناسبی برای فرمول F/2 شناخته شد. تنظیم مواد معدنی مورد نیاز جلبک عامـلی بسیار مهم در عمـلکرد رشد ریزجلبک‌هاست. یکی از مهم-ترین شاخص‌های رشد، بیشینه رشد یا تراکم سلولی است. رسیدن به بیشینه تراکم سلولی، امکان به‌کارگیری جلبک را در تولید آبزیان، یا تولید سوخت زیستی و تولید دارو فراهم می‌کند (Quinn et al. 2012; Lananan et al. 2013). یکی از دلایل مطلوبیت محیط کشت F/2 برای تولید بسیاری از ریزجلبک‌ها، نسبت نیتروژن به فسفر ۱۶:۱ در غلظت کم، مطرح شده است. در این پژوهش نسبت نیتروژن به فسفر ۱ به ۳/۶۸ بود که نسبت به فرمول F/2 کمتر بود. پژوهش‌های دیگر ثابت کرده است که می-توان نسبت‌های کمتری از نیتروژن به فسفر را برای کشت جلبک‌ها به‌کار برد (Barakoni et al. 2015). علت پذیرش نسبت‌های کمتر فسفر به نیتروژن توسط جلبک را می‌توان به حضور یک دیواره سلولی سفت و سخت در جلبک‌هایی مانند کلرلا نسبت داد. در این شرایط، جلبک قادر است تحمل فشار اسمزی خارج سلولی و طیف گسترده‌تری از نور را تحمل کند. بالاتر بودن تراکم سلولی ریزجلبک کلرلا در محیط رقیق شده کوپر نسبت به F/2، ممکن است به دلیل نیاز به مواد مغذی متعادل‌تر نیز باشد. گرچه بیان شده است جلبک کلرلا می‌تـواند در طیف متـغیری از مواد مـغذی با نسبت‌های نیتروژن به فسفر گسترده‌تر رشد کند و تراکم سلولی مطلوبی را ایجاد کند

www.SID.ir

Archive of SID

(Barakoni et al. 2015). ثابت شده است که با افزایش غلظت مواد مغذی و حفـظ نسبت نیتروژن به فسفر ۱ به ۴ امکان رشد جلبک‌هایی مانند *Isochrysis* (داده‌های منتشر نشده مولفان این پژوهش) و ریزجلبک *Pavolunis salina* وجود دارد (Tubea et al. 1981). از آنجا که نیتروژن عنصری اصلی برای کشت جلبک است و محیط‌های دریایی از نظر نیتروژن محدودیت دارند، وجود منابع و نوع نیتروژن در دسترس در محیط‌های کشت دارای اهمیت زیاد است. فسفر نیز نقش اصلی و مؤثری بر تولید جلبک دارد و نسبت فسفر و نیتروژن تابعی از نوع منبع نیتروژنی نیز هست. سطوح بالاتر نیتروژن آمونیاکی برای برخی از ریزجلبک‌های دریایی ممکن است سمی باشد (Berges et al. 2001). لذا، عملکرد رشد نامطلوب ریزجلبک‌ها در محیط‌هایی با غلظت‌های بالا و نیز رقیق‌سازی و کاهش غلظت، ممکن است نیتروژن مناسب را در محیط کشت فراهم نکند. در این مطالعه، سولفات آمونیوم اصلی‌ترین منبع تأمین نیتروژن بود که در تیمارهای ۱۰۰٪، ۷۵٪، ۵۰٪ و ۲۵٪، میزان آن به‌ترتیب ۰/۸۳۴، ۰/۶۲۵۵، ۰/۴۱۷ و ۰/۲۰۸۵ میلی‌گرم در لیتر بود. در چهار غلظت به‌کار رفته در مطالعه حاضر، اوره در کنار سولفات آمونیوم و دی آمونیوم فسفات به عنوان منبع نیتروژن اضافی در غلظت بهینه، حضور داشت و می‌توان از دلایل رشد مطلوب ریزجلبک‌ها در محیط‌هایی با غلظت‌های مختلف بارورکننده‌ها را بهینه‌سازی این نسبت ها در فرمول با ۲۵٪ کوپر نسبت داد (Jad-Allah EI Nabris, 2012). اثر مطلوب آمونیوم بر رشد گونه‌های جلبکی مختلف تأیید شده است. مشخص شده است که آمونیوم توسط *Isochrysis galbana* هشت برابر سریع‌تر از نیترات، زمانی که با هم به محیط کشت اضافه شوند، مصرف می‌شود. جذب نیترات نیز در حضور آمونیوم، به عنوان منبع اصلی نیتروژن، به علت غیرفعال شدن آنزیم نیترات رداکتاز متوقف می‌شود (Valenzuela-Espinoza et al. 1999).

کود الیت آبی رنگ به‌کار گرفته شده در مطالعه حاضر، حاوی عناصر کمیاب ضروری مانند منیزیم، آهن، بر، مس و روی بود و از علل مشاهده نتایجی بهتر در غلظت‌های مختلف محیط‌های حاوی کودهای کشاورزی نسبت به بیشتر مشاهدات، وجود غلظت بهینه این عناصر است که در غلظت‌های مختلف در محدوده بهینه تعریف شده‌اند. گزارش شده است که گوگرد، منیزیم و آهن اثرات قابل توجهی بر سوخت‌وساز و فیزیولوژی ریزجلبک‌ها دارند (Barakoni et al. 2015). مس برای رشد ریزجلبک به‌خصوص برای واکنش‌های فتوسنتزی و فعالیت‌های آنزیمی، ضروری است. در مطالعه حاضر، همان‌طور که پیش از این نیز ذکر شد، بالاترین غلظت‌های ریزجلبکی در محیط‌های حاوی بارورکننده های کشاورزی در کم‌ترین میزان pH، به‌دست آمد که با مطالعات Valenzuela-Espinoza و همکاران (۱۹۹۹) و Jad-Allah EI Nabris (۲۰۱۲)، مغایرت دارد و تنها محیط F/2، نتایجی مشابه دیگر تحقیقات نشان داد. نکته قابل ذکر این است که با توجه به همه آزمایش‌های صورت گرفته، در این پژوهش نیز در نهایت انتظار می‌رفت که با گذشت زمان و افزایش تراکم ریزجلبک‌ها در محیط‌های کشت، pH افزایش یابد، ولی نتیجه به‌دست آمده برخلاف انتظار و مغایر نتایج تمام پژوهش‌های انجام شده بود. بسیاری از مطالعات درباره کشت گیاهان خشکی‌زی و جلبک‌ها نشان داده است که نسبت بین نیترات، نیتریت و آمونیوم نقش مهمی در میزان رشد دارد. با توجه به اینکه یون مهم نیتروژنی در محلول‌های ساخته شده از نیترات و اوره تامین شد لازم است که اثرات نسبت این یون‌ها در پژوهش‌های بعدی بر رشد جلبک ارزیابی شود. با وجود این، از آنجا که تغییرات درونی محیط کشت (مثلاً تغییرات مواد مغذی هم درون سلول‌های جلبک و هم در محیط بیرون) در این پژوهش بررسی نشد و در حال حاضر امکان ارایه دلیلی برای توجیه نتایج به‌دست آمده از اثر pH و نیز نوع ترکیب نیتروژنی محیط کشت برای محیط‌های حاوی نمک‌های کشاورزی تجاری در غلظت‌های مختلف وجود ندارد، نیاز است پژوهش‌های دیگری در این باره انجام شود.

از نظر اقتصادی، استفاده از کودهای تجاری کشاورزی به‌کار رفته در این پژوهش تا ۹۴٪ (حدود ۱۶ برابر) نسبت به استفاده از نمک های معدنی با درجه آزمایشگاهی (مانند نمک‌های برند مرک) برای تولید یک مترمکعب محیط کشت ریزجلبک‌های دریایی، صرفه‌جویی اقتصادی به همراه داشت (این محاسبه بدون در نظر گرفتن هزینه پرداختی برای ویتامین‌های محیط F/2 در نظر گرفته شده است). برتری کودهایی با درجه کشاورزی همراه با صرفه جویی بیشتر در هزینه ها نسبت به محیط متعارف F/2، در کشت جلبک کلرلا اقتصادی‌تر بود (Jad-Allah EI Nabris,

www.SID.ir

Archive of SID

2012). لذا، در مطالعه حاضر، امکان کاهش بخشی از هزینه‌های تفریخگاه ها، با ارائه فرمول‌بندی جدید امکان‌پذیر شد و سعی شد با به‌کارگیری نمک‌های مختلف تجاری، محیط کشت تجاری جدیدی برای تولید ریزجلبک کلرلا، مورد نیاز صنعت آبزی پروری ایران، معرفی شود.

از کودهای کشاورزی می‌توان به‌طور مؤثرتر از نمک‌ها با درجه آنالیتیک برای کشت جلبک استفاده کرد. با وجود این، باید این موضوع را در نظر گرفت که ترکیب محیط کشت نه تنها بر تولید سلول، بلکه بر ترکیب سلول‌ها و بازده محصول نیز تأثیر گذار است (Imamoglu et al. 2007). تاکنون، گزارشی در زمینه استفاده از کودهای تجاری کشاورزی برای کشت ریزجلبک دریایی کلرلا، به‌خصوص در کشت‌های استوک درون سالنی، ارائه نشده است. با توجه به نتایج به‌دست آمده از پژوهش حاضر، می‌توان گفت که ساخت محیط کشتی با غلظت ۲۵٪ از محلول کوپر و با استفاده از نمک‌های تجاری، بهترین محیط عملکردی برای رشد کلرلا در مقایسه با سه محیط دیگر با غلظت های متفاوت بود و با تیمار شاهد (F/2) قابل رقابت بود. لذا، مطالعه حاضر فرمولی جدید به صورت یک دستورالعمل، شامل ترکیبی از کودهای کشاورزی مانند اوره، سولفات آمونیوم، سولفات پتاسیم، کود الیت آبی، دی آمونیوم فسفات و محلول ویتامین ها به‌عنوان محیط کشت جدید برای رسیدن به بیشینه تراکم، قابل ارائه برای تولید انبوه کلرلا ارائه می‌کند.

منابع

Applebaum, S.L., Rønnestad, I. 2004. Absorption, assimilation and catabolism of individual free amino acids by larval Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). Aquaculture 230: 313-322.

Bae, J.H., Hur, S.B. 2011. Development of economical fertilizer-based media for mass culturing of *Nannochloropsis oceanica*. Fisheries and Aquatic Sciences (FAS) 14: 317-322.

Barakoni, R., Awal, S., Christie, A. 2015. Growth performance of the marine microalgae *Pavlova salina* and *Dunaliella tertiolecta* using different commercially available fertilizers in natural seawater and inland saline groundwater. Algal Biomass Utilization (JABU) 6: 15-25.

Berges, J.A., Franklin, D.J., Harrison, P.J. 2001. Evolution of artificial seawater medium: Improvement in enriched seawater, artificial water over the last two decades. Applied Phycology 37: 1138-1145.

Chia, M.A., Lombardi, A.T., Melãno, M.D.G.G. 2013. Growth and biochemical composition of *Chlorella vulgaris* in different growth media. Annals of the Brazilian Academy of Sciences 85: 1427-1438.

Corsini, M., Karydis, M. 1990. An algal medium based on fertilizers and its evaluation in mariculture. Applied Phycology *2*: 333-339.

Coutteau, P. 1996. Micro-algae. In: Lavens, P., Sorgeloos, P. (Eds.). 1996. Manual on the Production and Use of Live Food for Aquaculture (pp. 7-48). Rome: FAO Fisheries Technical Paper No. 361., 295 p.

Guillard, R.L.L. 1975. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In: Smith, W.L., Chanley, M.H., (Eds.). 1975. Culture of Marine Invertebrates Animals. Plenum Press, New York, 338 p.

Hargreaves, J.A. 2006. Photosynthetic suspended-growth systems in aquaculture. Aquacultural Engineering 34: 344-363.

Imamoglu, E., Sukan, E.F.V., Dalay, M.C. 2007. Effect of different culture media and light intensities on growth of *Haematococcus pluvialis*. International Journal of Natural and Engineering Sciences 1: 5-9.

Jad-Allah El Nabris, K. 2012. Development of cheap and simple culture medium for the *Nannochloropsis* sp. based on agriculture grade fertilizers available in the local market of Gaza Strip (Palestine). Al Azhar University-Gaza (Natural Sciences) 14: 61-67

Kanlis, G., Elefteriadis, E., Papadopoulos, G., Arapoglou, P., Krey, G., Manos, G.

www.SID.ir

Archive of SID

2004. Environmental friendly fertilizers for the intensive production of high-quality sea algae at a low cost. Paper presented at the 3rd European Conference on Pesticides and Related Organic Micro-pollutants in the Environment.

Lananan, F., Juso, A., Ali, N., Lam, S.S., Endut, A. 2013. Effect of Conway medium and F/2 medium on the growth of six genera of South China Sea marine microalgae. Bioresource Technology 141: 75-82.

Lee, K., Lee, C.G. 2002. Nitrogen removal from wastewaters by microalgae without consuming organic carbon sources. Journal of Microbiology and Biotechnology 2: 979-985.

Loong, T.C., Wee, L.L., Idris, A. 2013. Comparison of Walne and F/2 medium in cultivating *Tetraselmis* sp. And *Nannochloropsis* sp. for biomass and lipid production. International Conference on Industrial Engineering and Management Science (ICIEMS 2013), 43-49.

Perumal, S.A.R.T., Pachiappan, P. (Editors). 2015. Advances in Marine and Brackish water Aquaculture. Springer India, 262 p.

Quinn, J.C., Yates, T., Douglas, N., Weyer, K., Butler, J., Bradley, T.H., Lammers, P.J. 2012. *Nannochloropsis* production metrics in a scalable outdoor photobioreactor for commercial applications. Bioresource Technology 117: 164-171.

Rafiee, G.R., Saad, C.R., Kamarudin, M.S., Sijam, K., Ismail, M.R., Yusoq, K. 2002. Use of aquaculture wastewaters as nutrient solutions for growth of lettuce (*Lactuca savita var. longifolia*). Proceeding of Asia-Pacific Conference on marine Science and technology, "Marine Science into the New Millennium" 12-16 may, Kuala Lumpur, Malaysia, 354-360.

Rahman Shah, M.D.M., Lutzu, G.A., Alam, M.D.A., Sarker, P., Chowdhury, M.A.K., Parsaeimehr, A., Liang, Y., Daroch, M. 2017. Microalgae in aquafeeds for a sustainable aquaculture industry. Applied Phycology 289: 1-17.

Sarma, S., Araiza, M.A.F., Nandini, S. 1999. Competition between *Brachionus calyciflorus* Pallas and *Brachionus patulus* (Müller) (Rotifera) in relation to algal food concentration and initial population density. Aquatic Ecology 33: 339-345.

Sengupta, S., Nawaz, T., Beaudry, J. 2015. Nitrogen and phosphorus recovery from wastewater. Current Pollution Reports 1: 155-166.

Simental, J.A., Sánchez-Saavedra, M.P. 2003. The effect of agricultural fertilizer on growth rate of benthic diatoms. Aquacultural Engineering 27: 265-272.

Tubea, B., Hawxby, K., Mehta, R. 1981. The effect of nutrient, pH and herbicide levels on algal growth. Hydrobiologia 79: 221-227.

Valenzuela-Espinoza, E., Millán-Núñez, R., Núñez-Cebrero, F. 1999. Biomass production and nutrient uptake by *Isochrysis aff. galbana* (Clone T-ISO) culture with a low cost alternative to the f/2 medium. Aquacultural Engineering 20: 135-147.

www.SID.ir

Archive of SID

Effects of different media in production of marine microalgae *Chlorella* spp. using commercial agriculture fertilizers

Gholamreza Rafiee*, Kamran Rezaei Tavabe, Nazanin Motamedi
Fisheries Department, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Alborz, Iran.

Received 04 June 2019; accepted 06 August 2019

Abstract
Algae play an important role as primary feed in aquatic ecosystems and as food for zoo-planktons which are also important for the aquatic animals husbandry in larval stages. Thus, their production at the industrial scale is important. The marine microalgae *Chlorella* sp. was cultured under small-scale, batch culture condition, to evaluate the differences in growth rates (biomass production): using commercial agriculture fertilizers and analytical grade of inorganic salts for 20 days. Five different culture media were formulated as treatments including different concentration (%) of Cooper hydroponic culture media ($T_{100\%}$, $T_{75\%}$, $T_{50\%}$ and $T_{25\%}$) and a control group, i.e. F/2 medium (T_0) which is commonly used for microalgae cultivation in commercial aquaculture without Cooper media. *Chlorella* sp. exhibited better results in $T_{25\%}$ during different experimental time interval. Results also revealed that $T_{25\%}$ is highly cost-effective as well, since it was almost 94% (sixteen times) cheaper than F/2 medium. The results suggest that commercial agricultural fertilizers could be added to the marine microalgae culture medium for providing the analytical grade nutrients with no significant side effect on the medium.

Keywords: *Chlorella* sp., Algae medium, Commercial agricultural salts, Biomass production.

Corresponding author: ghrafiee@ut.ac.ir

www.SID.ir