

# ارائه محیط کشت جدید برای تولید حداکثری ریزجلبک‌های دریایی ایزوکرایسیس (*Isochrysis* sp.)

نازنین معتمدی، غلامرضا رفیعی\*، کامران رضایی توابع

گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران.

\*نویسنده مسئول: ghrafiee@ut.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۹۹/۱/۲۷

تاریخ دریافت: ۹۷/۱۲/۳

## چکیده

این پژوهش با هدف بهینه‌سازی تولید زیست‌توده با حداقل هزینه‌های اقتصادی ریز جلبک دریایی ایزوکرایسیس (*Isochrysis* sp.) با استفاده از ترکیبات کودهای کشاورزی انجام گردید. برای انجام این تحقیق، رشد ریزجلبک‌های دریایی ایزوکرایسیس به روش کشت دسته‌ای با بکار بردن نمک‌های تجاری کشاورزی در مقایسه با نمک‌های معدنی با درجه آنالیتیک در مدت ۲۰ روز مورد ارزیابی قرار گرفت. در این تحقیق، چهار فرمول‌بندی جدید به عنوان محیط‌های کشت جلبک ایزوکرایسیس با به کارگیری غلظت‌های مختلف محلول کوپر (۱۰۰، ۷۵، ۵۰ و ۲۵ درصد) و نمک‌های تجاری تهیه گردید و عملکرد تولیدی این فرمول‌بندی با محیط کشت (F/2) به‌عنوان رایج‌ترین محیط کشت جلبک ایزوکرایسیس، که به‌طور معمول برای کشت در مقیاس آزمایشگاهی به کار می‌رود، مقایسه شدند. رشد و تراکم ریزجلبک ایزوکرایسیس در محیط F/2 در مقایسه با محیط کشت دارای غلظت ۷۵٪ محلول کوپر اختلاف معنی‌داری را نشان نداد ( $P > 0.05$ ). در نتیجه محیط کشت تیمار با غلظت ۷۵٪ کوپر برای ریز جلبک ایزوکرایسیس از نظر اقتصادی و تولید زیست توده در شرایط بهتری نسبت به سایر تیمارها قرار دارد. این تیمار علاوه بر تولید ریزجلبک نسبت به محیط F/2، هزینه تولیدی آن حدود ۱۶ برابر (بدون در نظر گرفتن هزینه برای ویتامین‌ها با درجه آنالیتیک) ارزان‌تر بود. نتایج نشان داد که با استفاده از نمک‌های تجاری کشاورزی می‌توان محیط کشت جدیدی را بدون اثرات منفی بر رشد ریزجلبک تولید کرد که می‌تواند یک جایگزین مناسب در کشت ریزجلبک دریایی ایزوکرایسیس باشد.

واژگان کلیدی: ایزوکرایسیس، محیط کشت، اقتصاد تولید، کودهای تجاری، زیست‌توده.

## مقدمه

صنعت آبی‌پروری می‌تواند به هزینه بالای تولید، وجود دیواره سلولی با هضم کم در برخی از آن‌ها، آلوده شدن زیست توده در میزان بالای تولید اشاره کرد. تغییرات فیزیولوژیکی زیست‌توده جلبک به شرایط محیطی که جلبک در آن رشد می‌کند، بستگی دارد (Chia et al., 2013). دستکاری به-منظور کنترل شرایط بیوشیمیایی و رشد با تمرکز بر ترکیبات خاص و بهره‌وری بالاتر انجام می‌شود. بنابراین، انتخاب یک محیط ارزان عملکرد تولیدی محصول ریزجلبک را برای منافع بزرگ، بهبود می-بخشد (Rahman Shah et al., 2017).

در حال حاضر، هزینه بالای تولید ریزجلبک باعث ایجاد محدودیت‌هایی در صنعت آبی‌پروری و از چالش‌های پیش‌روی پرورش‌دهندگان شده است.

استفاده از ریزجلبک‌ها به علت کیفیت تغذیه‌ای و اثر مثبت بر رشد آبزیان به دلیل افزایش تجمع تری-گلیسیرید و پروتئین در ماهیچه‌ها، بهبود مقاومت در برابر بیماری‌ها، کاهش نیتروژن خروجی به محیط، فعالیت‌های فیزیولوژیکی و کیفیت لاشه به‌طور بالقوه می‌توانند با برخی از مواد معمول در غذای آبی جایگزین شده و یا مصرف آن‌ها را کاهش دهند. از مزایای دیگر ریزجلبک‌ها می‌توان به رشد آن‌ها در طیف وسیعی از زیستگاه‌ها، تولید چند برابری زیست توده، داشتن نیازهای غذایی ساده و بالا بودن سرعت تقسیم آن‌ها و توانایی تجمع متابولیت‌های مهم اشاره کرد. از موانع و چالش‌های پیش‌رو در استفاده از ریزجلبک‌ها برای جایگزینی پودر و روغن ماهی در

ارایه داده‌اند؛ و گفته‌اند که امکان فرمول‌بندی علمی با قابلیت اجرایی شدن این نمک‌های تجاری برای رشد ریزجلبک‌ها وجود ندارد (Barakoni *et al.*, 2015). از این‌رو مطالعه حاضر با هدف امکان تولید ریزجلبک دریایی ایزوکرایسیس (*Isochrysis sp.*) با به کارگیری نمک‌های تجاری در کنار درصدهای مختلف محیط کشت کوپر برای ارائه محیط کشت-های مختلف و مقایسه آن‌ها با محیط کشت استاندارد F/2 انجام شد.

### مواد و روش‌ها

**تهیه و افزایش کشت ریزجلبک‌های دریایی:** ریزجلبک ایزوکرایسیس از مرکز تحقیقات نرم‌تنان خلیج فارس - بندرلنگه تهیه گردید و به آزمایشگاه تکثیر و پرورش آبزیان دانشکده منابع طبیعی دانشگاه تهران منتقل شد. برای افزایش ذخیره اولیه، ابتدا در ظروف پنج لیتری میزان سه لیتر آب نمک ۲۴ گرم در لیتر از نمک دریای خلیج فارس تهیه شد و هر ظرف به مدت یک شبانه روز تحت هوادهی در دمای ۲۳ درجه سانتی‌گراد و نور طبیعی اتاق قرار گرفت. سپس محیط کشت F/2 (Guillard, 1975) براساس روش Perumal و همکاران (۲۰۱۵) به ظرف وارد شد و تحت شرایط محیطی روز قبل کشت داده شد. در روز سوم، ریزجلبک به میزان ۶۰ میلی‌لیتر به ازای هر لیتر محیط کشت، به ظرف تلقیح و به مدت یک هفته تحت هوادهی (در ابتدا کم و با بلوم جلبکی بر میزان آن افزوده شد)، شرایط نوری ۲۴ ساعت روشنایی (۰:۲۴) (با شدت نور ۲۰۰۰ لوکس) و دمای محیط ۲۳ درجه سانتی‌گراد بود. در پایان تحقیق به مدت ۲۰ روز شمارش ریزجلبک‌ها انجام گردید (جدول ۱).

**طرح آزمایش و تیمارها:** این پژوهش شامل پنج تیمار با سه تکرار در قالب یک طرح کاملاً تصادفی انجام شد. محیط شاهد (تیمار ۱)، محیط استاندارد F/2 بود. چهار تیمار دیگر براساس مطالعات بر روی محیط کوپر (Rafiee *et al.*, 2002) در غلظت‌های

هزینه‌های تولید بالای ریزجلبک از طریق محیط کشت‌های موجود مانند F/2 (Guillard, 1975) برای کشت در مقیاس وسیع از جمله مشکلات صنعت آبی‌پروری است. آماده‌سازی محیط رشد، تعیین کننده بخش قابل توجهی از هزینه‌های اجرایی در روند پرورش ماهی می‌باشد. ۳۰-۴۰ درصد از هزینه‌های راه‌اندازی تفریخگاه‌های دریایی مربوط به کشت ریزجلبک است (Jad-Allah El Nabris, 2012). با توجه به این موضوع تلاش‌هایی برای کاهش هزینه‌ها به وسیله تولید در تراکم بالا، یا جایگزینی محیط‌های استاندارد پرورش جلبک با کودهای کشاورزی ارزان قیمت انجام شده است (Corsini and Karydis, 1999). با این حال استفاده تنها از کودهای کشاورزی، منجر به بروز مشکل رشد سلولی کم‌تر نسبت به محیط‌های کشت معمول مانند F/2 می‌شود.

در طول چند دهه گذشته، مطالعات مختلفی به منظور توسعه فرمول‌های مختلف محیط کشت برای گونه‌های مختلف ریزجلبک به وسیله جایگزینی مواد شیمیایی با درجه‌بندی آنالیتیک با کودهای کشاورزی به‌عنوان نوترینت انجام شده است (Corsini and Karydis, 1990; Valenzuela-Espinoza *et al.*, 1999; Simental and Sánchez-Saavedra, 2003; Kanlis *et al.*, 2004; Bae and Hur, 2011; Jad-Allah El Nabris, 2012; Chia *et al.*, 2013; Barakoni *et al.*, 2015). در این راستا، نیاز به ارایه فرمول‌های جدید با توجه به صنعت رو به رشد آبزیان، وجود شرایط محیطی مختلف، تنوع گونه‌ای و سویه‌های متفاوت ضروری است. محیط‌های حاوی بارور کننده‌های کشاورزی که در این تحقیق و بسیاری از پژوهش‌های دیگر مورد بررسی قرار می‌گیرند؛ به علت ناخالص بودن می‌توانند دارای فرمول‌بندی یکسانی نباشند، ولی با توجه به آنالیز ترکیب آن‌ها امکان رسیدن به فرمول‌بندی‌های جدید وجود دارد. برای اجرایی شدن این عملکرد و مقایسه آن‌ها با فرمول‌های پیشنهادی پژوهشگرانی که با مصرف نمک‌های آنالیتیک فرمول‌های استاندارد

جدول ۱ - تعداد سلول در میلی‌لیتر در زمان استوک گیری و در زمان ورود به تیمارها.

نام ریزجلبک	تعداد سلول در میلی‌لیتر در زمان استوک گیری	تعداد سلول در میلی‌لیتر ورودی به هر تیمار
ایزوکرایسیس	$3/5 \times 10^6$	$0/21 \times 10^6$

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	بور	مس	روی	نیتريت
درصد	۱۱/۳۹	۴/۱۳	صفر	۸	۱۴	۳/۴۱۶	۳	۳۴	۱۹/۷	۰/۳	۱/۸۴	۰/۳	۰/۲	۰/۰۶

جدول ۳ - مقادیر مصرف نمک‌های معدنی (گرم در لیتر) بر اساس فرمول کوپر.

نوع بارورکننده	غلظت محیط کشت کوپر			
	تیمار با کد ۲	تیمار با کد ۳	تیمار با کد ۴	تیمار با کد ۵
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

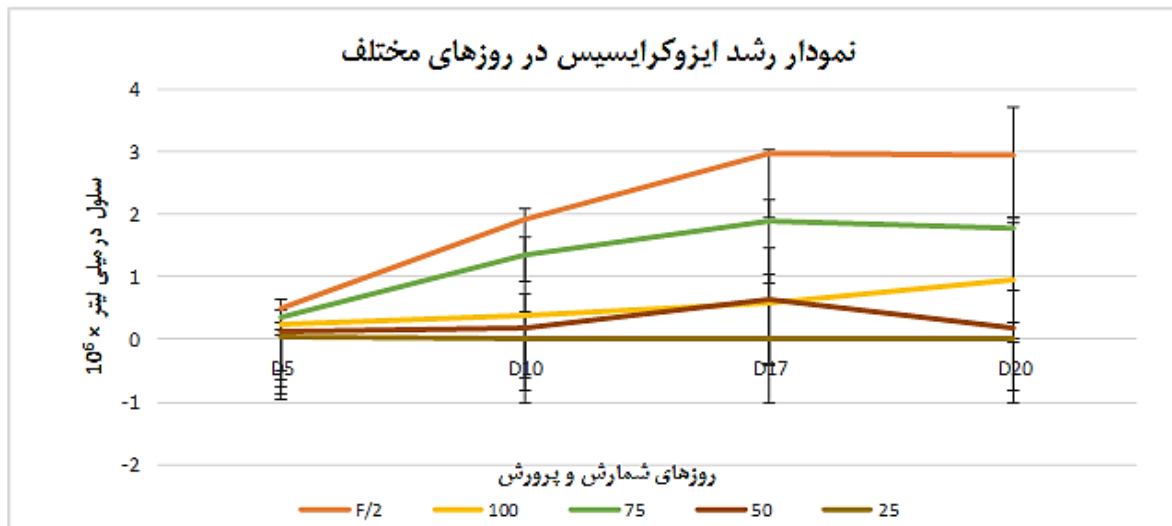
**تجزیه و تحلیل داده‌ها:** برای مقایسه متغیرها بین تیمارهای آزمایشی از آنالیز واریانس یک طرفه (One way-ANOVA) در نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۷ استفاده شد. برای تعیین سطح معنی‌دار بودن در بین میانگین‌ها از آزمون دانکن استفاده شد. داده‌های pH ابتدا به غلظت  $H^+$  تبدیل و بعد مورد ارزیابی قرار گرفت. رسم نمودارها در نرم‌افزار اکسل ۲۰۱۶ انجام شد.

### نتایج

رشد ریزجلبک در بین تیمارها اختلاف معنی‌داری داشت ( $P < 0/05$ ). نمودار رشد جلبک با نقاط رفرنس در روزهای پنجم (D5)، دهم (D10)، هفدهم (D17) و بیستم (D20) در شکل ۱ آورده شده است. از روز دهم و در دومین شمارش، عدم رشد جلبک در تیمار حاوی ۲۵ درصد مشاهده شد. حداکثر تراکم در روز هفدهم و به ترتیب در محیط‌های F/2 با تراکم  $2 \times 10^6 \pm 0/84852 \times 10^6$  و تیمار با غلظت ۷۵ درصد با تولید  $1/89 \times 10^6 \pm 0/353553 \times 10^6$  سلول در میلی لیتر بدون تفاوت معنی‌دار نشان داد ( $P > 0/05$ ) (شکل ۱). تیمارها با غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ درصد نیز در این روز به حداکثر غلظت خود

مختلف ۱۰۰ (تیمار ۲)، ۷۵ (تیمار ۳)، ۵۰ (تیمار ۴) و ۲۵ (تیمار ۵) درصد با استفاده از نمک‌های تجاری کشاورزی تهیه شدند (جدول ۳). کود الیت آبی رنگ به کار رفته در این تحقیق نیز تعیین پروفایل یونی شد (جدول ۲). نمک‌ها و مواد به کار رفته در این پژوهش، با ترازوی آزمایشگاهی با دقت ۰/۰۱ میلی‌گرم توزین شدند.

**شرح آزمایش:** مدت زمان آزمایش براساس پیش آزمایش‌ها، ۲۰ روز در نظر گرفته شد. در این مدت چهار تا پنج بار نمونه‌گیری برای تعیین تراکم جلبکی و خصوصیات فیزیکی آب انجام گرفت. پیش از تلقیح ریزجلبک‌ها به محیط‌های کشت، ابتدا شوری به وسیله دستگاه شوری‌سنج و پی‌اچ با دستگاه پی‌اچ متر (BANTE Instruments, Benchtop) (pH/mV Meter 210) ثبت شد. شوری برای تیمارها  $25 \pm 1$  گرم در لیتر در نظر گرفته شد. بر روی هر ظرف پرورشی دو منفذ یکی برای عبور لوله هواده و دیگری برای کاهش فشار و خروج هوا تعبیه شد. در مدت تحقیق، هیچ ماده مغذی به تیمارها وارد نشد. شمارش جلبک‌ها با برداشت ۱۰ میکرولیتر نمونه با سمپلر (Labtron، ایران) و بر روی لام نئوبار با استفاده از میکروسکوپ نوری انجام شد.



شکل ۱ - نمودار روند تغییرات تراکم سلولی ( میانگین سلول در میلی لیتر  $\pm$  SD  $\times 10^6$  ) ریز جلبک ایزووکرایسیس در طول دوره تحقیق در تیمارهای مختلف (بدون لگاریتم گیری از اعداد).

جدول ۴ - روند تغییرات pH در تیمارهای محیط کشت مختلف ریز جلبک ایزووکرایسیس در طول مدت آزمایش (میانگین  $\pm$  SD).

تیمار	زمان	روز پنجم	روز دهم	روز هفدهم	روز بیستم
محیط کشت F/2		۸/۴۶ $\pm$ ۰/۰۶ <sup>d</sup>	۸/۵۵ $\pm$ ۰/۰۰ <sup>d</sup>	۸/۶۷ $\pm$ ۰/۰۴ <sup>d</sup>	۸/۶۸ $\pm$ ۰/۰۶ <sup>d</sup>
تیمار ۱۰۰ درصد کوپر		۶/۹۶ $\pm$ ۰/۱۵ <sup>a*</sup>	۶/۸۰ $\pm$ ۰/۰۶ <sup>a</sup>	۶/۷۸ $\pm$ ۰/۰۲ <sup>a</sup>	۶/۸۰ $\pm$ ۰/۰۲ <sup>b</sup>
تیمار ۷۵ درصد کوپر		۶/۹۲ $\pm$ ۰/۰۹ <sup>a</sup>	۶/۷۸ $\pm$ ۰/۱۳ <sup>a</sup>	۶/۸۰ $\pm$ ۰/۰۱ <sup>a</sup>	۶/۸۴ $\pm$ ۰/۱۲ <sup>bc</sup>
تیمار ۵۰ درصد کوپر		۷/۳۲ $\pm$ ۰/۰۲ <sup>b</sup>	۷/۱۴ $\pm$ ۰/۰۴ <sup>b</sup>	۷/۱۲ $\pm$ ۰/۰۰ <sup>b</sup>	۷/۱۱ $\pm$ ۰/۰۶ <sup>c</sup>
تیمار ۲۵ درصد کوپر		۸/۱۵ $\pm$ ۰/۰۰ <sup>c</sup>	۸/۰۳ $\pm$ ۰/۰۵ <sup>c</sup>	۷/۹۶ $\pm$ ۰/۰۲ <sup>c</sup>	- <sup>a</sup>
		ریزش	ریزش	ریزش	عدم اندازه گیری

\*حروف انگلیسی یکسان در بالای اعداد در هر ستون نشان دهنده عدم اختلاف معنی دار در بین میانگین‌ها در سطح اعتماد ۰/۰۵ می باشد.

غلظت ۱۰۰٪ تقریباً به یک میزان بود. فقط تیمار F/2 بود که از روز پنجم تا روز بیستم روند افزایشی داشت و به میزان  $۸/۶۸ \pm ۰/۰۶$  در روز بیستم رسید و بالاترین میزان pH را در میان تیمارها در مدت بیست روز نشان داد. میزان pH برای این تیمار در زمان حداکثر تراکم در روز هفدهم  $۸/۶۷ \pm ۰/۰۴$  ثبت شد. برای تیمار با غلظت ۲۵٪، با وجود قرار گرفتن pH در محدوده مطلوب، بعد از اندازه گیری روز پنجم دچار ریزش شد.

#### بحث

نتایج نشان داد که تولید ریز جلبک / ایزووکرایسیس با بکارگیری فرمول‌ها و غلظت‌های مورد بررسی در این تحقیق براساس نمک‌های تجاری کشاورزی امکان پذیر

رسیده بودند و در رتبه های بعدی قرار داشتند. نتایج نشان داد که تولید ریز جلبک دریایی ایزووکرایسیس با بکارگیری محیط کشت‌های استاندارد و همچنین با فرمول‌های جدید تحقیق حاضر امکان پذیر است. نتایج برتری نسبی محیط F/2 را نشان داد و همچنین براساس این نتایج با غلظت ۷۵ امکان جایگزینی داشت (شکل ۱).

به طور کلی از روز پنجم تا روز بیستم بین تیمارها اختلاف معنی داری مشاهده شد ( $P < ۰/۰۵$ ) (جدول ۴). میزان pH برای تمام تیمارهای حاوی نمک‌های کشاورزی تجاری در مدت آزمایش، در روز پنجم حداکثر بود. میزان pH در تیمار با غلظت ۷۵٪ در روز پنجم  $۶/۹۲ \pm ۰/۰۹$  بود و در روز هفدهم با حداکثر تراکم به  $۶/۸۰ \pm ۰/۱۰$  رسید، و با تیمار در

جلبک می باشد و غلظت آن در محیط‌های دریایی بسیار پایین است. بسیاری از جلبک‌ها در آب‌هایی با میزان بالای نیتروژن رشد مطلوبی را نشان می‌دهند. گرچه بیان شده است که سطوح بالاتر نیتروژن و آمونیوم برای برخی از ریزجلبک‌های دریایی می‌تواند سمی باشد (Berges *et al.*, 2001). بنابراین عملکرد رشد نامطلوب ریزجلبک‌ها در محیط‌ها با غلظت‌های بالای فسفر و نیز رقیق‌سازی و کاهش غلظت، ممکن است نیتروژن مناسب را در محیط کشت فراهم نکند. در این تحقیق سولفات آمونیوم اصلی‌ترین منبع تأمین نیتروژن بود که در تیمار با غلظت‌های ۱۰۰٪، میزان آن ۰/۸۳۴ میلی‌گرم در لیتر، با غلظت ۷۵٪، ۰/۶۲۵۵ میلی‌گرم در لیتر، با غلظت ۵۰٪، ۰/۴۱۷ میلی‌گرم در لیتر و با غلظت ۲۵٪، ۰/۲۰۸۵ میلی‌گرم در لیتر بود. در چهار غلظت پژوهش حاضر، اوره در کنار سولفات آمونیوم و دی آمونیوم فسفات به‌عنوان منبع نیتروژن اضافی در غلظت بهینه حضور داشت و می‌توان یکی از دلایل رشد مطلوب ریزجلبک‌ها در محیط با غلظت‌های مختلف بارورکننده‌ها را به نوع منبع تأمین کننده نیتروژن نسبت داد. برتری آمونیوم بیش از انواع دیگر منابع نیتروژنی به‌علت شرایط احیایی آن مطلوبیت دارد (Jad-Allah EI Nabris, 2012). اثر مطلوب آمونیوم بر رشد گونه‌های جلبکی مختلف تأیید شده است. آمونیوم توسط ایزوکرایسیس *گالبانا* هشت برابر سریع‌تر از نیترات در مقایسه با محیط‌های با غلظت مشابه نیتروژن نیتراتی مصرف می‌شود و جذب نیترات در حضور آمونیوم؛ زمانی که غلظت آمونیوم به عنوان منبع اصلی نیتروژن حضور دارد، به‌علت غیرفعال شدن آنزیم نیترات رداکتاز متوقف می‌شود (Valenzuela-Espinoza *et al.*, 1999).

کود تجاری مطالعه حاضر، عناصر کمیاب ضروری مانند منیزیم، آهن، بور، مس و روی را در برداشت و از علل مشاهده نتایجی بهتر در غلظت‌های مختلف محیط‌های حاوی کودهای کشاورزی وجود غلظت بهینه از این عناصر می‌باشد که در غلظت‌های مختلف

است. تنظیم مواد معدنی مورد نیاز جلبک یک فاکتور بسیار مهم در عملکرد رشد ریزجلبک‌ها می‌باشد. یکی از مهم‌ترین شاخص‌های رشد، حداکثر رشد یا تراکم سلولی است که تراکم سلولی بالا امکان کاربردهای کشت انبوه را برای تولیدات آبی پروری، سوخت زیستی و یا اهداف دارویی را فراهم می‌کند (Quinn *et al.*, 2012; Lananan *et al.*, 2013). باید توجه داشت که حداکثر تراکم سلولی تنها یکی از ویژگی‌های تعیین عملکرد رشدی در ریزجلبک‌ها است. در برخی از کاربردهای تجاری و صنعتی (مثل تصفیه فاضلاب)، جنس‌هایی از ریزجلبک‌ها با میزان رشد سریع‌تر، نسبت به آن‌هایی که حداکثر تراکم سلولی را داشته‌اند، ترجیح داده می‌شوند (Lananan *et al.*, 2013). دلیل مطلوبیت F/2 برای ریزجلبک‌ها نسبت نیتروژن به فسفر (۱:۱۶) در غلظت کم، بیان شده است. محیط‌هایی با غلظت کم‌تر برای ایزوکرایسیس نتایج خوبی در پی نداشت که با دیگر نتایج در ارتباط با ریزجلبک پاولووا سالینا در محیط‌های رقیق شده مطابقت داشت (Barakoni *et al.*, 2015). این موضوع نشان داد که کودهای کشاورزی با نسب نیتروژن به فسفر (۱ : ۴) با غلظت کم‌تر یا بیش‌تر عناصر بهینه، ممکن است رشد ریزجلبک‌هایی مانند ایزوکرایسیس را محدود کند.

جلبک‌های طلایی قهوه‌ای تحمل بسیار پایین‌تری در برابر غلظت‌های مختلف درشت مغذی‌ها نشان می‌دهند که آن‌ها را از ساختار سلولی و بیولوژیکی جلبک‌های سبز و سبزلایی متمایز می‌کند. سایر ترکیب‌های به‌کار رفته در محیط حاوی کودها و سطوح تحمل ریزجلبک‌ها، از عواملی هستند که می‌توانند در نتایج اثرگذار باشند. از دیگر دلایل تأثیرگذار در نتایج این تحقیق می‌توان به سطوح بالاتر عناصر دیگر در محیط‌های حاوی بارورکننده‌های کشاورزی نسبت داد. افزایش سطوح مواد مغذی محلول می‌تواند اکوسیستم‌های آبیان را به‌وسیله تحریک رشد جلبک‌ها، تغییر دهد (Tubea *et al.*, 1981). از آن‌جایی که نیتروژن ماده اصلی مغذی برای کشت

کشاورزی در این پژوهش تا حدود ۱۶ برابر نسبت به استفاده از نمک‌های معدنی با درجه آزمایشگاهی برای تولید یک مترمکعب محیط کشت ریزجلبک های دریایی صرفه جویی اقتصادی به همراه داشت (این محاسبه بدون در نظر گرفتن هزینه پرداختی برای ویتامین‌های محیط  $F/2$  و حداقل بسته بندی که قابل تهیه بود، در نظر گرفته شده است). تولید محیط کشت جدید و فرمول‌بندی بر مبنای محیط کشت هیدرو پونیک پایه یا کوپر، صرفه‌جویی بیش‌تر در کاهش هزینه‌ها را نسبت به محیط متعارف  $F/2$  نشان داد.

به‌عنوان نتیجه‌گیری می‌توان بیان داشت که از کودهای تجاری کشاورزی می‌توان برای ایجاد یک فرمول‌بندی جدید جهت کشت جلبک‌های دریایی استفاده کرد. با این حال، این موضوع را باید 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). با توجه به نتایج ساخت محیط‌های کشت با بکارگیری غلظت‌های  $75\%$  از محلول کوپر و با استفاده از نمک‌های تجاری، بهترین محیط عملکردی برای رشد جنس ریزجلبک *ایزوکرایسیس* دارد. بنابراین دستورالعملی شامل ترکیبی از کودهای کشاورزی مانند اوره، سولفات آمونیوم، سولفات پتاسیم، کود الیت آبی، دی آمونیوم فسفات و محلول ویتامین‌ها به‌عنوان محیط‌های کشت جدید برای رسیدن به حداکثر تراکم، برای تولید انبوه جلبک *ایزوکرایسیس* ارائه گردید.

#### منابع

- 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(4), 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

در محدوده بهینه تعریف شده‌اند. گوگرد، منیزیم و آهن اثرات قابل توجهی بر متابولیسم و فیزیولوژی ریزجلبک‌ها دارند و مس برای رشد ریزجلبک به ویژه برای واکنش‌های فتوسنتزی و فعالیت‌های آنزیمی، ضروری می‌باشد (Barakoni *et al.*, 2015).

بیشترین میزان pH در تیمار  $75\%$  در زمان حداکثر تراکم در روز هفدهم  $8.67 \pm 0.04$  ثبت شد. برای تیمار با غلظت  $25\%$ ، با وجود قرار گرفتن pH در محدوده مطلوب، بعد از اندازه‌گیری روز پنجم، جلبک دچار ریزش شد که نشان داد عوامل دیگری غیر از pH در این امر دخالت داشتند. در این تحقیق بالاترین غلظت‌های ریزجلبکی در محیط‌های حاوی بارورکننده‌های کشاورزی در کم‌ترین میزان pH به دست آمد که با مطالعات سایر پژوهشگران همخوانی داشت (Valenzuela-Espinoza *et al.*, 1999; Jad-Allah EI Nabris, 2012). همچنین در این پژوهش هیچ کنترلی بر pH انجام نشد، اما در محیط‌های کشت جدید، در زمان حداکثر تراکم برای ریزجلبک *ایزوکرایسیس*، از روز اول تا روز بیستم میزان pH نوسانات کاهشی و افزایشی را نشان داد که با نتایج سایر مطالعات مغایرت دارد (Valenzuela-Espinoza *et al.*, 1999; Jad-Allah EI Nabris, 2012) و در محیط  $F/2$ ، نتایجی مشابه با سایر تحقیقات داشت. با توجه به همه آزمایش‌های انجام شده در ارتباط با به‌کارگیری بارورکننده‌ها، در این پژوهش نیز انتظار می‌رفت که با گذشت زمان و افزایش تراکم ریزجلبک‌ها در محیط‌های کشت، pH افزایش یابد. ولی نتیجه برخلاف انتظار بود. از آنجا که تغییرات محیط کشت (مثل تغییرات مواد مغذی هم درون سلول‌های جلبک و هم در محیط بیرون) مورد بررسی قرار نگرفت و در حال حاضر امکان ارائه دلیلی برای توجیه نتایج به‌دست آمده از pH برای محیط‌های حاوی نمک‌های کشاورزی تجاری در غلظت‌های مختلف وجود ندارد، نیاز است این موضوع در پژوهش‌های آتی مورد ارزیابی قرار گیرد. از نظر اقتصادی، استفاده از کودهای تجاری

- Nannochloropsis* production metrics in a scalable outdoor photobioreactor for commercial applications. *Bioresource Technology* 117, 164-171.
- Rahman Shah M.D.M., Lutz G.A., Alam M.D.A., Sarker P., Chowdhury M.A.K., Parsaeimehr A., Liang Y., Daroch M. 2017. Microalgae in aqua-feeds for a sustainable aquaculture industry. *Applied Phycology* 289, 1-17.
- Rafiee G.R., Saad C.R., Kamarudin M.S., Sijam K., Ismail M.R., Yusof 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. pp. 354-360.
- 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(3), 221-227.
- Valenzuela-Espinoza E., Millán-Núñez R., Núñez-Cabrero 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.
- inland saline groundwater. *Algal Biomass Utilization (JABU)* 6(1), 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., Melão M.D.G.G. 2013. Growth and biochemical composition of *Chlorella vulgaris* in different growth media. *Annals of the Brazilian Academy of Sciences* 85(4), 1427-1438.
- Corsini M., Karydis M. 1990. An algal medium based on fertilizers and its evaluation in mariculture. *Applied Phycology* 2, 333-339.
- Guillard R.L.L. 1975. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In: W.L. Smith, M.H. Chanley, (Eds.), *Culture of Marine Invertebrates Animals*. Plenum Press, New York, pp. 29-60.
- 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(3), 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., Eleftheriadis E., Papadopoulos G., Arapoglou P., Krey G., Manos G. 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 Micropollutants 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.
- Perumal S.A.R.T., Pachiappan P. 2015. Advances in marine and brackishwater aquaculture. *Springer (India) Pvt. Ltd. is part of Springer science + Business Media (www.Springer.com)*. - *Isolation and Culture of Microalga*, 1-15, 226 p.
- Quinn J.C., Yates T., Douglas N., Weyer K., Butler J., Bradley T.H., Lammers P.J. 2012.

## Formulation of new medium for production of marine microalgae, *Isochrysis* sp.

Nazanin Motamedi, Gholamreza Rafiee\*, Kamran Rezaei Tavabe

Department of Fisheries, Natural Resources Faculty, University of Tehran, Karaj, Iran.

\*Corresponding author: ghrafiee@ut.ac.ir

Received: 2019/2/22

Accepted: 2020/15/4

### Abstract

This study was conducted to optimize the marine microalgae *Isochrysis* sp. biomass by minimum economic cost using agriculture fertilizers. For this purpose, microalgae *Isochrysis* sp. was cultured under batch culture condition using agriculture fertilizers to evaluate the differences in growth rate (biomass production) with those of analytical grade for 20 days. Four different culture media were prepared based on 100, 75, 50 and 25% cooper formula using commercial agriculture fertilizers and analytical grade inorganic salts and compared with F/2 medium as commonly used media for microalgae cultivation in laboratory scale. *Isochrysis* sp. showed better results in F/2 medium in terms of growth and intensity, however, no significant difference was found compared to medium 75% ( $P>0.05$ ). This treatment i.e. medium 75% cooper for marine microalgae *Isochrysis* sp. is economically and biomass production have better conditions compared to other treatments. This treatment in addition to the marine microalgae compared to F/2, its cost is about 16 times lower (without consideration of the vitamins analytical grade vitamins). The results revealed that new formulation of fertilizer using commercial agricultural fertilizers as medium is feasible without any negative effect the *Isochrysis* sp. growth, and can be used as replacement for the marine microalgae *Isochrysis* sp. biomass by minimum economic cost using agriculture fertilizers. For this purpose, microalgae *Isochrysis* sp. culture.

**Keywords:** *Isochrysis*, Culture medium, Economic production, Commercial fertilizer, Biomass.