کشت متراکم ریزجلبک اسپیرولینا برای مصارف تغذیه‌ای آبزیان

الهام اسماعیل‌زاده رودسری، حسین عمادی، پدرام حاتمی

چکیده

اسپیرولینا یک ریزجلبک رشته‌ای، مارپیچی شکل، چند سلولی و به‌رنگ سبز-آبی است و به‌علت محتوای پروتئین بالا، رنگدانه‌ها، اسیدهای چرب ضروری و مواد معدنی، در سراسر جهان به‌صورت تجاری تولید می‌شود. همچنین، به‌عنوان مکمل پروتئینی و ویتامینی به غذاهای آبزیان اضافه می‌گردد. ریزجلبکی که به‌عنوان ماده غذایی دارای خواص عالی استفاده می‌شود، به جنس *Arthrospira* تعلق دارد. هدف از این مطالعه، بررسی کشت متراکم ریزجلبک اسپیرولینا در فضای آزاد و داخل سالن و تبدیل آن به خمیر و آرد برای تغذیه آبزیان بود. به این منظور، گونه *Arthrospira platensis* تا حجم ۴ مترمکعب کشت داده شد. پژوهش در مرحله اول، در فایکولب با استفاده از ۲ عدد لامپ فلورسنت ۴۰ واتی و دوره نوری ۱۲:۱۲ ساعت روشنایی- تاریکی و محیط کشت F_2، و در مرحله دوم، در خارج از آزمایشگاه شامل کشت در فضای باز با استفاده از نور خورشید و در داخل سالن با استفاده از نور مصنوعی و با محیط کشت TMRL انجام شد. قبل از هربار برداشت از حوضچه‌های ۴ مترمکعبی، میزان زیتوده خشک و تر (g/m^3) و تراکم سلولی ($cell/cm^3$) محاسبه گردید که میانگین آن در حوضچه‌های فضاي باز بالاتر از داخل سالن بود. نتایج حاصل از آنالیزهای آماری، اختلاف معنی‌داری را در میزان زیتوده (g/m^3) و تراکم سلولی ($cell/cm^3$) اسپیرولینای رشد یافته در حوضچه‌های فضای باز با سالن نشان داد ($p\leq$۰/۰۵). همچنین، میانگین پروتئین آرد اسپیرولینا در سه حوضچه ۴ مترمکعبی موجود در فضای باز و داخل سالن، به‌ترتیب ۸/۶۱ ± ۵۱/۴۵ و ۸/۲۲ ± ۳۸/۴۶ درصد به‌دست آمد، اما اختلاف معنی‌داری بین آنها مشاهده نگردید ($p\leq$۰/۰۵).

کلمات کلیدی : *Arthrospira platensis*، تغذیه آبزیان، خمیر و آرد، کشت انبوه.

مواد و روش‌ها

بذر *Arthrospira platensis* از موسسه تحقیقات شیلاتی آبهای دور، واقع در شهرستان چابهار تهیه شد. کشت اسپیرولینا در فایکولب، از ارلن‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری شروع و در ارلن‌های ۲ لیتری و مخازن ۲۰ لیتری پایان یافت. ۶ عدد ارلن ۲۵۰ میلی‌لیتری با ۲۰۰ میلی‌لیتر آب دریای فیلتر، استریل و تعدیل شده و با شوری ۲۵ قسمت در هزار و ۲۰ ml بذر اسپیرولینا با تراکم اولیه $cell/cm^3$ ۹۵۰ ۴۶۴۰۰± و ۲ ml/l محیط کشت F_2 در کنار شعله چراغ بنزن کشت داده شد. تمام محتویات یک ارلن ۲۵۰ میلی‌لیتری وارد یک ارلن ۲ لیتری و سپس تمامی محتویات یک ارلن مایر ۲ لیتری وارد یک مخزن ۲۰ لیتری شد. پس از آن، کشت در خارج از آزمایشگاه، در مخازن ۳۰۰ لیتری و ۱ مترمکعبی PVC و درنهایت در مخازن فایبرگلاس ۴ مترمکعبی و در دو محیط باز با استفاده از نور خورشید و داخل سالن با استفاده از لامپ‌های فلورسنت انجام شد، در کشت خارج از آزمایشگاه، از محیط کشت TMRL استفاده گردید. به‌منظور کشت، تمام محتویات یک مخزن ۲۰ لیتری، پس از هم دمایی به داخل هر مخزن ۳۰۰ لیتری منتقل شد. مخازن ۱ مترمکعبی با استفاده از ۲۰۰ لیتر از یک مخزن ۳۰۰ لیتری و مخازن ۴ مترمکعبی با استفاده از تمامی محتویات یک مخزن ۱ مترمکعبی کشت داده شد. همچنین برای هر مرحله سه تکرار وجود داشت.

ضدعفونی آب تا حجم ۲۰ لیتر، با استفاده از اتوکلاو با دمای ۱±۱۲۰ درجه سانتی‌گراد و فشار ۱ کیلوگرم بر سانتی‌مترمربع و برای کشت‌های بزرگتر، با کلرزنی انجام شد (Hoff and Snell, 1996). بعد از اضافه کردن کلر، حوضچه به‌مدت ۳۰ دقیقه هوادهی شدید شد. مقدار باقی مانده کلر با استفاده از محلول اورتوتولوئیدن بررسی گردید، تا وجود کلر در کشت، سبب تاخیر در رشد جلبک‌ها نشود. طی مدت کشت، تراکم سلولی با استفاده از لام سدویک‌رافتر، به‌صورت روزانه اندازه‌گیری شد. همچنین هوادهی کشت‌ها نیز به‌طور مداوم انجام گردید.

کشت‌های ۴ مترمکعبی به‌مدت ۶ روز برای افزایش تراکم سلولی نگهداری شدند و سپس به‌میزان ۱مترمکعب از هر حوضچه برداشت و حجم آب مجددا به ۴ مترمکعب رسانده شد و به ازای حجم آب اضافه شده، محیط کشت اضافه گردید، سپس در روز هشتم برداشت دوم انجام شد. در طول مدت کشت، دمای آب در حوضچه‌های فضای بیرون، به‌طور میانگین ۳۱ درجه

سانتی‌گراد و در حوضچه‌های داخل سالن ۲۸ درجه سانتی‌گراد بود. با رشد اسپیرولینا، pH به‌تدریج افزایش یافت و در زمان برداشت، بیشترین میزان آن به ۹/۹ در حوضچه‌های فضای بیرون و در حوضچه‌های داخل سالن به ۹/۳ رسید.

قبل از برداشت از حوضچه‌های ۴ مترمکعبی، مقادیر زیتوده براساس وزن خشک و تر (g/m^3)، با عبور دادن ۱۰۰ میلی‌لیتر کشت از کاغذ صافي (واتمن شماره ۱)، به‌دست آمد (Faramarzi et al., 2010). کاغذهای فیلتر به‌مدت ۲ ساعت در آون در دمای ۱۰۵ درجه سانتی‌گراد خشک شد و وزن خشك برحسب گرم در لیتر محاسبه و سپس به گرم در مترمکعب تبدیل گردید (Goksan et al., 2007). زمانی‌که رنگ آب داخل مخازن ۴ مترمکعبی کاملا سبز شد و قبل از این‌که سلول‌ها به حداکثر تراکم سلولی برسند، کشت از الک‌های با اندازه چشمه ۱۵، ۲۰ و ۴۲ میکرون عبور داده شد و فاز مایع از فاز جامد جدا گردید و خمیر اسپیرولینا تهیه شد. خمیر تهیه شده داخل سینی پهن شد و به‌مدت ۶ ساعت در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد در آون قرار گرفت، سپس ورقه‌های خشک توسط هاون به آرد تبدیل گردید (Jourdan, 2001). به‌منظور تعیین میزان پروتئین اسپیرولینا، نمونه‌های خمیر و آرد اسپیرولینا به آزمایشگاه اداره کل دامپزشکی زاهدان فرستاده شد.

نتایج

میانگین تراکم سلولی حوضچه‌های ٤ مترمکعبی فضای باز و سالن، در برداشت اول به‌ترتیب ۱۲٦٦۷± ٦٤٦۷۰ و ۲۸۲٦ ± ۳۷۳۰۰ $cell/cm^3$ و در برداشت دوم به‌ترتیب ۸۰٤۲ ± ۷٥٤۸۰ و ۳٦۳۹ ± ٤۱۱۰۰ $cell/cm^3$ به‌دست آمد. با مقایسه این مقادیر با استفاده از آزمون ANOVA، مشخص گردید که در هر دو برداشت، بین میزان تراکم سلولی موجود در دو محیط، تفاوت معنی‌داری وجود داشت ($p\leq$۰/۰٥). میانگین زیتوده خشک در برداشت اول در حوضچه‌های فضای باز و سالن به‌ترتیب ۹۰/۰٤ ± ۸۰۰ و ۷۷/٦۲ ± ٥۳٥ g/m^3، و در برداشت دوم به‌ترتیب ٥۷/٦٦ ± ۸۷٥ و ۳۷/۷٤ ± ٦۲۰ g/m^3 بود. همچنین، میانگین بیوماس تر در برداشت اول ۱۷۰/۲۲± ۱۹٥۰ و ۱٤٥/٥۱± ۱۲۸٥ g/m^3 و در برداشت دوم به‌ترتیب ۱٦٦/٤۳± ۲۰۷۰ و ٦۷/۱٤ ± ۱٥۰۰ g/m^3 تعیین شد، مقایسه میزان زیتوده خشک و تر (g/m^3)، با استفاده از آزمون ANOVA، نشان داد که در هر دو برداشت، بین مقادیر زیتوده تولید شده در دو محیط، اختلاف معنی‌داری وجود دارد ($p\leq$۰/۰٥). میانگین میزان پروتئین آرد اسپیرولینا در حوضچه‌های فضای باز، ۸/٦۱ ± ٥۱/٤٥ درصد و داخل سالن، ۸/۲۲ ± ۳۸/٤٦ درصد تعیین شد. نتایج آزمون T برای داده‌های مستقل، اختلاف معنی‌داری را بین مقادیر پروتئین اسپیرولینا در فضای باز با سالن نشان نداد ($p\leq$۰/۰٥).

بحث

اسپیرولینا، یکی از مهم‌ترین میکروارگانیسم‌های فتوسنتزکننده از لحاظ تولید تجاری است (Radmann et al., 2007). Faramarzi و همکاران (2010)، بیان کردند که بهترین کیفیت نور برای رشد ریزجلبک‌ها، نور طبیعی بوده و تولید توده زیستی در سیستم‌های کشت روباز، به‌میزان انرژی نورانی وارده به سطح کشت و مقدار انرژی لازم که به تک تک ریزجلبک‌ها می‌رسد، بستگی دارد. Richmond (1987)، بیان کرد که *Spirulina platensis*، برای رشد مطلوب، به دوره‌های طولانی مدت نور طبیعی و درجه‌حرارت بالا نیاز دارد. با توجه به این یافته‌ها، در مطالعه حاضر استفاده از نور مصنوعی و کاهش میزان نور رسیده به کشت، می‌تواند یکی از مهم‌ترین دلایل کاهش تولید اسپیرولینا در سالن باشد. درتحقیقی دیگر، Goksan و همکاران (2007)، از دلایل کاهش تولید *Spirulina platensis* را پایین بودن میزان شدت نور خورشید و همچنین، پایین بودن درجه‌حرارت که حداکثر آن ۲٥ درجه سانتی‌گراد بود، بیان کردند. Danesi و همکاران (2001) و Vonshak (1997)، بیان کردند که درجه‌حرارت بهینه برای رشد *Spirulina platensis* ، بین ۳۰ تا ۳٥ درجه سانتی‌گراد است. در تحقیق حاضر، میانگین درجه‌حرارت آب در حوضچه‌های فضای بیرون ۳۱ درجه سانتی‌گراد و در حوضچه‌های داخل سالن ۲۸ درجه سانتی‌گراد بود. این یافته می‌تواند، یکی دیگر از علت‌های بالاتر بودن تراکم سلولی و زیتوده خشک وتر در حوضچه‌های فضای باز باشد. Colla و همکاران (2007)، بیان کردند هنگامی که نور بیشتری برای سلول‌ها در دسترس باشد، نور به‌عنوان یک عامل محدود کننده متوقف شده و اجازه استفاده بهتر از نیتروژن در دسترس و تولید بالاتر پروتئین را می‌دهد. در این تحقیق نیز این احتمال وجود دارد که در کشت با استفاده از نور خورشید، میزان دسترسی نور برای سلول‌ها، بیشتر بود و درنتیجه، میزان پروتئین بالاتری تولید گردید. از طرف دیگر، در سالن که از لامپ‌های فلورسنت استفاده شده بود، کاهش تراکم سلولی ایجاد شده، سبب افزایش نور رسیده به سلول‌ها شد و در نتیجه میزان پروتئین تولید شده در این دو محیط،

اختلاف معنی‌داری با یکدیگر نداشت. همچنین Colla و همکاران (2007) بیان کردند که دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد نتایج بهتری را در تعداد سلول‌ها ارائه می‌دهد و کشت در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد دارای اثر منفی بر روی تولید زیتوده، اما دارای اثر مثبت بر روی تولید پروتئین می‌باشد. Ogbonda و همکاران (2007)، بیان کردند که دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد، درجه‌حرارت بهینه برای تولید زیتوده و پروتئین اسپیرولینا است. در تحقیق حاضر نیز، تولید زیتوده و پروتئین حوضچه‌های فضای باز که دارای دمای ۳۱ درجه سانتی‌گراد بود، بالاتر از حوضچه‌های داخل سالن که دمای کمتری داشت، به‌دست آمد.

از آنجایی‌که، در پرورش لارو آبزیان، غذای زنده به‌ویژه فیتوپلانکتون مورد نیاز بوده و در بسیاری از مواقع، تولید آن برای بخش خصوصی مشکل است، درنتیجه، فیتوپلانکتون می‌تواند به‌صورت غیرزنده و با ارزش غذایی مناسب، مورد استفاده قرار گیرد. با توجه به تولید زیتوده بالاتر در حوضچه‌های ۴ مترمکعبی کشت داده شده با استفاده از انرژی خورشید، حتی در شرایطی که میزان پروتئین تولید شده در فضای باز و داخل سالن، اختلاف معنی‌داری با یکدیگر نداشته باشد، کشت انبوه اسپیرولینا در فضای باز و با استفاده از نور خورشید، دارای مزیت بیشتر و از لحاظ اقتصادی به صرفه‌تر است که می‌توان در کشت‌های طولانی مدت، به‌منظور کاهش خطر آلودگی و محفوظ ماندن کشت‌ها از باد و باران، از فضای گلخانه مانند که از پوشش‌های نایلونی شفاف ساخته شده است استفاده کرد، اما باید به افزایش بیش از حد دما در گلخانه، به‌ویژه در مناطق دارای آب و هوای گرم توجه شود.

منابع

Colla, L.M., Reinehr, C.O., Reichert, C., Costa, J.A.V. 2007. Production of biomass and nutraceutical compounds by *Spirulina platensis* under different temperature and nitrogen regimes. Bioresource Technology, 98: 1489-1493.

Danesi, E.D.G., Rangel, C.O., Pelizer, L.H., Carvalho, J.C.M., Sato, S., Moraes, I.O. 2001. Production of *Spirulina platensis* under different temperatures and urea feeding regimes for Chlorophyll attainment. In: Proceeding of the eighth International Congress on Engineering and Food, Volume 2, pp. 1978-1982.

Faramarzi, M.A., Foroutanfar, H., shakibaei, M. 2010. microalgae biotechnology. Tehran University of Medical Sciences, 398 p.(In Persian)

Goksan, T., Zekeriyaoglu, A., Ak, I. 2007. The growth of *Spirulina platensis* in different culture systems under greenhouse condition. Turkey Journal Biology, 31: 47-52.

Hoff, F.H., Snell, T.W. 1996. Plankton Culture Manual. Azari Takami, G.H., Amini Charmhini, M. University of Tehran Press, 342 p.(In Persian)

Jourdan, P. 2001. Manual of small scale *Spirulina* culture. Antenna Technologies, 15 p.

Ogbonda, k.H., Aminigo, R.E., Abu, G.O. 2007. Influence of temperature and pH on biomass production and protein biosynthesis in a putative *Spirulina sp*. bioresource technology, 98: 2207-2211.

Radmann, E.M., Reinehr, C.O., Costa, J.A.V. 2007. Optimization of the repeated batch cultivation of microalga *Spirulina platensis* in open raceway ponds. Aquaculture, 265: 118-126.

Richmond, A. 1987. The challenge confronting industrial micro agriculture: high photosynthetic Efficiency in large-scale reactors. Hydrobiologia, pp 117-121.

Vonshak, a. 1997. *Spirulina platensis* (*Arthrospira*). Physiology, Cell-biology and Biotechnology. Taylor and Francis, London.Great Britain, pp. 213-226.