غنی سازی آب حوضه جنوبی دریای خزر و تاثیر آن بر رشد میکروجلبک اسپیرولینا

خورشید حسین زاده، علی گنجیان خناری

خلاصه

استفاده از ریز جلبک اسپیرولینا در تغذیه انسان به علت داشتن ترکیبهای فنولی، پروتئین، اسیدهای چرب غیر اشباع، ویتامین ها و مواد معدنی اهمیت دارد .تولید این ریز جلبک با استفاده از یک منبع ارزان قیمت مانند آب دریا همواره مورد توجه بوده است تا بتوان به تولید بالا با هزینه کم دست یافت .در این بررسی تاثیر غنی سازی آب سه ناحیه از حوضه جنوبی دریای خزر بر رشد میکروجلبک اسپیرولینا مورد بررسی قرار گرفت. آب دریا در منطقه گمیشان به علاوه 20% محیط کشت استاندارد بالاترین نرخ رشد و ضریب رشد را پس از محیط زاروک داشت.

مواد و روش ها

در این بررسی سیانوباکتر *Spirulina platensis* از پارک زیست فناوری خلیج فارس خریداری شد .محیط کشت زاروک برای آماده سازی و نگهداری مایه تلقیح مورد استفاده قرار گرفت. غنی سازی آب دریا سه ناحیه محمود آباد، گمیشان و ساری توسط غلظتهای مختلف (۰، ۵، ۱۰ و۲۰%) محیط کشت زاروک غنی سازی شد و جهت بررسی تاثیر محیطهای مختلف بر رشد میکروجلبک اسپیرولینا مورد بررسی قرار گرفت. کشت ریزجلبک در ارلین مایرهای ۲۵۰ میلی لیتر حاوی ۲۰۰ میلی لیتر محیط کشت، در قفسه کشت با دمای $۳۰ \pm ۲^{\circ}C$ ، با شدت نور ۴۶۷۰ لوکس به همراه هوادهی توسط پمپ انجام شد. به همه ارلن ها ۵ میلی لیتر استوک تلقیح شد. شمارش استوک با استفاده از لام نئوبار انجام شد .برای هر تیمار 2 تکرار در نظرگرفته شد و شمارش تعداد سلول های ریز جلبک با میکروسکوپ نوری و لام نئوبار آینه ای انجام شد. تعداد واقعی سلول های جلبک در هر تیمار و در هر روز با استفاده از رابطه زیر بدست آمد (Ganjian, 2011)

میلی مترمربع/سلول ها = میلی مترمربع/ سلول ها × ۱۰ × رقت

میلی متر مربع/ سلول ها = میانگین سلول های شمارش شده /سطح شمارش شده (میلی مترمربع)

1 mL = تعداد نمونه شمارش شده × ۵ × ۱۰ × رقت × ۱۰۰۰

برای محاسبه نرخ رشد ویژه Specific Growth Rate (SGR) در روزهای مختلف از فرمول زیر استفاده شد:

$$SGR= Ln (mt_2/mt_1)/t2-t1;\ t_2>t_1$$

m_2 = تراکم سلولی (cell/mL) در آخرین روز

m_1 = تراکم سلولی (cell/mL) در اولین روز

t_1 = اولین روز

t_2 = آخرین روز

تغییرات ریز جلبک اسپیرولینا طی 23 روز مورد بررسی قرار گرفت. هر ۴۸ ساعت یک بار شمارش از نمونه ها انجام شد. طرح کلی این تحقیق در قالب طرح کاملا تصادفی و کلیه اطلاعات ثبت شده در انتهای آزمایش به وسیله آنالیز واریانس یک طرفه و تست دانکن برای مقایسه میانگین ها مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت .کلیه عملیات مربوطه به وسیله نرم افزار $SPSS_{18}$ مورد سنجش قرار گرفت.

جدول ۱– درصد محیط کشت استاندارد در تیمارهای مختلف و نوع محیط کشت.

تیمار	ترکیب محیط کشت	تیمار	ترکیب محیط کشت
۱	M.S.W	۸	G.S.W + 10% Z.M
۲	G.S.W	۹	G.S.W + 20% Z.M
۳	S.S.W	۱۰	S.S.W + 5% Z.M
۴	M.S.W + 5 % Z.M	۱۱	S.S.W + 10% Z.M
۵	M.S.W + 10 % Z.M	۱۲	S.S.W + 20% Z.M
۶	M.S.W + 20 % Z.M	۱۳	Zarrouk medium
۷	G.S.W + 5% Z.M		

M.S.W – آب دریا در منطقه محمود آباد
G.S.W – آب دریا در منطقه گمیشان
S.S.W – آب دریا در منطقه ساری
Z.M – محیط استاندارد زاروک

نتایج

در تیمار ۱۳ محیط کشت زاروک برای کشت اسپیرولینا و مقایسه آن با سایر تیمارها مورد استفاده قرار گرفت. این تیمار بالاترین میزان ضریب رشد (μ/d ۰/۱۱) و نرخ رشد (۰/۱۵) را داشت.
تیمار 9 پس از تیمار 13 بالاترین میزان نرخ رشد و ضریب (به ترتیب ۰/۱۲ و ۰/۰۸۸) را داشت . در این تیمار تعداد سلولها پس از 23 روز کشت به $35*10^4$ عدد سلول در میلیلیتر رسید، در حالی که تعداد سلول ها در محیط استاندارد پس از 23 روز کشت ۵۷*۱۰^۴ عدد سلول در میلی لیتر رسید.

– مقایسه رشد ریز جلبک اسپیرولینا (میانگین ± انحراف معیار تعداد سلول در میلی لیتر × ۱۰^۴) در تیمارهای ۱ تا ۷.

روزهای شمارش تیمار	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷
۱	۵ ± -	۵ ± -	۵ ± -	۵ ± -	۵ ± -	۵ ± -	۵ ± -
۲	۵ ± -	۵ ± -	۵ ± -	۵ ± -	۵ ± -	۵ ± -	۵ ± -
۴	۵ ± -	۵ ± -	۵ ± -	۵ ± -	۵ ± -	۵ ± -	۵ ± -
۷	۵ ± -	۵ ± -	۵ ± -	۱۰ ± -	۱۰ ± -	۱۲/۵ ± ۳/۵۳	۱۰ ± -
۹	-	-	-	۱۰ ± -	۱۲/۵ ± ۳/۵۳	۱۵ ± -	۱۰ ± -
۱۱	-	-	-	۱۵ ± -	۱۵ ± -	۱۷/۵ ± ۳/۵۳	۱۲/۵ ± ۳/۵۳
۱۴	-	-	-	۱۵ ± -	۱۷/۵ ± ۳/۵۳	۲۰ ± -	۱۵ ± -
۱۶	-	-	-	۱۵ ± -	۲۰ ± -	۲۲/۵ ± ۳/۵۳	۱۵ ± -
۱۸	-	-	-	۱۵ ± -	۲۰ ± -	۲۵ ± -	۱۵ ± -
۲۱	-	-	-	۱۵ ± -	۲۰ ± -	۲۵ ± -	۱۵ ± -
۲۳	-	-	-	۱۵ ± -	۲۰ ± -	۲۵ ± -	۱۵ ± -
کل	۱/۸۱ ± ۲/۴۶	۱/۸۱ ± ۲/۴۶	۱/۸۱ ± ۲/۴۶	۳/۴۱ ± ۱۱/۴۶	۶/۳۹ ± ۱۳/۶۳	۸/۱۵ ± ۱۶/۱۳	۳/۲۳ ± ۱۱/۱۳

*عدد صفر نشانه عدم رشد ریز جلبک می باشد.

- مقایسه رشد ریز جلبک اسپیرولینا (میانگین ± انحراف معیار تعداد سلول در میلی لیتر × 10^3) در تیمارهای ۸ تا ۱۳.

روزهای شمارش تیمار	۸	۹	۱۰	۱۱	۱۲	۱۳
۱	۵ ± -	۵ ± -	۵ ± -	۵ ± -	۵ ± -	۵ ± -
۲	۵ ± -	۵ ± -	۵ ± -	۵ ± -	۵ ± -	۵ ± -
۴	۵ ± -	۵ ± -	۵ ± -	۵ ± -	۵ ± -	۱۰ ± -
۷	۱۲/۵ ±۳/۵۳	۱۵ ± -	۵ ± -	۷/۵ ± ۳/۵۳	۱۰ ± -	۱۵ ± -
۹	۱۵ ± -	۱۵ ± -	۱۰ ± -	۱۰ ± -	۱۲/۵ ±۳/۵۳	۲۲/۵ ±۳/۵۳
۱۱	۱۷/۵ ± ۳/۵۳	۲۲/۵ ± ۳/۵۳	۱۲/۵ ± ۳/۵۳	۱۵ ± -	۱۵ ± -	۲۵ ± -
۱۴	۲۰ ± -	۲۲/۵ ± ۳/۵۳	۱۲/۵ ± ۳/۵۳	۱۵ ± -	۱۷/۵ ± ۳/۵۳	۳۰ ± -
۱۶	۲۷/۵ ± ۳/۵۳	۲۷/۵ ± ۳/۵۳	۱۵ ± -	۱۷/۵ ± ۳/۵۳	۲۰ ± -	۳۷/۵ ± ۳/۵۳
۱۸	۲۷/۵ ± ۳/۵۳	۳۲/۵ ± ۳/۵۳	۱۵ ± -	۲۰ ± -	۲۰ ± -	۵۲/۵ ± ۳/۵۳
۲۱	۳۲/۵ ± ۳/۵۳	۳۵ ± -	۱۵ ± -	۲۰ ± -	۲۰ ± -	۵۷/۵ ± ۳/۵۳
۲۳	۳۲/۵ ± ۳/۵۳	۳۵ ± -	۱۵ ± -	۲۰ ± -	۲۰ ± -	۵۷/۵ ± ۳/۵۳
کل	۱۸/۱۸ ± ۱۰/۶۳	۲۰ ± ۱۱/۶۴	۱۰/۴۵ ± ۴/۰۶	۱۲/۷۲ ± ۶/۳۱	۱۳/ ۶۳± ۶/۳۹	۲۸ /۸۶± ۱۹/۶۳

بحث

بیشترین هزینه تولید اسپیرولینا در مقیاس کوچک، مربوط به محیط کشت میباشد و سعی میشود با انجام تحقیقاتی در این زمینه امکان تولید ارزان تر اسپیرولینا فراهم گردد Raoof .و همکاران (۲۰۱۶) استفاده از محیط کشت جدید فرموله شده برای کشت انبوه اسپیرولینا را با ترکیب کردن مواد مغذی انتخابی از محیط کشت استاندارد زاروک و ترکیبات شیمیایی کم هزینه دیگر مورد مطالعه قرار دادند .تفاوت معنی داری در میزان پروتئین اسپیرولینا رشد یافته در دو محیط مشاهده نشد .محاسبات هزینه نشان داد آماده سازی 1000 لیتر محیط کشت استاندارد ۷۹/۵ دلار آمریکا هزینه دارد، در حالی که محیط کشت جدید ۱۶ دلار آمریکا هزینه در بر خواهد داشت .بنابراین شایستگی محیط جدید نه تنها به خاطر هزینه کم آن، بلکه به علت بازدهی بالای آن تایید شد (Raoof et al. 2006)

میانگین سالانه تولید بیوماس اسپیرولینا در آب دریا به علاوه اوره g/m^2d ۷/۳۵ بود، که کمی پایینتر از مقدار به دست آمده از محیط استاندارد بیکربنات سدیم به علاوه آب دریا g/m^2d ۸/۱۴ تحت شرایط کنترل شده pH در دامنه 8 تا 8.3 بود (Tredici et al. 1986 .) نتایج این بررسی نشان داد استفاده از آب دریای خزر بدون غنی سازی برای کشت ریز جلبک اسپیرولینا مناسب نمیباشد .آب دریای منطقه گمیشان به دلیل داشتن منبع کربن و نیتروژن بالاتر نسبت به آب دریای ساری و محمود آباد در شرایط یکسان غنی سازی، قابلیت بیشتری برای حمایت از رشد اسپیرولینا پلاتنسیس از خود نشان داد .مطابق با تحقیق Tredici و همکاران ۱۹۸۶ ، می توان با استفاده از منبع کربن و نیتروژن در آب دریا اسپیرولینا را کشت داد که با نتایج این تحقیق مطابقت دارد. در این بررسی تیمار 2 که حاوی آب دریای گمیشان به علاوه % 20 محیط استاندارد زاروک بود، پس از محیط استاندارد زاروک بیشترین تراکم سلولی را داشت .در حالی که تراکم سلولی در تیمار۸ (آب دریای گمیشان به علاوه۱۰% محیط استاندارد زاروک)تنها کمی پایین تر از تیمار ۹ بود و اختلاف معنی داری بین این دو تیمار مشاهده نشد بنابر این استفاده از تیمار 8 تراکم سلولی نزدیک به تیمار 9 حاصل شد، در حالی که نصف میزان ترکیبات شیمیایی تیمار 9 را داشت .مطابق با تحقیق کاستا و رینر2006 استفاده از آب تالاب منگوئرا به علاوه % 10 محیط استاندارد برای کشت اسپیرولینا، بازدهی و ضریب رشد بالاتری نسبت به محیط استاندارد حاصل می کند، اما با استفاده از آب دریای گمیشان به علاوه 10 و % 20 محیط استاندارد در مقایسه با محیط استاندارد تراکم سلولی و ضریب رشد ویژه کمتری حاصل شد که با نتایج کار کاستا و رینر 2006 ، مغایرت داشت. علت این امر میزان ترکیبات مغذی بالاتر به ویژه نیتروژن و کربن که دو عنصر مهم برای رشد هستند، در آب تالاب منگوئرا در مقایسه با دریای خزر و همچنین استفاده از روش کشت غیر مداوم مکرر به جای کشت غیر مداوم است. در این بررسی بالاترین ضریب رشد پس از محیط زاروک در تیمار ۹ (۰/۰۸۸) محیط

کشت این تیمار آب دریای گمیشان بعلاوه ۲۰% محیط کشت زاروک بود. Radmannو همکاران2007 ، با استفاده از محیطی متشکل از ۸۰% آب مقطر و ۲۰% محیط زاروک ضریب رشد و زیست توده بیشتری نسبت به تیمار ۹ در این بررسی بدست آوردند. علت این امر استفاده از شیوه کشت غیر مداوم مکرر اسپیرولینا است که موجب افزایش ضریب رشد و تولید زیتوده شد، در حالی که در این بررسی از روش کشت غیر مداوم استفاده شد. به طور کلی می توان نتیجه گرفت استفاده از آب دریای خزر غنی شده با محیط زاروک را می توان به عنوان محیط کشت اسپیرولینا پلاتنسیس مورد استفاده قرار داد و هزینه های تولید آن را کاهش داد .در بین سه ناحیه ساری، محمود آباد و گمیشان، آب دریای منطقه گمیشان به دلیل داشتن ترکیبات مغذی بیشتر برای کشت اسپیرولینا مناسب تر است .با کشت غیر مداوم اسپیرولینا در محیط زاروک ضریب رشد و زیتوده بیشتری در مقایسه با محیط زاروک رقیق شده با آب دریای خزر حاصل شد. طبق تحقیقات قبلی می توان با افزودن متناوب ترکیبات مغذی و یا کشت غیر مداوم مکرر میزان زیتوده و ضریب رشد اسپیرولینا را افزایش داد .در مورد استفاده از آب دریای خزر به عنوان یک منبع ارزان قیمت برای کشت ریز جلبک اسپیرولینا به تحقیقات بیشتری در زمینه انواع روش کشت نیاز است.

منابع

Ajayan, K. V., Selvaraju, M. 2011. Reflector based chlorophyll production by *Spirulina platensis* through energy save mode. Bioresource Technology 102: 7591-7594.

Ayala, F. 1998. Guide Spirulina cultivation. Microorganisms in Biotechnology at photoautotrophs. Motril, Granada, Spain. 3-20.

Belay, A., Ota, Y., Miyakawa, K., Shimamatsu, H. 1993. Current knowledge on potential health benefits of Spirulina. Journal of Applied Phycology 5: 235-241.

Ciferri, O. 1983. Spirulina the edible microorganism. Microbiological Reviews 47: 551-578.

Costa, J. A. V., Colla, L. M., Filho, P. D. 2003. *Spirulina platensis* growth in open raceway ponds using fresh water supplemented with carbon, nitrogen and metal ions. Verlag der Zeitschrift für Naturforschung 58: 76-80.

Devanathan, J. Ramanathan, N. 2012. Pigment production from *Spirulina platensis* using seawater supplemented with dry poultry manure. Journal of Algal Biomass Utilization 3: 66-73.

Devgoswami, Ch.R., Kalita, M.C., Talukdar, J., Bora, R., Sharma, P. 2012. Studies on the growth behavior of *Chlorella*, *Haematococcus* and *Scenedesmus* sp. in culture media with different concentrations of sodium bicarbonate and carbon dioxide gas. African Journal of Biotechnology 10: 13128-13138.

Faucher, O., Coupal, B., Leduy, A., 1979. Utilization of seawater-urea as a culture medium for *Spirulina maxima*. Canadian Journal of Microbiology 25:752-759.

Ganjian, A., 2011. Temporal distribution and composition of phytoplankton in the Southern part of Caspian Sea in Iranian waters from 1994-2007. Thesis submitted in fulfillment of the requirement for the degree of Doctor of Philosophy. University Sains Malaysia.

Habib, M.A.B., Parvin, M., Huntington, T.C., Hasan, M. R. 2008. A review on culture, Production and use of Spirulina as food for humans and feeds for domestic animals and fish. FAO Fisheries And Aquaculture Circular.

Henrikson, R. 2010. Spirulina world food how this micro algae can transform your health and our planet. Maui, Hawaii, Ronore Enterprises.

Khatum, R., Hossain, M.M., Begum, S.M.S., Majid, F.Z. 1994. *Spirulina* culture in Bangladesh V. Development of simple, inexpensive culture media suitable for rural or domestic level cultivation of Spirulina in Bangladesh. Journal of Science Indian Research 29: 163-166.

Materassi, R., Tredici, M., Balloni, W. 1984. Spirulina culture in sea water. Applied Microbiology and Biotechnology 19: 384-386.

Mary Leema, J.T.R., Kirubagaran, N.V., Vinithkumar, P.S., Dheenan, S., Karthikayulu. 2010. High value pigment production from *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis* cultured in seawater. Bioresource Technology 101: 9221-9227.

Materassi, R., Tredici, M., Balloni, W. 1984. Spirulina culture in sea water. Applied Microbiology and Biotechnology 19: 384-386.

Pandey, J.P., Tiwari, A., Mishra, R.M. 2010. Evaluation of biomass production of *Spirulina maxima* on different reported media. Algal Biomass Utilization 1: 70-81.

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

Raoof, B., Kaushik, B.D., Radha, P. 2006. Formulation of a low-cost medium for mass production of Spirulina. Biomass and Bioenergy 30: 537-542.

Reinehr, C.O., and Costa, J.A.V. 2006. Repeated batch cultivation of the microalga *Spirulina platensis*. World Journal of Microbiology and Biotechnology 229: 937-943.

Singh, S. 2006. Spirulina: A Green gold mine. Spirutech- 2006. Spirulina cultivation: Potentials and Prospects. Jabalpur, Madhya Pradesh.

Tredici, M., Papuzzo, T., Tomaselli, L. 1986. Outdoor mass culture of *Spirulina maxima* in sea-water. Applied Microbiology and Biotechnology 24: 47-50.

Terziev, F.S., Maksimova, M.P., Jablinsko, E.A. 1996. "Gidrometeorologiai Gidrokhimia Morey, Vikaspiskoy More Sant-Peterburg Gidrometeoizdat. 12-17 (In Russian).

Venkataraman, L., Bhagyalakshmi, V., Ravishankar, G. 1995. A commercial production of micro and macroalgae problems and potentials. Indian Journal of Microbiology 35: 1-19.

Vonshak, A., Boussiba, S., Abeliovich, A., and Richmond, A. 1983. Production of Spirulina biomass: maintenance of monoalgal culture outdoors. Biotechnology and Bioengineering 25: 341-349.

Wu, B., Tseng, C.K., Xiang W. 1993. Large-scale cultivation of Spirulina in sea-water based cultured medium. Botanical Marine 36: 99-102.

Zarrouk, C. 1966. Contribution to the study of cyanobacteria, influence of various physical and chemical factors on growth and photosynthesis is *Spirulina maxima*. PhD thesis, University of Paris.