



تأثیر غنی سازی آب دریای خزر منطقه گمیشان با استفاده از بی کرینات سدیم بر رشد میکرو جلبک *SPIRULINA PLATENSIS*
 خورشید حسین زاده، علی گنجیان خناری

چکیده

بیوماس (زی توده) *Spirulina platensis* سال‌هاست توسط انسان مصرف می‌شود که علت آن خواص سلامتی بخش این میکرو جلبک می‌باشد. این خواص مفید به این علت میزان زیادی پروتئین (حدود ۶۵٪ وزنی-وزنی)، ترکیب متعادلی از ویتامین‌ها، مواد معدنی و ترکیبات دیگر مانند اسیدهای چرب غیر اشباع $\omega 3$ و $\omega 6$ ، ترکیبات فنولی با تأثیر آنتی‌اکسیدانی بر پرواکسیداسیون لیپیدها، می‌باشد (Costa, et al., 2002). خصوصیت این میکروارگانیسم این است که چون در محیط بسیار انتخابی رشد می‌کند، می‌توان آن را در استخرهای روباز کشت کرد اما نسبتاً عاری از میکروارگانیسم‌های آلوده کننده باقی بماند (Borowitzka, 1999). از طرفی تولید با هزینه پایین با استفاده از محیط کشت ارزان می‌تواند یک فاکتور کلیدی در توسعه تولید *Spirulina platensis* باشد. استفاده از آب دریا بهینه شده (Faucher, et al., 1979) یا بعد از غنی سازی با مواد مغذی خاص در شرایط آزمایشگاهی (Materassi, et al., 1984) یا در استخرهای روباز گردشی (Tredici, et al., 1986; Wu, et al., 1993) به عنوان یک محیط پیشنهادی جهت تولید *Spirulina platensis* گزارش شده است. با توجه به اهمیت اقتصادی میکرو جلبکها از جمله *Spirulina platensis* در زمینه‌های غذایی و دارویی، تولید این ارگانیسم با استفاده از منابع ارزان مانند آب دریا مورد توجه تولیدکنندگان می‌باشد. از طرفی با تغییر بعضی از منابع غذایی می‌توان میزان رشد و تراکم سلولی میکرو جلبکها را به حداکثر مقدار خود به خصوص در مقادیر انبوه رساند. بر اساس مطالعات انجام شده منابع آبی داخلی منبع بسیار مهم و سرشار از میکرو جلبکها هستند و در دریای خزر بیش از ۳۳۴ گونه از ۸ شاخه فیتوپلانکتون مورد شناسایی قرار گرفته است (گنجیان و همکاران ۱۳۹۱؛ Ganjian et al., 2010; Ganjian et al., 2011). در این تحقیق افزودن غلظت‌های مختلف بیکربنات سدیم ($0, 1/4, 2/8 \text{ gr l}^{-1}$) به آب دریای گمیشان (منطقه شرق حوضه جنوبی دریای خزر) جهت بررسی اثر آن بر رشد میکرو جلبک *Spirulina platensis* انجام شد. کشت در دمای 30°C ، شدت نور 350 lux ± 4670 و پریود نوری (L/D: 12/12) انجام شد و شمارش با استفاده از لام نئوبار انجام شد. نتایج نشان داد بالاترین نرخ رشد و ضریب رشد ویژه (به ترتیب 0.075/ و 0.054) و بیشترین میزان رشد ($10^4 \times 15$ عدد سلول در میلی لیتر) با استفاده از $2/8 \text{ gr l}^{-1}$ بیکربنات سدیم در آب دریا حاصل می‌شود. نتایج این بررسی نشان داد آب دریای گمیشان به تنهایی برای حمایت از رشد *Spirulina platensis* مناسب نمی‌باشد و برای این منظور به غنی سازی با ترکیبات مغذی نیاز دارد.

مواد و روش‌ها

میکروارگانیسم و محیط کشت

در این بررسی سیانوباکتر *Spirulina platensis* از پارک زیست فناوری خلیج فارس خریداری شد. محیط کشت زاروک^۳ برای کشت و نگهداری مایه تلقیح مورد استفاده قرار گرفت. این محیط توسط زاروک به عنوان محیط کشت استاندارد *Spirulina platensis* ساخته شد و در اغلب منابع علمی جهت کشت و توسعه مایه تلقیح *Spirulina platensis* مورد استفاده قرار می‌گیرد. (Vonshak, 1982; Zarrouk, 1996). آب خلیج گمیشان با غلظت‌های مختلف بیکربنات سدیم غنی سازی شد (جدول ۱). برای ساخت محیط زاروک از ترکیبات شیمیایی با درجه خلوص آزمایشگاهی (مرک) استفاده شد.



جدول ۱: غلظت میزان مصرف بیکربنات سدیم در تیمارها

تیمار	بیکربنات سدیم (sodium bicarbonate) gr/l
۱	۰
۲	۱/۴
۳	۲/۸

کشت

کشت در ارلن مایرهای ۲۵۰ ml با ۲۲۰ ml محیط کشت در قفسه کشت با دمای $20 \pm 2^\circ C$ ، شدت نور $4670 \pm 350 lux$ انجام شد. زمان نور دهی توسط تایمر اتوماتیک به صورت ۱۲ ساعت روشنایی، ۱۲ ساعت تاریکی تنظیم شد (Costa, et al., 2002) و (Reinehr and Costa, 2006). غلظت بی کربنات سدیم مطابق جدول ۱ در هر تیمار تنظیم شد. برای تنظیم غلظت در هر تیمار، جرم مورد نیاز از بیکربنات سدیم برای رسیدن به غلظت مشخص در حجم ۲۲۰ ml توزین و به ارلن حاوی آب دریای گمیشان افزوده شد. هوادهی ارلن‌ها بطور مداوم با کمک پمپ اکواریومی انجام شد. به همه تیمارها ۵ ml از استوک *Spirulina platensis* تلقیح شد. شمارش تعداد سلول در استوک تلقیح شده به تیمارها و خود تیمارها در روزهای مختلف با استفاده از لام نئوبار آینه‌ای انجام شد. برای هر تیمار ۳ تکرار در نظر گرفته شد. برداشت میکروجلبک‌ها با استفاده از پیپت پاستور استریل صورت گرفت. تعداد واقعی سلول‌های جلبک در هر تیمار و در هر روز با استفاده از فرمول زیر به دست آمد (Ganjian, 2011):

ملی متر مربع/سلول‌ها = ملی متر مربع/سلول‌ها $\times \times$ ۱۰۰

ملی متر مربع/سلول‌ها = میانگین سلول‌های شمارش شده/وسعت شمارش شده (میلی متر مربع)

تعداد سلول‌های شمارش شده $\times \times \times$ ۱۰۰ \times ۵ = تراکم سلولی در هر ۱ cc از نمونه

برای محاسبه ضریب رشد (ضریب رشد ویژه) (SGR) (Specific Growth Rate) در روزهای مختلف از فرمول زیر استفاده شد (Ganjian, 2011):

$$\mu = K' = \frac{\ln(m_2/m_1)}{t_2 - t_1}; t_2 > t_1$$

m_2 = تراکم سلولی (تعداد سلول در میلی لیتر) در آخرین روز

m_1 = تراکم سلولی (تعداد سلول در میلی لیتر) در اولین روز

t_1 = اولین روز

t_2 = آخرین روز

تغییرات میکروجلبک *Spirulina platensis* طی ۲۱ روز مورد بررسی قرار گرفت. هر ۲۲ ساعت یک بار شمارش از نمونه‌ها انجام شد. طرح کلی این تحقیق در قالب طرح کاملاً تصادفی و کلیه اطلاعات ثبت شده در انتهای آزمایش به وسیله آنالیز واریانس یک طرفه و تست دانکن جهت مقایسه میانگین‌ها مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. کلیه عملیات مربوط بوسیله نرم افزار SPSS 18 مورد سنجش قرار گرفت.

نتایج

نتایج حاصل از این بررسی نشان می‌دهد در بین غلظت‌های مختلف بیکربنات سدیم که جهت غنی سازی آب دریای خزر (گمیشان) مورد استفاده قرار گرفت، تیمار سوم با داشتن $2/8 g l^{-1}$ بیکربنات سدیم بیشترین میزان رشد (1.5×10^4 عدد سلول در میلی لیتر) را در روز بیست و یکم داشت. در این تیمار نرخ رشد و ضریب رشد ویژه به ترتیب به 0.054 و 0.075 رسید که از سایر تیمارها بالاتر بود (جدول ۲). با تلقیح *Spirulina platensis* به آب دریای خزر (گمیشان)، به علت کمبود مواد



مغذی رشدی مشاهده نشد و تعداد سلول‌ها افزایش پیدا نکرد و پس از ۸ روز، به دلیل کمبود مواد مغذی سلول‌های جلبک زرد شده و رسوب کردند. با افزودن ترکیبات مغذی (بی‌کربنات سدیم و نیترات سدیم) رشد *Spirulina platensis* ادامه پیدا کرد. تیمار ۳ در مقایسه با تیمار ۲ افزایش چندانی در تعداد سلول‌ها نداشت اما ضریب رشد و نرخ رشد بیشتری نسبت به تیمار ۲ نشان داد (جدول ۳).

جدول ۲: مقایسه رشد میکرو جلبک *Spirulina platensis* (تعداد سلول در میلی لیتر $\times 10^4$) در تیمارهای مختلف

میانگین \pm انحراف معیار ($\times 10^4$)			
روزهای شمارش	تیمار ۱	تیمار ۲	تیمار ۳
۱	0 ± 5	0 ± 5^a	0 ± 5^a
۴	0 ± 5	0 ± 5^a	0 ± 5^a
۸	0 ± 5	0 ± 10^b	7.3 ± 5.53^a
۱۱	۰	12.3 ± 5.53^b	12.3 ± 5.53^b
۱۵	۰	0 ± 10^b	0 ± 15^b
۱۸	۰	0 ± 10^b	0 ± 15^b
۲۱	۰	0 ± 10^b	0 ± 15^b

جدول ۳: میزان نرخ رشد و ضریب رشد ویژه میکرو جلبک *Spirulina platensis* در تیمارهای مختلف

تیمارها	ضریب رشد	نرخ رشد
۱	۰	۰
۲	۰/۰۳۴	۰/۰۴۷
۳	۰/۰۵۴	۰/۰۷۵

بحث

کربن ماده مغذی ضروری برای کشت سیانوباکترها است و می‌تواند به شکل آلی یا غیر آلی جذب شود. کربن غیر آلی از طریق مکانیسم تغلیظ دی‌اکسیدکربن مورد استفاده قرار می‌گیرد. سیانوباکترها این توانایی را دارند که هم از دی‌اکسیدکربن و هم از بی‌کربنات به عنوان منبع کربن غیر آلی استفاده کنند (Markou and Georgakakis, 2010). نتایج این بررسی نشان داد استفاده از آب دریای خزر (گمیشان) بدون غنی سازی جهت کشت میکرو جلبک *Spirulina platensis* مناسب نمی‌باشد. با توجه به حضور سایر ترکیبات مغذی در آب دریای خزر (گمیشان) با غنی سازی آب توسط منبع کربن می‌توان از آن برای کشت میکرو جلبک *Spirulina platensis* استفاده کرد.

مطابق با تحقیق Tredici و همکاران ۱۹۸۶، می‌توان با استفاده از منبع کربن در آب دریا *Spirulina platensis* را کشت کرد که با نتایج این تحقیق مطابقت دارد. در یک تحقیق محیط زاروک رقیق نشده، محیط زاروک رقیق شده با ۵۰٪ آب تالاب منگوئرا (برزیل) و آب تالاب بعلاوه ۱۰٪ محیط زاروک جهت کشت *Spirulina platensis* بکار رفت. ضریب رشد ویژه 0.111 d^{-1} و بازدهی بیومس $0.4223 \text{ g l}^{-1} \text{ d}^{-1}$ با استفاده محیط زاروک بدست آمد. در حالی که با استفاده از آب تالاب بعلاوه ۱۰٪ محیط زاروک ضریب رشد ویژه 0.113 d^{-1} و بازدهی $0.467 \text{ g l}^{-1} \text{ d}^{-1}$ حاصل شد و اختلاف معنی داری بین این دو محیط مشاهده نشد (Reinehr and Costa, 2006). در تحقیقی دیگر بی‌کربنات سدیم، اوره، فسفات، سولفات، فریک



آهن، منگنز و پتاسیم، برای تکمیل کردن آب تالاب منگوئرا جهت کشت *Spirulina platensis* مورد استفاده قرار گرفت. نتایج نشان داد تولید بیوماس *Spirulina platensis* در آب تالاب منگوئرا $78/01 \pm 0/0$ (بر مبنای وزن خشک) می‌باشد، در حالی که در آب تالاب بعلاوه $2/88 \text{ g l}^{-1}$ بیکربنات سدیم بدون افزودن اوره، فسفات، سولفات و آهن، میزان بیوماس تولید شده به $82/01 \pm 0/0$ رسید. با افزودن فسفات و ترکیبات آهن‌دار، میزان نهایی بیوماس *Spirulina platensis* به $1/34 \pm 0/03 \text{ g l}^{-1}$ افزایش یافت. (Costa, et al., 2003).

گنجیان و همکاران (۱۳۹۱)، تاثیر بی کربنات سدیم بر رشد میکرو جلبک کلرلا (*Chlorella sp.*) در محیط کشت TMRL را مورد ارزیابی قرار دادند، در این مطالعه اثر بی کربنات سدیم (NaHCO_3) بر رشد میکرو جلبک کلرلا در محیط کشت (AG) TMRL مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور از چهار غلظت بی کربنات سدیم NaHCO_3 (۵، ۷/۵، ۱۰ و ۱۰ میلی لیتر) در محیط کشت TMRL (AG) طی ده روز استفاده گردید. نتایج حاصله با غلظت‌های مختلف بی کربنات سدیم که به محیط کشت (AG) TMRL اضافه شده نشان داد که تیمار سوم با غلظت ۷/۵ میلی لیتر، بیشترین رشد را در روز دهم داشته است. نتایج بررسی حاضر با نتایج کار گنجیان و همکاران (۱۳۹۱)، مطابقت داشت و استفاده از بیکربنات سدیم برای کشت میکرو جلبک *Spirulina platensis* مانند کلرلا موثر واقع شد اما برای رشد *Spirulina platensis* در مقایسه با کلرلا به غلظت بالاتری از این ترکیب نیاز می‌باشد. در این بررسی بدون افزودن بیکربنات سدیم هیچ رشدی مشاهده نشد و با افزودن این ترکیبات رشد *Spirulina platensis* مشاهده شد که با نتایج Costa و همکاران (۲۰۰۳) مطابقت دارد. *Spirulina platensis* در آب تالاب منگوئرا بعلاوه بیکربنات رشد کمی داشت در آب دریای گمیشان بعلاوه بیکربنات سدیم نیز رشد کمی از خود نشان داد. افزودن منبع کربن و نیتروژن سبب افزایش قابل توجهی در میزان بیومس *spirulina platensis* شد که با نتایج Costa و همکاران (۲۰۰۳)، مطابقت دارد.

Costa و همکاران (۲۰۰۴)، از اوره و سدیم بیکربنات برای غنی سازی آب تالاب منگوئرا استفاده کردند و میزان رشد *Spirulina platensis* را مورد بررسی قرار دادند. اوره در غلظت‌های ۰، ۱/۱۲۵ و $2/250 \text{ mg l}^{-1}$ و سدیم بیکربنات در غلظت‌های ۰، ۲۱ و 42 mg l^{-1} مورد استفاده قرار گرفت. نتایج نشان داد افزودن $1/125 \text{ mg l}^{-1}$ اوره بدون افزودن بیکربنات سدیم بیشترین میزان بیومس را حاصل می‌کند که بیش از ۲ برابر بیومس تولید شده در آب تالاب غنی نشده بود. با افزودن $2/250 \text{ mg l}^{-1}$ اوره بدون بیکربنات سدیم، میزان بیومس کاهش پیدا کرد. 21 mg l^{-1} افزودن بیکربنات سدیم در غلظت‌های مختلف اوره افزایش کمی در میزان بیومس حاصل کرد در حالی که افزودن 42 mg l^{-1} بیکربنات سدیم در غلظت‌های مختلف اوره سبب کاهش تولید بیومس شد. همه تیمارها با استفاده از آب تالاب بدون افزودن ترکیبات مغذی شروع شد و پس از ۳۱۲ ساعت کشت (کمبود مواد مغذی) اضافه شدن اوره و بیکربنات سدیم در غلظت‌های مختلف انجام شد، تنش حاصل از املاح نمکی ممکن است علت کاهش بیومس در غلظت‌های بالاتر باشد. نتایج این بررسی نشان داد اگرچه میزان کربنات و بیکربنات موجود در آب تالاب منگوئرا می‌تواند از رشد *Spirulina platensis* حمایت کند اما افزودن اوره برای رشد *Spirulina platensis* مفید است (Costa, et al., 2004).

نتایج این بررسی نشان داد آب دریای خزر (گمیشان) به تنهایی برای حمایت رشد *Spirulina platensis* مناسب نمی‌باشد که با نتایج کار Costa و همکاران (۲۰۰۴)، مغایرت دارد علت آن کمتر بودن منبع کربن و نیتروژن آب دریای گمیشان در مقایسه با تالاب منگوئرا می‌باشد.

منابع

گنجیان خناری، ع.، شکوری، م.، قاسم نژاد، م.، گنجیان خناری، ف.، فارابی، و.، ۱۳۹۱. بررسی تاثیر بی کربنات سدیم بر رشد میکرو جلبک کلرلا (*Chlorella sp.*) در محیط کشت TMRL. مجله توسعه آبی پروری، سال ششم، شماره دوم، زمستان ۱۳۹۱.

Borowitzka, M.A., 1999. Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters. *Journal of Biotechnology*, 70, 313–321.



- Carvalho JCM, Francisco FR, Almeida KA, Sato S, Converti A., 2004. Cultivation of *Arthrospira (Spirulina) platensis* (Cyanophyceae) by fed-batch addition of ammonium chloride at exponentially increasing feeding rates. *J Phycol*, 40:589–97.
- Colla LM, Oliveira Reinehr C, Reichert C, Costa JAV., 2007. Production of biomass and nutraceutical compounds by *Spirulina platensis* under different temperature and nitrogen regimes. *Bioresour Technol*; 98:1489–93.
- Converti A, Scapazzoni S, Lodi A, Carvalho J., 2006. Ammonium and urea removal by *Spirulina platensis*. *J Ind Microbiol Biotechnol*; 33:8–16.
- Costa, J.A.V., Colla, L.M., Duarte Filho, P., Kabke, K., Weber, A., 2002. Modelling of *Spirulina platensis* growth in fresh water using response surface methodology. *World J. Microbiol: Biotechnology*. 18, 603–607.
- Costa, J.A.V., Colla, L.M., Duarte Filho, P., 2003. *Spirulina platensis* growth in open raceway ponds using fresh water supplemented with carbon, nitrogen and metal ions. *Journal for Nature Research: Journal of Biosciences* 58, 76–80.
- Costa, J.A.V., Colla, L.M.1, Duarte Filho, P., 2004. Improving *Spirulina platensis* biomass yield using a fed-batch process. *Bioresource Technology*, 92, 237-241.
- Costa JAV, Cozza KL, Oliveira L, Magagnin G. Different nitrogen sources and growth responses of *Spirulina platensis* in microenvironments. *World J Microbiol Biotechnol* 2001;17:439–42.
- Danesi EDG, Rangel-Yagui CO, de Carvalho JCM, Sato S., 2002. An investigation of effect of replacing nitrate by urea in the growth and production of chlorophyll by *Spirulina platensis*. *Biomass Bioenergy*; 23:261–9.
- Faucher, O., Coupal, B., Leduy, A., 1979. Utilization of seawater-urea as a culture medium for *Spirulina maxima*. *Can J Microbiol*, 25,752-759.
- Ganjian, A., Wan Maznah, W.O., Yahya, Kh., Najafpour, Sh., Najafpour, Gh.D., Roohi, A., Fazli, H., 2010. Seasonal succession of phytoplankton community structure in the southern part of Caspian Sea. *American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci.*, Vol. 8 (2), pp. 146-155.
- 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. UNIVERSITI 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., 1994. Superfood *Spirulina* microalgae-of futuro. Barcelona: Ediciones Urano SA ISBN 84-7953-047-2.
- Lincoln, E.P., Wilkie, A.C., French, BT., 1996. Cyanobacterial process for renovating dairy wastewater. *Biomass Bioenergy*, 10, 63–81.
- Markou, G., and Georgakakis, D., 2010. Cultivation of filamentous cyanobacteria (blue-green algae) in agro-industrial wastes and wastewaters A review: *Applied Energy* 88(10), 3389-3401.



- Materassi, R., Tredici, M., Balloni, W., 1984. *Spirulina* culture in sea water. *Appl Microbiol Biotechnol* 19: 384-386.
- Mitchell, S.A. and Richmond, A., 1988. Optimization of a growth medium for *Spirulina* based on cattle waste. *Biological Wastes*, 25(1), 41-50.
- Ohmori M, Ohmori K, Strotmann H., 1977. Inhibition of nitrate uptake by ammonia in a blue-green alga, *Anabaena cylindrica*. *Arch Microbiol*; 114:225-9.
- 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(1-4), 118-126.
- Reinehr, C.O., Costa, J.A.V., 2006. Repeated batch cultivation of the microalga *Spirulina platensis*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 22, 937-943.
- Richmond, A., 1990. *Handbook of Microalgal Mass Culture*. CRC Press, Boston. ISBN:0-8493-3240-0.
- Sanchez-Luna LD, Converti A, Tonini GC, Sato S, de Carvalho JCM., 2004. Continuous and pulse feedings of urea as a nitrogen source in fed-batch cultivation of *Spirulina platensis*. *Aquacult Eng*; 31:237-45.
- Soletto D, Binaghi L, Lodi A, Carvalho JCM, Converti A., 2005. Batch and fed-batch cultivations of *Spirulina platensis* using ammonium sulphate and urea as nitrogen sources. *Aquaculture*; 243:217-24.
- Tredici, M.R., Papuzzo, T. & Tomasello, L., 1986. Outdoor mass culture of *Spirulina maxima* in sea-water. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 24: 47-50.
- Vetayasupom, S., 2004. The Potential of Using Wastewater from Household Scale Fermented Thai Rice Noodle Factories for Cultivating *Spirulina Platensis*. *Pakistan Journal of Biological Scientific Information*, 7(9), 1554-1558.
- Vonshak, A., Abeliovich, A., Boussiba, S., Arad, S. & Richmond, A., 1982. Production of *Spirulina* biomass: effects of environmental factors and population density. *Biomass*, 2, 175-185.
- Vonshak, A., 1997 *Spirulina platensis* (Arthrospira): Physiology, Cell-Biology and Biotechnology. London: Taylor & Francis. ISBN 0-7484-0674-3.
- Wu B, Tseng CK., Xiang W., 1993. Large-scale cultivation of *Spirulina* in sea-water based cultured medium. *Bot Mar*, 36: 99-102
- Zarrouk, C., 1966. Contribution to the study of cyanobacteria, Influence of various physical and chemical factors on growth and photosynthesis in *Spirulina maxima*. PhD thesis, University of Paris.