تغــذیه و بیــوشیمی آبزیــان
سال اول، شماره اول،
تابستان ۱۳۹۳

بررسی تاثیر غنی سازی آب حوضه جنوبی دریای خزر بر پارامترهای رشد ریز جلبک *Spirulina platensis*

خورشید حسین زاده[۱]*، علی گنجیان خناری[۲]، سید مهدی جعفری[۳]
۱- دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان
۲- پژوهشکده اکولوژی دریای خزر، ساری
۳- دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان

تاریخ دریافت: ۹۲/۶/۱۵ تاریخ پذیرش: ۹۳/۱۲/۲۵

چکیده
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 آب سه ناحیه از حوضه جنوبی دریای خزر (گمیشان، ساری، محمودآباد) توسط غلظت‌های مختلف صفر، ۵، ۱۰، ۲۰٪ از محیط زاروک غنی سازی شده (صفر، ۵، ۱۰، ۲۰٪) جهت بررسی رشد ریز جلبک اسپیرولینا مورد استفاده قرار گرفت. کشت اسپیرولینا در دمای ۳۰°C، شدت نور ۴۶۷۰± ۳۵۰lux و زمان نور دهی (۱۲ ساعت نور، ۱۲ ساعت تاریکی) انجام شد. نتایج نشان داد محیط استاندارد زاروک بالاترین میزان ضریب رشد (۰/۱۱ μ/d) و نرخ رشد (۰/۱۵) را دارد. آب دریا در منطقه گمیشان به علاوه ۲۰٪ محیط کشت استاندارد زاروک پس از محیط کشت استاندارد بالاترین میزان نرخ رشد و ضریب رشد ویژه را داشت (به ترتیب ۰/۱۲ و ۰/۰۸۸ μ/d). در این محیط تعداد سلول‌ها پس از ۲۳ روز کشت به ۱۰^۵ × ۳/۵ عدد سلول در میلی لیتر رسید و در محیط استاندارد به ۱۰^۵ × ۵/۷۵ عدد سلول در میلی لیتر رسید. نتایج نشان داد با غنی سازی آب دریای خزر توسط محیط کشت استاندارد زاروک می‌توان هزینه تولید ریز جلبک اسپیرولینا را کاهش داد.

کلمات کلیدی: ریز جلبک، اسپیرولینا، محیط کشت استاندارد، تولید انبوه، دریای خزر

* نویسنده مسئول: hoseinzade_kh66@yahoo.com

مقدمه

میکروارگانیسم های فتوسنتز کننده مانند ریز جلبک‌ها و سیانوباکترها پایه بسیاری از زنجیره‌های غذایی را در سازگان آبزی تشکیل می دهد و استفاده از آن‌ها سبب بهبود کیفی غذای انسان و دام و ارتـقای سلامـــت آنها می شود (Reinehr and Costa, 2006; Devgoswami et al. 2012).

اسپیرولینا جلبکی سبز-آبی و مارپیچی که نام علمی آن آرتروسپیرا پلاتنسیس (*Arthrospira plantensis*) است. اولین بار در سال ۱۹۶۴ ارزش تغذیه ای این ریز جلبک مشخص شد (Henrikson, 2010). اسپیرولینا پلاتنسیس در آب‌های مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری با pH بالا زیتوده تشکیل می دهد (Ajayan and Selvaraju, 2011). کاهش سطح چربی خون، مبارزه با خستگی، افزایش تعداد ایمونوگلبولین‌ها، افزایش گلبول‌های سفید خون پس از شیمی درمانی و رادیوتراپی، بهبود عملکرد دستگاه ایمنی بدن و کاهش رشد سلول‌های سرطانی در افراد مبتلا به سرطان خون از جمله خواص درمانی اسپیرولینا می باشد (Habib et al. 2008).

به طورکلی نور، دما، pH، کیفیت آب، میزان هوادهی و حضور ترکیـــب‌های مغذی فاکتورهای موثـر در تولید اسپـــیرولینـــا می باشنـــــد (Ayala, 1998; Ciferri, 1983). کربن، نیتروژن، فسفر، سولفور، کلسیم، منیزیم و پتاسیم از جمله عناصر ضروری برای اسپیرولینا هستند. عناصری که اسپیرولینا در مقادیر کم به آنها نیاز دارد، شامل مولیبدن، آهن، نیکل، مس، روی، کبالت، بور، منگنز و کلرید است (Markou and Georgakakis, 2010).

تولید تجاری ریز جلبک در دنیا ابتدا در ژاپن با کشت کلرلا و به دنبال آن با کشت اسپیرولینا اوایل سال ۱۹۷۰ در دریای تکسکوکو در مکزیک آغاز شد (Henrikson, 2010). تولید انبوه اسپیرولینا در آب دریا می تواند صنعت تولید آن را بهبود بخشد و ممکن است در بسیاری از مناطق گرم و خشک یک ضرورت باشد، مکان هایی که شرایط آب و هوایی مناسبی برای تولید اسپیرولینا دارند اما آب شیرین در این مناطق کم است. (Materassi et al. 1984).

هزینه مواد مغذی حدود ۱۵ الی ۲۰٪ کل هزینه های تولید اسپیرولینا در مقیاس بالا را به خود اختصاص می دهند. هزینه پایین تر تولید با استفاده از محیط ارزان می تواند یک راه حل اساسی برای تولید اسپیرولینا به عنوان غذای دام و یک منبع برای محصولات با ارزش غذایی بالا باشد (Belay and Ota, 1993). اولین محیط کشت صناعی برای کشت اسپیرولینا محیط زاروک بود (Zarrouk, 1996) و این محیط هنوز هم به عنوان محیط استاندارد مورد استفاده قرار می گیرد. سپس محیط های مختلفی برای کشت اسپیرولینا مورد استفاده قرار گرفت. مانند محیط اصلاح شده (Revised medium) (Raoof et al. 2006)، محیط CFTIR (Venkataraman et al. 1995)، محیط بنگلادش (Khatum et al. 1994) محیط کشت رائو و محیط کشت OFERR (Singh, 2006). استفاده از آب دریا پس از پیش تیمار (Faucher et al. 1979) یا بعد از غنی سازی با مواد مغذی خاص در شرایط آزمایشگاهی (Materassi et al. 1984) یا در استخرهای رو باز گردشی (Tredici et al. 1986; Wu et al. 1993) و یا غنی سازی آب دریا با استفاده از ضایعات حیوانی (Devanathan and Ramanathan, 2012) به عنوان یک محیط پیشنهادی برای تولید اسپیرولینا گزارش شده است. همچنین نتایج تحقیقات نشان می دهد می توان تولید اسپیرولینا پلاتنسیس در استخرها (در روش تکرارکشت غیر مداوم) را با استفاده از محیط کشت زاروک رقیق شده با آب، انتخاب مناسب میزان نوسازی محیط کشت و غلظت سلولی اسپیرولینا هنگام برداشت، بهینه کرد و هزینه‌های تولید را کاهش داد (Radmann et al. 2007).

از جمله مزایای تولید اسپیرولینا با استفاده از آب دریا ۱) هزینه کمتر کود شیمیایی ۲) صرفه جویی در زمین کشاورزی با استفاده از سواحل بدون استفاده و ۳) عدم سهولت آلوده شدن آب دریا با فلزات سنگین و آلاینده ها می باشد (Wu et al. 1993). استفاده از آب دریا برای کشت اسپیرولینا پلاتنسیس هزینه های تولید را به طور قابل توجهی کاهش خواهد داد (Mary Leema et al. 2010).

آب دریای خزر دارای ترکیبات شیمیایی مخصوص به خود و متفاوت با ترکیب آب دیگر دریاها و دریاچه‌هاست (Kardavanii, 1992). میانگین شوری آب دریای خزر حدود ۳۰٪ املاح موجود در آب اقیانوس‌ها است. املاح

کلرید خزر کمتر اما نمک های سولفاتی وکربناتی آن بیشتر از مقادیر اقیانوسی گزارش شده است (Terziev et al. 1996).

هدف از این تحقیق غنی سازی آب سه ناحیه از دریای خزر (گمیشان، ساری، محمودآباد) با استفاده از محیط کشت استاندارد برای تولید ریز جلبک اسپیرولینا و مقایسه آنهاست تا در نهایت بتوان با سنجش تراکم و ضریب رشد ویژه بهترین مکان را برای تولید این ریز جلبک تعیین کرد.

مواد و روش ها

میکروارگانیسم و آماده سازی محیط کشت

در این بررسی سیانوباکـــتر *Spirulina platensis* در تاریخ تیر ماه سال ۱۳۹۱ از پارک زیست فناوری خلیج فارس خریداری شد. محیط کشت زاروک برای آماده سازی و نگهداری مایه تلقیح مورد استفاده قرار گرفت. این محیط از ۱۶/۸ گرم بیکربنات سدیم، ۰/۵ گرم دی پتاسیم هیدروژن فسفات، ۲/۵ گرم نیترات سدیم، ۱ گرم سولفات پتاسیم، ۱ گرم کلرید سدیم ، ۰/۲ گرم منیزیم سولفات هیدراته (۷ مولکول آب)، ۰/۰۴ گرم کلرید کلسیم هیدراته (۲ ملکول آب)، ۰/۰۱ گرم سولفات آهن هیدراته (۷ مولکول آب)، ۰/۰۸ گرم اتیلن دی متیل آمین تترا سدیم استات و ۱ میلی لیتر محلول A_5 در یک لیتر آب مقطر تشکیل می شود (Zarrouk, 1996). برای آماده سازی این محیط بیکربنات سدیم و دی پتاسیم هیدروژن فسفات در ۸۰۰ میلی لیتر آب مقطر حل شد (محلول)، سپس بقیه ترکیبات شیمیایی در ۲۰۰ میلی لیتر آب مقطر حل شدند (محلول۲). برای تهیه محلول A_5 ۲/۸۶۰ گرم اسید بوریک، ۱/۸۱۰ گرم منگنز کلراید هیدراته (۴ مولکول آب)، ۰/۲۲۲ گرم سولفات روی هیدراته (۴ مولکول آب)، ۰/۰۱۷۷ گرم سدیم مولیبدات و ۰/۰۷۹ گرم سولفات مس هیدراته (۵ مولکول آب) در یک لیتر آب مقطر حل شد. محلول های ۱، ۲ و A_5 در دمای $^{\circ}C$ ۱۲۱ به مدت ۱۵ دقیقه استریل شدند. پس از سرد شدن، در شرایط استریل محلول های ۱ و ۲ با هم مخلوط شده و یک میلی لیتر محلول از A_5 به آن افزوده شد (Zarrouk, 1996). آب سه ناحیه از دریای خزر (گمیشان، ساری، محمودآباد) به همراه درصدهای مختلفی از محیط زاروک (صفر، ۵، ۱۰، ۲۰٪) و محیط زاروک به تنهایی برای بررسی رشد ریز جلبک مورد استفاده قرار گرفت (جدول ۱). برای ساخت محیط زاروک از ترکیبات شیمیایی با کیفیت آزمایشگاهی (مرک) استفاده شد.

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

کشت ریز جلبک اسپیرولینا

کشت در ارلن مایرهای ۲۵۰ میلی‌لیتری با ۲۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت انجام شد. کشت در یک قفسه کشت با دمای $^{\circ}C$ ۲ ± ۳۰، شدت نور ۳۵۰ ± ۴۶۷۰ لوکس انجام شد. زمان نور دهی توسط تایمر اتوماتیک به صورت (۱۲ ساعت نور، ۱۲ ساعت تاریکی) تنظیم شد. هوادهی ارلن ها با کمک پمپ آکواریومی انجام شد. به همه تیمارها ۵ میلی لیتر از استوک تلقیح شد. شمارش استوک با استفاده

از لام نئوبار انجام شد. برای هر تیمار ۲ 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 به دست 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 ۲۳ 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.

نتایج

نتایج آنالیز آب سه ناحیه دریای خزر (ساری، گمیشان، محمود آباد) در جدول ۲ بیان شده است.

جدول ۲- نتایج آنالیز نمونه های آب دریا (mg/L).

ترکیب شیمیایی	آب دریای ناحیه ساری	آب دریای ناحیه گمیشان	آب دریای ناحیه محمود آباد
پتاسیم (K)	۷۶	۱۱۵	۸۲
کلسیم (Ca)	۱۶۰	۲۰۰/۴	۱۴۶/۶۹
سدیم (Na)	۵۱۰	۶۲۰	۴۵۰
کربنات (CO_3^{2-})	۸۰	۱۷۰	۱۱۰
بیکربنات (HCO^{3-})	۱۵۵	۵	۸۰
نیترات (NO^{3-})	-	۰/۸۹	۰/۸
نیتریت (NO^{2-})	۰/۰۰۳	۰/۰۱۳	۰/۰۰۰۳
فسفات (PO_4^{3-})	۷/۵	۳/۳	۳/۶

در تیمار ۱۳ از محیط استاندارد زاروک برای کشت اسپیرولینا و مقایسه آن با تیمارهای دیگر استفاده شد. این تیمار بالاترین میزان ضریب رشد (۰/۱۱ µ/d) و نرخ رشد (۰/۱۵) را داشت.

تیمار ۹ پس از تیمار ۱۳ بالاترین میزان نرخ رشد و ضریب رشد ویژه را داشت (به ترتیب ۰/۱۲ و µ/d ۰/۰۸۸). در این تیمار تعداد سلول‌ها پس از ۲۳ روز کشت به ۳۵×۱۰^۴ عدد سلول در میلی‌لیتر رسید، در حالی که تعداد سلول ها در محیط استاندارد پس از ۲۳ روز کشت به $۵۷/۵ \times ۱۰^۴$ عدد سلول در میلی لیتر رسید.

با تلقیح استوک اسپیرولینا به تیمارهای ۱، ۲ و ۳ رشدی مشاهده نشد و تعدا سلول ها افزایش پیدا نکرد و پس از ۷ روز سلول های ریز جلبک اسپیرولینا زرد شده و رسوب کردند.

تیمار ۶ نرخ رشد ۰/۱ و ضریب رشد µ/d ۰/۰۷۳ را از خود نشان داد و تعداد سلول های جلبک پس از ۲۳ روز به ۲۵×۱۰^۴ عدد سلول در میلی لیتر رسید. اسپیرولینا در تیمار ۶ نسبت به تیمار ۴ و ۵ رشد بهتری داشت. در تیمار ۴ تعداد سلول ها در روز ۱۱ به ۱۵×۱۰^۴ عدد سلول در میلی لیتر و تا روز ۲۳ ثابت باقی ماند، اما در

تیمار ۵ در روز ۱۶ به $۱۰^۴$ × ۲۰ عدد سلول در میلی لیتر رسید و تا روز ۲۳ ثابت باقی ماند. در تیمار ۶ افزایش تعداد سلول ها تا روز ۱۸ ادامه داشت و پس از آن ثابت شد. تیمار ۹ نسبت به دو تیمار ۷ و ۸ ضریب رشد و نرخ رشد بالاتری از خود نشان داد. نرخ رشد در تیمار ۸ نسبت به تیمار ۹ اختلاف کمی داشت (به ترتیب ۰/۱۱ و ۰/۰۸۱)، اما نسبت به تیمار ۷ اختلاف بین این فاکتورها بیشتر بود. همچنین در تیمار ۸ پس از ۲۳ روز کشت تعداد سلول ها به $۱۰^۴$ × ۳۲ عدد سلول در میلی لیتر رسید که کمی پایین تر از تیمار ۹ ($۱۰^۴$ × عدد سلول در میلی لیتر ۳۵) بود، در حالی که ۱۰٪ از محیط با محیط کشت استاندارد جایگزین شده بود، اما در تیمار ۹ ۲۰٪ از محیط کشت با محیط استاندارد جایگزین شد.

در تیمار ۷ رشد تا روز ۱۴ ادامه پیدا کرد و پس از آن ثابت شد ($۱۰^۴$ × ۱۵ عدد سلول در میلی لیتر). در یمارهای ۸ و ۹ افزایش تعداد سلول ها تا روز ۲۱ ادامه پیدا کرد و پس از آن ثابت شد.

تیمارهای ۱۰، ۱۱ و ۱۲ حاوی آب دریای منطقه ساری به ترتیب با درصدهای ۵، ۱۰ و ۲۰٪ از محیط استاندارد بودند. در تیمار ۱۱ و ۱۲ میزان نرخ رشد یکسان، اما ضریب رشد در تیمار ۱۲ بالاتر بود. تیمار ۱۰ ضریب رشد و نرخ رشد پایین تری نسبت به تیمار ۱۱ و ۱۲ داشت. در روز ۲۳ تعداد سلول ها در تیمار ۱۱ و ۱۲ برابر بود ($۱۰^۴$ × ۲۰ عدد سلول در میلی لیتر) و تیمار ۱۰ تعداد سلول کمتری داشت ($۱۰^۴$ × ۱۵ عدد سلول در میلی لیتر). در تیمار ۱۱ تعداد سلول ها در روز ۱۸ به $۱۰^۴$ × ۲۰ عدد سلول در میلی لیتر رسید، اما تیمار ۱۲ در روز ۱۶ به این تعداد سلول رسید و تا روز ۲۳ ثابت ماندند.

جدول ۳- مقایسه ضریب تغییرات مربوط به رشد ریز جلبک اسپیرولینا در تیمارهای مختلف.

روزهای شمارش/ تیمارها	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰	۱۱	۱۲	۱۳
۱	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
۲	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
۴	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
۷	۰	۰	۰	۰	۰	۲۸/۲۸	۰	۲۸/۲۸	۰	۰	۴۷/۱۴	۰	۰
۹	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۲۸/۲۸	۱۵/۷۱
۱۱	۰	۰	۰	۰	۰	۲۰/۲۰	۲۸/۲۸	۲۰/۲۰	۱۵/۷۱	۲۸/۲۸	۰	۰	۰
۱۴	۰	۰	۰	۰	۲۰/۲۰	۰	۰	۰	۱۵/۷۱	۲۸/۲۸	۰	۲۰/۲۰	۰
۱۶	۰	۰	۰	۰	۰	۱۵/۷۱	۰	۱۲/۵۸	۱۲/۵۸	۰	۲۰/۲۰	۰	۹/۴۲
۱۸	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۱۲/۵۸	۱۰/۸۷	۰	۰	۰	۶/۷۳
۲۱	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۱۰/۸۷	۰	۰	۰	۰	۶/۱۴
۲۳	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۱۰/۸۷	۰	۰	۰	۰	۶/۱۴
کل	۰	۰	۰	۳۸/۸۴	۴۶/۹۰	۵۰/۵۳	۳۹/۰۲	۵۸/۵۱	۵۸/۲۴	۴۴/۰۵	۴۹/۵۸	۴۶/۹۰	۶۸/۰۲

جدول ۴- میزان نرخ رشد و ضریب رشد (μ/d) ویژه ریز جلبک اسپیرولینا در تیمارهای مختلف.

تیمارها	ضریب رشد	نرخ رشد	تیمارها	ضریب رشد	نرخ رشد
۱	۰	۰	۸	۰/۰۸۱	۰/۱۱
۲	۰	۰	۹	۰/۰۸۸	۰/۱۲
۳	۰	۰	۱۰	۰/۰۴۹	۰/۰۶۸
۴	۰/۰۴۹	۰/۰۶۸	۱۱	۰/۰۵۶	۰/۰۸۶
۵	۰/۰۶۳	۰/۰۸۶	۱۲	۰/۰۶۳	۰/۰۸۶
۶	۰/۰۷۳	۰/۱	۱۳	۰/۱۱	۰/۱۵
۷	۰/۰۴۹	۰/۰۶۸			

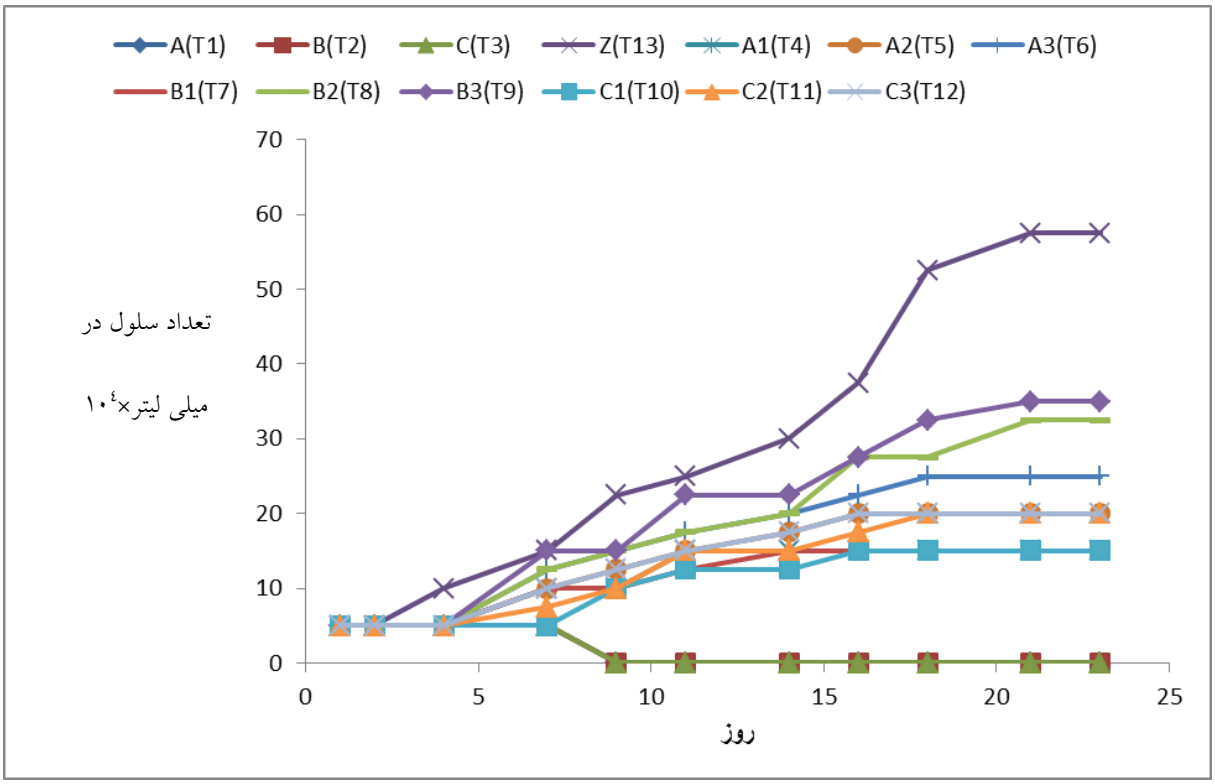
جدول ۵- مقایسه رشد ریز جلبک اسپیرولینا (میانگین ± انحراف معیار تعداد سلول در میلی لیتر × $۱۰^۴$) در تیمارهای ۱ تا ۷.

روزهای شمارش تیمار	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷
۱	۵ ± ۰	۵ ± ۰	۵ ± ۰	۵ ± ۰	۵ ± ۰	۵ ± ۰	۵ ± ۰
۲	۵ ± ۰	۵ ± ۰	۵ ± ۰	۵ ± ۰	۵ ± ۰	۵ ± ۰	۵ ± ۰
۴	۵ ± ۰	۵ ± ۰	۵ ± ۰	۵ ± ۰	۵ ± ۰	۵ ± ۰	۵ ± ۰
۷	۵ ± ۰	۵ ± ۰	۵ ± ۰	۱۰ ± ۰	۱۰ ± ۰	۱۲/۵ ± ۳/۵۳	۱۰ ± ۰
۹	۰	۰	۰	۱۰ ± ۰	۱۲/۵ ± ۳/۵۳	۱۵ ± ۰	۱۰ ± ۰
۱۱	۰	۰	۰	۱۵ ± ۰	۱۵ ± ۰	۱۷/۵ ± ۳/۵۳	۱۲/۵ ± ۳/۵۳
۱۴	۰	۰	۰	۱۵ ± ۰	۱۷/۵ ± ۳/۵۳	۲۰ ± ۰	۱۵ ± ۰
۱۶	۰	۰	۰	۱۵ ± ۰	۲۰ ± ۰	۲۲/۵ ± ۳/۵۳	۱۵ ± ۰
۱۸	۰	۰	۰	۱۵ ± ۰	۲۰ ± ۰	۲۵ ± ۰	۱۵ ± ۰
۲۱	۰	۰	۰	۱۵ ± ۰	۲۰ ± ۰	۲۵ ± ۰	۱۵ ± ۰
۲۳	۰	۰	۰	۱۵ ± ۰	۲۰ ± ۰	۲۵ ± ۰	۱۵ ± ۰
کل	۲/۴۶ ± ۱/۸۱	۲/۴۶ ± ۱/۸۱	۲/۴۶ ± ۱/۸۱	۱۱/۳۶ ± ۴/۴۱	۱۳/۶۳ ± ۶/۳۹	۱۶/۱۳ ± ۸/۱۵	۱۱/۱۳ ± ۴/۳۴

*عدد صفر نشانه عدم رشد ریز جلبک می باشد.

جدول ۶- مقایسه رشد ریز جلبک اسپیرولینا (میانگین ± انحراف معیار تعداد سلول در میلی لیتر × $۱۰^۴$) در تیمارهای ۸ تا ۱۳.

روزهای شمارش تیمار	۸	۹	۱۰	۱۱	۱۲	۱۳
۱	۵ ± ۰	۵ ± ۰	۵ ± ۰	۵ ± ۰	۵ ± ۰	۵ ± ۰
۲	۵ ± ۰	۵ ± ۰	۵ ± ۰	۵ ± ۰	۵ ± ۰	۵ ± ۰
۴	۵ ± ۰	۵ ± ۰	۵ ± ۰	۵ ± ۰	۵ ± ۰	۱۰ ± ۰
۷	۱۲/۵ ±۳/۵۳	۱۵ ± ۰	۵ ± ۰	۷/۵ ± ۳/۵۳	۱۰ ± ۰	۱۵ ± ۰
۹	۱۵ ± ۰	۱۵ ± ۰	۱۰ ± ۰	۱۰ ± ۰	۱۲/۵ ±۳/۵۳	۲۲/۵ ±۳/۵۳
۱۱	۱۷/۵ ± ۳/۵۳	۲۲/۵ ± ۳/۵۳	۱۲/۵ ± ۳/۵۳	۱۵ ± ۰	۱۵ ± ۰	۲۵ ± ۰
۱۴	۲۰ ± ۰	۲۲/۵ ± ۳/۵۳	۱۲/۵ ± ۳/۵۳	۱۵ ± ۰	۱۷/۵ ± ۳/۵۳	۳۰ ± ۰
۱۶	۲۷/۵ ± ۳/۵۳	۲۷/۵ ± ۳/۵۳	۱۵ ± ۰	۱۷/۵ ± ۳/۵۳	۲۰ ± ۰	۳۷/۵ ± ۳/۵۳
۱۸	۲۷/۵ ± ۳/۵۳	۳۲/۵ ± ۳/۵۳	۱۵ ± ۰	۲۰ ± ۰	۲۰ ± ۰	۵۲/۵ ± ۳/۵۳
۲۱	۳۲/۵ ± ۳/۵۳	۳۵ ± ۰	۱۵ ± ۰	۲۰ ± ۰	۲۰ ± ۰	۵۷/۵ ± ۳/۵۳
۲۳	۳۲/۵ ± ۳/۵۳	۳۵ ± ۰	۱۵ ± ۰	۲۰ ± ۰	۲۰ ± ۰	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



شکل ۱- تراکم (تعداد سلول در میلی لیتر ×۱۰^۴) ریز جلبک اسپیرولینا در تیمارهای مختلف.

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 (۲۰۰۶) استفاده از محیط کشت جدید فرموله شده برای کشت انبوه اسپیرولینا را با ترکیب کردن مواد مغذی انتخابی از محیط کشت استاندارد زاروک (SM) و ترکیبات شیمیایی کم هزینه دیگر مورد مطالعه قرار دادند. تفاوت معنی‌داری در میزان پروتئین اسپیرولینا رشد یافته در دو محیط مشاهده نشد. محاسبات هزینه نشان داد آماده سازی ۱۰۰۰ لیتر محیط کشت SM ۷۹/۵ دلار آمریکا هزینه دارد، در حالی که محیط کشت جدی (RM6 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).

اولین کشت موفقیت آمیز اسپیرولینا ماکسیما با استفاده از آب شور (آب دریا) بدون غنی سازی در شرایط آزمایشگاهی در سال ۱۹۸۴ توسط Materassi و همکاران (۱۹۸۴) گزارش شد. تکنیک آزمایشگاهی با موفقیت در کشت انبوه اسپیرولینا ماکسیما در استخر رو باز مورد استفاده قرارگرفت. 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 ۸ تا ۸/۳ 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.

آب تالاب منگوئرا (در برزیل) چندین ماده مغذی مورد نیاز برای رشد اسپیرولینا را دارد. این مواد شامل ۰/۱۳۲ میلی گرم در لیتر نیتروژن آمونیاکی، ۰/۲۵۴۸ میلی گرم در

لیتر فسفات، ۱/۰۴۰ میلی گرم در لیتر نیترات، ۰/۰۱۹۵ میلی گرم در لیتر نیتریت، ۰/۰۱۹۲ گرم در لیتر کلسیم، ۰/۰۰۴۸ گرم در لیتر پتاسیم، ۰/۰۳۰۶ گرم در لیتر سدیم، و ۰/۱۲۶ گرم در لیتر بیکربنات می باشد، بنابر این می‌تواند به محیط کشت اسپیرولینا افزوده شود و هزینه‌های تولید این ریز جلبک را کاهش دهد. در یک بررسی رشد ویژه و بازدهی اسپیرولینا پلاتنسیس طی کشت غیر مداوم مکرر مورد بررسی قرار گرفت. سه نوع محیط کشت در این تحقیق به کار رفت؛ محیط زاروک رقیق نشده، محیط زاروک رقیق شده با ۵۰٪ آب تالاب و آب تالاب به علاوه ۱۰٪ محیط زاروک، ضریب رشد ویژه ۰/۱۱۱ μ/d و بازدهی زیتوده ۰/۰۴۲۲۳ g/dL با استفاده از محیط زاروک به دست آمد. نتایج نشان داد بیشترین بازدهی زیتوده با استفاده از پایین ترین غلظت سلولی اسپیرولینا هنگام برداشت و بالاترین درصد نوسازی محیط کشت در روش کشت غیر مداوم مکرر حاصل می شود. با استفاده از آب تالاب به علاوه ۱۰٪ محیط زاروک ضریب رشد ویژه ۰/۱۱۳ μ/d و بازدهی ۰/۰۴۶۷ g/dL حاصل شد. مقادیر حاصل شده در این روش ۲ یا ۳ برابر مقادیر به دست آمده در روش کشت غیر مداوم می‌باشد (Reinehr and Costa, 2006).

در این بررسی تیمار ۹ که حاوی آب دریای گمیشان به علاوه ۲۰٪ محیط استاندارد زاروک بود، پس از محیط استاندارد زاروک بیشترین تراکم سلولی را داشت. در حالی که تراکم سلولی در تیمار ۸ (آب دریای گمیشان به علاوه ۱۰٪ محیط استاندارد زاروک) تنها کمی پایین تر از تیمار ۹ بود و اختلاف معنی داری بین این دو تیمار مشاهده نشد (جدول ۵). بنابر این استفاده از تیمار ۸ تراکم سلولی نزدیک به تیمار ۹ حاصل شد، در حالی که نصف میزان ترکیبات شیمیایی تیمار ۹ را داشت. مطابق با تحقیق کاستا و رینر (۲۰۰۶)، استفاده از آب تالاب منگوئرا به علاوه ۱۰٪ 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 ۱۰ و ۲۰٪ محیط استاندارد در مقایسه با محیط استاندارد تراکم سلولی و ضریب رشد ویژه کمتری حاصل شد که با نتایج کار کاستا و رینر (۲۰۰۶)، 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 بررسی دیگر از بیکربنات سدیم، اوره، فسفات، سولفات، فریک آهن، منگنز و پتاسیم، برای غنی سازی آب تالاب منگوئرا استفاده شد. نتایج نشان داد میزان تولید بیوماس اسپیرولینا در آب تالاب غنی نشده ۰/۰۱ گرم در لیتر ۰/۷۸ می‌باشد و در آب تالاب به علاوه ۲/۸۸ گرم در لیتر بیکربنات سدیم بدون افزودن مواد مغذی دیگر، g/L ۰/۰۱ گرم در لیتر ۰/۸۲ زیتوده حاصل می شود. با افزودن فسفات و ترکیبات آهن‌دار، رشد بیومس اسپیرولینا پلاتنسیس به ۰/۰۳ گرم در لیتر ۱/۳۴ افزایش یافت (Costa et al. 2003).

اسپیرولینا می تواند در آب تالاب منگوئرا تا حدودی رشد کند، اما آب دریای خزر به دلیل کم بودن ترکیبات مغذی به تنهایی و بدون غنی سازی قادر به حمایت از رشد اسپیرولینا نیست (جدول ۲ و ۵). طبق نتایج این بررسی با افزایش درصد محیط استاندارد در آب دریای خزر، تراکم سلولی و ضریب رشد اسپیرولینا افزایش پیدا می کند (جدول ۴ و ۵)، زیرا با افزایش درصد محیط کشت استاندارد در آب دریای خزر، ترکیبات مغذی بیشتری در دسترس ریز جلبک اسپیرولینا قرار می گیرد و سبب رشد سلولی می شود. نتایج حاصل شده در این بررسی تقریباً با تحقیق کاستا و همکاران (۲۰۰۳) مطابقت دارد، زیرا با افزودن چند ترکیبات مغذی (مانند افزودن محیط کشت استاندارد که حاوی چند ترکیب است) به تالاب منگوئرا در مقایسه با آب تالاب بدون مواد مغذی، رشد اسپیرولینا افزایش یافت.

در یک بررسی طی کشت غیر مداوم مکرر اسپیرولینا پلاتنسیس، بالاترین ضریب رشد ویژه (۰/۱۳۸ μ/d) و بازدهی تولید زیتوده (۰/۰۴۶ g/dL) با استفاده از محیط کشت حاوی ۲۰٪ محیط زاروک و ۸۰٪ آب مقطر، غلظت سلولی ۰/۴ گرم در لیتر و نوسازی بین ۴۰ تا ۶۰٪ از محیط کشت به دست می‌آید، در حالی که استفاده از محیط زاروک تغلیظ نشده ضریب رشد ویژه ۰/۱۳۴ μ/d و بازدهی تولید زیتوده ۰/۰۳۸ g/dL را با روش کشت غیر مداوم حاصل می‌کند (Radmann et al. 2007).

در این بررسی بالاترین ضریب رشد پس از محیط زاروک در تیمار ۹ حاصل شد (۰/۰۸۸). محیط کشت این تیمار

آب دریای گمیشان به علاوه ۲۰٪ محیط زاروک بود. Radmann و همکاران (۲۰۰۷)، با استفاده از محیطی متشکل از ۸۰٪ آب مقطر و ۲۰٪ محیط زاروک ضریب رشد و زیتوده بیشتری نسبت به تیمار ۹ در این تحقیق به دست 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

کردوانی، پ. ۱۳۷۱. اکوسیستم های آبی ایران، دریای خزر. نشر قوس. ۳۵۲ص.

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.

Effects of water enrichment on microalgae *Spirulina platensis* growth parameters in the southern Caspian Sea

Khorshid Hosseinzade [1*], Ali Ganjian Khenari [2,3], Seyed Mehdi Jafari [4]
1- Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran
2- Caspian Sea Research Center, Sari, Iran
3- Caspian Research Group of Fisheries & Water Pollutants, Sari, Iran
4- Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

Received 6 September 2013; accepted 16 March 2014

Abstract
Spirulina is an important microalgae in human nutrition due to its phenolic compounds, proteins, unsaturated fatty acids, vitamins and minerals. Production of this microalgae using low-cost sources such as sea water has always been considered to achieve high production at low cost. In this study, sea water from three areas of southern Caspian Sea (Gomishan, Sari and Mahmoud Abad) were enriched by 0, 5, 10, 20% Zarrouk medium to study the growth of *Spirulina* microalgae. *Spirulina* culturing was performed at 30°C, 4670 ± 350 lux light intensity and 12 h dark, 12 h light period. The results showed that standard Zarrouk medium has the highest specific growth rate (0.11) and growth rate (0.15). Sea water from Gomishan area enriched by 20% standard Zarrouk medium showed highest specific growth rate and growth rate (0.12, 0.088, respectively) following standard Zarrouk medium. In this medium, the number of cells reached to 3.5×10^5 cell mL^{-1} after 23 days, while in standard Zarrouk medium number of cells reached to 5.75×10^5 cell mL^{-1}. Results showed that by using the Caspian Sea water enriched by standard Zarrouk medium can reduce *Spirulina* production costs.

Keywords: Microalgae, *Spirulina*, Standard medium, Mass production, Caspian Sea

*Corresponding author: hoseinzade_kh66@yahoo.com