

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

خورشید حسین زاده<sup>۱\*</sup>، علی گنجیان خناری<sup>۲</sup>، سید مهدی جعفری<sup>۳</sup>

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، ویتامین‌ها 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  $350 \pm 4670 \text{ lux}$  و زمان نور دهی (۱۲ ساعت نور، ۱۲ ساعت تاریکی) انجام شد. نتایج نشان داد محیط استاندارد زاروک بالاترین میزان ضریب رشد ( $0/11 \mu/d$ ) و نرخ رشد ( $0/15$ ) 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  $0/12$  و  $0/88 \mu/d$ ). در این محیط تعداد سلول‌ها پس از ۲۳ روز کشت به  $3/5 \times 10^5$  عدد سلول در میلی لیتر رسید و در محیط استاندارد به  $5/75 \times 10^5$  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

## مقدمه

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

اسپیروولینا جلبکی سبز-آبی و ماریپیچی که نام علمی آن آرتروسپیرا پلاتنسیس (*Arthrospira plantensis*) است. اولین بار در سال ۱۹۶۴ ارزش تغذیه ای این ریز جلبک مشخص شد (Henrikson, 2010). اسپیروولینا پلاتنسیس در آب های 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 ایمونوگلوبولین ها، افزایش گلبول های سفید خون پس از شیمی درمانی و رادیوتراپی، بهبود عملکرد دستگاه ایمنی بدن و کاهش رشد سلول های سرطانی در افراد مبتلا به سرطان خون از جمله خواص درمانی اسپیروولینا می باشد (Habib et al. 2008).

به طور کلی نور، دما، pH، کیفیت آب، میزان هوادهی و حضور ترکیب های مغذی فاکتورهای موثر در تولید اسپیروولینا می باشند (Ayala, 1998; Ciferri, 1983; کربن، نیتروژن، فسفر، سولفور، کلسیم، منیزیم و پتاسیم از جمله عناصر ضروری برای اسپیروولینا هستند. عناصری که اسپیروولینا 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 اسپیروولینا اوایل سال ۱۹۷۰ در دریای تکزاسکو در مکزیک آغاز شد (Henrikson, 2010). تولید انبوه اسپیروولینا 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 اسپیروولینا دارند اما آب شیرین در این مناطق کم است. Materassi et al. (1984).

هزینه مواد مغذی حدود ۱۵ الی ۲۰٪ کل هزینه های تولید اسپیروولینا 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 اسپیروولینا به عنوان غذای دام و یک منبع برای محصولات با ارزش غذایی بالا باشد (Belay and Ota, 1993). اولین محیط کشت صنعتی برای کشت اسپیروولینا 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 اسپیروولینا مورد استفاده قرار گرفت. مانند محیط اصلاح شده (Revised medium) (Raof et al. 2006)، محیط CFTIR (Venkataraman et al. 1995)، محیط بنگلادش (Khatum et al. 1994) محیط کشت راثو 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 اسپیروولینا گزارش شده است. همچنین نتایج تحقیقات نشان می دهد می توان تولید اسپیروولینا 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 اسپیروولینا هنگام برداشت، بهینه کرد و هزینه های تولید را کاهش داد (Radmann et al. 2007).

از جمله مزایای تولید اسپیروولینا 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 اسپیروولینا 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 دریاچه هاست (Kardavanii, 1992). میانگین شوری آب دریای خزر حدود ۳۰٪ املاح موجود در آب اقیانوس ها است. املاح

آب، ۰/۰۸ گرم اتیلن دی متیل آمین تترا سدیم استات و ۱ میلی لیتر محلول A5 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 (محلول ۲). برای تهیه محلول A5 ۲/۸۶۰ گرم اسید بوریک، ۱/۸۱۰ گرم منگنز کلراید هیدراته (۴ مولکول آب)، ۰/۲۲۲ گرم سولفات روی هیدراته (۴ مولکول آب)، ۰/۱۷۷ 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 A5 در دمای °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 A5 به آن افزوده شد (Zarrouk, 1996). آب سه ناحیه از دریای خزر (گمیشان، ساری، محمودآباد) به همراه درصد های 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.

کلرید خزر کمتر اما نمک های سولفاتی و کربناتی 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

### میکروارگانسیم و آماده سازی محیط کشت

در این بررسی سیانوباکتر *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 مولکول آب)، ۰/۰۱ گرم سولفات آهن هیدراته (۷ مولکول

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 میلی لیتری با ۲۰۰ میلی لیتر محیط کشت انجام شد. کشت در یک قفسه کشت با دمای °C ۲۰ ± 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

سلول های جلبک در هر تیمار و در هر روز با استفاده از رابطه زیر به دست آمد (Ganjian, 2011):

از لام نئوبار انجام شد. برای هر تیمار ۲ تکرار در نظر گرفته شد و شمارش تعداد سلول های ریز جلبک با میکروسکوپ نوری و لام نئوبار آینه ای انجام شد. تعداد واقعی

رقت  $\times 10 \times$  میلی مترمربع / سلول ها = میلی مترمربع / سلول ها

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

$1 \text{ mL} = 1000 \times$  رقت  $\times 10 \times 5 \times$  تعداد نمونه شمارش شده

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

$$\text{SGR} = \text{Ln} (m_2/m_1) / (t_2 - t_1); t_2 > t_1$$

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

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

$t_1$  = اولین روز

$t_2$  = آخرین روز

عملیات مربوطه به وسیله نرم افزار SPSS18 مورد سنجش قرار گرفت.

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

### 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 ( $\text{CO}_3^{2-}$ )	۸۰	۱۷۰	۱۱۰
بیکربنات ( $\text{HCO}_3^-$ )	۱۵۵	۵	۸۰
نیترات ( $\text{NO}_3^-$ )	-	۰/۸۹	۰/۸
نیتريت ( $\text{NO}_2^-$ )	۰/۰۰۳	۰/۰۱۳	۰/۰۰۰۳
فسفات ( $\text{PO}_4^{3-}$ )	۷/۵	۳/۳	۳/۶

با تلقیح استوک اسپیرولینا به تیمارهای ۱، ۲ و ۳ رشدی مشاهده نشد و تعداد 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  $0.073 \mu/d$  را از خود نشان داد و تعداد سلول های جلبک پس از ۲۳ روز به  $10^4 \times 25$  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  $10^4 \times 15$  عدد سلول در میلی لیتر و تا روز ۲۳ ثابت باقی ماند، اما در

در تیمار ۱۳ از محیط استاندارد زاروک برای کشت اسپیرولینا و مقایسه آن با تیمارهای دیگر استفاده شد. این تیمار بالاترین میزان ضریب رشد ( $0.11 \mu/d$ ) و نرخ رشد ( $0.15$ ) را داشت.

تیمار ۹ پس از تیمار ۱۳ بالاترین میزان نرخ رشد و ضریب رشد ویژه را داشت (به ترتیب  $0.12$  و  $0.088 \mu/d$ ). در این تیمار تعداد سلول ها پس از ۲۳ روز کشت به  $10^4 \times 35$  عدد سلول در میلی لیتر رسید، در حالی که تعداد سلول ها در محیط استاندارد پس از ۲۳ روز کشت به  $10^4 \times 57/5$  عدد سلول در میلی لیتر رسید.

تیمارهای ۵ در روز ۱۶ به  $10^4 \times 20$  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  $10^4 \times 32$  عدد سلول در میلی لیتر رسید که کمی پایین تر از تیمار ۹ ( $10^4 \times$  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 ( $10^4 \times 15$  عدد سلول در میلی لیتر). در تیمار 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 ( $10^4 \times 20$  عدد سلول در میلی لیتر) و تیمار ۱۰ تعداد سلول کمتری داشت ( $10^4 \times 15$  عدد سلول در میلی لیتر). در تیمار ۱۱ تعداد سلول ها در روز ۱۸ به  $10^4 \times 20$  عدد سلول در میلی لیتر رسید، اما تیمار ۱۲ در روز ۱۶ به این تعداد سلول رسید و تا روز ۲۳ ثابت ماندند.

تیمار ۱۳ در روز ۱۳ هیچگونه رشدی نداشت. تیمار ۱۲ در روز ۱۲ هیچگونه رشدی نداشت. تیمار ۱۱ در روز ۱۱ هیچگونه رشدی نداشت. تیمار ۱۰ در روز ۱۰ هیچگونه رشدی نداشت. تیمار ۹ در روز ۹ هیچگونه رشدی نداشت. تیمار ۸ در روز ۸ هیچگونه رشدی نداشت. تیمار ۷ در روز ۷ هیچگونه رشدی نداشت. تیمار ۶ در روز ۶ هیچگونه رشدی نداشت. تیمار ۵ در روز ۵ هیچگونه رشدی نداشت. تیمار ۴ در روز ۴ هیچگونه رشدی نداشت. تیمار ۳ در روز ۳ هیچگونه رشدی نداشت. تیمار ۲ در روز ۲ هیچگونه رشدی نداشت. تیمار ۱ در روز ۱ هیچگونه رشدی نداشت.

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	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
۲	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
۴	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
۷	.	.	.	.	.	۲۸/۲۸	.	۲۸/۲۸	.	.	۴۷/۱۴	.	.
۹	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	۲۸/۲۸	۱۵/۷۱
۱۱	.	.	.	.	.	.	۲۸/۲۸	۲۰/۲۰	۱۵/۷۱	۲۸/۲۸	.	.	.
۱۴	.	.	.	.	.	.	.	.	۱۵/۷۱	۲۸/۲۸	.	۲۰/۲۰	.
۱۶	.	.	.	.	.	.	.	۱۵/۷۱	۱۲/۵۸	۱۲/۵۸	۲۰/۲۰	.	۹/۴۲
۱۸	.	.	.	.	.	.	.	.	۱۲/۵۸	۱۰/۸۷	.	.	۶/۷۳
۲۱	.	.	.	.	.	.	.	.	۱۰/۸۷	.	.	.	۶/۱۴
۲۳	.	.	.	.	.	.	.	.	۱۰/۸۷	.	.	.	۶/۱۴
کل	.	.	.	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 ( $\mu/d$ ) ویژه ریز جلبک اسپیرولینا در تیمارهای مختلف.

تیمارها	ضریب رشد	نرخ رشد	تیمارها	ضریب رشد	نرخ رشد
۱	.	.	۸	۰/۰۸۱	۰/۱۱
۲	.	.	۹	۰/۰۸۸	۰/۱۲
۳	.	.	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			

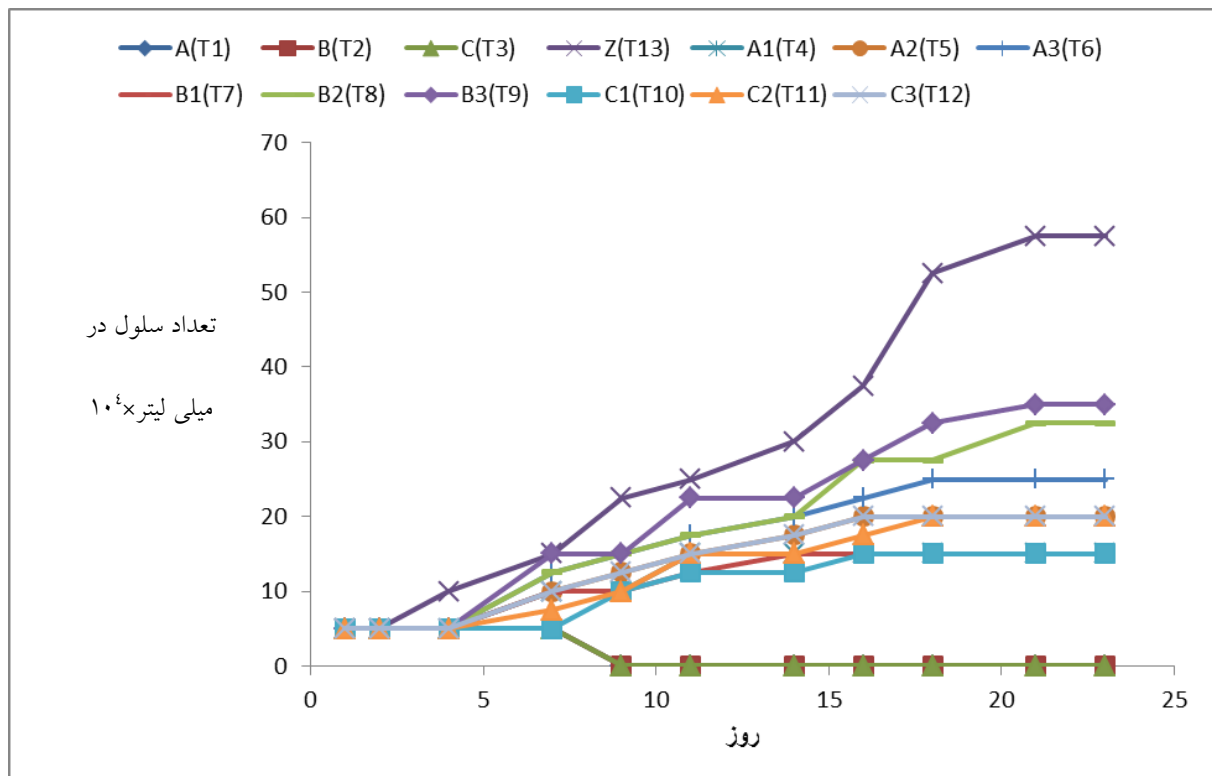
جدول ۵- مقایسه رشد ریز جلبک اسپیرولینا (میانگین  $\pm$  انحراف معیار تعداد سلول در میلی لیتر  $\times 10^4$ ) در تیمارهای ۱ تا ۷.

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

\*عدد صفر نشانه عدم رشد ریز جلبک می باشد.

جدول ۶- مقایسه رشد ریز جلبک اسپیرولینا (میانگین  $\pm$  انحراف معیار تعداد سلول در میلی لیتر  $\times 10^4$ ) در تیمارهای ۸ تا ۱۳.

روزهای شمارش تیمار	۸	۹	۱۰	۱۱	۱۲	۱۳
۱	۵ $\pm$ ۰	۵ $\pm$ ۰	۵ $\pm$ ۰	۵ $\pm$ ۰	۵ $\pm$ ۰	۵ $\pm$ ۰
۲	۵ $\pm$ ۰	۵ $\pm$ ۰	۵ $\pm$ ۰	۵ $\pm$ ۰	۵ $\pm$ ۰	۵ $\pm$ ۰
۴	۵ $\pm$ ۰	۵ $\pm$ ۰	۵ $\pm$ ۰	۵ $\pm$ ۰	۵ $\pm$ ۰	۱۰ $\pm$ ۰
۷	۱۲/۵ $\pm$ ۳/۵۳	۱۵ $\pm$ ۰	۵ $\pm$ ۰	۷/۵ $\pm$ ۳/۵۳	۱۰ $\pm$ ۰	۱۵ $\pm$ ۰
۹	۱۵ $\pm$ ۰	۱۵ $\pm$ ۰	۱۰ $\pm$ ۰	۱۰ $\pm$ ۰	۱۲/۵ $\pm$ ۳/۵۳	۲۲/۵ $\pm$ ۳/۵۳
۱۱	۱۷/۵ $\pm$ ۳/۵۳	۲۲/۵ $\pm$ ۳/۵۳	۱۲/۵ $\pm$ ۳/۵۳	۱۵ $\pm$ ۰	۱۵ $\pm$ ۰	۲۵ $\pm$ ۰
۱۴	۲۰ $\pm$ ۰	۲۲/۵ $\pm$ ۳/۵۳	۱۲/۵ $\pm$ ۳/۵۳	۱۵ $\pm$ ۰	۱۷/۵ $\pm$ ۳/۵۳	۳۰ $\pm$ ۰
۱۶	۲۷/۵ $\pm$ ۳/۵۳	۲۷/۵ $\pm$ ۳/۵۳	۱۵ $\pm$ ۰	۱۷/۵ $\pm$ ۳/۵۳	۲۰ $\pm$ ۰	۳۷/۵ $\pm$ ۳/۵۳
۱۸	۲۷/۵ $\pm$ ۳/۵۳	۳۲/۵ $\pm$ ۳/۵۳	۱۵ $\pm$ ۰	۲۰ $\pm$ ۰	۲۰ $\pm$ ۰	۵۲/۵ $\pm$ ۳/۵۳
۲۱	۳۲/۵ $\pm$ ۳/۵۳	۳۵ $\pm$ ۰	۱۵ $\pm$ ۰	۲۰ $\pm$ ۰	۲۰ $\pm$ ۰	۵۷/۵ $\pm$ ۳/۵۳
۲۳	۳۲/۵ $\pm$ ۳/۵۳	۳۵ $\pm$ ۰	۱۵ $\pm$ ۰	۲۰ $\pm$ ۰	۲۰ $\pm$ ۰	۵۷/۵ $\pm$ ۳/۵۳
کل	۱۸/۱۸ $\pm$ ۱۰/۶۳	۲۰ $\pm$ ۱۱/۶۴	۱۰/۴۵ $\pm$ ۴/۰۶	۱۲/۷۲ $\pm$ ۶/۳۱	۱۳/۶۳ $\pm$ ۶/۳۹	۲۸/۸۶ $\pm$ ۱۹/۶۳



شکل ۱- تراکم (تعداد سلول در میلی لیتر  $\times 10^4$ ) ریز جلبک اسپیرولینا در تیمارهای مختلف.

موفقیت در کشت انبوه اسپیرولینا ماکسیما در استخر رو باز مورد استفاده قرار گرفت. میانگین سالانه تولید بیوماس اسپیرولینا در آب دریا به علاوه اوره  $7/35 \text{ g/m}^2\text{d}$  بود، که کمی پایین‌تر از مقدار به دست آمده از محیط استاندارد بیکربنات سدیم به علاوه آب دریا ( $8/14 \text{ g/m}^2\text{d}$ ) تحت شرایط کنترل شده pH در دامنه ۸ 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)، می‌توان 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  $0/132$  میلی گرم در لیتر نیتروژن آمونیاکی،  $0/2548$  میلی گرم در

#### بحث

بیشترین هزینه تولید اسپیرولینا در مقیاس کوچک، مربوط به محیط کشت می‌باشد و سعی می‌شود با انجام تحقیقاتی در این زمینه امکان تولید ارزان‌تر 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  $1000$  لیتر محیط کشت SM  $79/5$  دلار آمریکا هزینه دارد، در حالی که محیط کشت جدی (RM6)  $16$  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 (Raouf 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

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، فربک 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 می باشد و در آب تالاب به علاوه ۲/۸۸ گرم در لیتر بیکربنات سدیم بدون افزودن مواد مغذی دیگر، ۰/۰۱ گرم در لیتر ۰/۸۲ زیتوده حاصل می شود. با افزودن فسفات و ترکیبات آهن دار، رشد بیوماس 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  $\mu/d$ ) 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 می آید، در حالی که استفاده از محیط زاروک تغلیظ نشده ضریب رشد ویژه ۰/۱۳۴  $\mu/d$  و بازدهی تولید زیتوده ۰/۰۳۸  $g/dL$  را با روش کشت غیر مداوم حاصل می کند (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

لیتر فسفات، ۱/۰۴۰ میلی گرم در لیتر نترات، ۰/۰۱۹۵ میلی گرم در لیتر نیتريت، 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 می تواند به محیط کشت اسپیرولینا افزوده شود و هزینه های 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  $\mu/d$  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  $\mu/d$  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 می باشد (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



- 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

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.

- 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., Kirubakaran, 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.
- Raof, 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. "Gidrometeorologii i Hidrokhimii 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 in *Spirulina maxima*. PhD thesis, University of Paris.

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

Khorshid Hosseinzade <sup>1\*</sup>, Ali Ganjian Khenari <sup>2,3</sup>, Seyed Mehdi Jafari <sup>4</sup>

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<sup>5</sup> cell mL<sup>-1</sup> after 23 days, while in standard Zarrouk medium number of cells reached to 5.75 × 10<sup>5</sup> cell mL<sup>-1</sup>. 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