Archive of SID

ISSN: 2476-6887; Journal of Fisheries Science and Technology. 2019;8(4):229-240

Effect of Various Alternative Carbon Sources on Growth Parameters of *Spirulina maxima* Microalgae

ARTICLE INFO

Article Type
Original Research

Authors
Mirhosseini N.*[1] *MSc,*
Davarnejad R.[1] *PhD,*
Hallaji Sani A.[2] *PhD,*
Cano-Europa E.[3] *PhD,*
Tavakoli O.[4] *PhD*

How to cite this article
Mirhosseini N, Davarnejad R, Hallaji Sani A, Cano-Europa E, Tavakoli O. Effect of Various Alternative Carbon Sources on Growth Parameters of *Spirulina maxima* Microalgae. Journal of Fisheries Science and Technology. 2019;8(4):229-240.

[1]Chemical Engineering Department, Engineering Faculty, Arak University, Arak, Iran
[2]Caspian Faculty of Engineering, College of Engineering, University of Tehran, Tehran, Iran
[3]Physiology Department, Faculty of Physiology, Institute of National Polytechnic (IPN), Mexico City, Mexico
[4]School of Chemical Engineering,,College of Engineering, University of Tehran, Tehran, Iran

Correspondence
Address: Chemical Engineering Faculty, Arak University, Shahid Beheshti Street, Arak, Iran
Phone: +98 (11) 33379749
Fax: -
n.mir89@yahoo.com

Article History
Received: November 14, 2019
Accepted: May 11, 2020
ePublished: June 10, 2020

ABSTRACT

Aims Nowadays, microalgae use to produce biologically active drugs and pharmaceuticals. The carbon source is an essential factor for *Spirulina maxima* growth. It is valuable to find the appropriate carbon source and its concentration to achieve high levels of biomass in the shortest cultivation period. Therefore, in the present study, the effect of different carbon sources (sodium carbonate, sodium bicarbonate, glucose, and molasses) with different concentrations (16, 24, and 32gL^{-1}) on growth and biomass production was evaluated.

Materials & Methods Microalgae were grown in 11 treatments with 3 replications at laboratory temperature (28±3°C) and 1350±100Lux light intensity (24-hours exposure-time). The maximum specific growth rate and doubling time were calculated according to nonlinear modeling by Wolfram Mathematica 11.3 software at a 99% confidence interval.

Findings The highest biomass concentration (gL^{-1}) at the highest carbon source concentration in the first 5 days belongs to molasses (3.083), glucose (2.094), sodium carbonate (0.869), and sodium bicarbonate (0.835). Biomass production of treatments except for glucose in medium was increased by increasing concentration from 16 to 32gL^{-1}. Although molasses has reached the highest biomass production during the first 5 days of cultivation, the greatest effect on increasing specific growth rate belongs to the glucose sample.

Conclusion The carbon source and its concentration had a significant effect on growth and biomass production. Glucose was selected as an effective carbon source for growth with a concentration of 24gL^{-1}. Moreover, the highest concentration of treatments had shown the least effect on the specific growth rate.

Keywords Carbon Source; Molasses; Glucose; Growth Parameters; Biomass; *Spirulina maxima*

CITATION LINKS

[1] A Monograph on Spirulina Platensis: Biotechnology and ... [2] Chemicals from ... [3] A review on culture, production and use of Spirulina as food for humans and feed ... [4] Plants as 'chemical factories' for the production of polyunsaturated ... [5] Antioxidant activity of different fractions of ... [6] Effect of light and temperature on the cyanobacterium ... [7] Prevention of experimental oral cancer by extracts of ... [8] Current microalgae health food R and D activities in ... [9] Effects of CD59 on antitumoral activities of phycocyanin ... [10] Antioxidant properties of Spirulina ... [11] Phycocyanin production in seawater culture of ... [12] New medium for pharmaceutical grade... [13] Culture of Spirulina platensis in human urine for ... [14] Annual productivity of Spirulina (Arthrospira) ... [15] Degradation of chlorphrifos by an alkaline phosphatase ... [16] Growth and chemical composition of Spirulina ... [17] Spirulina culture in ... [18] Effect of carbon content, salinity and pH on ... [19] Growth and phycocyanin formation of Spirulina ... [20] Growth characteristics of Spirulina platensis ... [21] Phycobiliproteins and complementary ... [22] Effect of alternative C2 carbon sources on the ... [23] Application of mathematical models to the determination ... [24] Evaluation of Spirulina sp. growth in photoautotrophic ... [25] High cell density mixotrophic culture of Spirulina platensis on ... [26] Mixotrophic cultivation of microalga Spirulina platensis using ... [27] Enhance the growth of Spirulina platensis using molasses as ... [28] Arthrospira maxima (Spirulina) and C-phycocyanin prevent the ... [29] Combine effects of temperature and photoperiod on growth ... [30] Comparative study on the growth performance of Spirulina ... [31] Growth, productivity and some physico-chemical ... [32] Growth performance of Spirulina (Arthrospira) platensis in a low cost ... [33] Mixotrophic cultivation of Spirulina platensis in dairy ... [34] Biosorption of microelements by spirulina: Towards ... [35] Optimization of Fedbach cultivation of new two ... [36] Spirulina platensis: process ... [37] Accumulation of selenium in mixotrophic ... [38] Effects of chemical parameters on Spirulina ... [39] Cyanobacterial ... [40] Spirulina, the edible ...

Copyright© 2019, TMU Press. This open-access article is published under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License which permits Share (copy and redistribute the material in any medium or format) and Adapt (remix, transform, and build upon the material) under the Attribution-NonCommercial terms.

www.SID.ir

Archive of SID

بررسی تاثیر منابع کربنی جایگزین متعدد بر پارامترهای رشد ریزجلبک *Spirulina maxima*

ندا میرحسینی* MSc
گروه مهندسی شیمی، دانشکده مهندسی، دانشگاه اراک، اراک، ایران
رضا داورنژاد PhD
گروه مهندسی شیمی، دانشکده مهندسی، دانشگاه اراک، اراک، ایران
احمد حلاجی ثانی PhD
دانشکده فنی کاسپین، پردیس دانشکده‌های فنی، دانشگاه تهران، تهران، ایران
اِدگار کانو یروپا PhD
گروه فیزیولوژی، دانشکده فیزیولوژی، دانشگاه پلی‌تکنیک، مکزیکوسیتی، مکزیک
امید توکلی PhD
گروه مهندسی شیمی، دانشکده مهندسی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

چکیده

اهداف: امروزه استفاده از ریزجلبک‌ها برای تولید مواد فعال زیستی و دارویی بسیار مورد توجه است. کربن یک ماده ضروری برای رشد ریزجلبک *Spirulina maxima* محسوب می‌شود. یافتن بهترین منبع کربنی و غلظت برای رسیدن به مقادیر بالای زیست‌توده در کوتاه‌ترین دوره کشت بسیار ارزشمند است. بنابراین در مطالعه حاضر، تاثیر منابع کربنی (کربنات و بی‌کربنات‌سدیم، گلوکز و ملاس) با غلظت‌های مختلف (۱۶، ۲۴ و ۳۲گرم بر لیتر) بر میزان رشد و تولید زیست‌توده بررسی شد.

مواد و روش‌ها: کشت در قالب ۱۱ تیمار و ۳ تکرار در محدوده دمایی آزمایشگاه (۲۸±۳°C) و شدت نور ۱۰۰±۱۳۵۰لوکس (نوردهی ۲۴ساعته) انجام شد. حداکثر ضریب رشد ویژه و زمان دوبرابرشدن مطابق با روش مدل‌سازی غیرخطی با کمک نرم‌افزار Wolfram Mathematica 11.3 در فاصله اطمینان ۹۹% محاسبه شد.

یافته‌ها: بیشترین میزان غلظت زیست‌توده در بالاترین غلظت منبع کربن (بر حسب گرم بر لیتر) در ۵ روز اول به ترتیب متعلق به نمونه‌های ملاس (۳/۰۸۳)، گلوکز (۲/۰۹۴)، کربنات‌سدیم (۰/۸۶۹) و بی‌کربنات‌سدیم (۰/۸۳۵) است. افزایش غلظت نمونه‌ها به جز گلوکز از ۱۶ تا ۳۲گرم بر لیتر در محیط کشت سبب افزایش زیست‌توده شد. اگرچه نمونه رشدیافته در ملاس دارای بالاترین میزان غلظت زیست‌توده در روزهای ابتدایی است اما بیشترین تاثیر بر ضریب رشد ویژه متعلق به نمونه گلوکز است.

نتیجه‌گیری: منبع کربنی و غلظت آن تاثیر به‌سزایی بر رشد زیست‌توده دارند و گلوکز با غلظت ۲۴گرم بر لیتر به‌عنوان منبع کربنی جایگزین موثر بر رشد انتخاب شد. همچنین کلیه نمونه‌ها در بالاترین غلظت کمترین تاثیر را بر ضریب رشد ویژه داشته‌اند.

کلیدواژه‌ها: منبع کربنی، ملاس، گلوکز، پارامترهای رشد، زیست‌توده، *Spirulina maxima*

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۸/۲۳
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۲/۲۲
*نویسنده مسئول: n.mir89@yahoo.com

مقدمه

امروزه استفاده از ریزجلبک‌ها برای تولید مواد غذایی و دارویی به‌منظور برطرف‌شدن نیاز تغذیه‌ای بشر بسیار مورد توجه واقع شده است. از سویی همه انواع جلبک‌ها می‌توانند به‌عنوان منبعی از پروتئین استفاده شوند. همچنین می‌توان مواد شیمیایی باارزش مانند رنگدانه و آنزیم‌ها را از آنها استخراج کرد. تا به امروز چندین هزار جلبک در طبیعت یافت شده است اما فقط تعداد محدودی از آنها به‌دلیل توانایی رشد در محیط کشت صنعتی، تنوع در تعداد رنگدانه‌ها، ویتامین، پروتئین‌ها و امثال آن، جداسازی ساده اجزای سازنده، پایداری در برابر خشک‌شدن، کم‌هزینه‌بودن محیط رشد و عناصر سازنده تشکیل‌دهنده آنها صنعتی شده‌اند[1]. اسپیرولینا نیز یک فیکوبیلی‌پروتئین قابل حل در آب و یک پروتئین با خاصیت فلورسنتی بالا است که در pH فیزیولوژیکی پایداری زیادی دارد[2]. اولین قبایل شکارچی جلبک اسپیرولینا را در حاشیه دریاچه‌ها یافتند و از آن به‌عنوان غذا استفاده کردند و حتی امروزه بومی‌های آفریقا از این جلبک رشدیافته در دریاچه آفریقا استفاده می‌کنند[3]. طی ۳-۲ دهه گذشته، میلیون‌ها انسان در سراسر جهان از اسپیرولینا به‌عنوان یک مکمل غذایی در خوراک دام و طیور استفاده کرده‌اند. البته امروزه به‌دلیل داشتن ترکیباتی همچون کاروتن، امگا ۳ و ٦، اسیدهای چرب اشباع‌نشده برای مصارف دارویی نیز کاربرد یافته است[4]. اسپیرولینا همچنین منبع بسیار خوبی از ویتامین B_{12} است که همین امر سبب به‌وجودآمدن اثرات تقویت‌کننده سیستم ایمنی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن شده است[5]. امروزه از آنها به‌دلیل خاصیت غیرسمی به‌عنوان رنگدانه طبیعی برای مواد خوراکی و آرایشی استفاده می‌شود[6]. فیکوسیانین سبز- آبی در میان رنگدانه‌های استخراج‌شده از اسپیرولینا به‌دلیل خواص ضدسرطانی، ضدتوموری و ضدآنتی‌اکسیدانی از اهمیت بالایی برخوردار است[7-10]. مزیت‌های زیادی برای کشت و پرورش ریزجلبک اسپیرولینا وجود دارد که از جمله می‌توان به منبع غنی پروتئین اشاره کرد و همچنین عدم پردازش فرآورده‌های جانبی، محصول مناسب برای کشت در مناطق خشک و یا نیمه‌خشک جهان و حتی کشت در آب شور از مزایای کشت این ریزجلبک هستند. با این حال، معایبی هم وجود دارد که عمدتاً مربوط به تهیه مواد معدنی برای محیط کشت آن است که معمولاً گران‌قیمت هستند[11]. اسپیرولینا به‌طور متداول در محیط زاروک یا اصلاح‌شده زاروک کشت داده می‌شود که برای رشد به مقادیر زیادی نیترات‌سدیم، کربنات‌سدیم و بی‌کربنات‌سدیم نیاز دارد. زاروک به‌عنوان اولین محیط کشت استاندارد صنعتی شناخته شده است که امروزه نیز بسیار مورد استفاده قرار می‌گیرد[12]. محیط کشت ادرار انسانی و پساب حاصل از تصفیه‌خانه‌های فاضلاب پرورش خوک به‌عنوان یک محیط پیشنهادی برای تولید *Spirulina platensis* گزارش شده‌اند[13,14]. *Spirulina platensis* و *Spirulina maxima* دو گونه رایج این ریزجلبک هستند[15]. *Spirulina maxima* به‌راحتی در آب شور رشد می‌کند و اولین‌بار در سال ۱۹۸٤ توسط *مترسی* و همکاران با استفاده از آب دریا بدون غنی‌سازی با دیگر عناصر در شرایط آزمایشگاهی رشد کرد[16,17]. محققین دیگر تاثیر میزان شوری را روی رشد ریزجلبک *Spirulina platensis* بررسی کردند. بر این اساس بالاترین میزان رنگدانه فیکوسیانین، آلوفیکوسیانین و فیکواریترین از این جلبک در غلظت ۰/٤مولار کلریدسدیم نسبت به غلظت استاندارد محیط کشت و دیگر غلظت‌ها (۰/۲، ۰/٦ و ۰/۸مولار)

www.SID.ir

Archive of SID

گزارش شده است[18]. از دهه‌های پیشین گلوکز و استات به‌عنوان سوبسترای کربنی آلی مناسب برای رشد ریزجلبک *Spirulina platensis* در شرایط هتروتروفیک و میکسوتروفیک معرفی شد[19, 20]. به‌سبب اینکه فیکوسیانین یک رنگدانه فتوسنتزکننده است رشد هتروتروفیک برای تولید آن نامناسب گزارش شد[21]. از طرفی باید دقت کرد که شدت نوردهی و غلظت سوبسترای کربنی نباید خیلی زیاد یا کم باشد که مانع رشد سلولی شود[19]. همچنین نتایج تحقیقات نشان داد که تولید *Spirulina platensis* با استفاده از منابع کربنی مختلف (گلوکز، اتانول و اسیداستیک) در خوراک‌دهی به‌صورت ناپیوسته در شرایط میکسوتروفیک می‌تواند سبب افزایش زیست‌توده شود[22]. استفاده از گلوکز به‌عنوان منبع کربنی مازاد با غلظت بهینه ۲/٤٤٧١گرم بر لیتر در محیط کشت زاروک میزان نرخ رشد زیست‌توده *Spirulina platensis* را افزایش می‌دهد[23]. محققین دست یافتند که *Spirulina platensis* در هر دو شرایط هتروتروفیک و میکسوتروفیک با کمک سوبستراهای گلوکز و ملاس قادر به رشد است[24-27]. محققین مدعی شدند که افزودن گلوکز در غلظت‌های بالاتر از ۰/۵گرم بر لیتر به محیط کشت زاروک در شرایط کشت میکسوتروفیک سبب افزایش میزان نرخ رشد ریزجلبک *Spirulina platensis* خواهد شد[24]. همچنین افزودن ملاس سبب چندبرابرشدن رشد زیست‌توده *Spirulina platensis* در محیط کشت زاروک می‌شود[27].

با توجه به اهمیت ویژه افزایش زیست‌توده جلبک *Spirulina maxima* و نبود اطلاعات دقیق از آن، تاثیر منابع کربنی آلی (گلوکز و ملاس) بر سرعت رشد و مقدار زیست‌توده این ریزجلبک، موضوع مطالعه حاضر قرار گرفت. افزون بر آن، به‌منظور افزایش تولید زیست‌توده، منابع کربنی (گلوکز، ملاس و کربنات‌سدیم) در سه غلظت مختلف (١٦، ٢٤ و ٣٢گرم بر لیتر) به‌عنوان منبع کربنی جایگزین در شرایط محیطی یکسان به محیط کشت افزوده شدند و از منبع کربنی بی‌کربنات‌سدیم در غلظت‌های ١٦ و ٢٤گرم بر لیتر به‌عنوان نمونه کنترلی استفاده شد.

مواد و روش‌ها

آماده‌سازی محیط کشت

در مطالعه حاضر، از محیط کشت زاروک با کمی تغییرات برای آماده‌سازی تیمارهای مرجع و نگهداری مایع تلقیح استفاده شد[28]. ترکیب شیمیایی این محیط کشت و سایر محیط کشت‌های سنتزی به‌کاررفته بر حسب گرم بر لیتر در جدول ۱ آورده شده است. کلیه عناصر شیمیایی برای ساخت محیط کشت از شرکت مرک خریداری شدند. برای تهیه محیط کشت زاروک (به‌عنوان شاهد) ابتدا کلریدکلسیم هیدراته، سولفات‌آهن هیدراته و سولفات‌پتاسیم هر یک به‌صورت جداگانه به ۲۵میلی‌لیتر آب دی‌یونیزه استریل اضافه شدند تا کاملاً حل شوند. بقیه ترکیبات شیمیایی به‌جز ریزمغذی‌ها در ۵۰۰میلی‌لیتر آب دی‌یونیزه استریل حل و از کاغذ صافی عبور داده شدند. سپس محلول‌های آماده‌شده در ارلن‌های ۲۵میلی‌لیتری به ارلن ۵۰۰میلی‌لیتر حاوی محلول اضافه شدند و در انتها ۱میلی‌لیتر ریزمغذی که قبلاً در حجم ۱۰۰۰میلی‌لیتر تهیه شده بود به ارلن حاوی محیط زاروک اضافه و بعد از اختلاط به حجم رسانده شد.

جدول ۱) ترکیب شیمیایی محیط کشت به‌کاررفته برای کشت *Spirulina maxima* بر حسب گرم بر لیتر

نام و ترکیب شیمیایی	گلوکز (G)	ملاس (M)	کربنات‌سدیم (C)	بی‌کربنات‌سدیم (B)	زاروک اصلاح‌شده
سدیم‌بی‌کربنات ($NaHCO_3$)				a	١٦
دی‌پتاسیم‌فسفات (K_2HPO_4)	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵
سدیم‌نیترات ($NaNO_3$)	۲/۵	۲/۵	۲/۵	۲/۵	۲/۵
پتاسیم‌سولفات (K_2SO_4)	۱	۱	۱	۱	۱
سدیم‌کلرید	۱	۱	۱	۱	۱
منیزیم‌سولفات ۷آبه ($MgSO_4.7H_2O$)	۰/۲	۰/۲	۰/۲	۰/۲	۰/۲
کلسیم‌کلرید ۲آبه ($CaCl_2.2H_2O$)	۰/۰٤	۰/۰٤	۰/۰٤	۰/۰٤	۰/۰٤
آهن (II) سولفات ۷آبه	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۱
EDTA	۰/۰۸	۰/۰۸	۰/۰۸	۰/۰۸	۰/۰۸
ریزمغذی	۱	۱	۱	۱	۱
سدیم‌کربنات (Na_2CO_3)			d		
ملاس		c			
گلوکز	b				

a: از منبع کربنی استاندارد بی‌کربنات‌سدیم در غلظت‌های مختلف استفاده شد؛ b: از گلوکز، c: از ملاس و d: از کربنات‌سدیم به جای منبع کربنی استاندارد بی‌کربنات‌سدیم در غلظت‌های مختلف استفاده شد.

کلیه ظروف در دمای ۱۲۱°C به مدت ۱۵ دقیقه در اتوکلاو استریل شدند. برای تهیه آب استریل و ازبین‌بردن هر نوع باکتری، ظرف حاوی آب مقطر به ازای هر میلی‌لیتر آب به مدت ۱/۲ ثانیه در دمای ۵۰°C در آون قرار گرفت. سپس ظرف حاوی آب مقطر در حمام یخ سرد شد. پس از سردشدن، ظروف حاوی آب مقطر دوباره به ازای هر میلی‌لیتر آب به مدت ۰/۷۲ ثانیه با همان درجه حرارت در آون قرار گرفت. برای آماده‌سازی محلول‌های کربنات‌سدیم (C)، ملاس (M) و گلوکز (G) ابتدا هر یک از عناصر محیط کشت زاروک به غیر از

www.SID.ir

Archive of SID

بی‌کربنات‌سدیم در آب دی‌یونیزه استریل حل و سپس کلیه محلول‌ها در شرایط استریل براساس غلظت مندرج‌شده در جدول ۱ با هم مخلوط شدند. برای جلوگیری از ته‌نشینی محلول‌ها عناصر به ترتیب خاصی (کلریدمنیزیم، کلریدکلسیم، کلریدسدیم، نیترات‌سدیم، سولفات‌پتاسیم و فسفات‌پتاسیم) به ارلن اضافه شدند. سپس محلول ریزمغذی، EDTA و سولفات‌آهن به ارلن افزوده و در انتها منابع کربنی آلی مندرج در جدول ۱ در غلظت‌های مختلف در شرایط کاملاً استریل به ارلن افزوده شدند. کلیه مراحل آزمایش به‌منظور حفظ محیط استریل در شعاع ۲۰سانتی‌متری چراغ بونزن انجام شد.

آماده‌سازی اتاقک رشد

به‌منظور محیط آماده‌سازی کشت، دو اتاقک به ابعاد ۳۶×۳۵×۵۰سانتی‌متر ساخته شد. هر اتاقک با لامپ و ترمومتر تجهیز شد تا در تمام اتاقک‌ها شدت نور و دما به‌طور ثابت تنظیم شوند. منبع نور اتاقک‌ها به وسیله لامپ‌های LED سفیدرنگ تامین شد. در این مطالعه فاصله نوری با مایع درون فلاسک کلیه ارلن‌مایرها ثابت و برابر با ۲۷سانتی‌متر است. اتاقک‌ها به‌منظور رفلاکس نور بیشتر با ورق آلومینیومی پوشش داده شدند[29]. از آنجایی که این آزمایش در اواخر تابستان و اوایل پاییز انجام شد میزان دما در طول عصر برای ۲ ساعتی به دمای ۳۲°C و در غروب به دمای ۲۸°C و در کل روز دمای ۳۰°C را نشان می‌داد که ریزجلبک به‌راحتی می‌تواند این دامنه دمایی را تحمل کند.

کشت ریزجلبک *Spirulina maxima*

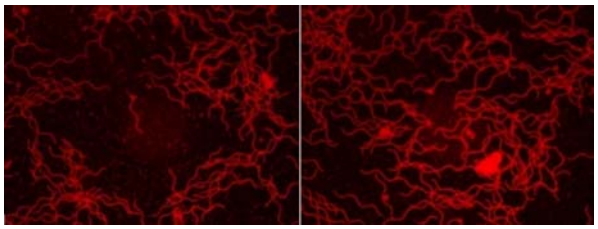
کشت ریزجلبک در ارلن‌مایرهای ۱۲۵میلی‌لیتری با ۹۵میلی‌لیتر محیط کشت انجام شد. همه تیمارها با ۳۰میلی‌لیتر سوسپانسیون حاوی ریزجلبک *Spirulina maxima* با دانسیته نوری (OD) اولیه ۰/۲۲۱ تلقیح شدند. در این مطالعه جلبک *Spirulina maxima* با کد شناسایی CIB 79 از کلکسیون دانشکده فیزیولوژی دانشگاه پلی‌تکنیک مکزیک جمع‌آوری شد. کشت در دمای آزمایشگاه (۲۸±۳°C) و شدت نور ۱۰۰±۱۳۵۰لوکس انجام شد. کلیه نمونه‌ها تحت جریان هوادهی استریل و تناوب نوردهی ۲۴ساعته قرار گرفتند که رشد جلبک آغاز شد. در طول مدت کشت شدت هوادهی توسط پمپ‌های هوا، مدل AC-9602 (RESUN؛ مکزیک) تنظیم شد و دی‌اکسیدکربن مورد نیاز از طریق هوادهی و شیلنگ هوای ۳۰میلی‌متری متصل به ارلن محتوی آب استریل تزریق شد[28]. بدین منظور ۱۱ تیمار مختلف با دو تکرار براساس جدول ۲ در شرایط محیطی کاملاً مشابه کشت داده شدند.

در این مطالعه از منبع کربنی کربنات‌سدیم به‌عنوان یک منبع کربنی رایج برای مقایسه بیشتر و از منابع کربنی ارزان‌قیمت گلوکز و ملاس به‌عنوان منابع کربنی جایگزین در غلظت‌های ۱۶، ۲۴ و ۳۲گرم بر لیتر محیط کشت استاندارد زاروک استفاده شد و همچنین منبع کربنی بی‌کربنات‌سدیم به‌عنوان منبع کربنی شاهد به کار برده شد. خوراک‌دهی منبع کربنی جایگزین به‌صورت ناپیوسته انجام شد. بدین صورت که در روز صفر منابع کربنی به‌طور کامل به هر یک از محیط‌های کشت اضافه شدند. کل دوره کشت ۱۳ روز بوده است. برای تامین میزان آب تبخیرشده روزانه آب استریل به ارلن‌ها افزوده شد. کلیه آزمایشات به‌منظور بررسی عملکرد منابع کربنی متعدد در شرایط یکسان محیطی آزمایشگاه انجام شده است.

از کلیه نمونه‌ها در طول دوره کشت برای تعیین آنالیز جذب با دستگاه اسپکتروفتومتری مدل Multiscan Go (Thermo SCIENTITIC؛ انگلستان) به‌صورت روزانه نمونه‌برداری شد. برای مشاهده ریزجلبک از میکروسکوپ‌های نوری فلورسانس 50i (Nikon؛ ژاپن) و نوری معمولی (Carl Zeiss؛ مکزیک) استفاده شد. از میکروسکوپ فلورسانس به‌منظور مشاهده ساختار زیست‌توده نمونه اولیه (نمونه‌ای که برای تلقیح کلیه تیمارها استفاده شد) و مطمئن‌شدن از صحت سلامتی ریزجلبک استفاده شد. بدین منظور ابتدا نمونه طی سه مرحله و هر مرحله به مدت ۱۰ دقیقه با دستگاه سانتریفیوژ LEGEND MICRO 17 (Thermo Scientific؛ آلمان) و با سرعت ۱۳/۳دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. برای ثابت‌ماندن خواص بیولوژیکی ریزجلبک طی سانتریفیوژ ۱میلی‌لیتر فرمالین اضافه شد. شکل ۱ تصویر فلورسنت نمونه اولیه *Spirulina maxima* با دانسیته نوری ۰/۲۲۱ را نشان می‌دهد. برای مشاهده رشد *Spirulina maxima* بقیه تیمارها از میکروسکوپ نوری استفاده شد. برای اندازه‌گیری pH از دستگاه pHمتر مدل pH21 pH/mV meter (Hanna؛ ایالات متحده) استفاده شد.

جدول ۲) غلظت منابع کربنی در تیمارهای مختلف محیط کشت

تیمار	ترکیب محیط کشت	غلظت منبع کربنی (گرم بر لیتر)
۱	بی‌کربنات‌سدیم (B)	۱۶
۲		۳۲
۳	گلوکز (G)	۱۶
٤		۲٤
٥		۳۲
٦	کربنات‌سدیم (C)	۱۶
۷		۲٤
۸		۳۲
۹	ملاس (M)	۱۶
۱۰		۲٤
۱۱		۳۲



شکل ۱) تصویر فلورسنت نمونه اولیه *Spirulina maxima* سانتریفیوژشده

آنالیز داده‌ها

نمودارها با کمک نرم‌افزار GraphPad Prism نسخه ۲، ۰، ۸ ترسیم شدند و برای کلیه داده‌ها در نمودارها انحراف معیار محاسبه و بر

www.SID.ir

Archive of SID

روی نمودارها نمایش داده شد. تجزیه و تحلیل کلیه تیمارها با استفاده از نرم‌افزار Wolfram Mathematica 11.3 و براساس دستورالعمل مدل معادلات غیرخطی (nonlinearmodelfit) با سطح اطمینان ۹۹% انجام شد.

ضریب رشد ویژه

برای محاسبه ضریب رشد ویژه برای تیمارها در روزهای مختلف از فرمول رایج ۱ استفاده شد[30, 31]:

(۱)

$$\mu\ [day^{-1}] = \frac{lnC_s^t - \ln C_s^0}{t}\ ,\ \mu t + \ln C_s^0 = lnC_s^t$$

t در فرمول ۱ طول دوره زمان کشت، C_s^0 وزن خشک سلولی اولیه محیط کشت در زمان صفر و C_s^t وزن خشک سلولی در محیط کشت در زمان t را نشان می‌دهد. ضریب رشد ویژه در فرمول ۱ برابر با شیب نمودار لگاریتم غلظت به زمان کشت است.

تعیین زمان دوبرابرشدن

زمان دوبرابرشدن جمعیت ریزجلبک از فرمول ۲ محاسبه شد[32]:

(۲)

$$DT = log_e^2\ /\mu$$

محاسبه راندمان زیست‌توده تولیدشده

در این مطالعه راندمان میزان تولید زیست‌توده از رابطه ۳ تعیین شد[33]:

(۳)

$$Overall\ Biomass\ (g\ L^{-1}\ d^{-1}) = \frac{C_s^t\ (g\ L^{-1}) - C_s^0 (g\ L^{-1})}{t_2 - t_1};\ t_2 > t_1$$

C_s^t: مقدار زیست‌توده در انتهای دوره، C_s^0: مقدار زیست‌توده در ابتدای دوره

برای کلیه تیمارها حداکثر ضریب رشد ویژه، زمان دوبرابرشدن و راندمان زیست‌توده روز پایانی براساس معادلات رایج ۱ تا ۳ محاسبه شد. از آنجایی که صحت نتایج به‌دست‌آمده از روابط مورد تردید است بنابراین حداکثر ضریب رشد ویژه و زمان دوبرابرشدن با کمک فرمول ٤ به روش رگرسیون غیرخطی برای بررسی صحت نتایج شبیه‌سازی شد.

(٤)

$$\mathrm{xa} = \mathrm{xo} + \frac{a}{1 + \mathrm{e}^{b - ct^n}}$$

در این رابطه xo برابر با غلظت در روز صفر است. همچنین a، b و c پارامترهای مدل هستند که از طریق مدل‌سازی به‌طور جداگانه برای هر یک از تیمارها برآورد شد. n در این معادله برابر با ۱ فرض شده است.

تست میکروب‌شناسی

حالت پلی‌مورفیسم جلبک طی دوره‌های مختلف با استفاده از میکروسکوپ بررسی و از نظر باکتری و آلاینده‌های کلی‌فرمی ارزیابی شد. برای انجام تست میکروب‌شناسی در زیست‌شناسی مولکولی معمولاً از روش رنگ‌آمیزی سلول‌های چسبنده از طریق کریستال بنفش مطابق الگوی زیر استفاده می‌شود:

۱- ابتدا قطره بسیار کوچکی از جلبک‌های رشدیافته در محلولی که از ملاس و گلوکز به‌عنوان منبع کربنی استفاده شده نمونه‌برداری و روی لام نئوبار میکروسکوپ ریخته شد. پس از گذشت ۱۰ دقیقه آب روی لام نئوبار تبخیر و مواد باقیمانده بر روی شعله خشک شد. البته باید توجه داشت که در صورت داغ‌شدن زیاد شعله، باکتری از بین می‌رود.

۲- مایع بنفش کریستال روی اسلایدهای اسمیر ثابت اضافه شد. بعد از ۵ ثانیه، لام به‌آرامی تکان داده شد تا مایعات سطح لام را پوشش دهد.

۳- بعد از یک دقیقه، کریستال بنفش به‌آرامی با آب شیر شست‌وشو داده شد تا اینکه میزان بیشتری از آن از روی لام چکه نکند.

٤- سپس نمونه در هوای آزاد خشک شد. در این مرحله مهم است که در مجاورت هوا خشک شود و برای تسریع در عمل خشک‌شدن چندین بار لام نئوبار تکان داده شد تا به هوارسانی کمک کند.

۵- در این مرحله می‌توان برای شناسایی باکتری لام نئوبار را زیر میکروسکوپ نوری مشاهده کرد. برای افزایش قدرت تفکیک میکروسکوپ به میزان ۱۰۰ برابر از روغن ایمرسیون استفاده شد.

یافته‌ها

میزان زیست‌توده روزانه با کمک نمودار کالیبراسیون به دست آمد. منحنی استاندارد کالیبراسیون رابطه بین غلظت *Spirulina maxima* خشک و میزان جذب در طول موج بهینه را نشان می‌دهد (نمودار ۱). به‌منظور تعیین طول موج جذب بهینه ابتدا میزان جذب ریزجلبک در محدوده طول موج ۳۰۰ تا ۸۰۰نانومتر رسم و بهترین طول موج جذب ٦٧٤نانومتر شناسایی شد و سپس جذب کلیه نمونه‌ها در این طول موج مورد محاسبه قرار گرفت. برای رسم منحنی کالیبراسیون، *Spirulina maxima* در ٦ غلظت و با ۳ تکرار مختلف تهیه شد. برای آماده‌سازی غلظت‌های مختلف از محیط کشت زاروک مشابه این کار تحقیقاتی استفاده شد. بهترین محدوده جذب برای رشد ریزجلبک *Spirulina maxima* بین ۰/۲۷۱ تا ۱/۰٦۵ گزارش شد. از این پس جذب کلیه تیمارها در طول موج بهینه اندازه‌گیری شد. در این مطالعه نمونه خشک *Spirulina maxima* به‌منظور رسم منحنی کالیبراسیون از شرکت اسپیرال اسپرینک خریداری شد. نمودار رسم‌شده در توافق نسبی با نمودار رسم‌شده توسط دیگر محققین است[34].

حدود ٤ روز پس از کشت آب موجود در ارلن‌ها به سبز تغییر رنگ داد که این میزان تغییر رنگ در نمونه‌های ملاس و گلوکزی بسیار بیشتر بود. نقاط تجربی در تمام نمودارها و جدول‌ها نشان‌دهنده میانگین نتایج سه تکرار است.

اثر تغییر غلظت با استفاده از منبع کربنی بی‌کربنات‌سدیم

نمودار ۲ اثر تغییر غلظت خوراک‌دهی ناپیوسته روی میزان رشد سلول و pH را نمایش داده است. تیمار ۱ تا ٤ از محیط استاندارد

www.SID.ir

Archive of SID

زاروک با کمی اصلاحات در غلظتی برابر با غلظت بی‌کربنات‌سدیم (نمونه شاهد) و غلظت دو برابر غلظت محیط استاندارد برای کشت *Spirulina maxima* و مقایسه آن با تیمارهای دیگر استفاده شد. بررسی‌ها نشان داد که میزان رشد زیست‌توده طی ٤ روز اولیه آزمایش در محیط کشت B رشد چندانی نداشته است و سلول‌ها بعد از ٤ روز از دوره تاخیر به‌منظور سازگاری با شرایط فتوسنتز روند صعودی را طی کرده‌اند.

با توجه به نتایج به‌دست‌آمده از محیط کشت B، غلظت منبع کربنی بی‌کربنات‌سدیم به‌عنوان یک عامل مهم و تاثیرگذار در پروسه رشد سلولی است. میزان جذب طی ۱۰ روز اول کشت همان‌طور که انتظار می‌رفت افزایش یافت که این میزان از روز ۱۰ تا ۱۳ تقریباً ثابت مانده است و میزان جذب در انتهای رشد برای نمونه با غلظت ۱٦گرم بر لیتر (تیمار ۱) نسبت به نمونه ۳۲گرم بر لیتر (تیمار ۲) کمی بیشتر است که از لحاظ اقتصادی نیز استفاده از نمونه با غلظت کمتر ترجیح داده می‌شود. بیشترین افزایش pH در ۳ روز اول مشاهده شد که این میزان از ۸/۷ به ۱۰ افزایش یافت که طی ۱۰ روز آتی افزایش و کاهش چندانی نداشته است. با مشاهده نمونه در زیر میکروسکوپ (شکل ۲) شکست بافت سلولی در تیمار ۲ دیده شد ولی در تیمار ۱ نمونه‌های بلند فنری‌شکل ریزجلبک به‌وضوح قابل مشاهده بود.

اثر تغییر غلظت با استفاده از منبع کربنی کربنات‌سدیم

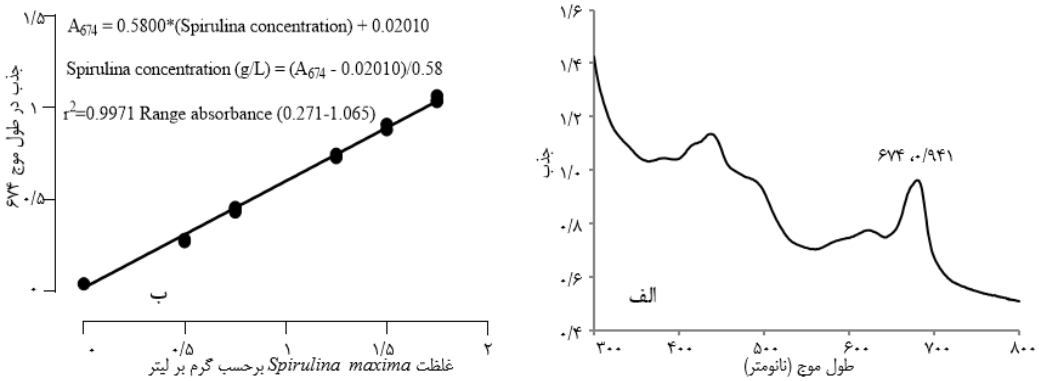
نمودار ۳ روند تغییرات جذب و pH با زمان در محیط کشت C روی میزان رشد سلول را نشان می‌دهد. نتایج حاصل از این نمودار نشان داد که با رشد ریزجلبک و تکثیر آن، pH محیط کشت به‌تدریج افزایش یافت و در زمان برداشت به حدود ۱۰ رسید که تا حدود معینی مشابه با نمونه کشت‌داده‌شده با منبع کربنی بی‌کربنات‌سدیم است.

مقایسه نمودارهای ۲ و ۳ نشان دادند که اختلاف موجود در رفتار دو محیط کشت علاوه بر منبع کربنی آن به غلظت و زمان نیز بستگی دارد. هرچند رشد نمودار نمونه کربناتی تقریباً مشابه نمونه بی‌کربنات‌سدیمی بوده است.

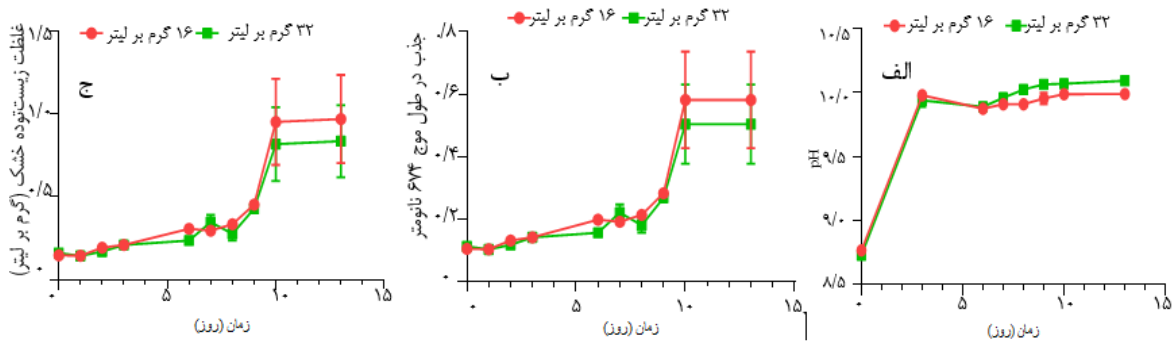
در روند تغییرات غلظت متوسط زیست‌توده در روز نهایی برای تیمار ۸ (۰/۸٦۹گرم بر لیتر) و تیمار ۲ (۰/۸۳۵گرم بر لیتر) اختلاف ناچیزی دیده شد. با این حال، مشاهده شد که تیمار ۱ تاثیر مثبت کمتری بر رشد و تکثیر سلولی نسبت به تیمار ٦ دارد، در حالی که هر دو تیمار از پایین‌ترین غلظت آزمون برخوردار هستند. شکل ۳ تصویر میکروسکوپی *Spirulina maxima* کشت‌داده‌شده را نشان می‌دهد.

اثر تغییر غلظت با استفاده از منبع کربنی گلوکز

نمودار ٤ تغییرات جذب و pH با زمان در محیط کشت G روی میزان رشد سلول را نشان می‌دهد. میزان تغییر غلظت منبع کربنی گلوکز با رشد سلول با گذشت زمان بررسی شد و نتایج نشان داد که طی ٦ روز اول، غلظت سلولی همزمان با رشد سلولی و تا رسیدن به حداکثر به‌طور مداوم افزایش یافت و سپس سیر ثابت و نزولی را پیش گرفت، در حالی که pH به جز برای نمونه با غلظت ۳۲گرم بر لیتر که دارای نوساناتی است رو به افزایش است.



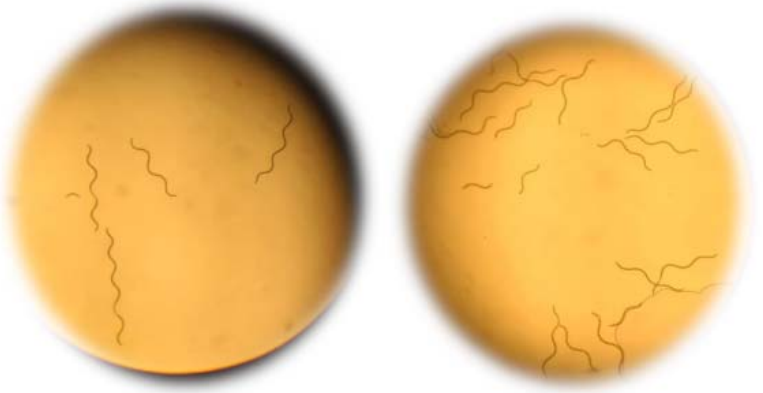
نمودار ۱) الف) نمودار تعیین طول موج بهینه جذب؛ ب) نمودار کالیبراسیون استاندارد *Spirulina maxima* در طول موج بهینه ٦۷٤نانومتر



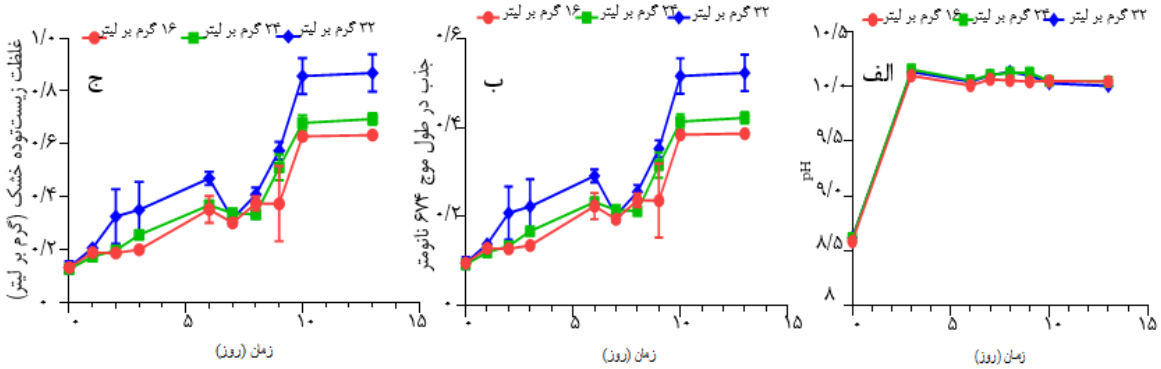
نمودار ۲) روند تغییرات pH (الف)، میزان جذب (ب) در طول موج ٦۷٤نانومتر و غلظت زیست‌توده خشک (ج) با زمان در محیط کشت B

www.SID.ir

Archive of SID

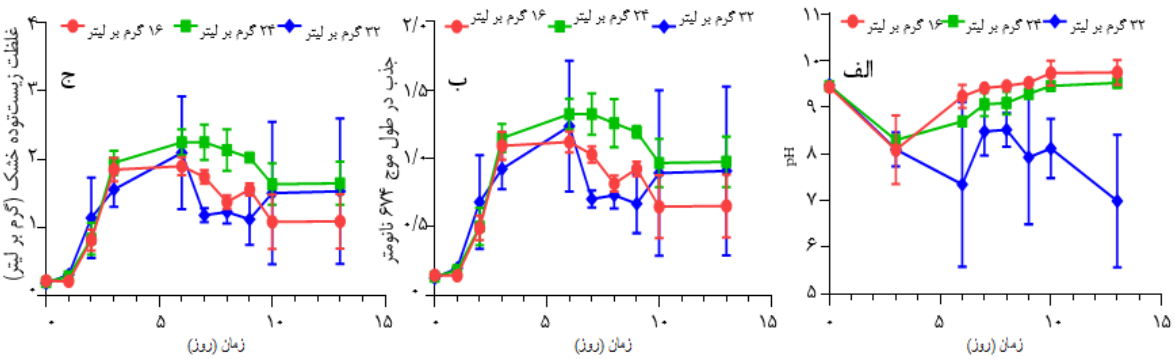


شکل ۲) تصویر میکروسکوپی *Spirulina maxima* با بزرگنمایی ۱۰ در محیط کشت B (از راست به چپ مربوط به غلظت ۳۲ و ۱۶گرم بر لیتر)



نمودار ۳) روند تغییرات pH (الف)، میزان جذب (ب) در طول موج ٦٧٤نانومتر و غلظت زیست‌توده خشک (ج) با زمان در محیط کشت C

شکل ۳) تصویر میکروسکوپی *Spirulina maxima* با بزرگنمایی ۱۰ در محیط کشت C (از راست به چپ مربوط به غلظت ۳۲، ۲٤ و ١٦گرم بر لیتر)

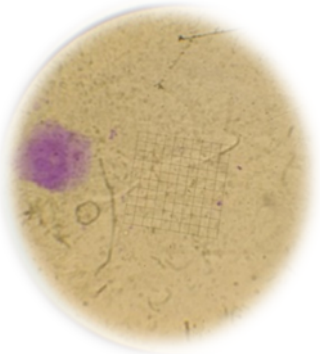


نمودار ٤) روند تغییرات pH (الف)، میزان جذب (ب) در طول موج ٦٧٤نانومتر و غلظت زیست‌توده خشک (ج) با زمان در محیط کشت G

www.SID.ir

Archive of SID

در روز اول بالاترین pH را محیط کشت G نسبت به دیگر محیط‌های کشت به خود اختصاص داد و نمودار سیر نزولی را طی چند روز اول طی کرده است تا اینکه ریزجلبک شروع به رشد کرد و خود را با محیط تطبیق داد. نتایج نمودار ٤ حاکی از آن است که طی روزهای اولیه سلول رشد بسیار خوبی داشته است که تقریباً در روز ٦ تا ٧ (به جز برای نمونه با غلظت ۳۲گرم بر لیتر) ثابت باقی مانده است اما پس از آن با افت شدیدی در میزان رشد مواجه شد. بعد از بررسی تست باکتری به‌منظور ارزیابی آلاینده‌های کلی‌فرمی، رشد باکتری باسیلوس و کوکسی در این نمونه دیده شد که همین امر سبب کاهش میزان رشد ریزجلبک شد (شکل ٤).



شکل ٤) تراکم رشد باکتری باسیلوس و کوکسی در نمونه رشدیافته با منبع کربنی گلوکز

در روزهای ٦ به بعد که رشد اولیه باکتری شروع شد pH (با درنظرنگرفتن برخی نوسانات) رشد صعودی یافت و جذب رشد نزولی را طی کرد. بنابراین میزان pH با جذب رابطه عکس دارد یعنی نمونه با بالاترین pH کمترین میزان جذب و زیست‌توده خشک را به همراه دارد. البته نتایج و مشاهدات عینی نشان داد که ممکن است این تغییرات در میزان جذب به‌علت شرایط کشت میکسوتروفیک باشد یعنی در مراحل نخست کشت بخش هتروتروفیک عامل تعیین‌کننده سرعت رشد جلبک بوده است و پس از ۷ روز به‌دلیل افزایش غلظت سلولی به حد ماکزیمم خود سبب کاهش نفوذ نور به داخل بافت سلولی می‌شود و بخش فتوتروفیک نتوانسته است بر بخش هتروتروف چیره شود و پدیده فتوسنتز تسلط پیدا نکرده است و البته رشد باکتری در این نمونه هم را نباید نادیده گرفت.

اثر تغییر غلظت با استفاده از منبع کربنی ملاس

نمودار ٥ اثر منبع کربنی ملاس چغندر بر میزان رشد و pH در سه غلظت متفاوت را نشان داده است. نتایج نشان داد که میزان جذب طی روزهای اولیه در کلیه نمونه‌ها مشابه نمونه‌های آماده‌سازی‌شده در محیط کشت G یک روند افزایشی داشته است که میزان افزایش در نمونه با غلظت ۳۲گرم بر لیتر بیشتر از ۲٤گرم بر لیتر و همچنین بیشتر از ١٦گرم بر لیتر بوده است که این میزان در روزهای ٦ و ٧ تغییرات چندانی نداشته است. البته در روز ۸ یک کاهش بسیار جزیی در کلیه نمونه‌های ملاسی دیده شد که دوباره در روز ۹ برای هر ۳ نمونه افزایش یافت ولی این افزایش و کاهش چشمگیر نبوده و پس از آن روند رشد سلولی نزولی بوده است. نمودار جذب و متقابلاً نمودار وزن خشک زیست‌توده نوسانات زیادی داشته است. افت جذب زیادی به‌ویژه برای نمونه با غلظت ۳۲گرم بر لیتر دیده شد که پس از ارزیابی تست میکروبی مشخص شد که از روز ٦ میزان رشد باکتری شروع و در روزهای پایانی به حدی زیاد شد که باکتری، جلبک محیط کشت را به‌عنوان ماده مغذی استفاده کرد. هر دو محیط کشت منابع کربنی گلوکز و ملاس حاوی نوع باکتری یکسان بوده‌اند اما باکتری رشدیافته در محیط کشت M بسیار بیشتر از محیط کشت G است. به‌طور کلی، به نظر می‌رسد که در هر دو محلول M و G، در اغلب اوقات، اوایل کشت سبب افزایش تقسیمات سلولی و افزایش غلظت شده ولی با افزایش دوره کشت این میزان کاهش یافته است. مقایسه نمودارهای ٤ و ٥ نشان می‌دهد که روند تقسیمات و رشد سلولی در هر دو محیط کشت از روز تلقیح اولیه یک روند افزایشی داشته است و فاز تاخیری مشاهده نشد. البته این مساله در خصوص دو منبع کربنی دیگر صدق نمی‌کند. در روز هفتم ریزجلبکی که از ملاس به‌عنوان منبع کربنی استفاده کرده است از نظر باکتری و آلاینده‌های کلی‌فرمی ارزیابی و توده‌های باکتری گرم مثبت هوازی میله‌ای باسیلوس از جنس‌های لاکتوباسیلوس و باکتری کروی‌شکل کوکسی مشاهده شد که میزان تراکم باکتری نمونه ملاسی بسیار بیشتر از زیست‌توده رشد یافته در منبع کربنی گلوکزی بوده است (شکل ٥).

جدول ۳ مقایسه ضریب تغییرات مربوط به رشد ریزجلبک *Spirulina maxima* در تیمارهای مختلف را نشان می‌دهد. بالاترین غلظت در روزهای اولیه مربوط به نمونه‌های ملاس و گلوکز است، هرچند که بعد از یک دوره از روزهای اولیه نمودار سیر نزولی پیدا کرد. با این حال غلظت رشد جلبک در روز نهایی به ترتیب در نمونه گلوکز، ملاس، کربنات‌سدیم و بی‌کربنات‌سدیم بیشترین مقدار بود.

ضریب رشد ویژه نمونه ملاس در غلظت‌های مختلف در این بررسی با نتایج حاصل از کار محققین در غلظت‌های ٠/٥ و ٠/٧٥گرم بر لیتر برای رشد ریزجلبک *Spirulina platensis* در شرایط میکسوتروفیک برابری کرده است[26]. در طول یک دوره ۱۳روزه، بالاترین ضریب رشد ویژه به ترتیب مربوط به تیمارهای ٥ و ٤ بود که متعلق به محلول گلوکز است و پس از آن مربوط به تیمار ۸ بوده است. تیمارهای ۷ و ۲ که هر یک به ترتیب متعلق به محلول‌های C و B بودند از میزان ضریب رشد ویژه یکسانی برخوردار هستند و تقریباً زمان دوبرابرشدن سلول آنها هم مشابه است. مطالعه *فرجی* و همکاران با نتایج مطالعه حاضر همخوانی داشت و آنها گلوکز را به‌عنوان منبع کربنی موثر بر رشد ریزجلبک *Spirulina platensis* و تولید رنگدانه فیکوسیانین دانستند[35]. طی تست‌های روزانه ضریب رشد ریزجلبک با استفاده از عامل کربنی ملاس چغندر در غلظت‌های مختلف نسبت به نمونه شاهد (تیمارهای ۱ و ۲) کمتر است، به‌طوری که رشد در غلظت ١٦گرم بر لیتر، ٤٧/٧% کمتر از نمونه شاهد است و تغییر غلظت ملاس هم در این امر تاثیر چندانی

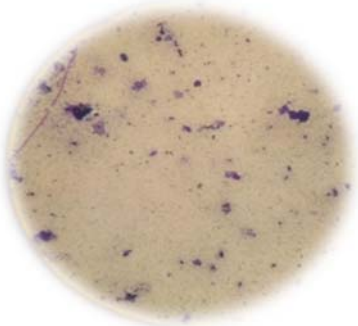
www.SID.ir

Archive of SID

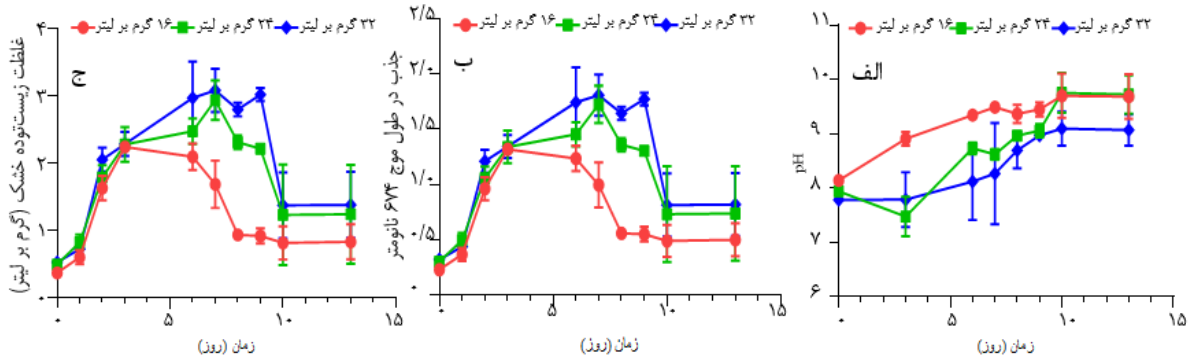
ندارد، به‌طوری که در غلظت ۳۲گرم بر لیتر ملاس چغندر رشد ریز جلبک نسبت به غلظت ۱۶گرم بر لیتر خیلی ناچیز تغییر کرد. به‌طور کلی برخلاف برخی مطالعات قبلی، حضور گلوکز در محیط کشت سبب تحریک رشد و تقسیمات سلولی شد، به‌طوری که بیشترین ضریب رشد و کمترین زمان دوبرابرشدن سلول‌ها در تیمار ۵ مشاهده شد. به‌طور کلی نتایج بررسی ضریب رشد ویژه در همه تیمارها نشان داده است که تاثیر غلظت‌های مختلف بر رشد سلولی یکسان نبوده است.

نمودار ٦ به‌وضوح نشان داده است که با افزایش ضریب نرخ رشد ویژه، زمان دوبرابرشدن رشد جلبک کاهش یافته است. بالاترین ضریب رشد یعنی کمترین زمان دوبرابرشدن رشد متعلق به نمونه گلوکزی است. در میان تیمارها نمونه رشدیافته در محیط کشت با منبع کربنی کربنات‌سدیم بالاترین زمان دوبرابرشدن رشد و کمترین ضریب رشد ویژه را به خود اختصاص داده است. افزایش غلظت ملاس باعث کاهش حداکثر ضریب رشد ویژه شده است. تحقیقات پژوهشگران ثابت کرد که افزایش غلظت ملاس از ۰/۲۵ تا ۰/۵گرم بر لیتر تاثیری درحداکثر ضریب رشد ویژه ریزجلبک *Spirulina platensis* ندارد ولی افزایش غلظت بیش از ۰/۵گرم بر لیتر سبب افزایش میزان حداکثر ضریب رشد ویژه خواهد شد که با نتایج مطالعه حاضر تناقض دارد[26]. نتایج حاکی از آن است که موثرترین غلظت رشد جلبک ۲٤گرم بر لیتر است و کلیه نمونه‌ها در غلظت بالا کاهش حداکثر ضریب رشد ویژه را نشان داده‌اند که این میزان کاهش برای نمونه گلوکزی (۳۱% افت نرخ حداکثر رشد ویژه) نسبت به سایر بیشتر بود. حداکثر نرخ رشد محاسبه‌شده با استفاده از روش رگرسیون اختلاف معنی‌داری با میزان محاسبه‌شده از روابط ۱ و ۲ را نشان داده است و از آنجایی که در روش رگرسیون طول خط با بهترین برازش نموداری از میان داده‌ها را نشان می‌دهد و در مدل رگرسیونی حاصل، ضریب تعیین بالاتر از ۹۹% بوده است، لزوماً صحت یک مدل مناسب را نشان می‌دهد.

نمودار ۷ سطح زیر منحنی در منابع کربنی مختلف با غلظت‌های متفاوت را ارایه می‌دهد. از آنجایی که میزان رشد نمونه ملاسی طی چند روز اول سیر صعودی داشته است بنابراین سطح زیر منحنی رشدیافته با منبع کربنی ملاس بیشتر از سایر نمونه‌ها است.



شکل ۵) تراکم رشد باکتری باسیلوس و کوکسی در نمونه رشدیافته با منبع کربنی ملاس



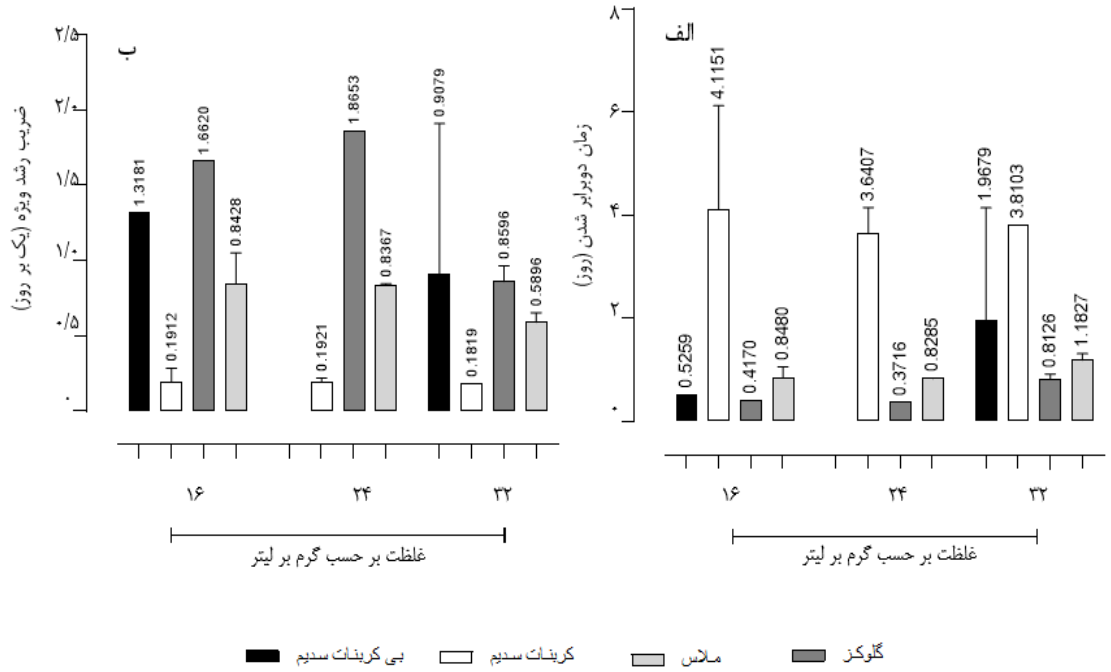
نمودار ۵) روند تغییرات pH (الف)، میزان جذب (ب) در طول موج ٦٧٤نانومتر و غلظت زیست‌توده خشک (ج) با زمان در محیط کشت M

جدول ۳) مقایسه ضریب تغییرات مربوط به رشد ریزجلبک *Spirulina maxima* در تیمارهای مختلف

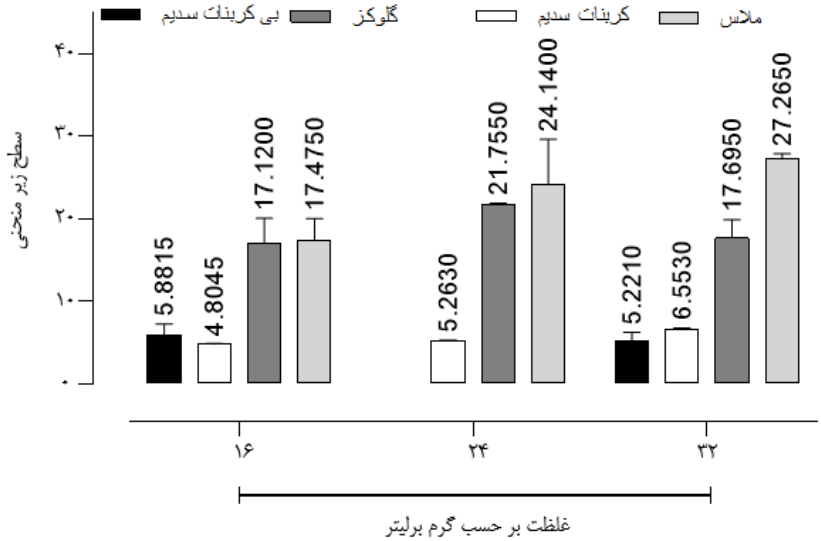
تیمار	ماکزیمم غلظت (گرم بر لیتر)	روز	غلظت روز نهایی (گرم بر لیتر)	ضریب رشد روز نهایی (یک بر روز)	زمان دوبرابرشدن (روز)	راندمان
۱	۰/۹٦۸	۱۳	۰/۹٦۸	۰/۱۳۲	۵/۲٦۲	۰/۵۷٤
۲	۰/۸۳۵	۱۳	۰/۸۳۵	۰/۱۲۷	۵/٤۵۸	۰/۸۲۳
۳	۱/۸۹۸	٦	۱/۰۹۲	۰/۱۲۲	۵/٦۷٤	۱/۰۷۵
٤	۲/۲٤۹	۷	۱/٦٤۸	۰/۱۵٤	٤/۵۰٦	۱/٦۳
۵	۲/۰۹٤	٦	۱/۵۳۲	۰/۱٦۳	٤/۲٦٦	۱/۵۱۷
٦	۰/٦۳۳	۱۳	۰/٦۳۳	۰/۱۲۰	۵/۷٦۳	۰/٦۲۳
۷	۰/٦۹۵	۱۳	۰/٦۹۵	۰/۱۲۷	۵/٤٤۲	۰/٦۸٤
۸	۰/۸٦۹	۱۳	۰/۸٦۹	۰/۱٤۵	٤/۷۹٤	۰/۸۵۸
۹	۲/۲۸٤	٤	۰/۸۲۹	۰/۰٦۳	۱۰/۹۳۳	۰/۸۰۱
۱۰	۲/۹٤۰	۷	۱/۲۳۷	۰/۰٦۷	۱۰/٤۲۲	۱/۱۹۷
۱۱	۳/۰۸۳	۷	۱/۳۷۷	۰/۰۷۵	۹/۲۷۵	۱/۳۳۷

www.SID.ir

Archive of SID



نمودار ٦) حداقل زمان دوبرابرشدن (الف) و حداکثر ضریب نرخ رشد ویژه (ب) در تیمارهای مختلف



نمودار ۷) سطح زیر منحنی در تیمارهای مختلف

بحث و نتیجه‌گیری

منبع کربنی یکی از مهمترین عوامل محدودکننده رشد و کنترل‌کننده رشد ریزجلبک است. اگرچه سیانوباکتری‌های تک‌سلولی می‌توانند از منابع کربنی متعددی برای رشد استفاده کنند. محدود مطالعاتی روی ریزجلبک *Spirulina maxima* انجام شده است. محققین اثبات کردند که گلوکز سبب افزایش نرخ رشد *Spirulina platensis* در روشنایی خواهد شد اما *Spirulina platensis* در محیط با غلظت ۰/۰۵ می‌تواند به‌خوبی رشد کند[36]. براساس دیگر مطالعات، *Spirulina platensis* در محیط با منبع کربنی گلوکز نسبت به منبع کربنی استات رشد بهتری دارد[37]. در پژوهشی اثرات مختلف کربنات‌سدیم، گلوکز، مانیتول، ساکاروز، کربنات‌آمونیوم و کربنات‌کلسیم به‌عنوان منابع کربنی جایگزین به جای منبع کربنی محیط‌های کشت SM-2، S-10، SP و CS-1 بررسی شد. در این بررسی منابع کربنی با غلظتی برابر با غلظت کربنات به محیط کشت افزوده و برای مدت ۳۰ روز کشت داده شدند و هر ۱۰ روز میزان زیست‌توده به‌منظور بررسی تاثیر منبع کربنی جایگزین اندازه‌گیری شد. بی‌کربنات‌سدیم و کربنات‌سدیم برجسته‌ترین منابع کربنی معرفی شده هستند که سبب افزایش میزان زیست‌توده شدند. به‌طور کلی میزان زیست‌توده زمانی افزایش یافت که کربنات‌سدیم جایگزین بی‌کربنات‌سدیم در محیط‌های کشت شد. بیشترین و

www.SID.ir

Archive of SID

کمترین میزان زیست‌توده به ترتیب از محیط کشت‌های CS-1 و S-10 گزارش شد. *Spirulina platensis* در استفاده از منابع کربنی گلوکز، مانیتول و اوره به‌عنوان منبع کربنی جایگزین رشد چندانی نداشته است[38]. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که افزودن گلوکز و ملاس هرچند با غلظتی برابر با غلظت کربنات محیط کشت زاروک با کمی اصلاحات تاثیرات خوبی برای رشد ریزجلبک *Spirulina maxima* برای کشت‌های کوتاه‌مدت خواهد داشت، اگرچه در طولانی‌مدت این تاثیر کاهش می‌یابد. البته این نتایج در توافق با نتایج دیگران نیست. به‌طور مثال محققین ثابت کردند که به ازای تولید ۱کیلوگرم *Spirulina platensis* نیاز به ۰/۵کیلوگرم شکر به‌عنوان منبع کربنی جایگزین است[39]. نتایج مطالعه حاضر شامل افزودن منبع کربنی گلوکز به جای منبع بی‌کربنات‌سدیم محیط کشت زاروک به‌منظور رشد ریزجلبک *Spirulina maxima* با نتایج این محققین مغایرتی ندارد. هرچند به نظر می‌رسد که با افزایش میزان قندی بهتر است که دوره کشت را کاهش داد، به‌طوری که پرورش این گونه در محیط کشت G در تیمار ۵ بالاترین راندمان را نسبت به محیط کشت زاروک نشان داده است که تقریباً بیش از ۲/۵ برابر تیمار ۱ بود. همچنین دیگر محققین ماکزیمم رشد ریز جلبک و تولید بیشترین میزان فیکوسیانین را زمانی گزارش کردند که منبع کربنی گلوکز به‌عنوان منبع کربنی مازاد (۲گرم بر لیتر) به‌صورت نیمه‌پیوسته و نه ناپیوسته به محیط کشت زاروک در شرایط میکسوتروفیک افزوده شد[26, 40]. نتایج این مطالعه حاکی از آن است که افزودن گلوکز به‌عنوان منبع کربنی جایگزین در غلظت‌های بالا به‌صورت ناپیوسته در شرایط میکسوتروفیک بر رشد ریزجلبک *Spirulina maxima* موثر است. نتایج تیمارهای ۳، ٤ و ۵ نشان‌دهنده واکنش مطلوب ریزجلبک *Spirulina maxima* در غلظت ۳۲گرم بر لیتر است و برای تولید انبوه با اضافه‌کردن این غلظت می‌توان زیست‌توده بیشتری را تولید کرد. دیگر محققین تاثیر منابع کربنی مختلف (گلوکز، اتانول و اسیداستیک) را در خوراک‌دهی به‌صورت ناپیوسته و نیمه‌پیوسته در شرایط میکسوتروفیک بررسی کردند و به این نتیجه رسیدند که افزایش غلظت منبع کربنی در خوراک‌دهی ناپیوسته سبب افزایش زیست‌توده می‌شود. اگرچه افزودن منابع کربنی در غلظت‌های بالاتر از ۱گرم در لیتر در محیط تغذیه‌ای نیمه‌پیوسته تاثیر معنی‌داری بر پارامترهای فوق نداشته است[23]. بررسی رشد سلول‌ها در روزهای مختلف آزمون نشان داد که افزایش غلظت ملاس در رشد ریزجلبک بسیار موفق بوده اما در میزان ضریب رشد ویژه نامطلوب بوده است که نتایج در توافق با کار دیگر محققین بوده است[26]. کلیه تیمارهای رشدیافته در محیط کشت G از روز شروع آزمایش یا تلقیح اولیه روند صعودی داشته‌اند، هرچند طی روزهای پایانی این میزان رشد بسیار کاهش یافت اما همچنان دارای رشد سلولی بهتری نسبت به نمونه شاهد (سوسپانسیون جلبکی در محیط کشت زاروک اصلاح‌شده این مطالعه) در همان روز داشته است که این امر نشان‌دهنده تاثیر بسیار محرک تیمارهای گلوکز بر رشد و تقسیمات سلولی است. بدین منظور تعیین بهترین منبع کربنی جایگزین در فرآیند ناپیوسته که سبب افزایش میزان زیست‌توده شود از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. نتایج حاکی از افزایش زیست‌توده و ضریب رشد ویژه است که بسته به غلظت گلوکز برخی تفاوت‌ها میان مقادیر قابل مشاهده بود اما میزان زمان دوبرابرشدن سلول‌ها با افزایش غلظت کاهش یافت. نتایج به‌دست‌آمده در این مطالعه نشان داد که غلظت ملاس تاثیر به‌سزایی در حداکثر ضریب رشد آن داشته، در حالی که غلظت منابع کربنی دیگر عامل موثری بر تغییرات حداکثر ضریب رشد نداشته است. اگرچه نمونه ملاس دارای بیشترین میزان غلظت زیست‌توده است ولی ماکزیمم میزان نرخ رشد ویژه متعلق به نمونه گلوکز است که با افزایش غلظت گلوکز به حداکثر ضریب رشد ویژه منجر شد.

تشکر و قدردانی: بدین وسیله از دانشگاه پلی‌تکنیک مکزیک (SIP-IPN) که زمینه انجام مطالعه حاضر با شماره پروژه‌های ۲۰۱۹۵۳۲۰، ۲۰۱۹۵۵۸٤ و ۲۰۱۹٦۳۰٤ تعریف‌شده در دانشگاه نامبرده را فراهم کردند سپاسگزاری می‌شود.

تاییدیه‌اخلاقی: موردی توسط نویسندگان گزارش نشده است.

تعارض منافع: موردی توسط نویسندگان گزارش نشده است.

سهم نویسندگان: ندا میرحسینی (نویسنده اول)، پژوهشگر اصلی/تحلیلگر آماری (٤۰%)؛ رضا داورنژاد (نویسنده دوم)، نگارنده مقدمه (۱۰%)؛ احمد حلاجی ثانی (نویسنده سوم)، تحلیلگر آماری (۲۰%)؛ اِدگار کانو ایروپا (نویسنده چهارم)، پژوهشگر کمکی (۲۰%)؛ امید توکلی (نویسنده پنجم)، روش‌شناس (۱۰%)

منابع مالی: سرمایه لازم برای اجرای این پروژه تحقیقاتی توسط دانشگاه پلی‌تکنیک مکزیک تامین شده است.

منابع

1- Venkataraman LV. A Monograph on Spirulina Platensis: Biotechnology and Application. Mysuru: Central Food Technological Research Institute; 1983.
2- Cohen Z. Chemicals from Microalgae. Boca Raton: CRC Press; 1999.
3- Habib M, Ahsan B, Parvin MA, Huntington T, Hasan MR. A review on culture, production and use of Spirulina as food for humans and feed for domestic animals and fish [Report]. Rome: FAO; 2008. Report No.: 1034.
4- Alonso DL, Maroto FG. Plants as 'chemical factories' for the production of polyunsaturated fatty acids. Biotechnol Adv. 2000;18(6):481-97.
5- Estrada JP, Bescós PB, Del Fresno AV. Antioxidant activity of different fractions of Spirulina platensis protean extract. Il Farmaco. 2001;56(5-7):497-500.
6- Chaneva G, Furnadzhieva S, Minkova K, Lukavsky J. Effect of light and temperature on the cyanobacterium Arthronema africanum-a prospective phycobiliprotein-producing strain. J Appl Phycol. 2007;19(5):537-44.
7- Schwartz J, Shklar G, Reid S, Trickier D. Prevention of experimental oral cancer by extracts of Spirulina-Dunaliella algae. Nutr Cancer. 1988;11(2):127-34.
8- Liang Sh, Liu X, Chen F, Chen Z. Current microalgae health food R and D activities in China. Hydrobiologia. 2004;512(1):45-8.

www.SID.ir

Archive of SID

of Spirulina platensis on glucose for phycocyanin production using a fed-batch system. Enzyme Microb Technol. 1997;20(3):221-4.
26- Andrade MR, Costa JA. Mixotrophic cultivation of microalga Spirulina platensis using molasses as organic substrate. Aquaculture. 2007;264(1-4):130-4.
27- Dineshkumar R, Umamageswari P, Jayasingam P, Sampathkumar P. Enhance the growth of Spirulina platensis using molasses as organic additives. World J Pharm Res. 2015;4(6):1057-66.
28- Memije-Lazaro IN, Blas-Valdivia V, Franco-Colín M, Cano-Europa E. Arthrospira maxima (Spirulina) and C-phycocyanin prevent the progression of chronic kidney disease and its cardiovascular complications. J Funct Foods. 2018;43:37-43.
29- Shahini Z, Farhadian O, Kadivar M. Combine effects of temperature and photoperiod on growth and biomass of green algae Scenedesmus quadricauda. J Plant Res. 2018;31(1):169-81. [Persian]
30- Soni RA, Sudhakar K, Rana RS. Comparative study on the growth performance of Spirulina platensis on modifying culture media. Energy Rep. 2019;5:327-36.
31- Ndjouondo GP, Dibong SD, Wamba FO, Taffouo VD. Growth, productivity and some physico-chemical factors of spirulina platensis cultivation as influenced by nutrients change. Int J Bot. 2017;13(2):67-74.
32- Ranjith L, Shukla SP, Vennila A, Purushothaman CS. Growth performance of Spirulina (Arthrospira) platensis in a low cost medium: An assessment. Acta Biologica Indica. 2013;2(1):335-42.
33- Pereira MI, Chagas BM, Sassi R, Medeiros GF, Aguiar EM, Borba LH, et al. Mixotrophic cultivation of Spirulina platensis in dairy wastewater: Effects on the production of biomass, biochemical composition and antioxidant capacity. PLoS One. 2019;14(10):e0224294.
34- Dmytryk A, Saeid A, Chojnacka K. Biosorption of microelements by spirulina: Towards technology of mineral feed supplements. Sci World J. 2014;2014:356328.
35- Faraji D, Rezaei K, Hashemiravan M, Kalantari M, Sharifi A, Golmakani MT, et al. Optimization of Fedbach cultivation of new two carbon resources (ethanol and acetic acid) in Phycocyanin Production by Spirulina Microalgae. Innov Food Sci Technol. 2015;7(2):78-87. [Persian]
36- Moraes ID, Arruda RD, Maresca NR, Antunes AD, Moraes RD. Spirulina platensis: process optimization to obtain biomass. Food Sci Technol. 2013;33(supl.1):179-83.
37- Chen T, Zheng W, Wong YS, Yang F, Bai Y. Accumulation of selenium in mixotrophic culture of Spirulina platensis on glucose. Bioresour Technol. 2006;97(18):2260-5.
38- Soundarapandian P, Vasanthi B. Effects of chemical parameters on Spirulina platensis biomass production: Optimized method for phycocyanin extraction. Int J Zool Res. 2008;4(1):1-11.
39- Venkataraman GS, Subramanian G, Kaushik BD. Cyanobacterial biotechnology. Enfield: Science Publishers; 1998.
40- Ciferri. Spirulina, the edible microorganism. Microbiol Rev. 1983;47(4):551-78.
9- Li B, Zhang X, Gao M, Chu X. Effects of CD59 on antitumoral activities of phycocyanin from Spirulina platensis. Biomed Pharmacother. 2005;59(10):551-60.
10- Colla LM, Furlong EB, Costa JA. Antioxidant properties of Spirulina (Arthospira) platensis cultivated under different temperatures and nitrogen regimes. Braz Arch Biol Technol. 2007;50(1):161-7.
11- Lamela T, Rocha FJ. Phycocyanin production in seawater culture of Arthrospira maxima. Ciencias Marinas. 2000;26(4):607-19.
12- Amara AA, Steinbüchel A. New medium for pharmaceutical grade Arthrospira. International J Bacteriol. 2013;2013:203432.
13- Feng DL, Wu ZC. Culture of Spirulina platensis in human urine for biomass production and O_2 evolution. J Zhejiang Univ Sci B. 2006;7(1):34-7.
14- Olguín EJ, Galicia S, Mercado G, Pérez T. Annual productivity of Spirulina (Arthrospira) and nutrient removal in a pig wastewater recycling process under tropical conditions. J Appl Phycol. 2003;15(2-3):249-57.
15- ScholarlyEditions. Alkaline Phosphatase. Degradation of chlorphrifos by an alkaline phosphatase from the cyanobacterium Spirulina Platensis. In: ScholarlyEditions. Phosphoric monoester hydrolases: Advances in research and application. Atlanta: Scholarly Editions; 2011. pp. 41-90.
16- De Oliveira MA, Monteiro MP, Robbs PG, Leite SG. Growth and chemical composition of Spirulina maxima and Spirulina platensis biomass at different temperatures. Aquac Int. 1999;7(4):261-75.
17- Materassi R, Tredici M, Balloni W. Spirulina culture in sea-water. Appl Microbiol Biotechnol. 1984;19(6):384-6.
18- Sharma G, Kumar M, Ali MI, Jasuja ND. Effect of carbon content, salinity and pH on Spirulina platensis for phycocyanin, allophycocyanin and phycoerythrin accumulation. J Microb Biochem Technol. 2014;6(4):202-6.
19- Chen F, Zhang Y, Guo S. Growth and phycocyanin formation of Spirulina platensis in photoheterotrophic culture. Biotechnol Lett. 1996;18(5):603-8.
20- Marquez FJ, Sasaki K, Kakizono T, Nishio N, Nagai Sh. Growth characteristics of Spirulina platensis in mixotrophic and heterotrophic conditions. J Ferment Bioeng. 1993;76(5):408-10.
21- Bogorad L. Phycobiliproteins and complementary chromatic adaptation. Annu Rev Plant Physiol. 1975;26(1):369-401.
22- Golmakani MT, Rezaei K, Mazidi S, Razavi SH. Effect of alternative C_2 carbon sources on the growth, lipid, and γ-linolenic acid production of spirulina (Arthrospira platensis). Food Sci Biotechnol. 2012;21(2):355-63.
23- Zhang XW, Zhang YM, Chen F. Application of mathematical models to the determination optimal glucose concentration and light intensity for mixotrophic culture of Spirulina platensis. Process Biochem. 1999;34(5):477-81.
24- Chojnacka K, Noworyta A. Evaluation of Spirulina sp. growth in photoautotrophic, heterotrophic and mixotrophic cultures. Enzyme Microb Technol. 2004;34(5):461-5.
25- Chen F, Zhang Y. High cell density mixotrophic culture

www.SID.ir