تاثیر غنی‌سازی آب دریای خزر منطقه گمیشان با استفاده از بی‌کربنات سدیم بر رشد میکروجلبک*SPIRULINA PLATENSIS*

خورشید حسین زاده*[۱]، علی گنجیان خناری[۲و۳]

۱- دانشجوی دکتری تکنولوژی مواد غذایی - دانشگاه ارومیه
۲- پژوهشکده اکولوژی دریای خزر- موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور
۳- گروه پژوهشی شیلات و آلاینده‌های آبی خزر–وزارت علوم،تحقیقاتوفناوری

*kh.hoseinzade@yahoo.com

چکیده

به دلیل ارزش غذایی بالا و کاربرد گسترده میکروجلبک اسپیرولینا پلاتنسیس در غنی‌سازی مواد غذایی مختلف، در این بررسی افزودن غلظت‌های مختلف بی‌کربنات سدیم (gl^{-1} ۰، ۱/۴، ۲/۸) و نیترات سدیم (gl^{-1} ۰، ۰/۲۵، ۰/۵) به آب دریای گمیشان(منطقه شرق حوضه جنوبی دریایی خزر)جهت بررسی اثر آن‌ها بر رشد میکروجلبک اسپیرولینا پلاتنسیس، در قالب ۸ تیمار با طرح کاملا تصادفی انجام شد. کشت اسپیرولینا در دمای۳۰°C، شدت نور ۴۶۷۰±۳۵۰lux و پریود نوری (L/D: 12/12)انجام شد. نتایج نشان دادgl^{-1} ۲/۸ بی‌کربنات سدیم و gl^{-1} ۰/۲۵ نیترات سدیم بیشترین میزان رشد ($۱۰^{۴}\times$ ۳۵ عدد سلول در میلی‌لیتر) را حاصل می‌کند. در این تیمار نرخ رشد و ضریب رشد ویژه به ترتیب ۰/۱۳ و ۰/۰۹۷ ، که از سایر تیمارها بالاتر بود. استفاده از ۲/۸ گرم در لیتر بی‌کربنات سدیم و gl^{-1} ۰/۵ نیترات سدیم تعداد سلول‌ها، نرخ رشد و ضریب رشد ویژه را کاهش داد.

واژه های کلیدی: اسپیرولینا، غنی‌سازی، آب دریا، بی‌کربنات سدیم، نیترات سدیم.

مقدمه

بیوماس(زی‌توده) *Spirulina platensis* سال‌هاست توسط انسان مصرف می‌شود که علت آن خواص سلامتی‌بخش این میکروجلبک می‌باشد. این خواص مفید به‌علت میزان زیاد پروتئین(حدود ۶۵٪ وزنی-وزنی)، ترکیب متعادلی از ویتامین‌ها، مواد معدنی و ترکیبات دیگر مانند اسیدهای چرب غیراشباع امگا ۳[۱] و امگا ۶[۲] ، ترکیبات فنولی با تاثیر آنتی‌اکسیدانی بر پرواکسیداسیون لیپیدها،می‌باشد(Costa, *et al.*, 2002).ترکیب شیمیایی پودر اسپیرولینا تجاری شامل ۶۰٪ پروتئین، ۲۰٪ کربوهیدرات، ۵٪ چربی، ۷٪ مواد معدنی و ۶-۳٪ رطوبت، می‌باشد این ماده کم‌چربی، کم‌کالری، بدون کلسترل و منبع عالی پروتئین می‌باشد. طبق یافته‌های موسسه ملی سرطان ایالات متحده آمریکا، مصرف روزانه ۶mg بتاکاروتن خطر ابتلا به سرطان را کاهش داده و به حداقل می‌رساند. این در حالی‌است که مصرف روزانه ۴g پودر اسپیرولینا برای دریافت ۶mg بتاکاروتن کفایت می‌کند(Habib, *et al.*, 2008). این میکروارگانیسم‌به‌دلیل رشد در محیط بسیارانتخابی،می‌تواند در استخرهایروباز(عاری از میکروارگانیسم‌های آلوده‌کننده)کشت داده‌شود(Borowitzka, 1999).

۱- ω3
۲- ω6

Algalnao

از طرفی تولید با هزینه پایین با استفاده از محیط کشت ارزان می‌تواند یک فاکتور کلیدی در توسعه تولید *Spirulina platensis* باشد. استفاده از آب دریا بهینه شده (Faucher, *et al*., 1979) یا بعد از غنی‌سازی با مواد مغذی خاص در شرایط آزمایشگاهی(Materassi, *et al*., 1984) یا در استخرهای روباز گردشی (Tredici, *et al*., 1986;Wu, *et al*., 1993) به عنوان یک محیط پیشنهادی جهت تولید *Spirulina platensis* گزارش شده‌است. باتوجه به اهمیت اقتصادی میکروجلبک‌ها از جمله *Spirulinaplatensis* در زمینه‌های غذایی و دارویی، تولید این ارگانیسم‌با استفاده از منابع ارزان مانند آب دریا مورد توجه تولیدکنندگان می‌باشد.با توجه به اهمیت اقتصادی جلبک‌ها در زمینه‌های غذایی، دارویی،کود بیولوژیک(کودسبز)و بیودیزل(سوخت سبز)ضرورت رشد سریع‌تر و ارزان‌تر این ارگانیسم‌ها مورد توجه تولیدکنندگان انبوه می‌باشد، از این‌رو با تغییر بعضی از منابع غذایی می‌توان میزان رشد و تراکم سلولی را به‌حداکثر مقدار خود به‌خصوص در مقادیر انبوه رساند. لذا می‌بایست مطالعاتی بر روی تاثیر میزان این عناصر روی واریته‌ها وگونه‌های بومی و غیربومی‌کشورمان صورت گیرد تا بتوان به خودکفایی و رفع مشکلات آبزی‌پروی دست یافت. بررسی تنوع گونه‌ای میکروجلبک‌های بومی منطقه و ارزیابی پتانسیل پرورش انبوه، بررسی ارزش غذایی و یافتن کاربردآن‌ها درصنایع مختلف می‌تواند بنیادی‌ترین تحقیق درآغازصنعتی شدن کشت، پرورش و استفاده از میکروجلبک‌ها باشد. براساس مطالعات انجام-شده منابع آبی داخلی منبع بسیارمهم و سرشار از میکروجلبک‌ها هستند و در دریای خزر بیش از ۳۳۴گون هاز۸شاخه فیتوپلانکتون موردشناسایی قرارگرفته‌است(گنجیان و همکاران ۱۳۹۱ ,Ganjian *et al*., 2010; Ganjian *et al*., 2011;

هدف از این تحقیق تعیین مناسب‌ترین غلظت بی‌کربنات سدیم و نیترات سدیم در آب خلیج گمیشان (سال ۱۳۹۱) جهت حصول محیط کشتی ارزان و کارآمد برای تولید میکروجلبک اسپیرولینا پلاتنسیس می‌باشد.

مواد و روش ها

میکروارگانیسم و محیط کشت

در این بررسی سیانوباکتر *Spirulinaplatensis* از پارک زیست‌فناوری خلیج فارس خریداری شد. محیط کشت زاروک[۳] برای کشت و نگهداری مایه تلقیح مورد استفاده قرار گرفت. این محیط توسط زاروک به عنوان محیط کشت استاندارد *Spirulinaplatensis* ساخته شد و در اغلب منابع علمی جهت کشت و توسعه مایه تلقیح *Spirulinaplatensis* مورد استفاده قرار می‌گیرد(Vonshak, 1982; Zarrouk, 1996). آب خلیج گمیشان با غلظت‌های مختلف بی‌کربنات سدیم غنی‌سازی شد(جدول۱). برای ساخت محیط زاروک از ترکیبات شیمیایی با درجه خلوص آزمایشگاهی (مرک) استفاده شد.

جدول ۱. آنالیز آب دریای گمیشان

ترکیب شیمیایی	آب دریای گمیشان(ppm)
پتاسیم(k)	۱۱۵
کلسیم(Ca)	۲۰۰/۴
سدیم(Na)	۶۲۰
کربنات(CO_3^{2-})	۱۷۰
بی‌کربنات(HCO^{3-})	۵
نیترات(NO^{3-})	۰/۸۹
نیتریت(NO^{2-})	۰/۰۱۳
فسفات(PO_4^{3-})	۳/۳

۳-Zarrouk medium

Aisalmag

جدول۲. غلظت میزان مصرف بی‌کربنات سدیم و نیترات سدیم در تیمارها

تیمار	بیکربنات سدیم (sodium bicarbonate)g/l	نیترات سدیم (sodium nitrate) g/l
۰	۰	۰
۱	۰	/۲۵
۲	۰	۰/۵
۳	۱/۴	۰
۴	۱/۴	۰/۲۵
۵	۱/۴	۰/۵
۶	۲/۸	۰
۷	۲/۸	۰/۲۵
۸	۲/۸	۰/۵

در این بررسی آب دریا بدون افزودن مواد مغذی به عنوان شاهد در نظر گرفته شد.

کشت

کشت در ارلن‌مایرهای ۲۵۰ ml با ۲۲۰ ml محیط کشت در قفسه کشت با دمای ۳۰±۲°C،شدتنور۴۶۷۰±۳۵۰ lux انجام شد. زمان نور دهی توسط تایمر اتوماتیک به صورت ۱۲ ساعت روشنایی، ۱۲ ساعت تاریکی تنظیم شد (Costa, *etal*., 2002)و(Reinehr and Costa, 2006).غلظت بی‌کربنات سدیم مطابق جدول ۱ در هر تیمار تنظیم شد. برای تنظیم غلظت در هر تیمار، جرم مورد نیاز ازبی‌کربنات سدیم برای رسیدن به غلظت مشخص در حجم ۲۲۰ ml توزین و به ارلن حاوی آب دریای گمیشان افزوده شد.هوادهی ارلن‌ها به‌طور مداوم با کمک پمپ اکواریومی انجام شد. به همه تیمارها ۵ ml از استوک *Spirulinaplatensis* تلقیح شد. شمارش تعداد سلول در استوک تلقیح شده به تیمارها و خود تیمارها در روزهای مختلف با استفاده از لام نئوبار انجام شد. برایهرتیمار ۳تکراردرنظر گرفتهشد. برداشت میکروجلبک‌ها با استفاده از پیپت پاستور استریل صورت گرفت. تعدادواقعیسلول‌هایجلبکدرهرتیمارودرهرروزبااستفادهاز فرمول زیربه-دستآمد (Ganjian, 2011):

رقت×۱۰×میلی‌مترمربع/سلول‌ها = میلی‌مترمربع/سلول‌ها (۱)

وسعت شمارش‌شده(میلی‌متر مربع)/میانگین سلول‌های شمارش‌شده = میلی‌متر مربع/سلول‌ها

۱۰۰۰×۱۰×رقت×۵ ×تعداد سلول‌های شمارش‌شده = تراکم سلولی در هر ۱cc از نمونه

برای محاسبه ضریب رشد(ضریب رشد ویژه) Specific Growth Rate (SGR) درروزهای‌مختلف ازفرمول زیراستفاده شد (Ganjian, 2011):

$$\mu = K' = Ln\ (mt2/mt1)/t2-t1;\ t2>t1 \quad (۲)$$

m_2 = تراکم سلولی (تعداد سلول در میلی‌لیتر) در آخرین روز،m_1 =تراکم سلولی (تعداد سلول در میلی‌لیتر) دراولین روز، t_1 = اولین روز، t_2 = آخرین روز

تغییرات میکروجلبک *Spirulina platensis* طی ۲۱روز مورد بررسی قرار گرفت. هر ۷۲ ساعت یک بار شمارش از نمونه‌ها انجام شد. طرح کلی این تحقیق در قالب طرح کاملا تصادفی و کلیه اطلاعات ثبت شده در انتهای آزمایش به وسیله آنالیز واریانس یک‌طرفه و تست دانکن جهت مقایسه میانگین‌ها مورد تجزیه‌وتحلیل قرار گرفت. کلیه عملیات مربوط بوسیله نرم‌افزار *SPSS* 18 مورد سنجش قرار گرفت.

نتایج

نتایج حاصل از این بررسی نشان می‌دهد در بین غلظت‌های مختلف بی‌کربنات سدیم و نیترات سدیم که جهت غنی‌سازی آب دریای گمیشان مورد استفاده قرار گرفت، تیمار هفتم با داشتن ۲٫۸ gl^{-1} بی‌کربنات سدیم و ۰/۲۵ gl^{-1} نیترات سدیم بیشترین میزان رشد (۳۵×۱۰^{۴} عدد سلول در میلی‌لیتر) را در روز بیست‌ویکم داشت. در این تیمار نرخ رشد و ضریب رشد ویژه به ترتیب به ۰/۱۳ و ۰/۰۹۷ رسید که از سایر تیمارها بالاتر بود(جدول ۴).

با تلقیح اسپیرولینا به تیمار شاهد رشدی مشاهده نشد و تعداد سلول‌ها افزایش پیدا نکرد و پس از ۸ روز سلول‌های جلبک زرد شده و رسوب کردند. با افزودن ترکیبات مغذی (بی‌کربنات سدیم و نیترات سدیم) رشد اسپیرولینا ادامه پیدا کرد.

در تیمار ۱ و ۲ که به ترتیب حاوی ۰/۲۵ و ۰/۵gl^{-1}نیترات سدیم بودند رشد اسپیرولینا ادامه پیدا کرد. پس از ۲۱ روز کشت در تیمار ۱ تراکم سلولی به ۱۰^{۴}× ۷٫۵ عدد سلول در میلی‌لیتر و در تیمار ۲ به۱۰×۱۰^{۴} عدد سلول در میلی‌لیتر رسید.

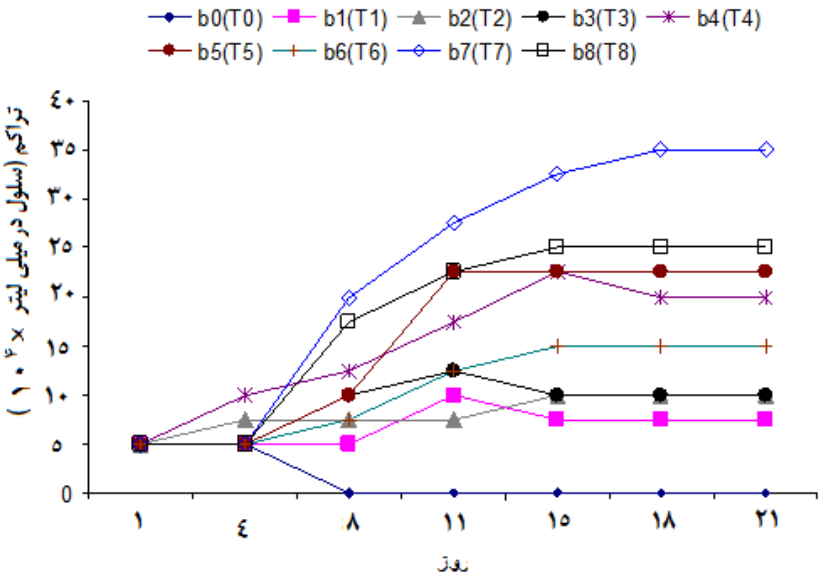
تیمارهای ۳، ۴ و ۵ حاوی ۱٫۴ gl^{-1} بی‌کربنات سدیم و به ترتیب ۰، ۰/۲۵ و۰/۵ گرم در لیتر نیترات سدیم بودند. در این تیمارها با افزایش میزان نیترات سدیم نرخ رشد و ضریب رشد افزایش یافت. در تیمار ۵ نرخ رشد به ۰/۱ و ضریب رشد ویژه به ۰/۰۷۴۵ رسید. تعداد سلول در تیمار ۵ بیشتر از تیمار ۳ و ۴ بود و در روز بیست‌و یکم به (۲۲٫۵×۱۰^{۴} عدد سلول در میلی‌لیتر)رسید(جدول ۴).

تیمارهای ۶، ۷ و ۸ حاوی ۲٫۸ gl^{-1} بی‌کربنات سدیم و به ترتیب ۰، ۰/۲۵ و ۰/۵ gl^{-1} نیترات سدیم بودند. تیمار ۶ در مقایسه با تیمار ۳ افزایش چندانی در تعداد سلول‌ها نداشت اما ضریب رشد و نرخ رشد بیشتری نسبت به تیمار ۳ نشان داد(جدول ۳).

تیمار ۷ و ۴ میزان نیتروژن یکسان داشتند اما با افزایش میزان بی‌کربنات سدیم از ۱٫۴ به ۲٫۸ gl^{-1} تعداد سلول‌ها به بیشترین میزان خود رسید (۳۵×۱۰^{۴}عدد سلول در میلی‌لیتر) اما در تیمار ۸ با افزایش میزان نیترات سدیم به ۰/۵ gl^{-1} تعداد سلول‌ها، نرخ رشد و ضریب رشد کاهش پیدا کرد(شکل ۱، جدول ۳).

جدول۳. میزان نرخ رشد و ضریب رشد ویژه میکروجلبک اسپیرولینا در تیمارهای مختلف

تیمارها	ضریب رشد	نرخ رشد	تیمارها	ضریب رشد	نرخ رشد
T5	۰/۰۷۴۵	۰/۱	T0	۰	۰
T6	۰/۰۵۴	۰/۰۷۵	T1	۰/۰۱۷	۰/۰۲۷
T7	۰/۰۹۷	۰/۱۳	T2	۰/۰۳۴	۰/۰۴۷
T8	۰/۰۸	۰/۱۱	T3	۰/۰۳۴	۰/۰۴۷
T5	۰/۰۷۴۵	۰/۱	T4	۰/۰۶۹	۰/۰۹۵



شکل ۱. تراکم (تعداد سلول در میلی‌لیتر ×۱۰^۴) میکروجلبک اسپیرولینا در تیمارهای مختلف

Algal

جدول ۴. مقایسه رشد میکروجلبک اسپیرولینا (تعداد سلول در میلی‌لیتر × ۱۰۴) در تیمارهای مختلف

	انحراف معیار ±میانگین (×۱۰^{۴})								
روزهای شمارش	b0(T0)	b1(T1)	b2(T2)	b3(T3)	b4(T4)	b5(T5)	b6(T6)	b7(T7)	b8(T8)
۱	۰۵	۰۵	۰۵	۰۵	۰۵	۰۵	۰۵	۰۵	۰۵
۴	۰۵	۰۵	۷٫۳۵٫۵۳	۰۵	۰۱۰	۰۵	۰۵	۰۵	۰۵
۸	۰۵	۰۵	۷٫۳۵٫۵۳	۰۱۰	۱۲٫۳۵٫۵۳	۰۱۰	۷٫۳۵٫۵۳	۰۲۰	۱۷٫۳۵٫۵۳
۱۱	۰	۰۱۰	۷٫۳۵٫۵۳	۱۲٫۳۵٫۵۳	۱۷٫۳۵٫۵۳	۲۲٫۳۵٫۵۳	۱۲٫۳۵٫۵۳	۲۷٫۳۵٫۵۳	۲۲٫۳۵٫۵۳
۱۵	۰	۷٫۳۵٫۵۳	۰۱۰	۰۱۰	۲۲٫۳۵٫۵۳	۲۲٫۳۵٫۵۳	۰۱۵	۳۲٫۳۵٫۵۳	۰۲۵
۱۸	۰	۷٫۳۵٫۵۳	۰۱۰	۰۱۰	۰۲۰	۲۲٫۳۵٫۵۳	۰۱۵	۰۳۵	۰۲۵
۲۱	۰	۷٫۳۵٫۵۳	۰۱۰	۰۱۰	۰۲۰	۲۲٫۳۵٫۵۳	۰۱۵	۰۳۵	۰۲۵
کل	۱٫۲۴۲٫۳۴	۶٫۲۷۸٫۴۸	۸٫۲۲۱٫۴۸	۸٫۲۹۲٫۸۹	۱۵٫۶۳۵٫۳۴	۱۵٫۸۷۱٫۵۱	۱۰٫۴۷۱٫۷۴	۲۲٫۱۲۸۵٫۸۱	۱۸٫۷۵۷٫۹۴

جدول۵ . مقایسه ضریب تغییرات مربوط به رشد میکروجلبک اسپیرولینا در تیمارهای مختلف

روزهای شمارش	b0	b1	b2	b3	b4	b5	b6	b7	b8
۱	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
۴	۰	۰	۴۷٫۱۴	۰	۰	۰	۰	۰	۰
۸	۰	۰	۴۷٫۱۴	۰	۲۸٫۲۸	۰	۴۷٫۱۴	۰	۲۰٫۲۰
۱۱	۰	۰	۴۷٫۱۴	۲۸٫۲۸	۲۰٫۲۰	۱۵٫۷۱	۲۸٫۲۸	۱۲٫۸۵	۱۵٫۷۱
۱۵	۰	۴۷٫۱۴	۰	۰	۱۵٫۷۱	۱۵٫۷۱	۰	۱۰٫۸۷	۰
۱۸	۰	۴۷٫۱۴	۰	۰	۰	۱۵٫۷۱	۰	۰	۰
۲۱	۰	۴۷٫۱۴	۰	۰	۰	۱۵٫۷۱	۰	۰	۰
کل	۰	۳۶٫۶۳	۳۰٫۲۶	۳۲٫۴۲	۴۱٫۳۱	۵۴٫۱۹۴	۴۴٫۲۹	۴۲٫۸۰	۴۲٫۸۰

Algalmag

بحث

کربن ماده مغذی ضروری برای کشت سیانوباکترها است و می‌تواند به شکل آلی یا غیرآلی جذب شود. کربن غیرآلی از طریق مکانیسم تغلیظ دی‌اکسیدکربن مورد استفاده قرار می‌گیرد. سیانوباکترها این توانایی را دارند که هم از دی-اکسیدکربن و هم از بی‌کربنات به عنوان منبع کربن غیرآلی استفاده کنند(Markou and Georgakakis, 2010) .

انحلال دی‌اکسیدکربن در آب یک سیستم بافر ضعیف اسید/باز به‌نام بی‌کربنات-کربنات ایجاد می‌کند. تشکیل گونه‌های کربن غیرآلی تابعی از دما و pH می‌باشد. در مقادیر pH تا حدود ۱۰/۵، گونه‌های بی‌کربنات غالب هستند در حالی که در مقادیر بالاتر از pH=۱۰/۵ کربنات غالب می‌باشد (Markou and Georgakakis, 2010).

نیتروژن نیز یکی از مواد مغذی مهم برای تولید بیوماس میکروجلبک می‌باشد. میزان نیتروژن در بیوماس بسته به مقدار، در دسترس بودن و نوع منبع نیتروژن، از ۱ تا ۱۰٪ متغیر است. نیتروژن می‌تواند به صورت NO^{3-}، NO^{2-}، NH^{4+}و N_2 مورد استفاده قرار گیرد. ترتیب مواد نیتروژنی که اسپیرولینا ترجیح می‌دهد از آن استفاده کند به صورت $N_2 > NO^{3-} > NH^{4+}$ می‌باشد. زمانی که نیترات در دسترس است این ماده به صورت درون سلولی توسط نیترات ردوکتاز F۳[۴] به نیتریت احیا می‌شود و نیتریت توسط نیتریت ردوکتاز F۴[۵] به آمونیوم احیا می‌شود. بنابر این ضایعات و پساب‌های غنی از نیتروژن می‌توانند به عنوان یک محیط کشت مناسب برای تولید پروتئین مورد توجه قرار گیرند (Markou and Georgakakis, 2010).

طبق تحقیقات با کشت اسپیرولینا در دمای ۳۰ میزان پروتئین و لیپید به طور معناداری با تغییر غلظت نیتروژن تاثیر نمی‌پذیرد در حالی که در دمای 35^0C افزایش در میزان پروتئین و لیپید مشاهده می‌شود. در اغلب تحقیقات انجام شده در ارتباط با اسپیرولینا، این میکروجلبک در محیط زاروک کشت شده‌است که نیتروژن در این محیط به صورت نیترات سدیم در دسترس می‌باشد. تحقیقات زیادی انجام شده‌است که در آن‌ها تلاش شده از منابع مختلف نیتروژن مانند آمونیوم کلراید، آمونیوم سولفات، آمنیوم فسفات، اسید و اوره برای کشت اسپیرولینا استفاده شود. با این وجود نیترات سدیم مناسب‌ترین ماده مغذی برای کشت اسپیرولینا می‌باشد(Markou and Georgakakis, 2010).

اولین کشت موفقیت‌آمیز اسپیرولینا ماکسیما با استفاده از آب دریا به‌علاوه اوره، میانگین سالانه تولید بیوماس اسپیرولینا ۷/۳۵ میلی‌گرم به‌ازای هر مترمربع در هر روز را نتیجه داد که کمی پایین‌تر از مقدار بدست آمده از محیط استاندارد بی-کربنات سدیم به‌علاوه آب دریا بود(۸/۱۴ گرم به‌ازای هر متر مربع در هر روز)(Tredici, *etal*., 1986).

نتایج این بررسی نشان داد استفاده از آب دریای گمیشان بدون غنی‌سازی جهت کشت میکروجلبک اسپیرولینا مناسب نمی‌باشد. با توجه به حضور سایر ترکیبات مغذی در آب گمیشان(جدول ۱) با غنی‌سازی آب توسط منبع کربن و نیتروژن می‌توان از آن برای کشت میکروجلبک اسپیرولینا استفاده کرد(جدول ۴). مطابق با تحقیق تردسی و همکاران ۱۹۸۶، می-توان با استفاده از منبع کربن و نیتروژن در آب دریا اسپیرولینا را کشت کرد که با نتایج این تحقیق مطابقت دارد.

آب تالاب منگوئرا[۶](در برزیل)چندین ماده مغذی مورد نیاز برای رشد اسپیرولینا را دارد، بنابر این می‌تواند به محیط کشت اسپیرولینا افزوده شود و هزینه‌های تولید این میکروجلبک را کاهش دهد. در یک تحقیق محیط زاروک رقیق نشده، محیط زاروک رقیق شده با ۵۰٪ آب تالاب و آب تالاب به‌علاوه ۱۰٪ محیط زاروک جهت کشت اسپیرولینا به‌کار رفت. ضریب رشد

4- nitrate reductase
5-nitrite reductase
6-Mangueira Lagoon

ویژه d^{-1} ۰/۱۱۱ و بازدهی بیومس $gl^{-1}d^{-1}$ ۰/۰۴۲۲۳با استفاده محیط زاروک به‌دست آمد. در حالی که با استفاده از آب تالاب به‌علاوه ۱۰٪ محیط زاروک ضریب رشد ویژه d^{-1} ۰/۱۱۳ و بازدهی $gl^{-1}d^{-1}$ ۰/۰۴۶۷ حاصل شد (Reinehr and Costa, 2006).

در این بررسی تیمار ۷ بیشترین تراکم سلولی را داشت در حالی‌که تراکم سلولی در تیمار ۸ (با وجود مواد مغذی بیشتر) کمی پایین‌تر از تیمار ۷ بود(جدول ۴). مطابق با تحقیق Costa وReinehr(۲۰۰۶)، استفاده از آب تالاب منگوئرا بهعلاوه ۱۰٪ محیط استاندارد جهت کشت اسپیرولینا، بازدهی و ضریب رشد بالاتری نسبت به محیط استاندارد حاصل می‌کند اما با استفاده از آب دریای گمیشان به‌علاوه بی‌کربنات سدیم (gl^{-1} ۰، ۱/۴، ۲/۸) و نیترات سدیم (gl^{-1} ۰/۵، ۲/۵، ۰)

در مقایسه با محیط استاندارد تراکم سلولی و ضریب رشد ویژه کمتری حاصل شد. علت این امر میزان ترکیبات مغذی بالاتر در آب تالاب منگوئرا در مقایسه با آب دریای گمیشان می‌باشد.

در تحقیقی دیگر بی‌کربنات سدیم،اوره، فسفات، سولفات، فریک‌آهن، منگنز و پتاسیم، برای تکمیل کردن آب تالاب منگوئرا جهت کشت اسپیرولینا مورد استفاده قرار گرفت. نتایج نشان داد تولید بیوماس اسپیرولینا در آب تالاب منگوئرا gl^{-1} ۰/۰۷۸/۰۱ (بر مبنای وزن خشک) می‌باشد، در حالی که در آب تالاب به‌علاوه gl^{-1} ۲/۸۸ بی‌کربنات سدیم بدون افزودن اوره، فسفات، سولفات و آهن، میزان بیوماس تولید شده به gl^{-1} ۰/۰۸۲/۰۱ رسید. با افزودن فسفات و ترکیبات آهن‌دار، میزان نهایی بیوماس اسپیرولینا پلاتنسیس به gl^{-1} ۰/۰۳ ۱/۳۴ افزایش یافت(Costa *et al.*, 2003).

طبق مطالعهای که گنجیان و همکاران در سال۱۳۹۱انجام دادند اثر بی‌کربنات سدیم ($NaHCO_3$) بر رشد میکروجلبک کلرلا در محیط کشتTMRL (AG) مورد بررسی قرار گرفت.بدین منظور از چهار غلظت بی‌کربنات سدیم $NaHCO_3$ (۲/۵، ۵، ۷/۵و ۱۰ در میلی لیتر) در محیط کشتTMRL (AG) طی ده روز استفاده گردید. نتایج حاصله با غلظت‌های مختلف بی‌کربنات سدیم که به محیط کشت TMRL(AG) اضافه شده نشان داد که تیمار سوم با غلظت ۷/۵ میلی‌لیتر، بیشترین رشدرا در روز دهم داشته‌است.

نتایج این تحقیق با نتایج کار گنجیانو همکاران (۱۳۹۱)، مطابقت داشت و استفاده از بی‌کربنات سدیم برای کشت میکروجلبک اسپیرولینا مانند کلرلا موثر واقع شد اما برای رشد اسپیرولینا در مقایسه با کلرلا به غلظت بالاتری از این ترکیب نیاز (7.5 ml)می‌باشد.

در این بررسی بدون افزودن بی‌کربنات سدیم و نیترات سدیم هیچ رشدی مشاهده نشد و با افزودن این ترکیبات رشد اسپیرولینا مشاهده شد که با نتایج کاستا و همکاران مطابقت دارد. اسپیرولینا در آب تالاب منگوئرا به‌علاوه بی‌کربنات رشد کمی داشت در آب دریای گمیشان به علاوه بی‌کربنات سدیم بدون نیترات سدیم (تیمار ۳ و ۶) نیز رشد کمی از خود نشان داد. افزودن منبع کربن و نیتروژن سبب افزایش قابل توجهی در میزان بیومس اسپیرولینا شد که با نتایج Costa و همکاران (۲۰۰۳)، مطابقت دارد.

تاثیر افزودن مواد مغذی به آب تالاب منگوئرا جهت رشد اسپیرولینا مورد بررسی قرار گرفت. در این بررسی اوره در ۰/۰۰۱۷۰، ۰/۰۱، ۰/۰۱۱۷۰، ۰/۰۰۵۸۵ و ۰ مولار و بی‌کربنات سدیم در غلظت‌های ۰، ۲/۸۸، ۹/۸۴، ۱۶/۸ و gl^{-1} ۱۹/۷ مورد استفاده قرار گرفت. این بررسی در قالب طرح RSMانجام شد نتایج نشان داد بهینه سطح ترکیبات مغذی ۰/۰۰۵۸۵ مولار اوره بدون افزودن بی‌کربنات سدیم می‌باشد در این حالت غلظت بیومس به gl^{-1} ۱/۴ رسید در حالی که بدون افزودن ترکیبات مغذی غلظت بیومس gl^{-1} ۰/۹ بود(Costa, et al., 2002).

نتایج این تحقیقنشان می‌دهد با افزایش میزان نیترات سدیم در غلظت ثابت بی‌کربنات سدیم بیومس اسپیرولینا افزایش پیدا می‌کند(به‌جز تیمار ۸ که علت آن می‌تواند افزایش غلظت ترکیبات محلول و افزایش فشار اسمزی باشد که سبب کاهش رشد اسپیرولینا شد). نتایج این بررسی با نتایج تحقیق Costa و همکاران (۲۰۰۲)، مطابقت دارد و نشان‌دهنده اهمیت منبع نیتروژن جهت رشد اسپیرولینا می‌باشد.

در بین ترکیبات مختلفی که برای کشت اسپیرولینا مورد استفاده قرار می‌گیرند کربن از لحاظ هزینه مهم‌تر می‌باشد، اگر منبعی بتواند این عنصر را تامین نماید استفاده از آن برای تولید انبوه اسپیرولینا مناسب می‌باشد(Vonshak, 1997).

کشت آزمایشی اسپیرولینا در هوای آزاد انجام شد در حالی که نیترات سدیم و بی‌کربنات سدیم به ضایعات مایع گاو(شیرابه) افزوده شد. در این بررسی بالاترین نرخ تولید بدست آمده $۱۴gm^{-2}d^{-1}$ بود (Mitchell and Richmond, 1988). در مطالعه‌ای دیگر ضایعات گاو رقیق شده با آب به صورت بی‌هوازی هضم شد، سپس از این محیط برای کشت اسپیرولینا استفاده شد. نتایج نشان داد رشد جلبک در این شرایط سریع می‌باشد و هیچ گونه محدودیتی در حضور ترکیبات نیتروژنی[۷] در غلظت کم‌تر از mgl^{-1} ۷۵ رخ نمی‌دهد. اما غلظت بالاتر از mgl^{-1} ۱۰۰ این ترکیبات، از رشد جلبک جلوگیری می‌کند. با این حال بازدهی حذف ترکیبات نیتروژنی توسط جلبک $mgl^{-1}d^{-1}$ ۲۴ بود و بازدهی بیومس برای تولید در آزمایشگاه به $mgl^{-1}d^{-1}$ ۷۰ و برای کشت در هوای آزاد به $mgl^{-1}d^{-1}$ ۲۴ رسید(Lincoln, *etal*., 1996).

نتایج این تحقیق نشان می‌دهد کمبود منبع نیتروژن (تیمار ۳ و ۶) سبب کاهش تراکم سلولی، ضریب رشد ویژه و نرخ رشد میکروجلبک می‌گردد(جدول ۳ و ۴) که با نتایج Mitchellو Richmond(۱۹۸۸)، و Lincolnو همکاران (۱۹۹۶)، مطابقت دارد.

در یک بررسی، پساب هضم و صاف شده کارخانه نودل برنج برای کشت اسپیرولینا استفاده شد. غلظت‌های مختلف نیترات، فسفات، پتاسیم و سدیم کربنات برای برای غنی سازی پساب مورد استفاده قرار گرفت. نتایج نشان داد محیط پساب اصلاح شده، حاوی پساب رقیق شده(رقت ۱:۱۱) و تکمیل شده با gl^{-1} ۰/۰۹ نیترات، gl^{-1} ۰/۵۹ فسفات، gl^{-1} ۰/۱۸ پتاسیم و gl^{-1} ۳ سدیم کربنات، بالاترین توانایی را برای کشت اسپیرولینا پلاتنسیس دارد. بیومس تولید شده ۵۹٪ پروتئین و ۱۴٪ فیکوسیانین داشت که تقریبا با مقدار این ترکیبات در بیومس رشد یافته در محیط زاروک برابر بود (Vetayasupom, 2004).

در بررسی حاضر بهترین میزان رشد میکروجلبک در غلظت gl^{-1} ۲/۸ بی‌کربنات سدیم و gl^{-1} ۰/۲۵ نیترات سدیم حاصل شد (تیمار ۷). در این تیمار میزان بی‌کربنات سدیم تقریبا مشابه مقدار آن در پساب کارخانه نودل می‌باشد اما میزان نیترات سدیم در این تیمار بیشتر از پساب کارخانه نودل است علت این امر حضور بیشتر نیتروژن در پساب و نیاز کمتر به منبع نیتروژن جهت غنی‌سازی آن می‌باشد.

تولید اسپیرولینا در مقیاس وسیع به عوامل مختلفی بستگی دارد، مهمترین این عوامل دما، نور و دسترسی مواد مغذی می‌باشد. این عوامل رشد و ترکیب اسپیرولینا را با تغییر متابولیسم تحت تاثیر قرار می‌دهند. کربن ماده مغذی اصلی مورد نیاز اسپیرولینا است. در دریاچه‌های قلیایی به دلیل حضور غلظت بالای بیکربنات سدیم، اسپیرولینا میکروارگانیسم غالب می‌باشد. بعد از هزینه کارگری، هزینه مواد مغذی بویژه کربن دومین هزینه در تولید توده اسپیرولینا می‌باشد Costa, *etal*., (2003).

7- $N–NH_3$

Costa و همکاران (۲۰۰۴) ،از اوره و سدیم بی‌کربنات برای غنی‌سازی آب تالاب منگوئرا استفاده کردند و میزان رشد اسپیرولینا را مورد بررسی قرار دادند. اوره در غلظت‌های ۰، ۱/۱۲۵ و $۲/۲۵۰ mgl^{-1}$ و سدیم بی‌کربنات در غلظت‌های ۰، ۲۱ و $۴۲ mgl^{-1}$ مورد استفاده قرار گرفت. نتایج نشان داد افزودن $۱/۱۲۵ mgl^{-1}$ اوره بدون افزودن بی‌کربنات سدیم بیشترین میزان بیومس را حاصل می‌کند که بیش از ۲ برابر بیومس تولید شده در آب تالاب غنی نشده بود. با افزودن $۲/۲۵۰ mgl^{-1}$ اوره بدون بی‌کربنات سدیم، میزان بیومس کاهش پیدا کرد. $۲۱ mgl^{-1}$ افزودن بی‌کربنات سدیم در غلظت‌های مختلف اوره افزایش کمی در میزان بیومس حاصل کرد در حالی که افزودن $۴۲ mgl^{-1}$ بی‌کربنات سدیم در غلظت‌های مختلف اوره سبب کاهش تولید بیومس شد. همه تیمارها با استفاده از آب تالاب بدون افزودن ترکیبات مغذی شروع شد و پس از ۳۱۲ ساعت کشت (کمبود مواد مغذی) اضافه شدن اوره و بی‌کربنات سدیم در غلظت‌های مختلف انجام شد، تنش حاصل از املاح نمکی ممکن است علت کاهش بیومس در غلظت‌های بالاتر باشد. نتایج این بررسی نشان داد اگرچه میزان کربنات و بی‌کربنات موجود در آب تالاب منگوئرا می‌تواند از رشد اسپیرولینا حمایت کند اما افزودن اوره برای رشد اسپیرولینا مفید است (Costa, *et al*., 2004).

نتایج این بررسی نشان داد آب دریای گمیشان به تنهایی برای حمایت رشد اسپیرولینا پلاتنسیس مناسب نمی‌باشد که با نتایج کار Costa و همکاران (۲۰۰۴)، مغایرت دارد علت آن کمتر بودن منبع کربن و نیتروژن آب دریای گمیشان در مقایسه با تالاب منگوئرا می‌باشد. همچنین نتایج نشان می‌دهد تنها با افزودن منبع نیتروژن به آب دریای گمیشان نمی‌توان به حداکثر رشد اسپیرولینا دست یافت که با نتایج Costa و همکاران (۲۰۰۴)، مغایرت دارد و علت آن کمتر بودن میزان منبع کربن آب دریای گمیشان نسبت به تالاب منگوئرا می‌باشد. طبق نتایج این تحقیق با افزایش غلظت منبع نیتروژن و کربن در تیمار ۸ (جدول ۴) تراکم سلولی کاهش پیدا کرد که علت آن تنش حاصل از املاح نمک می‌باشد که با نتایج کار Costa و همکاران (۲۰۰۴)، مطابقت دارد.

منابع

گنجیان خناری، ع.، شکوری، م.، قاسم نژاد، م.، گنجیان خناری، ف.، فارابی، و.، ۱۳۹۱. بررسی تاثیر بی‌کربنات سدیم بر رشد میکروجلبک کلرلا(.Chlorella sp) در محیط کشت TMRL. مجلهتوسعهآبزیپروری،سالششم،شماره دوم.

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

Costa, J.A.V., Colla, L.M., Duarte Filho, P., Kabke, K., Weber, A., 2002. Modelling of Spirulinaplatensis growth in fresh water using response surface methodology.World J. Microbiol: Biotechnology. 18, 603–607.

Costa, J.A.V., Colla, L.M., Duarte Filho, P., 2003. Spirulinaplatensis growth in open raceway ponds using fresh water supplemented with carbon, nitrogen and metal ions. Journal forNatureResearch: Journal of Biosciences 58, 76–80.

Costa, J.A.V., Colla, L.M.1, Duarte Filho, P., 2004. Improving Spirulinaplatensis biomass yield using a fed-batch process. Bioresource Technology, 92, 237-241.

Faucher, O., Coupal, B., Leduy, A., 1979. Utilization of seawater-urea as a culture medium for Spirulina maxima. Can J Microbiol, 25,752-759.

Ganjian, A.,WanMaznah, W.O.,Yahya , Kh., Najafpour, Sh., Najafpour, Gh.D., Roohi, A., Fazli, H., 2010. Seasonal succession of phytoplankton community structure in the southern part of Caspian Sea. American-EunrasianJ.Agric.& Environ. Sci., Vol. 8 (2), pp. 146-155.

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

Algalmas

Habib, M.A.B., Parvin, M., Huntington, T.C., Hasan, M.R,. 2008. A Review On Culture, Production And Use Of Spirulina As Food For Humans And Feeds For Domestic Animals And Fish: FAO Fisheries And Aquaculture Circular.

Henrikson, R. 1994.SuperfoodSpirulinamicroalgae-of futuro.Barcelona: EdicionesUranoSAISBN84-7953-047-2.

Lincoln, E.P., Wilkie, A.C., French, BT., 1996. Cyanobacterial process for renovating dairy wastewater. Biomass Bioenergy, 10, 63–81.

Markou, G., and Georgakakis, D., 2010. Cultivation of filamentous cyanobacteria (blue-green algae) in agro-industrial wastes and wastewaters A review: Applied Energy 88(10), 3389-3401.

Materassi, R., Tredici, M., Balloni, W. 1984. Spirulina culture in sea water. ApplMicrobiolBiotechnol 19: 384-386.

Mitchell, S.A. and Richmond, A., 1988. Optimization of agrowthmedium for Spirulina based on cattlewastea. Biological Wastes, 25(1), 41-50.

Radmann, E. M., Reinehr, C. O., Costa, J. A. V., 2007. Optimization of the repeated batch cultivation of microalga Spirulinaplatensis in open raceway ponds. Aquaculture, 265(1-4), 118-126.

Reinehr, C.O., Costa, J.A.V., 2006. Repeated batch cultivation of the microalga Spirulinaplatensis. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 22, 937–943.

Richmond, A., 1990. Handbook of Microalgal Mass Culture. CRC Press, Boston. ISBN:0-8493-3240-0.

Tredici, M.R., Papuzzo, T. &Tomasello, L. 1986. Outdoor mass culture of Spirulina maxima in sea-water. Appl. Microbiol. Biotechnol., 24: 47–50.

Vetayasupom, S., 2004. The Potential of Using Wastwater from Household Scale Fermented Thai Rice Noodle Factories for Cultivating SpirulinaPlatensis. Pakistan Journal of Biological Scientific Information, 7(9), 1554-1558.

Vonshak, A., Abeliovich, A., Boussiba, S., Arad, S. & Richmond, A., 1982. Productio n of Spirulina biomass: effects of environmental factors and population density. Biomass, 2, 175–185.

Vonshak, A. 1997 Spirulinaplatensis (Arthrospira): Physiology, Cell-Biology and Biotechnology.London: Taylor & Francis. ISBN 0-7484-0674-3.

Wu B, Tseng CK., Xiang W. 1993. Large-scale cultivation of Spirulina in sea-water based cultured medium. Bot Mar, 36: 99-102

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

Algalmag

Study the Effects of Adding Nutrients to Gomishan Sea Water for Growth of*Spirulinaplatensis*

Abstract

Spirulina Microalgae cultivation is important Due to its high nutritional value and health benefits, and much research in the field of Microalgae production and factors affecting it have been done. Adding different concentrations of sodium bicarbonate (0, 1.4, 2.8 gl^{-1}) and sodium nitrate (0, 0.25, 0.5 gl^{-1}) to the Gomishan Sea water have been done for Study Spirulinaplatensis growth factors. Spirulina cultivation was performed at 30℃ , 4670± 350 lux and light period 12 L / 12 D. The results show that Use of 2.8 gl^{-1} sodium bicarbonate and 0.25 gl^{-1} sodium nitrate highest growth ($10^4 \times 35$ cells per ml) is obtained. In this treatment, the rate of growth and specific growth rate were 0.13 and 0.097 respectively, which were higher than other treatments. Use 2.8 gl^{-1} sodium bicarbonate and 0.5 gl^{-1} sodium nitrate decreased cell number, growth rate and the specific growth rate.

Keywords: *Spirulina, Enrichment,*GomishanSea water, sodium bicarbonate, sodium nitrate

Algalmag