

جداسازی زی توده (بیوماس) میکرو جلبک از محیط کشت با استفاده از تکنولوژی انعقاد الکتریکی

مریم عابدی^{۱*}، علی گنجیان خناری^۲، فائزه حیدری^۳، ساناز درویش زاده^۴

۱- استادیار گروه صنایع شیمیایی، دانشکده فنی امام محمد باقر (ع) ساری، دانشگاه فنی و حرفه‌ای، مازندران، ایران.

۲- گروه پژوهشی شیلات و آلاینده‌های آبی خزر (کاسپین)، وزارت علوم، تحقیقات و فناوری، ساری، ایران.

۳- پژوهشکده اکولوژی دریای خزر، موسسه تحقیقاتی علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، ساری، ایران.

۴- دانشگاه آزاد اسلامی واحد آیت الله آملی، آمل، ایران.

m.abedi80@gmail.com

چکیده

جمع‌آوری میکرو جلبک یک فرایند دو مرحله‌ای است که عبارتست از جداسازی فاز مایع‌رویی از زی توده (Biomass) یا فاز جامد که بعد از تولید انبوه آغاز می‌شود. هدف از این تحقیق جمع‌آوری زی توده (رسوب‌دهی و یا لخته‌سازی) میکرو جلبک کلرلا با انعقاد الکتریکی و تعیین مناسب‌ترین مقدار ولتاژ و آمپر جهت رسوب‌دهی سلول‌های میکرو جلبک کلرلا می‌باشد. در مطالعه حاضر، امکان استفاده از روش انعقاد الکتریکی (الکتروفلوکولاسیون) برای برداشت زی توده میکرو جلبک کلرلا از محیط کشت مورد آزمایش قرار گرفت. در این بررسی بعد از دوره رشد میکرو جلبک (حداکثر ۱۵ روز) از ۶ تیمار و سه تکرار در بشرهای یک لیتری از سوسپانسیون میکرو جلبک کلرلا با ولتاژهای (۳/۵، ۹، ۱۴/۲، ۲۸/۲۶، ۴۹، ۳۱/۸) و آمپرهای متفاوت (۰/۲، ۰/۰۶، ۰/۱، ۰/۲، ۰/۳، ۰/۴)، مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد سرعت لخته شدن میکرو جلبک کلرلا با افزایش آمپر و ولتاژ رابطه مستقیم داشته به طوری که در تیمار با آمپر ۰/۴ و ولتاژ ۳۱/۸ سلول‌های میکرو جلبک کلرلا شروع به بهم چسبیدن و لخته شدن کردند. در این تیمار با توجه به آمپر و ولتاژ بالاتر نسبت به تیمارهای دیگر سرعت جداسازی و جمع‌آوری سلول‌های میکرو جلبک (زی توده) بیشتر و در زمان کوتاه‌تری از محیط کشت جدا شدند و در سطح آب شناور شدند؛ بدین صورت که بعد از دو دقیقه سلول‌های میکرو جلبک کلرلا شروع به لخته شدن و بهم چسبیدن کردند و کل زمان تا جمع‌آوری کامل زی توده حدود ۱۴ دقیقه از سوسپانسیون خارج شده و تمام زی توده بصورت لخته روی آب شناور شد، بقیه آب کاملاً شفاف و بدون میکرو جلبک کلرلا بوده‌است. در صورتی که در تیمار با ولتاژ ۲/۵ و آمپر ۰/۲ پایین تر بعد از ۵۴ دقیقه شروع به لخته شدن و بعد از ۲۵۸ دقیقه کل زی توده میکرو جلبک کلرلا لخته و جمع‌آوری شدند. بین تیمارها و زمان‌های مختلف اختلاف معنی‌داری وجود داشت. میکرو جلبک کلرلا پس از انعقاد الکتریکی در تیمارهای مختلف نشان داد که سلول‌ها در شرایط خوبی از نظر شکل قرار داشته و تفاوت قابل تشخیصی بین آن‌ها و سلول‌های غیر فلوکوله در زیر میکروسکوپ نوری دیده نشد. این تحقیق به روشنی نشان داده‌است که انعقاد الکتریکی روش موثر برای لخته‌سازی سلول میکرو جلبک کلرلا بوده و از آنجایی که بازیابی زی توده میکرو جلبک یک مرحله مهم در فرایند تولید زی توده میکرو جلبک می‌باشد و هزینه قابل توجهی از تولید میکرو جلبک را شامل می‌شود، این روش می‌تواند با هزینه بسیار پایین قابل اجرا باشد.

واژگان کلیدی: جداسازی، میکرو جلبک کلرلا، تکنولوژی انعقاد الکتریکی.

مقدمه

جلبک‌ها یکی از مهمترین ارگانیزم‌های آبی بوده و از جمله اولین موجودات زنجیره غذایی محسوب می‌شوند. تنوع این ارگانیزم‌های آبی بسیار بالاست و به بیش از ۳۰۰۰۰ گونه تخمین زده شده و در اکثر اکوسیستم‌های آبی پراکنش دارند. از بین این جلبک‌ها، تعداد محدودی به صورت تجاری مورد پرورش قرار می‌گیرند که از عمده‌ترین آنها می‌توان به *Berg-Nilsen*، *Chlorella*، *Scenedesmus*، *Spirulina*، *Haematococcus* و *Dunaliella* اشاره نمود (۲۰۰۶، Berg-Nilsen). پرورش جلبک‌ها نسبت به گیاهان خشکی‌زی، دارای مزایایی است که می‌توان به توانایی پرورش آنها در سیستم‌های پایدار، برداشت آنها در تمام طول سال، پایین بودن میزان مواد ساختاری در پیکره آنها، قابلیت هضم و مصرف تمام پیکره سلولی و

سهولت در افزودن CO₂ مورد نیاز برای رشد آنها به محیط کشت اشاره نمود. (Barak, ۱۹۸۰; Benemann, ۱۹۸۷). جلبک‌ها قابلیت رشد در زمین‌ها و مکان‌های غیر کشاورزی و غیر قابل کشت را نیز دارند و در شرایط متغیر آب و هوایی می‌توانند رشد کنند. جلبک‌ها برای رشد به نور خورشید، کربن دی‌اکسید و مواد مغذی نیاز دارند. مصرف کربن دی‌اکسید توسط جلبک باعث حذف آن از هوا و کاهش گازهای گلخانه‌ای می‌شود. ایران به دلیل داشتن آب شور فراوان، نور خورشید و زمین زیاد و میزان تولید کربن دی‌اکسید بالا مکان مناسبی برای جلبک‌ها می‌باشد (گلزاری و همکاران ۱۳۹۵).

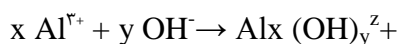
به طور کلی جلبک‌ها دارای کاربردهای متنوعی در صنایع دارویی، تحقیقات علمی، تولید مواد غذایی برای انسان، دام و آبزیان می‌باشند. مواد استخراج شده از جلبک‌ها برای تولید انواع آنتی‌اکسیدان‌ها، ویتامین C و E، اسیدهای چرب غیراشباع، آنزیم‌های متنوع، مواد پلیمری با خواص کاربردی بالا، مواد بیولوژیک مانند پپتیدها، ایزوتوپ‌ها، انواع آمینواسیدهای آزاد، مورد استفاده قرار می‌گیرد. از طرف دیگر، بسیاری از جلبک‌ها برای حذف بیولوژیک بسیاری از آلاینده‌های آب و هوا استفاده می‌شوند (Berg-Nilsen, ۲۰۰۶; Barbosa et al, ۲۰۰۳). از جمله مهمترین جلبک‌های اقتصادی و با ارزش غذایی بالا، که توسط محققین بسیار مورد توجه قرار گرفته‌است، می‌توان به دو نمونه جلبک *Spirulina sp* و *Chlorella sp* اشاره نمود. کلرلا دارای بیش از ۵۰٪ پروتئین و ۱۲/۴٪ لیپید بوده و سرشار از اسیدهای چرب غیراشباع، ویتامین B_۶ و ویتامین B_{۱۲} (متیل کوبالامین) و اسپوروپولین (کاهش سمیت نوروتوکسین‌ها و فلزات سنگین) می‌باشد. از مهمترین خواص بالینی جلبک کلرلا، می‌توان به کاهش کلسترول در خون و کبد، کاهش فشار خون، دیابت، جلوگیری از پوکی استخوان، بهبود یبوست، زخم معده و کم‌خونی اشاره نمود. همچنین عملکرد مفید این جلبک در بهبود و تقویت سیستم ایمنی، کاهش آلرژی، کند شدن روند رشد تومورهای سرطانی و کاهش عملکرد ویروس‌ها، به اثبات رسیده‌است (Kanno and Kazie, ۲۰۰۵).

با توجه به اهمیت تکثیر و پرورش میکرو جلبک در صنایع آبی‌پروری و صنایع مختلف از جمله تغذیه انسانی، دام و طیور، داروسازی، بیودیزل (سوخت سبز)، کود سبز و نبود اطلاعات جامع و مفید در زمینه میکرو جلبک در کشور خصوصاً جداسازی میکرو جلبک (تولید انبوه) از سوسپانسیون آن، نیاز به بررسی و مطالعه بیشتر ضروری است. بازیابی بیوماس (زی توده) میکرو جلبک که معمولاً به یک یا بیش از یک فرآیند جداسازی جامد-مایع نیاز دارد، یک مرحله مهم در فرآیند تولید بیوماس میکرو جلبک بوده و بین ۲۰ تا ۳۰ درصد کل هزینه‌های مربوط به تولید را شامل می‌شود. انتخاب تکنولوژی جمع-آوری محصول در تولید اقتصادی بیوماس میکرو جلبک بسیار تعیین کننده‌است. لخته‌سازی میکرو جلبک اولین مرحله در فرآیند جمع‌آوری توده می‌باشد. هدف از انجام این مرحله متراکم نمودن سلول‌های میکرو جلبکی به منظور افزایش سایز موثر ذرات می‌باشد (Mata et al., ۲۰۱۰). لخته‌سازی یک مرحله مقدماتی پیش از سایر روش‌های جمع‌آوری می‌باشد. روش‌های متداول در جمع‌آوری میکرو جلبک‌ها شامل: سانتریفیوژ، فیلتراسیون، رسوب‌دهی، انعقاد و شناورسازی می‌باشد (Shelef et al., ۱۹۸۴; Grima et al., ۲۰۰۳).

سه جنبه کلی در ارزیابی عملکرد این روش‌ها وجود دارد که عبارتند از: ۱) بهره‌وری این روش‌ها یعنی درصد میکرو جلبک بازیابی شده از کل پروسه تولید ۲) مقدار ماده جامد در میکرو جلبک بدست آمده ۳) نرخ برداشت محصول (درصد حذف آب) (Uduman, ۲۰۱۰). از آنجایی که در اکثر کشورهایی که تولید بالای میکرو جلبک در صنایع مختلف را دارند جهت رسوب دادن از روش انعقاد الکتریکی استفاده می‌شود و همچنین تاکنون در ایران به طور جدی و علمی این کار مورد استفاده قرار نگرفته‌است. با توجه به فواید و تولید آسان میکرو جلبک‌ها و امکانات موجود جهت کاهش هزینه تولید پروتئین از منابع جلبکی نسبت به محصولات دیگر کشاورزی، بررسی روش‌های مختلف جمع‌آوری میکرو جلبک‌ها بسیار ضروری به نظر می‌رسد، تا بتوان با معرفی روش مناسب گامی برای کاهش هزینه تولید پروتئین گیاهی و فواید حاصل از آن در صنایع دیگر برداشته شود.

مواد و روش‌ها

در این آزمایش، استوک خالص میکروجلبک سبز کلرلا از آزمایشگاه کشت جلبک گروه پژوهشی شیلات و آلاینده‌های آبی خزر (کاسپین-ساری) تهیه گردید. میکروجلبک کلرلا بعد از خالص‌سازی در شرایط استریل از لوله آزمایش به ارلن‌های ۲۵۰ و بعد از چند روز به ارلن‌های بزرگتر انتقال پیدا کرد. برای انجام کار میکروجلبک سبز کلرلا در ظروف شیشه‌ای ارلن‌های ۵ لیتری شرایط آزمایشگاهی با محیط کشت (TMRL(AG) در دمای میانگین 25 ± 2 درجه سانتی‌گراد و دوره نوری میکسوتروف D۱۲ / L۱۲ و لوکس نوری 350 ± 350 طی یک دوره ۱۵ روزه کشت داده شد تا به تولید انبوه رسید. بعد از دوره رشد، میکرو جلبک کلرلا جهت جداسازی زی‌توده (بیوماس) از فاز مایع، سوسپانسیون میکروجلبک کلرلا در بشرهای یک لیتری که شامل ۶ تیمار و هر تیمار ۳ تکرار با دستگاه انعقاد الکتریکی (الکتروفلوکولاسیون) با الکتروود آلومینیوم انجام گردید. برای انجام این آزمایش شرایط دما، PH، نوع الکتروود و فاصله الکتروودها از هم یکسان در نظر گرفته شده‌است و شش تیمار با ولتاژ و آمپر متفاوت مورد ارزیابی قرار گرفت (جدول ۱).
زمانی که آلومینیوم به‌عنوان آند استفاده می‌شود، واکنش شیمیایی زیر رخ می‌دهد (Mouedhen et al, ۲۰۰۸)



جدول ۱. میزان ولتاژ و آمپر در تیمارهای مختلف

تیمارها	ولتاژ V=	آمپر A=
T _۱ =تیمار اول	۳/۲	۰/۰۲
T _۲ =تیمار دوم	۹	۰/۰۶
T _۳ =تیمار سوم	۱۴/۲	۰/۱
T _۴ =تیمار چهارم	۲۶/۹	۰/۲
T _۵ =تیمار پنجم	۲۸/۳	۰/۳
T _۶ =تیمار ششم	۳۱/۸	۰/۴

در این پژوهش میکروجلبک کلرلا با تراکم مشابه (تعداد سلول در میلی‌لیتر) در سه تکرار با آمپر و ولتاژ مختلف در یک طرح کاملا تصادفی متعادل (CRD) مورد آزمایش قرار گرفت و سرعت (زمان به دقیقه) لخته‌شدن میکروجلبک کلرلا بدست آمده از هر تیمار به ثبت رسید.

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

داده‌ها با استفاده از نرم افزارهای Excel ۲۰۰۷ و SPSS ۱۸ مورد آنالیز آماری قرار گرفت و پارامترهای میانگین، انحراف معیار، خطا معیار، حداقل و حداکثر دست‌بندی محاسبه گردید. برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از (ANOVA) و جهت مقایسه میانگین‌ها از آزمون دانکن در سطح ۹۵ درصد استفاده گردید (Zar, ۱۹۸۴; Toyub et al., ۲۰۰۸).

نتایج

۱-۱ مطالعه آزمایشگاهی اثرات موثر الکتروفولوکیشن (انعقاد الکتریکی) جهت جمع آوری محصول (زی توده)

در این بررسی تعداد سلول اولیه میکروجلبک کلرلا تقریباً 25×10^6 تعداد در میلی لیتر بوده است. نتایج آنالیز واریانس یک-طرفه (میانگین، انحراف معیار) در محیط های کشت مختلف میکروجلبک کلرلا در تیمارهای مختلف در جدول (۲) آورده شده است.

۱-۲ ولتاژ، آمپر و زمان در تیمارهای مختلف

در تیمار یک با ولتاژ ۳ و آمپر ۰/۰۲ بعد از روشن شدن دستگاه و پس از ۵۴ دقیقه اولین نشانه لخته شدن سلول های میکروجلبک کلرلا مشاهده گردید. در این تیمار سرعت لخته شدن سلول های میکروجلبک کلرلا بسیار آهسته صورت گرفت و در این زمان سلول های لخته شده در سطح بالایی مایع جمع گشتند. در زمان های مختلف این لایه ضخیم تر و در نهایت بعد از زمان ۲۵۸ دقیقه کل سلول های میکروجلبک در سطح بالایی بشر به صورت لایه ضخیم در آمده که به راحتی جمع آوری گشت و آب زیرین کاملاً شفاف و روشن شد. نتایج تجزیه واریانس یک طرفه بین زمان های مختلف رسوب دهی میکروجلبک کلرلا نشان دهنده اختلاف معنی دار در سطح ۹۵ درصد می باشد ($P < 0/05$) (جدول ۲، شکل های ۱ و ۲).

در تیمار دوم با ولتاژ ۹ و آمپر ۰/۰۶، بعد از ۱۱ دقیقه اولین لخته و بهم چسبندگی سلول ها اتفاق افتاد و نسبت به تیمار اول سریع تر لخته سازی سلول های میکروجلبک کلرلا صورت گرفت، این زمان تقریباً بیش از چهار برابر سرعت لخته سازی و جمع آوری محصول نسبت به تیمار اول بوده است و ضخامت زی توده در زمان های بعدی بیشتر و در نهایت در زمان ۶۸ دقیقه، کل سلول های میکروجلبک کلرلا بهم چسبیده و در سطح آب شناور شدند و لایه زیرین زی توده کاملاً شفاف شد. به جز زمان های ۳۹ و ۴۲ دقیقه و ۴۲ و ۴۵ در یک گروه قرار گرفتند و با هم اختلاف معنی داری را نشان نمی دهند ($P > 0/05$). ولی با گروه های دیگر اختلاف داشتند ($P < 0/05$) (جدول ۱، شکل های ۱ و ۳).

تیمار سوم با ولتاژ ۱۴ و آمپر ۰/۱ انجام شد و بعد از ۹ دقیقه، اولین لخته و بهم پیوستگی سلول های میکروجلبک کلرلا اتفاق افتاد. در زمان های بیشتر رنگ سوسپانسیون کمتر و ضخامت لایه بالایی سلول های میکروجلبک کلرلا بیشتر شد به طوری که در زمان ۴۹ دقیقه کل سلول ها بهم چسبیده و آب کاملاً شفاف شد. درصد رسوب دهی اختلاف معنی داری بین زمان های مختلف نشان داده است ($P < 0/05$) (جدول ۱، شکل های ۱ و ۴).

در تیمار چهارم با ولتاژ ۲۷ و آمپر ۰/۲ بعد از سه دقیقه سلول های میکروجلبک کلرلا روی سوسپانسیون جمع گشته و بهم چسبیدند و در زمان ۲۶ دقیقه کل سلول ها بهم چسبیده و لایه ضخیمی از زی توده میکروجلبک کلرلا را تشکیل دادند. به جز درصدهای ۴۰ و ۶۰ درصد که در یک گروه قرار گرفتند و بین این دو زمان اختلاف معنی داری مشاهده نگردید اما با گروه های دیگر و بین درصدها در زمان های مختلف اختلاف معنی دار بوده است (جدول ۱، شکل های ۱ و ۵).

تیمار پنجم با ولتاژ ۲۸ و آمپر ۰/۳ انجام شد. در این تیمار شروع لخته شدن و بهم چسبیدن زی توده میکروجلبک کلرلا بعد از ۲ دقیقه اتفاق افتاد. در نهایت زی توده میکروجلبک کلرلا در زمان ۲۱ دقیقه در لایه بالایی جمع آوری گردید و لایه های زیرین کاملاً شفاف و عاری از سلول های میکروجلبک شد. بین درصدهای ۲۰ و ۴۰ درصد اختلاف معنی داری مشاهده نگردید ولی بین درصدهای مختلف (زمان ها) اختلاف معنی داری وجود داشته است (جدول ۱، شکل های ۱ و ۶).

در تیمار ششم با ولتاژ ۳۲ و آمپر ۰/۴ همانند تیمار پنجم بعد از ۲ دقیقه لخته شدن و بهم پیوستن زی توده میکروجلبک کلرلا رخ داد و بعد از ۱۴ دقیقه جمع آوری زی توده به اتمام رسید (شکل ۷). به طوری که بین زمان ۱۱-۱۳ (۶۰ و ۹۰ درصد) و ۱۳-۱۴ (۹۰ و ۱۰۰ درصد) در یک گروه قرار گرفتند و اختلاف معنی داری مشاهده نگردید. اما بین

این دو گروه و زمان‌های دیگر اختلاف معنی‌دار مشاهده گردید با توجه به جدول (۱) و شکل (۱) با افزایش آمپر و ولتاژ زمان جمع‌آوری محصول به صورت چشمگیر کاهش نشان داد.

جدول ۲. درصد رسوبدهی میانگین (زمان \pm انحراف معیار) میکروجلبک کلرلا در زمان‌ها و تیمارهای مختلف

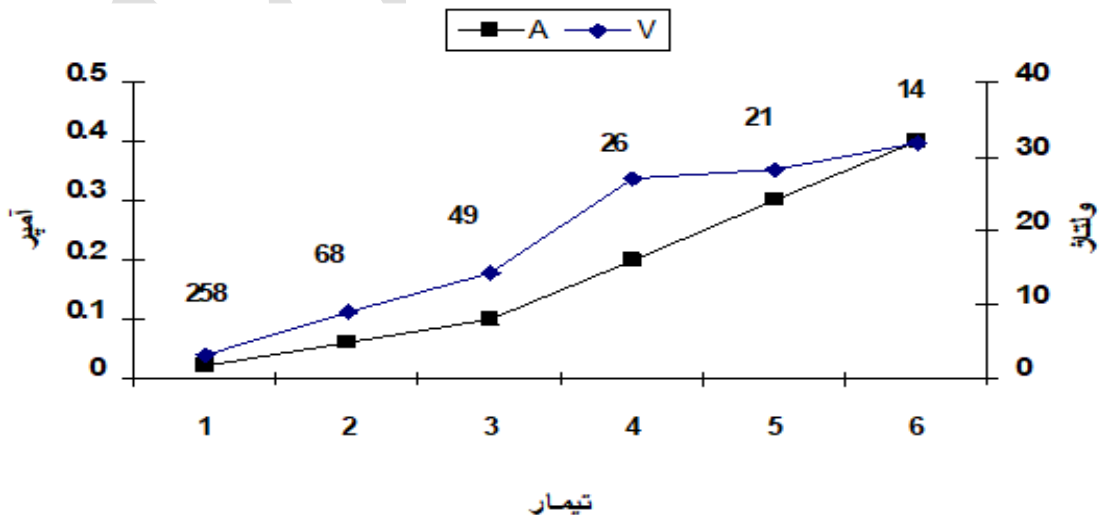
انحراف معیار \pm میانگین (زمان : دقیقه)						درصد رسوبدهی
T ₆	T ₅	T ₄	T ₃	T ₂	T ₁	
a ₂ \pm ۰/۶	a ₂ \pm ۰/۶	a ₃ \pm ۰/۶	a ₉ \pm ۰/۰	a ₁₁ \pm ۱/۰	a ₅₄ \pm ۴/۵	۰*
b ₅ \pm ۰/۶	b ₅ \pm ۰/۶	b ₆ \pm ۱/۵	b ₁₇ \pm ۱/۰	b ₃₉ \pm ۲/۱	b ₁₁₂ \pm ۳/۵	۵%
c ₈ \pm ۰/۶	c ₉ \pm ۰/۶	c ₁₁ \pm ۱/۰	c ₂₂ \pm ۰/۰	bc ₄₂ \pm ۲/۷	c ₁₃₃ \pm ۵/۵	۱۰%
c ₉ \pm ۰/۶	d ₁₁ \pm ۰/۶	d ₁₄ \pm ۱/۰	d ₂₅ \pm ۰/۶	cd ₄₅ \pm ۲/۱	d ₁₆₇ \pm ۵/۰	۲۰%
d ₁₀ \pm ۰/۶	d ₁₂ \pm ۰/۶	e ₁₇ \pm ۱/۰	e ₂₉ \pm ۲/۵	d ₄₉ \pm ۱/۷	e ₁₈₇ \pm ۵/۰	۴۰%
e ₁₁ \pm ۰/۶	e ₁₅ \pm ۰/۶	e ₁₉ \pm ۲/۰	f ₃₄ \pm ۲/۵	e ₅₅ \pm ۱/۵	f ₂₀₀ \pm ۴/۰	۶۰%
ef ₁₃ \pm ۰/۶	f ₁₇ \pm ۰/۶	f ₂₂ \pm ۰/۶	g ₄₀ \pm ۲/۰	f ₆₁ \pm ۴/۶	g ₂₃₆ \pm ۴/۵	۹۰%
f ₁₄ \pm ۰/۰	g ₂₁ \pm ۰/۶	g ₂₆ \pm ۳/۵	h ₄₉ \pm ۳/۰	g ₆₈ \pm ۳/۶	h ₂₅₈ \pm ۴/۰	۱۰۰%

* = شروع لخته شدن A=آمپر، V=ولتاژ

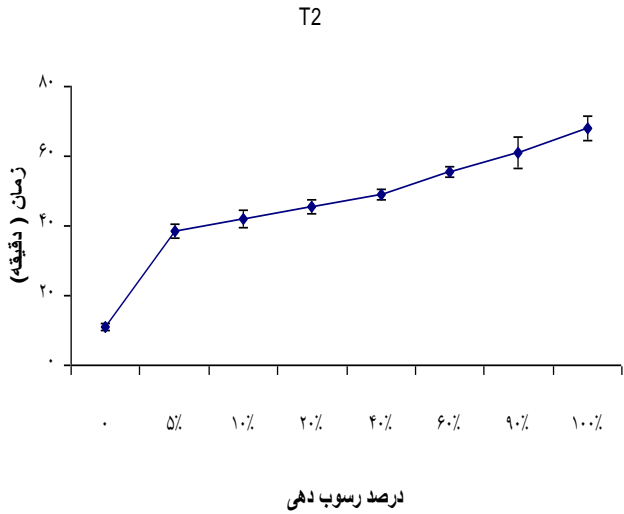
میانگین \pm (انحراف از استاندارد) اعداد در یک سطر با حروف متفاوت با یکدیگر دارای اختلاف معنی‌داری می باشند ($P < 0,05$)

T₁: A=۰/۰۲ ; V= ۳/۲
 T₂: A=۰/۰۶ ; V=۹
 T₃: A=۰/۱ ; V= ۱۴/۲

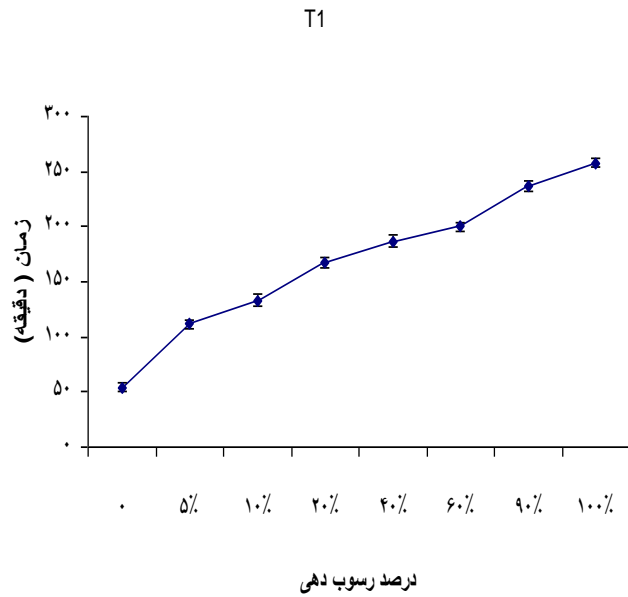
T₄: A=۰/۲ ; V= ۲۶/۹
 T₅: A=۰/۳ ; V= ۲۸/۳
 T₆: A=۰/۴ ; V= ۳۱/۸



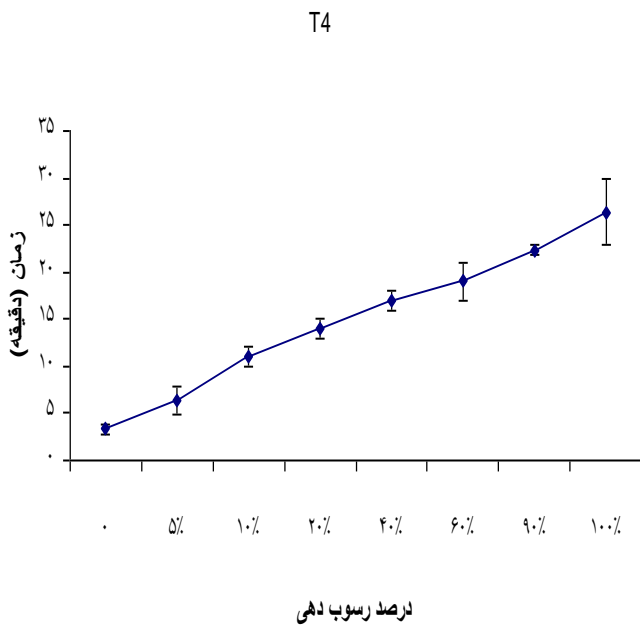
شکل ۱. ولتاژ و آمپر رسوبدهی میکروجلبک کلرلا در تیمارهای مختلف



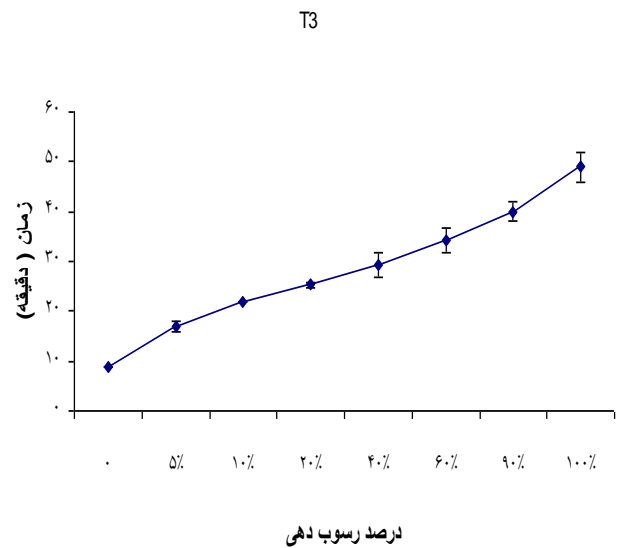
شکل ۳. درصد رسوب دهی میکروجلبک کلرلا در زمان های مختلف در تیمار دوم



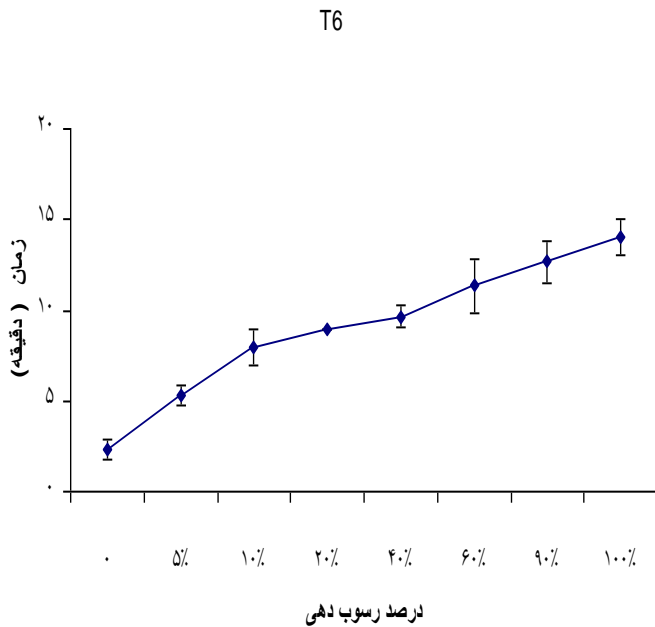
شکل ۲. درصد رسوب دهی میکروجلبک کلرلا در زمان های مختلف در تیمار یک



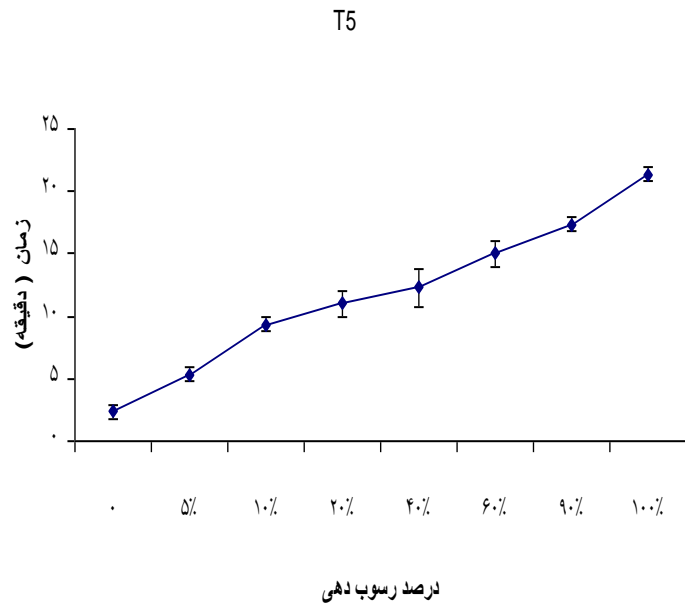
شکل ۵. درصد رسوب دهی میکروجلبک کلرلا در زمان های مختلف در تیمار چهارم



شکل ۴. درصد رسوب دهی میکروجلبک کلرلا در زمان های مختلف در تیمار سوم



شکل ۷. درصد رسوب دهی میکروجلبک کلرلا در زمان های مختلف در تیمار ششم



شکل ۶. درصد رسوب دهی میکروجلبک کلرلا در زمان های مختلف در تیمار پنجم

بحث و نتیجه گیری

طی لخته سازی، سلول های پراکنده میکروجلبک ها متمرکز و به شکل ذرات بزرگتر تجمع می یابند. فلوکولاسیون می تواند با استفاده از چندین ماده شیمیایی مانند Zn^{2+} , Al^{3+} , Fe^{3+} انجام شود (Papazi et al, ۲۰۱۰). Knuckey و همکاران (۲۰۰۶) گزارش کردند که تنظیم pH با افزودن هیدروکسید سدیم به منظور برداشت سلول های *Chaetoceros calcitrans*, *C. muelleri*, *Thalassiosira pseudonana*, *Attheyasep tentrionalis*, *Nitzschia closterium*, *Skeletonema sp.*, *Tetraselmis suecica* and *Rhodomonas salina*, بیشتر از ۸۰ درصد دارد.

Harith و همکاران (۲۰۰۹) از هیدروکسید سدیم (NaOH) (۵M) و هیدروکسید پتاسیم (KOH) (۵M) برای فلوکولاسیون *Chaetoceros calcitrans* استفاده نمودند و در پایان بازدهی فلوکولاسیون با استفاده از هیدروکسید پتاسیم در مقایسه با هیدروکسید سدیم کمی بیشتر بود و بازدهی ۹۸٪ در $PH = 10/2$ و بیشتر حاصل گردید.

Vandamme و همکاران (۲۰۱۰) برای فلوکولاسیون میکروجلبک های پاراکلرلا و سندسموس از نشاسته کاتیونی Greenfloc ۱۲۰ (CSG۱۲۰) استفاده نمودند که در غلظت ۲۰-۱۰ میلی گرم در لیتر بیشترین بازدهی بدست آمد و در غلظت مطلوب، بیش از ۹۰٪ زی توده برداشت شد. میزان برداشت با غلظت زی توده ارتباط مستقیم دارد. ارتباط خطی بین غلظت فولوکولانت و اندازه ذره در CSG برقرار است.

Salihon و Tao (۲۰۱۱) از کلراید فریک برای رسوب گیری از میکروجلبک استفاده نمودند و در غلظت ۱ مول در لیتر و pH برابر ۸/۴۵، بازدهی بیشتر از ۹۹٪ را بدست آوردند.

Aziz و همکاران در سال ۲۰۰۷ نشان دادند که با استفاده و افزایش غلظت سولفات آهن میلی گرم تا ۵۰۰ میلی گرم در لیتر به عنوان یک لخته ساز بازدهی مناسبی خواهد داشت.

همچنین گزارش شده است که سولفات آلومینیوم در مقایسه با سایر نمک های معدنی از لحاظ دزمناسب، pH و کیفیت برداشت شده از بقیه برتر بوده است. برخی از آنها در مقیاس صنعتی به ویژه در تصفیه فاضلاب نیز انجام می شود. مطالعات دیگری از فلوکولاسیون برای برداشت میکرو جلبک توسط Lee *et al.*, (۲۰۱۱) و McGarry (۱۹۷۰) انجام شده است که از دزهای به ترتیب ۳۰۰ و ۱۲۵ میلی گرم در لیتر Al^{3+} استفاده شده است.

Papazi و همکاران (۲۰۱۰) از فلوکولاسیون برای جداسازی بیوماس میکرو جلبک استفاده کردند و بازده ۶۰٪ را از *Chlorella minutissima* با افزودن یک گرم در لیتر $Al_2(SO_4)_3$ و $ZnCl_2$ به ترتیب در زمان ۱/۵ و ۶ ساعت بعد بدست آوردند. Balmer و Foulds (۱۹۸۶) مواد الکتروود مختلفی از جمله آلیاژ آلومینیوم، آهن، استیل، مس، برنج، برنز را به منظور تعیین تاثیر یون های مختلف فلزات بر تشکیل لخته و جداسازی مورد مطالعه قرار دادند نتایج این دو محقق نشان داده است که همه موادها در تولید لخته و درجه بالای از جداسازی مناسب بودند. بنابراین آنها پیشنهاد کردند ارزانتترین و در دسترس ترین ماده الکتروود باید استفاده گردد.

Fox (۱۹۸۳) در مطالعه ای خود اثر ولتاژ، جریان و فاصله ی بین کاتد و آند بر نرخ حذف میکرو جلبک ها (فاضلاب) بررسی نمود و نشان داد جمع آوری ریز جلبک ها را می توان تا حدود ۸۰٪-۹۵٪ در عرض ۳۵ دقیقه به دست آورد. ولتاژ پایین تر و فواصل بزرگتر بین آند و کاتد منجر به زمان بیشتری برای جدا کردن ریز جلبک خواهد شد که هرچند، در سطوح مختلف ولتاژ (۷۱۸-۷۸۵) شرایط متفاوت در زمان رسوب دهی مشاهده شد.

در تحقیقی که تاثیر ولتاژ، جریان و فاصله کاتد و آند بر نسبت حذف میکرو جلبک (موجود در فاضلاب) توسط Poelman (۱۹۹۷) ارائه گردید. نتایج نشان داد نسبت حذف میکرو جلبک می تواند به سطح ۸۰-۹۰ درصد در حدود ۳۵ دقیقه برسد و ولتاژ کمتر و فاصله بیشتر آنها و کاتدها منجر به افزایش زمان جداسازی میکرو جلبک می گردد. راندمان بازیابی نیز در سطوح ولتاژ متفاوت (۸۵ V-۱۸۷) تقریباً در یک سطح می باشد.

گلزاری و همکاران (۱۳۹۵) گزارش دادند که شدت جریان کاربردی در راندمان جداسازی تاثیر گذار است. نتیجه های به دست آمده از بهینه سازی نشان داد که با اعمال شدت جریان الکتریکی $1/6 \text{ mA/cm}$ ، به مدت $17/65$ دقیقه درصد جداسازی بسیار دلخواهی (۹۶/۸٪) با کمترین هزینه قابل دستیابی است. همچنین برای دستیابی به چنین درصد حذفی نیازی به تنظیم pH نیست. مشهدی نژاد و همکاران (۱۳۹۴) به بررسی پارامترهای موثری همانند الکترولیت و ... در راندمان برداشت میکرو جلبک با استفاده از روش انعقاد الکتریکی پرداختند. نتایج به دست آمده از مطالعه اثر غلظت های مختلف سدیم کلرید در راندمان برداشت میکرو جلبک نشان داد که افزایش غلظت الکترولیت باعث بهبود راندمان جداسازی میکرو جلبک می شود.

بعضی از محققان از جمله Vandamme *et al.*, (۲۰۱۱)؛ Xu *et al.*, (۲۰۱۰) فرایند انعقاد الکتریکی را برای جمع آوری میکرو جلبک با هدف تولید بیودیزل مورد مطالعه قرار دادند. Vandamme و همکاران (۲۰۱۱) گونه های *Chlorella vulgaris* و *Phaeodactylum tricornutum* به عنوان نمونه مورد مطالعه قرار دادند و به نتایج مشابهی دست یافتند؛ در شدت جریان کمتر (0.6 mA cm^{-2}) در مقایسه با شدت جریان بالاتر (3 mA cm^{-2})، زمان جمع آوری طولانی تر می شود، با این حال کارایی کلی جمع آوری میکرو جلبک در پایان کار نزدیک بهم بوده است.

در تحقیق حاضر نیز از الکتروود آلومینیوم استفاده گردید و فاصله ی بین کاتد و آند در همه تیمارها یکسان در نظر گرفته شده است و با توجه به سرعت لخته شدن میکرو جلبک کلرلا در آمپر و ولتاژهای مختلف، زمان رسوب دهی و لخته شدن آنها متفاوت بوده و دقیقاً با افزایش ولتاژ و آمپر زمان رسوب دهی کوتاه تر بوده است. و رابطه مستقیم بین زمان رسوب دهی و لخته-

شدن سلول‌های میکروجلبک کلرلا با افزایش آمپر و ولتاژ وجود داشته‌است. همچنین زمان رسوب‌دهی و لخته‌شدن در تیمار ۶ در زمان کمتری، زی‌توده میکروجلبک کلرلا از سوسپانسیون خارج شده و فاز مایع کاملاً شفاف و عاری از سلول‌های میکروجلبک بوده‌است.

Gao و همکاران (۲۰۱۰) به مطالعه اثر مواد مختلف الکترو، چگالی جریان، pH اولیه، تراکم سلولی اولیه جلبد و همچنین اثر دما به حذف جلبد از نمونه‌های تصفیه آب پرداختند و دریافتند استفاده از الکترو آلومینیوم عملکرد بهتری نسبت به الکترو آهن داشته و همچنین زمان کمتری لازم است تا میکروجلبک‌ها رسوب کند.

در این آزمایش مقدار PH، دما، نوع الکترو، و تراکم سلولی میکروجلبک کلرلا برای تمام تیمارها یکسان در نظر گرفته شده‌است و با توجه به این، واکنش سلول‌های میکروجلبک کلرلا با میزان آمپر و ولتاژ متفاوت بوده‌است. بطوریکه در تیمار یک با ولتاژ ۳/۲ و آمپر ۰/۰۲ شروع لخته شدن سلول‌های میکروجلبک کلرلا بعد ۵۴ دقیقه اتفاق افتاده در صورتی که در تیمار شش با افزایش ولتاژ و آمپر (۳۱/۸ و ۰/۴) شروع لخته شدن سلول‌های میکروجلبک بعد از ۲ دقیقه اتفاق افتاده‌است و زمان کمتری لازم داشت تا زی‌توده میکروجلبک کلرلا به صورت لخته و از آب جدا شود.

Sathi (۲۰۱۱) اثر آمپر و ولتاژهای مختلف بر دو استوک میکروجلبک MUR۲۳۰ و MUR۲۳۲ جهت لخته‌سازی مورد مطالعه قرار داد و نتایج نشان داد در لخته‌سازی با آمپر ۰/۱ سرعت لخته‌سازی خیلی آهسته بوده و چندین ساعت زمان می‌برد در حالیکه با افزایش ولتاژ زمان لخته‌سازی میکروجلبک کاهش یافته‌است. در این تحقیق اشاره شده با ولتاژ ۵۵ و آمپر ۵ بعد از چهار دقیقه بین ۹۰-۱۰۰ درصد سلول‌های میکروجلبک از سوسپانسیون خارج شده و لخته گردیدند. و همچنین با آمپر بیش از ۲۵ باعث کاهش روند لخته‌سازی میکروجلبک خواهد شد. در تحقیق Poelman و همکاران ۱۹۹۷ با آمپر ۱ و ولتاژ ۱/۵، ۷۵ دقیقه زمان نیاز است تا سلول‌ها لخته گردند.

نتایج در تحقیق حاضر نیز با افزایش آمپر از ۰/۰۲ به ۰/۴ و ولتاژ از ۳/۲ به ۳۱/۸ سرعت لخته شدن افزایش نشان داد بطوریکه از ۲۵۸ دقیقه در تیمار ۱ با افزایش ولتاژ و آمپر در تیمار ۶ به ۱۴ دقیقه زمان برای لخته‌سازی میکروجلبک کلرلا کاهش نشان داده‌است همچنین در تیمارهای ۴ و ۵ تقریباً مشابه تیمار ۶ سرعت لخته شدن سلول‌های میکروجلبک کلرلا نسبت به تیمارهای ۱، ۲ و ۳ بدلیل افزایش آمپر و ولتاژ بیشتر بوده‌است.

هزینه برداشت میکروجلبک‌ها به دلیل دارا بودن اندازه کوچک و میزان تغلیظ پائین‌شان در محیط کشت، به عنوان یک چالش بزرگ محسوب می‌گردد و بیش از ۳۰ درصد هزینه کل را در بر می‌گیرد (de la Noue and de Pauw, ۱۹۸۸). انجام برخی از این فرایندها نیازمند صرف انرژی زیاد می‌باشند. هنگامی که دانسیته سلول پایین باشد (معمولاً بین ۰/۳ تا ۵ گرم بر لیتر)، و اندازه سلول‌های جلبد کوچک باشد (بین ۲۰ تا ۴۰ میکرومتر) بازیابی زی‌توده کار دشواری خواهد بود (Wang et al., ۲۰۰۸; Li et al., ۲۰۰۸). در مطالعه حاضر، امکان استفاده از روش الکتروفلوکولاسیون (جریان مستقیم برق) برای برداشت زی‌توده میکروجلبک کلرلا بررسی شد و با توجه به استفاده از الکترو مناسب (الکترو آلومینیوم) و با تغییر ولتاژ و آمپر در زمان لخته‌سازی و رسوب (برداشت محصول) تفاوت‌های بارزی دیده شد. با افزایش آمپر و ولتاژ در تیمارهای ۴ و ۵ و ۶ که از نظر زمان جمع‌آوری محصول تقریباً یکسان بودند و با توجه به هزینه کمتر انرژی می‌توان پیشنهاد نمود. که بین این سه تیمار، تیمار ۴ هزینه انرژی کمتری نیاز داشت. همچنین این روش نسبت به روش‌های سانتریفیوژ و فیلتراسیون هزینه انرژی کمتری نیاز دارد (Danquah et al., ۲۰۰۹). با توجه به نتایج بدست آمده با استفاده از انعقاد الکتریکی می‌توان جمع‌آوری و بازیابی زی‌توده میکروجلبک کلرلا با هزینه کمتر نسبت به فولوکولاسیون شیمیایی، انجام داد.

با توجه به نتایج بدست آمده در این تحقیق، الکتروفلوکولاسیون (انعقاد الکتریکی) روشی موثر برای فلوکوله نمودن سلول‌های میکروجلبک کلرلا بوده، از این رو می‌تواند به عنوان یک روش مناسب و جایگزینی سودآور در بازیابی زی‌توده و تولید

میکرو جلبک تغلیظ شده برای استفاده در صنایع مختلف از جمله صنایع غذایی، دارویی و بهداشتی، بیودیزل و بالانس جیره غذایی دام، طیور و صنعت آبی پروری پیشنهاد نمود.

منابع

گلزاری، ا. عبدلی، م.ع. خدادادی، ع. کرباسی، ع. ایمانیان، س. ۱۳۹۵. بررسی فرایندهای انعقاد الکتریکی و شیمیایی برای جداسازی میکرو جلبک های آب شور. نشریه شیمی و مهندسی شیمی ایران. دوره ۳۵، شماره ۱.

مشهدی نژاد، ا. ریحانی، ر. سرمد، ج. زمانی، ح. ۱۳۹۴. جداسازی بیومس ریز جلبک تک سلولی *Chlorella sp.* با روش Electro-Coagulation-Flotation. فیزیولوژی و بیوتکنولوژی آبریان. سال سوم، شماره چهارم.

Aziz H. A., Alias S., Assari F., Adlan M. N., ۲۰۰۷ The use of alum, ferric chloride and ferrous sulphate as coagulants in removing suspended solids, colour and COD from semi-aerobic landfill leachate at controlled pH. Waste Manag Res ۲۵:۵۵۶-۵۶۵.

Balmer&foulds, ۱۹۸۶ Balmer L.M & Foulds A. W., ۱۹۸۶. Electroflocculation/ Electroflotation for the removal of oil from oil-in-water emulsions. Filtration& separation. ۲۳، ۳۶۶.

Barak, A. (۱۹۸۰) Research and development in applied algology and protein shortage problem. In : algae Biomass. Elsevier Biomedical press. pp:۲۱-۲۴

Barbosa MJ., Janssen, M., Ham, N., Tramper, J. and Wijffel, R. H. (۲۰۰۳) Microalgae Cultivation in air- lift reactors: Modelling biomass yield and growth rate as a function of mixing frequency. Biotechnology and Bioengineering. ۸۲:۱۷۰-۱۷۹

Berg-Nilsen, J., ۲۰۰۶. Production of Micro-algae Based Products. Nordic Innovation Centre, Oslo.

Benemann, J.R., Tillett, D and Weiman, J.C. (۱۹۸۷) Microalgae Biotechnology. Trends in Biotechnology. ۵:۴۷-۵۳

Danquah, E. Dewatering of microalgal culture for biodiesel production: exploring polymer flocculation and tangential flow filtration. Journal of Chemical Technology and Biotechnology ۸۴(۲۰۰۹): ۱۰۷۸-۱۰۸۳.

De la Noue, J. and de Pauw, N., (۱۹۸۸), The potential of microalgal biotechnology: A review of production and uses of microalgae, Biotechnology Advances, ۶, ۴, ۷۲۵-۷۷۰.

Fox, J.M. ۱۹۸۳. Intensive algal culture techniques. In: CRC Handbook of mariculture. Volume ۱. Crustacean Aquaculture. McVey J P (Ed.). CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, USA, pp ۴۳-۶۹.

Gao, S. Yang, J., Tian, J., Ma, F., Tu, G., Du, M. (۲۰۱۰). Electro-coagulation-flotation process for algae removal. Journal of Hazardous Materials ۱۷۷(۲۰۱۰): ۳۳۶-۳۴۳

Grima, M, E., Belarbi, E. H., Ación Fernandez, F. G., Robles Medina, A. and Chisti, Y., (۲۰۰۳), Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics, Biotechnology Advances, ۲۰, ۷-۸, ۴۹۱-۵۱۵.

Harith Z.T., Yusoff M.Y., Mohamed M.S., Shariff M., Ariff A. (۲۰۰۹) Effect of different flocculants on the flocculation performance of microalgae, *Chaetoceros calcitrans*, cells. African Journal of Biotechnology ۸(۲۱):۵۹۷۱-۵۹۷۸

Kanno, Toshihiro. Uyama, Kazie. (۲۰۰۵) *Chlorella vulgaris*: The powerful Japanese Medicinal Green Algae as a biological Response Modifier. Publicado por Woodland publishing.

Knuckey, R. M., Brown, M. R., Robert, R. and Frampton, D. M. F., (۲۰۰۶), Production of microalgal concentrates by flocculation and their assessment as aquaculture feeds, Aquacultural Engineering, ۳۵, ۳, ۳۰۰-۳۱۳.

Li, Y., Horsman, M., Wu, N., Lan, C. Q. and Dubois-Calero, N., (۲۰۰۸), Biofuels from Microalgae, Biotechnology Progress, ۲۴, ۴, ۸۱۵-۸۲۰.

- McGarry MG (۱۹۷۰) Algal flocculation with aluminum sulfate and polyelectrolytes. Res J Water Pollut Control Fed ۴۲:۱۹۱-۲۰۱
- Mata, T. M., Martins, A. n. A. and Caetano, N. S., (۲۰۱۰), Microalgae for biodiesel production and other applications: A review, Renewable and Sustainable Energy Reviews, ۱۴, ۱, ۲۱۷-۲۳۲.
- Mouedhen, G. Fekia. M, Weryb, M.D.P., Ayedia, H.F. Behavior of aluminum electrodes in electrocoagulation process. Journal of Hazardous Materials. ۱۵۰(۲۰۰۸):۱۲۴-۱۳۵.
- Oh HM, Lee SJ, Park MH, Kim HS, Kim HC, Yoon JH, et al. Harvesting of *Chlorella vulgaris* using a bioflocculant from *Paenibacillus* sp. AM ۴۹. Biotechnol Lett ۲۰۰۱;۲۳: ۱۲۲۹-۳۴.
- Papazi A, Makridis P, Divanach P (۲۰۱۰) Harvesting *Chlorella minutissima* using cell coagulants. J Appl Phycol ۲۲:۳۴۹-۳۵۵
- Poelman, E., Shelef, G. Potential of electrolytic flocculation for recovery of micro-algae, Conservation and Recycling Resources, ۱۹(۱۹۹۷):۱-۱۰.
- Sathi, S, ۲۰۱۱. Culturing and Harvesting Marine Microalgae for the Large-scale Production of Biodiesel. Thesis of Masters of Engineering Science, in the school of Chemical Engineering. university of ADELIDE Australia.
- Shelef G., Sukenik A. & Green M., (۱۹۸۴), Microalgae Harvesting and Processing- A literature review, Haifa, Solar Energy Research Institute, Technion Research and development Foundation Ltd.,
- Tao and J. Salihon, "The Optimisation of levels of the variables pH and Concentration of Ferric chloride for Harvesting marine microalgae by flocculation," in Proceedings of the International Conference on Food Engineering and Biotechnology (IPCBE), IACSIT Press, Singapore, ۲۰۱۱.
- Toyub, M.A, Miah, M.I, Habib, B. Rahman, M.M, (۲۰۰۸), Growth performance and nutritional value of *Scenedesmus obliquus* culture in different concentrations of sweetmeat factory media. Bang. J. Anim. Sci, ۳۷(۱): ۸۶-۹۳
- Uduman, N. Dewatering of microalgal cultures: a major bottleneck to algae-based fuels. Journal of Renewable Sustainable Energy. ۲ (۲۰۱۰), ۰۱۲۷۰۱.
- Vandamme, D. Robert, R., Frampton, D. M., Evaluation of Electro-coagulation-Flocculation for harvesting marine and freshwater microalgae, Biotechnology and Bioengineering, ۱۰(۲۰۱۱):۲۳۲۰-۲۳۲۹
- Vandamme D, Foubert I, Meesschaert B, Muylaert K (۲۰۱۰) Flocculation of microalgae using cationic starch Journal of Applied Phycology, vol ۲۲ (۴), ۵۲۵-۵۳۰.
- Wang, B., Li, Y., Wu, N. and Lan, C., (۲۰۰۸), CO₂ bio-mitigation using microalgae, Applied Microbiology and Biotechnology, ۷۹, ۵, ۷۰۷-۷۱۸.
- Xu, L. Wang, F., Li, H., Hu, Z., Guo, C., Liu, C. Development of an efficient electroflocculation technology integrated with dispersed-air flotation for harvesting microalgae, Journal of Chemical Technology and Biotechnology, ۸۵(۲۰۱۰):۱۵۰۴-۱۵۰۷
- Zar, J.H., (۱۹۸۴), Biostatistics. Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs, New Jersey, USA. pp ۷۱۸.

Isolation of micro-algae biomass from culture media using electrical coagulation technology

Abstract:

Microalgae collection is a two-step process that involves separating the supernatant liquid phase from the biomass or solid phase that begins after mass production. The purpose of this study was to collect (coagulate or clot) the chlorella microalgae by electric coagulation and determine the most appropriate voltage and ampere for the deposition of chlorella microalgae cells. In the present study, the feasibility of using an electric coagulation (electroplating) method for the extraction of chlorella microalgae biomass from the culture media was investigated. In this study, after a microalgae growth period (maximum 10 days) of 6 treatments and three replicates in human one liter of chlorella microalgae suspension at voltages (3.0, 4.9, 14.2, 9, 28.26 And 31.8) and different amps (0.02, 0.06, 0.1, 0.2, 0.3 and 0.4) were evaluated. The results showed that the clotting rate of Chlorella microalgae was directly related to the increase in amperes and voltage, so that in the treatment with 0.4 amp and voltage of 31.8, Chlorella microalgae cells began to clot and clot. In this treatment, due to higher amperes and voltage, the isolates were faster than micro algae cells and were separated from the culture medium in a shorter time and floated on water surface.

Thus, after two minutes, the chlorella microalgae cells began to clot and stick together, and the whole time, about 14 minutes, until the complete mass was removed, the whole mass was floated on the water, the rest of the water completely. It was clear and without micro-algae chlorella. Whereas, in the treatment with 2.0 V and 0.02 amp treatment they started to clot after 04 minutes and after 208 minutes total microalgae mass was clotted and collected. There was a significant difference between treatments and different times. Chlorella microalgae after electro-coagulation in different treatments showed that the cells were in good condition and no detectable difference was observed between them and non-flocculated cells under light microscope. This research clearly demonstrates that electrical coagulation is an effective method for micro-algae cell clotting, and since microalgae biomass recovery is an important step in the microalgae biomass production process and involves a significant cost of microalgae production. However, this method can be implemented at a very low cost.

Keywords: Isolation, Chlorella microalgae, Coagulation technology.

بیوترانسفورماسیون وانیلین به وانیل الکل توسط جلبک *Chlorella Vulgaris*

معصومه حسینزاده^{۱،۲*}، علی گنجیان خناری^۳

۱- استادیار گروه شیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی - واحد قائم شهر، ایران
 ۲- گروه پژوهشی شیلات و آلاینده‌های آبی دریای خزر (کاسپین)، وزارت علوم، تحقیقات و فناوری، ساری، ایران.

۳- پژوهشکده اکولوژی دریای خزر، موسسه تحقیقاتی علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، ساری، ایران

ma_hosseinzadeh@yahoo.com

چکیده

تعداد زیادی از میکروارگانیسم‌ها توانایی تبدیل اکسیداسیون و احیا ترکیبات شیمیایی را دارند. در این تحقیق با استفاده از میکروجلبک کلرلا ولگاریس بعد از لوگ رشد (رشد تصاعدی) در شرایط آزمایشگاهی وانیلین که دارای گروه کربونیل هست به وانیل الکل که دارای گروه الکل هست احیا و جدا سازی شد. میکروجلبک کلرلا در حجم کم داخل ارلن، کشت داده شد و حجم‌های مختلفی از وانیلین که بهترین مقدار ۰.۱ گرم در ۱ میلی‌لیتر متانول حل نموده و به نمونه تزریق شد و بعد از چهار روز نمونه‌ها استخراج شدند و به کمک دستگاه GCMASS شناسایی شده‌است. نتایج بدست آمده ۸۰ درصد وانیلین به محصول وانیل الکل تبدیل شده است. مطالعه اخیر نخستین گزارش از کاربرد میکرو جلبک کلرلا ولگاریس در تولید وانیل الکل از وانیلین محسوب می‌شود.

واژه‌های کلیدی: کلرلا ولگاریس، وانیلین، وانیل الکل و GCMASS

مقدمه

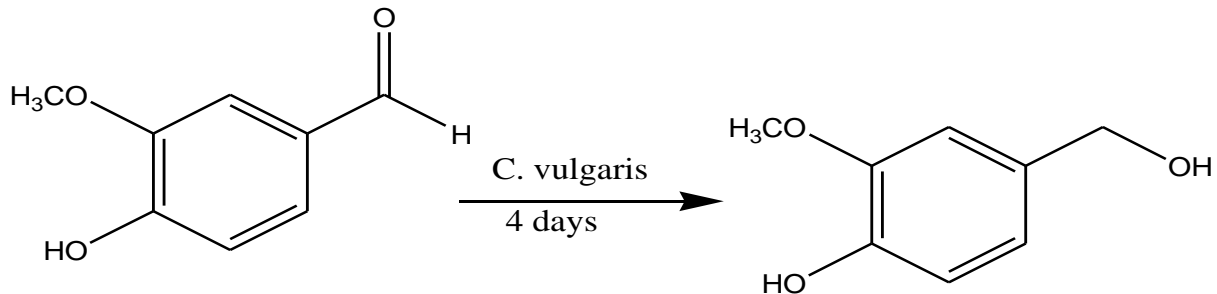
مزایای میکروجلبک‌ها و پتانسیل بالا آنها در صنایع مختلف که دارای هستند از اهمیت بسزایی برخوردار می‌باشند. زمین‌های حاشیه‌ای و آب‌هایی (تحمل شوری) که مناسب زراعت نیستند می‌تواند برای رشد میکروجلبک‌ها مورد استفاده قرار گیرند. و به سبب نرخ رشد بالا، زمان رشد کوتاه‌تر، چربی و پروتئین بالاتر مورد توجه زیاد هستند. (Wawrik & Harriman, ۲۰۱۱; Violeta et al., ۲۰۱۱).

جلبک‌ها قادرند طیف وسیعی از ترکیبات شیمیایی را تولید نمایند که بسته به نوع جلبک تولید این ترکیبات متفاوت‌اند. انواع مختلفی از آنتی‌اکسیدان‌ها، اسیدهای چرب غیراشباع، ترکیبات موثر دارویی، پروتئین، ترکیبات ضد ویروس، ضد باکتری و ضدقارچ از جمله ترکیبات ارزشمندی هستند که توسط جلبک‌ها تولید می‌شود. برخی از جلبک‌ها منبع آنتی‌بیوتیک‌ها محسوب می‌شوند و مانع از رشد دیگر باکتری‌ها می‌گردد، به‌عنوان مثال می‌توان از آنتی‌بیوتیک *Chlorellin* نام برد که در جلبک *Chlorella* یافت می‌شود (Tanaka K et al., ۱۹۸۶; گنجیان ۱۳۹۶).

پژوهش‌هایی در زمینه تصفیه فلزات سنگین (Jones et al., ۲۰۱۵)، مکانیسم اکسیداسیون و احیا ترکیبات معدنی از جمله آرسنیک (Zouboulis et al., ۲۰۰۵)؛ و متیلاسیون و دمتیلاسیون ترکیبات شیمیایی (Stolz et al., ۲۰۰۶) و کاربردهای دیگر از جمله مواردی است که روی این جلبک صورت گرفته‌است.

وانیل الکل یک ترکیب فنولی هست که خاصیت آنتی‌اکسیدان زیادی دارد (Silva et al., ۲۰۰۶) و همچنین خاصیت دارویی از جمله؛ اثر ضد تشنجی (Sasaki et al., ۱۹۹۰)، اثر آنژیوژنیک (Rupasinghe et al., ۲۰۰۵)، اثر ضدردی و ضد

التهاب (Tai *et al.*, ۲۰۱۱) دارد که نشان دهنده اثر درمانی قابل قبول آن در برخی از داروها است (Hsieh *et al.*, ۲۰۰۰, Jung *et al.* ۲۰۰۰).



شکل ۱: وانیل الکل که از وانیلین به وسیله جلبک کلرلا سنتز گردید

مواد و روش ها

میکرو اورگانیزم و محیط کشت

در این بررسی جلبک کلرلا ولکاریس از گروه پژوهشی شیلات و آلاینده‌های آبی خزر (کاسپین) تهیه شد و در ارلن مایر ۲۵۰ ml با ۱۰۰ ml محیط کشت (BBM) شامل (g/L): (۰,۱۷۵), KH₂PO₄, (۰,۰۷۵), K₂HPO₄, (۰,۲۵), NaNO₃, (۰,۰۳۱), KOH, (۰,۰۵), EDTA.۲Na, (۰,۰۷۵), MgSO₄۷H₂O, (۰,۰۲۵), CaCl₂۲H₂O, (۰,۰۲۵), NaCl, (۰,۰۰۳), MnCl₂۴H₂O, (۰,۰۰۱۵), ZnSO₄۷H₂O, (۰,۰۰۰۳), Co(NO₃)۲۶H₂O, (۰,۰۰۰۳), CuSO₄۵H₂O, (۰,۰۰۰۲۵), در قفسه کشت در دمای ۲۸ درجه سانتیگراد با زمان نوردهی توسط تایمر اتوماتیک به صورت ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی تنظیم شد (Priefert *et al.*, ۲۰۰۱).

بعد از اینکه جلبک‌ها خوب رشد کردند (لوگ رشد) ۰,۱ گرم وانیلین که در ۱ میلی لیتر متانول حل گردید را به ارلن اضافه شد و ۱۲ ارلن آماده برای تیمار و شاهد که همه مواد وجود داشت به جز وانیلین پس از ۴ روز با دستگاه سانتریفوژ جلبک‌ها را جدا شده و با آب مقطر شسته و با دی کلرومتان استخراج و با دستگاه روتاری حلال پراکنی و با TLC چک گردید بعد باقیمانده مواد را در متانول حل و به دستگاه GCMASS تزریق گردید.

نتایج و بحث

استفاده از فرآورده‌های طبیعی برای تامین نیازهای بشر، به عنوان یک راهکار سالم و مهم در زندگی ماشینی امروز مطرح شده و در این میان جلبک‌ها از سودمندترین و کارآمدترین تولیدکنندگان جامعه گیاهی هستند (Wijffels and Barbosa, ۲۰۱۰). صرفه جویی اقتصادی با تاکید بر مصرف بهینه مواد اولیه، دلیل بسیار خوبی برای رشد و توسعه منابع جلبکی می باشد (Richmond, ۲۰۰۴; Pulz and Gross, ۲۰۰۸; Habib, ۲۰۰۴, اکبری و مددکار حق جو ۱۳۹۷).

نتایج حاصل از این آزمایش در حجم‌های مختلف از وانیلین انجام شد (۰,۰۱ و ۰,۰۵ و ۰,۱) بهترین نتیجه غلظت ۰,۱ بوده که در شکل ۲ با کاغذ TLC چک شده است. در روی این کاغذ در روزهای مختلف مقدار کمی از نمونه گرفته و با کاغذ چک می گردید که در روزهای دوم و سوم اثری از محلول نبوده است و در روز چهارم محصول آشکار شده است در روز پنجم هم

محصول دیده نمیشود که نشان می‌دهد بهترین زمان برای این ماده چهار روز هست. سپس این غلظت ۰,۱ را گرفته در روزهای مختلف انجام شد که بهترین زمان ۴ روز بوده است بعد از تثبیت زمان و مقدار وانیلین در حجم‌های زیاد گذاشته شده و بعد از استخراج به دستگاه GCMASS تزریق شد و در شکل های ۳ و ۴ نشان داده شده است. با توجه به نتایج طیف اول ما ماده خالص که وانیلین می‌باشد به دستگاه تزریق میکنیم که طیف به دست آمده در شکل ۳ مشخص شده حدودا در رنج ۱۴,۵۶ بعد به دستگاه محصول تزریق می‌شود که طیف محصول در رنج ۱۴,۹ آشکار شده است با بررسی به عمل آمده ۶۳ در صد وانیلین به محصول وانیل الکل تبدیل شده است.

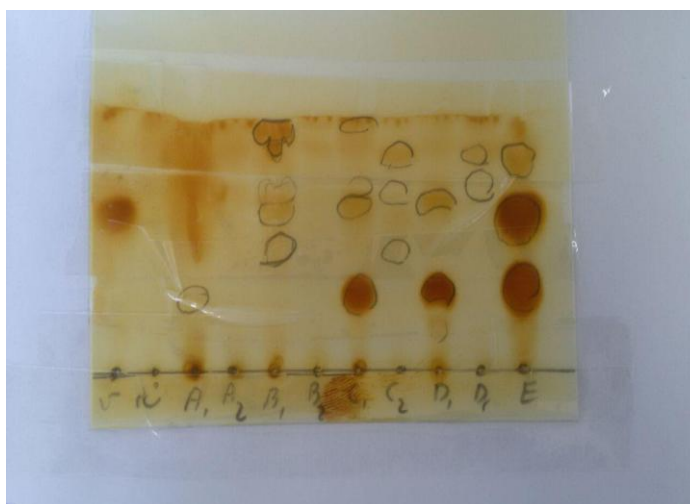
peak #	R.T. min	Start min	End min	PK TY	peak height	peak area	peak % max.	peak % total
۱	۱۴,۶۰۹	۱۴,۲۰۶	۱۴,۸۴۶	BV	۷۴۲۶۷	۵۳۴۳۴۹۸	۵۷,۳۱٪	۳۶,۴۳۰٪
۲	۱۴,۹۱۸	۱۴,۸۴۶	۱۵,۲۷۳	VB	۲۰۶۷۷۰	۹۳۲۴۱۹۵	۱۰۰,۰۰٪	۶۳,۵۷۰٪
Sum of corrected areas:					۱۴۶۶۷۶۹۳			

تا کنون کارهای زیادی در این مورد انجام شد. اولین کار انجام شده ایزوئوگنول (Isoeugenol) را به وانیلین با استفاده از باکتری *Aspergillus niger* که بازده ۱۰٪ بود (Abraham et al., ۱۹۸۸) تبدیل شد و بعد آن با میکرو اورگانسیم‌های دیگر از جمله *Bacillus subtilis* strain که بازده محصول بین ۱۲ تا ۱۴ درصد بود انجام گردید (Shimoni et al., ۲۰۰۰). بالاترین محصول ۵۸ درصد با استفاده از باکتری *Rhodococcus rhodochrous* گزارش شد (Zhang et al., ۲۰۰۶).

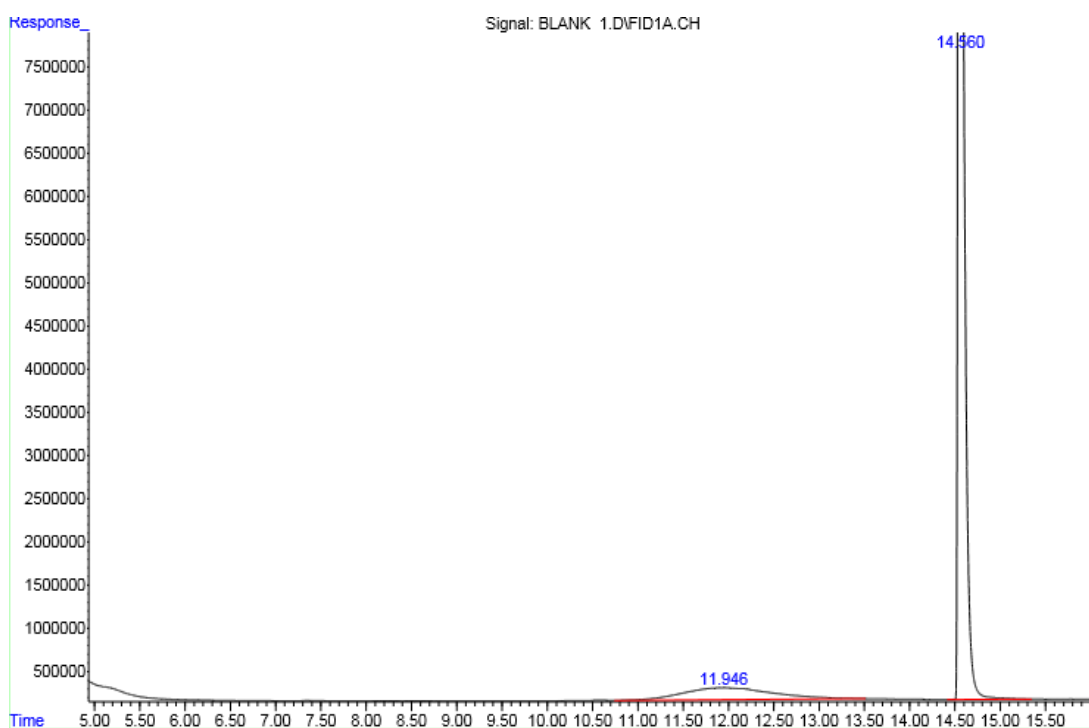
در تحقیق اشنگرف و نحوی (۱۳۹۵) با باکتری نو ترکیب استریپتوکوکوس ترموفیلوس قادر به تبدیل اسیدفرولیک به وانیلین با راندمان مولی ۶۲ درصد پس از ۱۲ ساعت واکنش، و وانیلین الکل با راندمان مولی ۱۸ درصد، پس از ۱۶ ساعت واکنش زیست تبدیلی بود (آشننگرف و نحوی ۱۳۹۵).

با توجه به شکل ۱ در این مقاله وانیلین به وانیلین الکل احیا شد تحت شرایط خاص به کمک جلبک کلرلا ولگاریس و احیا وانیلین به وانیلین الکل تحت شرایط تاریکی و روشنایی انجام شد. در این مقاله جلبک توانست بیوترانسفور را انجام دهد.

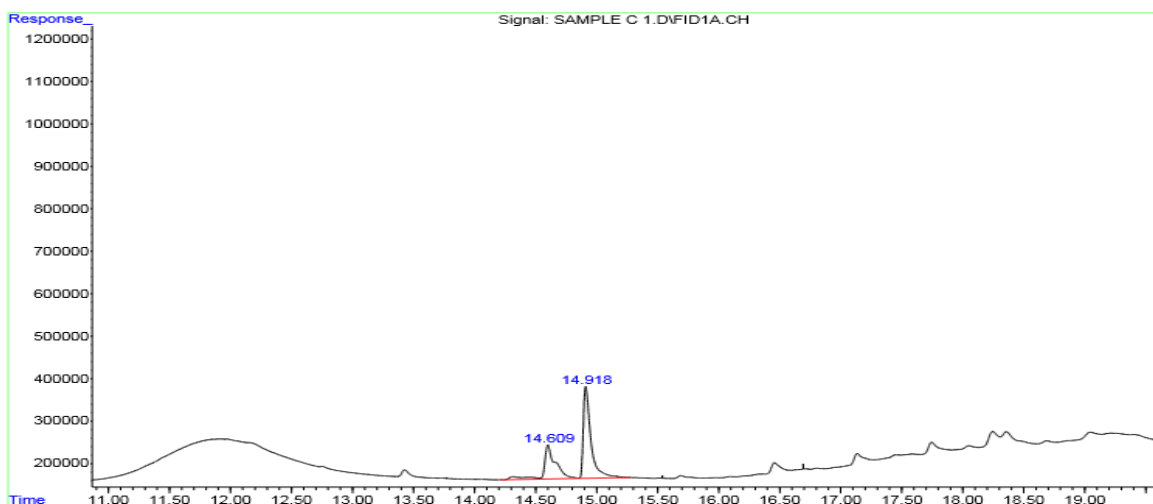
نتایج حاصل در این مقاله نشان داد در بین غلظت‌های مختلف وانیلین مقدار ۰,۱ گرم در لیتر وانیلین بهترین نتیجه را داد و همچنین در روزهای مختلف اندازه گیری و استخراج شد که در ۴ روز بهترین محصول داشت که توانست ۶۳٪ وانیلین را به وانیل الکل تبدیل کند.



شکل ۲: غلظت‌های مختلف وانیلین بر روی کاغذ TLC



شکل ۳: طیف GCMASS نمونه وانیلین



شکل ۴: طیف GC/MS آنیلین و وانیل الکل

تشکر و قدردانی

با تشکر از گروه پژوهشی شیلات و آلاینده های آبی خزر (کاسپین) امکانات این تحقیق را در اختیار ما قرار دادند.

منابع

آشنگر ف. مراسم و نحوی ایرج ۱۳۹۴. استرپتوکوکوس ترموفیلوس مهندسی شده برای سنتز وانیلین طبیعی و کاربرد آن در صنعت غذا. مجله علوم غذایی و تغذیه/پاییز ۱۳۹۵/سال سیزدهم/شماره ۴.

اکبری فروغ و مددکار حق جو مریم ۱۳۹۷. افزایش بیومس و رشد میکروجلبک *Dunaliella* تحت تاثیر تیمار وانیلین. مجله فرآیند و کارکرد گیاهی، جلد ۷، شماره ۲۴، سال ۱۳۹۷.

گنجیان خناری، علی. ۱۳۹۶. میکروجلبک طلای سبز آینده. انتشارات تحول، شماره کتابشناسی ملی ۴۵۲۶۸۸۰. ص ۳۱۲

Abraham, W.R., Arfmann, H.A., Stumpf, B., *Microbial transformation of some terpenoids and natural compounds*. Analysis. Biochemistry. Berlin. (۱۹۸۸). PP ۳۹۹-۴۱۴

Hsieh, C.H. Chang, S.Y. Chiang, T.C. Li, N.Y. Tang, C.Z. Pon, C.T. Hsieh, J.G. Lin, *Life Sci.* ۶۷ (۲۰۰۰) ۱۱۸۵-۱۱۹۵.

Habib, M. A. B., Parvin, M., Huntington, T. C., and Hasan, M. R. (۲۰۰۸) *A review on culture, production and use of spirulina as food for humans and feeds for domestic animals and fish*. Food and Agriculture Organization of the United Nations ۱۰۲۹: ۱-۴۲.

Jung, S. Suh, H. Lee, I. Kim, H. Kim, H. Yoo, S. Lee, *Phytother. Res.* ۲۱ (۲۰۰۷) ۹۶۰-۹۶۴.

Noma, Y., & Asakawa, Y. (۱۹۹۸). *Biotechnology in agriculture and forestry*. In Y. P. S. Baji, Medicinal and aromatic plants X, Vol ۴۱ Berlin: Springer.

Priefert H, Babenhorst J, Steinbuchel A (۲۰۰۱) *Biotechnological production of vanillin*. Appl. Microbiol. Biotechnol. ۵۶: ۲۹۶-۳۱۴.

Pulz, O., and Gross, W. (۲۰۰۴) *Valuable products from biotechnology of microalgae*. Applied Microbiology and Biotechnology ۶۵: ۶۳۵-۶۴۸.

Sasaki, Y.F., Ohta, T., Imanishi, H., Watanabe, M., Matsumoto, K., Kato, T., Shirasu, Y., ۱۹۹۰. *Suppressing effects of vanillin, cinnamaldehyde, and anisaldehyde on chromosome aberrations induced by X-rays in mice*. Mutat. Res. ۲۴۳, ۲۹۹-۳۰۲

Simoni, E., Ravid, V., Shoham, Y. *Isolation of a bacillus sp capal of transformation isoeugenol to vanillin* . J. Biotechnol. (۲۰۰۰). ۷۸, ۱-۹

Silva, E. Odoux, P. Brat, F. Ribeyre, G. Jimenes, V. Olvera, M.A. Alvarado, Z. Gunata, Food Chem. ۹۹ (۲۰۰۶) ۷۲۸-۷۳۵.

Rupasinghe, H.P.Vasantha., Boulter-Bitzer, Jeanine., Ahn, Taehyun., Odumeru, Joseph.A., ۲۰۰۵. *Vanillin inhibits pathogenic and spoilage microorganisms in vitro and aerobic microbial growth in fresh-cut apples*. Food Res. Int. ۳۹, ۵۷۵- ۵۸۰.

Richmond, A. (۲۰۰۴) *Handbook of microalgal culture. Biotechnology and Applied Phycology*. Oxford: Blackwell Science. John Wiley and Sons.

Tai, A., Sawano, T., Yazama, F., Ito, H., ۲۰۱۱. *Evaluation of antioxidant activity of vanillin by using multiple antioxidant assays*. Biochim. Biophys. Acta ۱۸۱۰, ۱۷۰-۱۷۷.

Tanaka K., Koga T., Konishi F., Nakamura M., Mitsuyama M., Himeno K., Nomoto K., (۱۹۸۶) Augmentation of host defense by a unicellular green alga, *Chlorella vulgaris*, to *Escherichia coli* infection, Infect. Immun. ۵۳ (۱۹۸۶) ۲۶۷-۲۷۱.

Zhang, Y.M., XU, P., Han, S., Yan, H.Q., *Metabolism of isoeugenol via isoeugenol-diol by a newly isolated strain of bacillus subtilis H*. Appl. Microbiol. Biotechnol (۲۰۰۶). ۷۳, ۷۷۱-۷۷۹.

Violeta Makarevičienė, Vaida Andrulėvičiūtė, Virginija Skorupskaitė and Jūratė Kasperovičienė. (۲۰۱۱), *Cultivation of Microalgae Chlorella sp. And Scenedesmus sp. as a Potential Biofuel Feedstock*. Environmental Research, Engineering and Management, No. ۲(۵۷), P. ۲۱ – ۲۷ ISSN ۲۰۲۹-۲۱۳۹ .

Wawrik, B., Harriman B. Rapid, *Colorimetric Quantification of Lipid from Algal Cultures*. The Journal of Microbiological Methods, ۲۰۱۰, Vol. ۸۰, pp. ۲۶۲-۲۶۶.

Wijffels, R. H., Barbosa, M. J., and Eppink, M. H. (۲۰۱۰) *Microalgae for the production of bulk chemicals and biofuels*. Biofuels, Bioproducts and Biorefining ۴ (۳): ۲۸۷-۲۹۵.

Abstract

A large number of microorganisms including various microalgal strains are able to convert compounds into useful metabolites. In this paper, the green synthesis using a *Chlorella Vulgaris* ability of transforming vanillin to vanillyl alcohol (VA) was isolated that VA was the main product was the results of this biotransformation. The incubation was carried out at ۲۵°C under continuous illumination in the present of ۰,۱ gL⁻¹ of vanillin. After ۴ days incubation of the microalga in BG-۱۱ liquid medium, the broth was extract and the products were purified by the aid of chromatographic methods. Structure elucidation of the metabolites by preparative thin layer chromatography, gas chromatography–mass spectrometry and NMR. *Chlorella Vulgaris* reduced vanillin to the corresponding primary alcohols with a molar yield of ۸۲% that is the highest up to now to VA.

Keywords: Vanillin; vanillyl alcohol; Biotransformation, Microalgae and *Chlorella Vulgaris*.

کشت ریز جلبک اسپیرولینا، فرآیند تولید و استخراج فیکوسیانین: مروری

ندا میرحسینی*^۱، احمدحاجی‌ثانی^۲، رضا داورنژاد^۳، Edgar Cano Europa^۳، هاله باقرنوه سی^۲

۱- دانشگاه اراک، دانشکده شیمی و مهندسی شیمی، اراک، میدان بسیج، بلوار کربلا، ۷۷۵۸۴-
P.O. Box ۳۸۴۸۱

۲- دانشگاه تهران، رضوانشهر گیلان، دانشکده فنی کاسپین، پردیس دانشکده‌های فنی

۳- Metabolism Laboratory I, Department of Physiology, Institute of National Polytechnic (IPN), Mexico City, Mexico

* n.mir89@yahoo.com

چکیده

امروزه همه مردم جهان برای داشتن زندگی سالم به داروها، فرآورده‌های گیاهی و فرآورده‌های مشتق شده از گیاهان وابسته‌اند که استفاده از آن‌ها بجای منابع مصنوعی مضر مقبولیت عمومی یافته است. لازمه دانستن دانش فنی روش کشت اسپیرولینا به منظور استخراج فیکوسیانین و انتخاب شرایط رشد از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. بدین منظور این پژوهش مروری بر نحوه کشت ریز جلبک تا استخراج رنگدانه داشته است. در این مطالعه مروری مقالات معتبر علمی نمایه شده در پایگاه‌های اطلاعاتی مختلف مانند Scopus, Springer, Science Direct و دیگر بانک‌ها دارای یکی از کلیدواژه‌های اسپیرولینا، پلاتنسیس، رنگدانه فیکوسیانین، کشت و روش استخراج بررسی شدند. اسپیرولینا پلاتنسیس ریزجلبک میکروسکوپی رشته‌ای غنی از پروتئین، ویتامین‌های گروه B، اسیدهای آمینه ضروری و مواد معدنی مهم است. این جلبک اساساً سیانو باکتری غیرهتروسیست اتوتروف و فتوسنتز کننده است. مطابق با نتایج مطالعات، فیکوسیانین به‌عنوان یکی از رنگدانه‌های این جلبک، کاربردهای متنوعی از جمله در تهیه قرص دارویی به‌منظور درمان سرطان، ضدالتهاب، درمان ایدز و افزودنی غذایی به‌عنوان مکمل و یا رنگدانه طبیعی چهار مزیت اصلی است که بر ضرورت استخراج این ریز جلبک تأکید می‌کند. تولید جلبک با مقادیر بالا فیکوسیانین به عوامل متعددی از جمله شرایط رشد جلبک، قابلیت تجمع رنگیزه‌ای، فناوری تولید و کارایی فرآیند پایین‌دستی بستگی دارد. برای کشت این ریزجلبک از محیط کشت‌های متعددی از جمله زاروک، زاروک اصلاح شده، کانوی، جردن، اف ۲ و شوسلر به کار گرفته می‌شود اما بهترین محیط کشت برای رشد این ریزجلبک زاروک در شرایط آزمایشگاهی $28-35^{\circ}\text{C}$ ، شدت نوری $1500-4500$ لوکس، $\text{pH}=9-9.5$ و هوادهی کافی معرفی شده است.

واژه کلیدی: کشت، فیکوسیانین، اسپیرولینا، غیرهتروسیست، اتوتروف

مقدمه

جلبک‌ها ساده‌ترین موجودات زنده، فتوسنتز کننده، یک یا چند سلولی، دارای کلروفیل و بدون ریشه، ساقه، برگ و آوند هستند که همگی آن‌ها از یک‌سو توانایی رشد و تکثیر و از سوی دیگر توانایی ساختن مواد آلی را دارند. جلبک‌ها برای اولین بار ۲۰۰۰ سال پیش توسط چینی‌ها برای زنده ماندن از قحطی‌زدگی بعنوان غذا استفاده شدند (Tseng, ۲۰۱۱). در تقسیم‌بندی سنتی در رده گیاهان دسته‌بندی شده‌اند (داورنژاد و همکاران، ۱۳۸۵). به‌طور کلی کلیه موجودات زنده عموماً به روش اتوتروف، گاهی به روش هتروتروف و تدریجاً به روش میکسوتروف انرژی دریافت می‌کنند (Pourkarimi et al., ۲۰۱۹). مقایسه این سه روش برخی از جلبک‌ها با منبع تغذیه کربنی آن‌ها در جدول ۱ لیست شده است.

جدول ۱. مقایسه روش‌های تکثیر انواع ریز جلبک (Patra et al, ۲۰۱۸).

تنوع جانوری	تولید / مصرف (اکسیژن)	منبع کربنی	فتوسنتز	روش
گستره وسیعی از گیاهان، جلبک‌ها و باکتری‌ها	>۱	CO ₂	دارد	اتوتروف
محدود به برخی از جانداران	<۱	آلی	با و بدون فتوسنتز	هتروتروف
باکتری تجزیه‌کننده		آلی	دارد	میکسوتروف

یکی از مزیت‌های روش هتروتروفیک نسبت به روش اتوتروفیک قابل کنترل‌تر بودن کشت است (Patra et al, ۲۰۱۸). از دهه ۱۹۵۰ میلادی مطالعات گسترده‌ای راجع به جلبک‌های تجاری *دونالیلا*، *اسپیروولینا*، *سندسموس* و *کلرلا* انجام شد (Noori et al, ۲۰۱۶; Sathasivam et al, ۲۰۱۷). هر سه جلبک حاوی بیش از ۳۰٪ پروتئین می‌باشند ولی *اسپیروولینا* نسبت به سایر گونه‌ها به دلیل نرخ بالای رشد سلولی، کنترل فرایند آسان، توانایی رشد در محیط قلیایی و محیط با غلظت نمک بالا اولویت دارد؛ البته محیط قلیایی و شور میزان رشد آلاینده در زیستگاه جلبک را کاهش می‌دهد که سبب کاهش اثرات زیان‌آور آلودگی محیطی می‌شود (Spolaore et al, ۲۰۰۶). ارزش غذایی هر کیلوگرم *اسپیروولینا* با ۱۰۰۰ کیلوگرم از سبزی و میوه برابری می‌کند و در مقایسه با کشت سویا رشد سریعی دارد و ۲۰ برابر مساحت زمین کمتری نیاز است و همچنین تولید آن یک سوم میزان تولید دانه سویا به آب نیاز دارد و این پروتئین به حذف گرمای جهانی کمک می‌کند. فیکوسیانین نیز یک رنگ‌دانه مناسب در فتاوری مواد غذایی هست و نه تنها در مقایسه با سایر رنگ‌دانه‌های سنتزی مصنوعی مضر نیست، بلکه بر سلامتی عمومی فردی هم تأثیرگذار است. هدف از این مطالعه، بررسی آخرین یافته‌های تحقیقاتی از مرحله کاشت تا تولید محصول از ریز جلبک *اسپیروولینا* و تأثیر مثبت هر یک از شرایط رشد بر میزان تولید رنگ‌دانه است.

پیشینه تحقیق

اسپیروولینا جلبک سبز-آبی رشته‌ای چندسلولی است که رنگ سبز آن برگرفته از رنگ‌دانه کلروفیل a و رنگ آبی آن مشتق شده از فیکوسیانین است (Munawaroh et al, ۲۰۱۸). از زیر سوبه‌های غالب *اسپیروولینا* می‌توان به پلاتنسیس (*platensis*) و *ماکسیما* (*Maxima*) اشاره نمود (Tomaselli, ۱۹۹۷). جلبک پلاتنسیس منبع غنی از اسید لینولئیک، ویتامین‌ها (Ghaeni and Roomiani, ۲۰۱۶)، اسیدهای چرب ضروری و کمیاب مانند گاما لینولنیک اسید، پروتئین‌های گیاهی (Tietze, ۲۰۰۴) و امگا-۶ و طیف متنوعی از دیگر مواد معدنی است (Falquet, ۲۰۰۳; Belay, ۲۰۰۲) که کیفیت آن به وسیله سازمان غذا و کشاورزی آمریکا (FDA) تأیید شده است. این جلبک به خوبی در مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری با منابع آبی سرشار از کربنات و بی‌کربنات رشد می‌کند (Gitelson et al, ۱۹۹۶). بعد از آنکه سازمان فضایی آمریکا *اسپیروولینا* را به عنوان مکمل غذایی سودمند برای فضانوردان خود در مسافرت‌های فضایی به کار برد از آن به عنوان غذایی برای آینده یاد شد (Abert, ۱۹۹۷).

اولین و بزرگ‌ترین کارخانه تولید *اسپیروولینا* در دهه ۱۹۷۰ توسط شرکت Sosa Texcoco در مکزیک احداث شد و از سال ۱۹۷۹ صادرات خود را به کشورهای ژاپن و آمریکا آغاز کرد که بیشترین میزان تولید را در دهه ۱۹۸۰ داشته است (Henrikson, ۲۰۱۱; Ciferri, ۱۹۸۳). کارخانه شکلات Nestlé تولید اسمارتیز آبی را به دلیل سمیت بالا رنگ سنتزی طی سالهای ۲۰۰۶ تا ۲۰۰۸ منع کرد تا اینکه از رنگ‌دانه استخراج‌شده از جلبک *اسپیروولینا* را بجای رنگ آبی

مصنوعی اسمارتیز جایگزین نماید (<https://theuijunkie.com>). اخیر شرکت‌های متعددی در این راستا از کشورهای آسیایی خصوصاً چین و هند وارد عرصه تولید محصولات جانبی از این ریز جلبک شده‌اند (Henrikson, ۲۰۱۱).

اسپیروولینا از کلمه لاتین اسپیرال^۱ به معنای چرخش یا پیچش مشتق شده است که برگرفته از شکل مارپیچی جلبک است (Pometto *et al*, ۲۰۰۸). شکل ۱ تصویر اسپیرولینا ماکسیما رشد یافته در محیط کشت زاروک در روز ۴ کشت در دانشگاه پلی تکنیک مکزیک با بزرگنمایی ۴۰ با کمک میکروسکوپ نوری (Carl Zeiss ساخت کشور مکزیک) را نشان می‌دهد. نام معمول *اسپیروولینا* در کاربردهای تجاری به توده سلولی خشک *آرتروسپیرا پلاتنسیس* اطلاق می‌گردد (Gershwin and Belay, ۲۰۰۷). *اسپیروولینا* جزء غذاهای قلیائی محسوب می‌شود که در درمان سرطان و بیماری‌های سیستم ایمنی استفاده می‌شود (Abu Zaid, ۲۰۱۵) که برخی دیگر از این کاربردها عبارت‌اند از: کمک به درمان ایدز (Koničková, ۲۰۱۴)، جلوگیری از پیشرفت بیماری‌های مزمن همچون بیماری های کلیوی و قلبی (Cano-Europa *et al*, ۲۰۱۰)، تهیه ادویه، آنتی‌اکسیدانت (Gitelson *et al*, ۱۹۹۶)، مکمل‌های غذایی در محصولات دارویی (Cohen, ۱۹۹۷)، کاهش‌دهنده چربی خون (Iwata *et al*, ۱۹۹۰)، افزایش عملکرد سیستم ایمنی (Hwang, ۱۹۸۹)، کاهش آسیب‌های سلولی (Cano-Europa *et al*, ۲۰۱۲)، کود بیوشیمیایی (Nandar, ۲۰۱۱)، محصولات لبنی (Patro *et al*, ۲۰۱۱)، غنی‌سازی غذای زنده لارو ماهیان دریایی (Ghaeni *et al*, ۲۰۱۱) و حذف آلاینده‌های معدنی و آلی از پساب‌ها (Bagheri and Masoumi, ۲۰۱۶).



شکل ۱: تصویر میکروسکوپی اسپیرولینا ماکسیما رشد یافته در محیط کشت زاروک

جلبک *اسپیروولینا* قادر به رشد در هر سه روش اتوتروف، هتروتروف و میکسوتروف هست ولی از آنجا که محتوای فیکوسیانین در کشت‌های هتروتروف و میکسوتروف بسیار پایین است تولید تجاری آن به‌طور اتوتروف انتخاب مناسبی است (Chen *et al*, ۱۹۹۶; Chojnacka and Noworyta, ۲۰۰۴; Andrade and Costa, ۲۰۰۷). از طرفی بهره‌وری پایین کشت (معمولاً کمتر از 1 gL^{-1}) در روش اتوتروف نسبت به روش میکسوتروف یک مانع بزرگ برای موفقیت تجاری این ریزجلبک است (Marquez *et al.*, ۱۹۹۵; Marquez *et al.*, ۱۹۹۳). علاوه بر این کشت *اسپیروولینا* به عوامل محیطی و تغذیه‌ای بستگی دارند. رشد سلول‌ها با کاهش شدت نوردهی کاهش و یا حتی متوقف خواهد شد (Kula and Schütte, ۱۹۸۷). درصد خلوص فیکوسیانین استخراج‌شده با استفاده از نور قرمز در مقابل نورهای زرد، آبی و سبز بیشترین مقدار گزارش شده است هرچند که محتوای فیکوسیانین کاهش یافته است (Walter, ۲۰۱۱). pH مناسب محیط کشت در محدوده قلیایی ۸-۱۰/۵ است. pH برابر ۹ و بالاتر از آن آلودگی محیط کشت با سایر آلاینده‌ها را کاهش داده است پس محدوده pH بین ۱۰-۹/۲ انتخاب مناسبی برای کشت در سامانه محیط باز است. در این راستا محققین pH اولیه محیط کشت به‌منظور حذف آلودگی ۹-۹/۵ گزارش کردند و pH‌های بالاتر از ۱۰ مانع رشد جلبک *اسپیروولینا* می‌شود (Kim *et al*, ۲۰۰۷). فیکوسیانین در دماهای پایین‌تر از 4°C پایدار است ولی دماهای بالاتر از 22°C را فقط برای

^۱. Spiral

مدت کوتاهی تحمل می‌کند و تخریب نمی‌شود. محققین بیان کردند که افزایش دما به بالاتر از 35°C در محیط کشت جردن سبب کلنی شدن رشته‌های اسپیرولینا و ته‌نشینی آن در کف وان می‌شود (Ghaeni *et al*, ۲۰۰۹).

جلبک علاوه بر نور به‌عنوان منبع انرژی برای ساخت سلول از یون‌های معدنی (غیر آلی) به‌عنوان منبع غذایی برای پروتوپلاسم سلولی خود استفاده می‌کند که استفاده از این مواد می‌تواند هزینه تولید را تغییر دهد و بر نرخ رشد و یا ترکیب درصد توده مؤثر باشد (Grobbelaar, ۲۰۰۷). آب‌های زیرزمینی به دلیل گستره مواد معدنی اثر مطلوبی بر نرخ رشد دارد که سبب کاهش هزینه‌های تولید و میزان آلاینده می‌شود (Kim *et al*, ۲۰۰۷). جهت هدایت سنتز مواد ارگانیک موجود در ریزجلبک از عناصر مختلفی نظیر کربن، نیتروژن، فسفر و ... استفاده می‌شود. کربن و نیتروژن به ترتیب اولین و دومین عناصر ضروری رشد جلبک‌ها هستند. مولیبدن، آهن، مس، روی، کبالت، منگنز و کلرید عناصر میکرو هستند که اسپیرولینا در مقادیر کم به آن‌ها نیاز دارد (Dalirynezhad *et al*, ۲۰۱۷). در انتخاب غلظت مطلوب بی‌کربنات سدیم باید دقت شود که غلظت‌های پایین‌تر از ۰/۱ مولار، نرخ رشد زیست‌توده را کاهش می‌دهد (Richmond *et al*, ۱۹۸۲). اوره و نمک آمونیوم را منبع نیتروژنی ارزان‌قیمت می‌باشند که در روش سنتی از منبع نیترات به‌وفور استفاده می‌کردند (Danesi *et al*, ۲۰۰۲). فرجی و همکارانش بیشترین تولید فیکوسیائین را به ترتیب در منبع کربنی گلوکز، اسید استیک و اتانول از محیط کشت تغییر یافته سچلوسر و روش نیمه مداوم در دمای 30°C طی دوره ۱۴ روزه کشت به دست آوردند (فرجی و همکاران، ۱۳۹۳).

محیط کشت زاروک اولین محیط کشت صنعتی و استاندارد اسپیرولینا است (Murugan and radhamadhavan, ۲۰۱۰) که پس از آن محیط‌های زاروک اصلاح شده (Dineshkumar *et al*, ۲۰۱۶)، جردن (Jourdan, ۲۰۰۱)، کانوی، محیط گیلارد کشت اف ۲ (Dineshkumar *et al*, ۲۰۱۶)، محیط کشت BG-۱۱ (Rippka *et al*, ۱۹۷۹)، شوسلر (Çelekli *et al*, ۲۰۰۹)، MKV، SKM (Sukumaran *et al*, ۲۰۱۸) برای کشت استفاده شد. جداول ۲ و ۳ برخی از محیط‌های کشت رایج بر اساس محلول اصلی و ریزمغذی برای رشد ریزجلبک اسپیرولینا را لیست کرده است. اسپیرولینا به طور متداول در محیط زاروک یا اصلاح شده زاروک برای مصرف تجاری کشت داده می‌شود (Zarrouk, ۱۹۶۶). محیط کشت ادرار انسانی در چین و پساب حاصل از تصفیه خانه‌های فاضلاب پرورش خوک در کره به عنوان یک محیط پیشنهادی برای تولید اسپیرولینا پلاتنسیس گزارش شده است (Lun and Cheng, ۲۰۰۶; Hong and Lee, ۱۹۹۳). اگرچه محیط کشت زاروک به‌عنوان بهترین محیط کشت برای تولید زیست‌توده اسپیرولینا انتخاب شده است اما مارز و همکارانش بالاترین میزان محتوای رنگ‌دانه فیکوسیائین و آلفوفیکوسیائین را از محیط کشت اصلاح شده BG-۱۱ و فیکواریترین از محیط کشت SHU گزارش شده است (Marrez *et al*, ۲۰۱۳).

همزن و سیستم هوادهی سبب نشر اکسیژن آزاد شده به محیط بیرون شده و غلظت پایداری در محیط کشت به وجود می‌آورد. شیخی نژاد و همکارانش همزدن به روش‌های مختلف (همزدن با هوا، شیکر و همزدن چرخش ظرف کشت) به‌منظور افزایش تولید ریز جلبک اسپیرولینا در چهار محیط کشت سنتزی (جردن، اف ۲، شوسلر و زاروک) و محیط کشت نمک دریا مطالعه و بررسی کردند و به این نتیجه رسیدند که در همزدن با چرخش ظرف در همه محیط‌های کشت سنتزی در مدت‌زمان کمتری به بالاترین میزان رشد خود می‌رسد درحالی‌که همزدن با هوا در محیط کشت نمک دریا بهتر بوده است (Sheykhi *et al*, ۲۰۱۵).

جدول ۲. ترکیب درصد عناصر اصلی محیط‌های کشت رایج رشد ریز جلبک اسپیرولینا بر حسب گرم بر لیتر

نوع ماده	ZM-mZm	نوع ماده	Con	نوع ماده	Gf۲	نوع ماده	BG-۱۱	نوع ماده	SHU
NaHCO _۳	۱۶/۸	Na _۲ .EDTA	۴۵	NaNO _۳	۷۵	Na _۲ HPO _۴ .H _۲ O	۵	NaHCO _۳	۱۳/۶۱
NaNO _۳	۲/۵	NaNO _۳	۱۰۰	Na _۲ SiO _۳ .۹H _۲ O	۳۰	K _۲ HPO _۴	۰/۰۴	Na _۲ CO _۳	۴/۰۳
NaCl	۱	H _۳ BO _۳	۳۳/۶	FeCl _۳ .۶H _۲ O	۳/۱۵	NaNO _۳	۱/۵	K _۲ HPO _۴	۰/۵
K _۲ SO _۴	۱	NaH _۲ PO _۴ .H _۲ O	۲۰	Na _۲ EDTA.۲H _۲ O	۴/۳۵	MgSO _۴ .۷H _۲ O	۰/۰۷۵	NaNO _۳	۲/۵
K _۲ HPO _۴ .۳H _۲ O	۰/۵	MnCl _۲ .۴H _۲ O	۰/۳۶	CuSO _۴ .۵H _۲ O	۹/۸	CaCl _۲ .H _۲ O	۰/۰۳۶	K _۲ SO _۴	۱
MgSO _۴ .۷H _۲ O	۰/۲	FeCl _۳ .۶H _۲ O	۱/۳	Na _۲ MoO _۴ .۲H _۲ O	۶/۳	Citric Acide	۰/۰۰۶	NaCl	۱
FeSO _۴ .۷H _۲ O	۰/۰۱	CaCl _۲	۲	ZnSO _۴ .۷H _۲ O	۲۲	FeSO _۴ .۷H _۲ O	۰/۰۰۶	MgSO _۴ .۷H _۲ O	۰/۲
CaCl _۲ .۲H _۲ O	۰/۰۸-۰/۰۴			COCl _۲ .۶H _۲ O	۱۰	Na _۲ CO _۳	۰/۰۰۱	CaCl _۲ .۲H _۲ O	۰/۰۴
EDTA	۰/۰۱-۰/۰۸			MnCl _۲ .۴H _۲ O	۱۸	EDTA	۰/۰۲		
				Na _۲ HPO _۴ .H _۲ O	۵				
نوع ماده	SKM	نوع ماده	MKM	نوع ماده	JM	نوع ماده	mHM	نوع ماده	mJM
NaHCO _۳	۴/۵	Baking Soda	۴/۵	NaHCO _۳	۱۶	NaHCO _۳	۱۶	NaHCO _۳	۸
NaCl	۰/۲۵	Sea Salt	۰/۲۵	K _۲ SO _۴	۰/۵	(NH _۴) _۲ PO _۴	۰/۱	NaCl	۱
CaCl _۲	۰/۰۱	CaCl _۲	۰/۰۱	NaCl	۱	MgSO _۴ .۶H _۲ O	۰/۱	(NH _۴) _۲ PO _۴	۰/۲
MgSO _۴ .۷H _۲ O	۰/۰۵	Epsom Salt	۰/۰۵	MgSO _۴ .۷H _۲ O	۰/۱	FeSO _۴ .۶H _۲ O	۰/۰۱	MgSO _۴ .۶H _۲ O	۰/۲
NaNO _۳	۰/۶۲۵	Urea	۰/۲۲۱	CaCl _۲ .۲H _۲ O	۰/۱	K _۲ SO _۴	۰/۵	FeSO _۴ .۶H _۲ O	۰/۰۰۱
K _۲ HPO _۴	۰/۱۲۵	H _۳ BO _۳	۰/۰۷	FeSO _۴ .۷H _۲ O	۰/۰۱	CaCl _۲ .۲H _۲ O	۰/۱	K _۲ SO _۴	۱
K _۲ SO _۴	۰/۲۵	KOH	۰/۲۴۲	KNO _۳	۲	CH _۳ N _۳ O	۰/۱	CH _۳ N _۳ O	۰/۰۰۹
FeSO _۴ .۷H _۲ O	۰/۰۲۵	FeSO _۴ .۷H _۲ O	۰/۰۲۵	(NH _۴) _۲ HPO _۴	۰/۱			KNO _۳	۱

ZM: زاروک

Jm: جردن

mHM: هیبری اصلاح شده

mZM: زاروک اصلاح شده

mJM: جردن اصلاح شده

SHU: شوسلر

SKM: standard Kosaric medium

MKM: modified Kosaric medium

GF۲: ۲ گیلارد اف

Con: کانوی

جدول ۳. ترکیب درصد عناصر ریزمغذی محیط‌های کشت رایج رشد ریزجلبک اسپروولینا

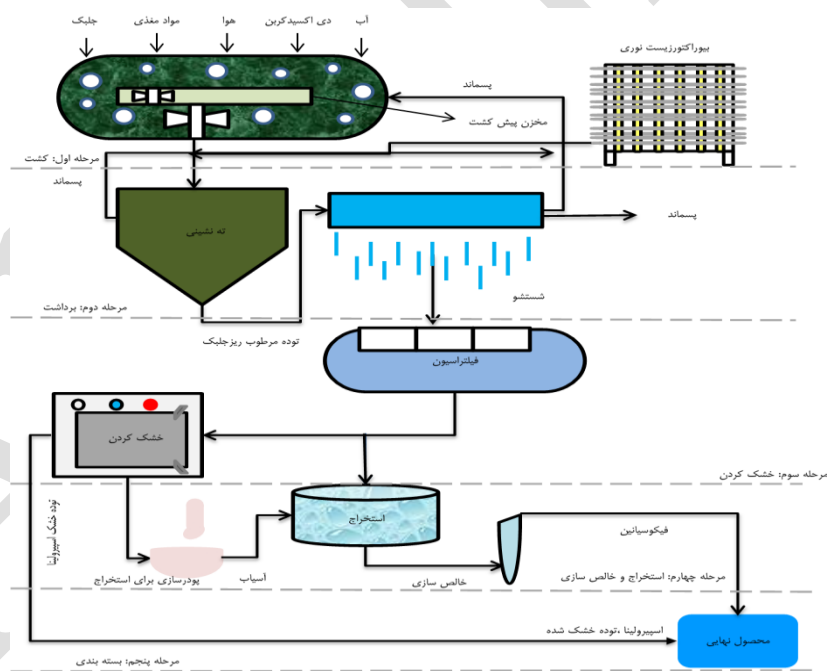
نوع ماده	زاروک (µg/L)	نوع ماده	Con (g/L)	نوع ماده	GF۲ (g/L)	نوع ماده	SHU (g/L)
H _۲ BO _۳	۲/۸۶	Vitamin B ^{۱۲}	۰/۱	Biotin	۲۰	H _۲ BO _۳	۰/۶۲
MnCl _۲ .۴H _۲ O	۱/۸۱	Vitamin B ^۱	۲	Vitamin B ^{۱۲}	۰/۱	MnCl _۲ .۴H _۲ O	۰/۰۱۲
ZnSO _۴ .۷H _۲ O	۰/۲۲	Thiamine	۱	Thiamine HCL	۰/۱	ZnSO _۴ .۴H _۲ O	۰/۰۴۴
CuSO _۴ .۵H _۲ O	۰/۰۸	ZnCl _۲	۰/۲۱			CuSO _۴ .۵H _۲ O	۰/۰۲
MoO _۳	۰/۰۱	CoCl _۲ .۶H _۲ O	۰/۲			CoCl _۲ .۶H _۲ O	۰/۰۲
		(NH _۴) _۲ Mo _۷ O _{۲۴} .۴H _۲ O	۰/۰۹			Na _۲ MoO _۴ .۲H _۲ O	۰/۰۱۲
		CuSO _۴ .۵H _۲ O	۰/۲			Na _۲ EDTA.۲H _۲ O	۰/۰۵
						FeCl _۳ .۶H _۲ O	۰/۰۹۷
						MnCl _۲ .۴H _۲ O	۰/۰۴۱
						ZnCl _۲	۰/۰۰۵
						FeSO _۴ .۷H _۲ O	۰/۰۱۲
نوع ماده	SKM (g/L)	نوع ماده	MKM (g/L)	نوع ماده	mHM (mg/L)	نوع ماده	BG-۱۱ (g/L)
H _۲ BO _۳	۲/۸۶	H _۲ BO _۳	۲/۸۶	EDTA	۵۰	H _۲ BO _۳	۲/۸۶
MnCl _۲ .۴H _۲ O	۱/۸۱	MnCl _۲ .۴H _۲ O	۱/۸۱	H _۲ BO _۳	۱۱/۴	MnCl _۲ .۲H _۲ O	۱/۸۱
ZnSO _۴ .۷H _۲ O	۰/۲۲	ZnSO _۴ .۷H _۲ O	۰/۲۲	ZnSO _۴ .۷H _۲ O	۲۲	ZnSO _۴	۰/۲۲۲
CuSO _۴ .۵H _۲ O	۰/۰۸	CuSO _۴ .۵H _۲ O	۰/۰۸	MnCl _۲ .۴H _۲ O	۵/۰۶	Na _۲ MoO _۴ .۲H _۲ O	۰/۳۹
MoO _۳	۰/۰۱	MoO _۳	۰/۰۱	COCl _۲ .۶H _۲ O	۱/۶۱	CuSO _۴ .۵H _۲ O	۰/۰۷۹
COCl _۲ .۶H _۲ O	۰/۰۱	COCl _۲ .۶H _۲ O	۰/۰۱	CuSO _۴ .۵H _۲ O	۱/۵۷	Co(NO _۳) _۲ .۶H _۲ O	۰/۰۴۹
				Mo _۷ O _{۲۴} (NH _۴) _۲ .۴H _۲ O	۱/۱		

- برای محیط کشت BG-۱۱ به میزان ۰/۵ میلی‌لیتر از ۱ لیتر محلول ریزمغذی نیاز دارد.

جدول ۴. تفاوت سامانه محیط باز و بسته

مرجع	سامانه محیط بسته	سامانه محیط باز	فاکتورها
(Patra <i>et al.</i> , ۲۰۱۸)	طولانی	کم	زمان کشت
(Chisti, ۲۰۰۷)	کم	زیاد	تبخیر آب
(Patra <i>et al.</i> , ۲۰۱۸)	زیاد	کم	استرلیزاسیون
(Patra <i>et al.</i> , ۲۰۱۸)	ثابت	متغیر	دما
(Pourkarimi <i>et al.</i> , ۲۰۱۹)	مناسب	ضعیف	نفوذ نور
(Patra <i>et al.</i> , ۲۰۱۸)	بدون آلودگی	غیرممکن	ممانعت از آلودگی
(Patra <i>et al.</i> , ۲۰۱۸)	وابستگی کم به تغییرات	بسیار وابسته	وابستگی به آب و هوا
(Naji, ۲۰۱۴)	بسیار خوب	مناسب نیست	شدت انتقال CO ₂
(Pourkarimi <i>et al.</i> , ۲۰۱۹)	بالا	کم	هزینه عملیاتی
(Pourkarimi <i>et al.</i> , ۲۰۱۹)	کم	بالا	هزینه‌های برداشت
(Pourkarimi <i>et al.</i> , ۲۰۱۹)	مناسب	ضعیف	تولید مواد دارویی

ریزجلبک‌ها در سامانه محیط باز و بسته کشت داده می‌شوند. سامانه محیط باز قدیمی‌ترین، ارزان‌ترین و ساده‌ترین سیستم کشت جلبک است (Gouveia, ۲۰۰۹) که می‌تواند تا مقیاس ۱۰۰۰۰ - ۵۰۰۰ مترمربع و یا حتی بالاتر از این روش استفاده نمود (Tredici *et al.*, ۱۹۹۳). این دو سامانه تفاوت‌های عمده‌ای دارند که در جدول ۴ ملاحظه می‌شود. شماتیکی از مراحل کشت، رشد و برداشت محصول از ریزجلبک/اسپیروولینا در شکل ۲ آورده شده است.

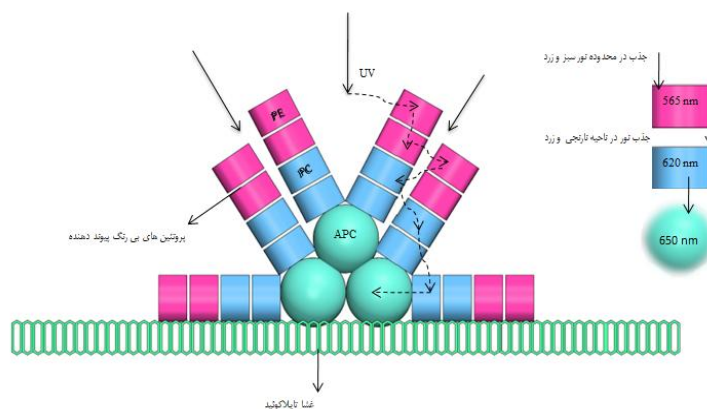


شکل ۲. شماتیک سیکل کاشت تا برداشت محصول از اسپروولینا

بحث

فیکوسیانیین از سویه‌های مختلف سیانوباکتری از جمله نوستک (Nostoc)، اسپیرولینا فوزیفرم (Spirulina Fusiformis)، اسپیرولینا ماکسیما (Spirulina Maxima) و پلاتنسیس (Platensis)، آنابنا مارینا (Anabaena marina) و میکروسیستین (Microcystis) استخراج می‌شود (Kuddus *et al.*, ۲۰۱۳). پلی پپتید آبی‌رنگ فیکوسیانیین

اصلی ترین رنگدانه فتوسنتزکننده و محلول در آب ریز جلبک / اسپیرولینا است که در سال های اخیر به دلیل کاربردهای گسترده آن مورد توجه بسیاری از محققان قرار گرفته است و در حال حاضر در بسیاری از صنایع جایگزین رنگ های مصنوعی شده است (Kaur et al, ۲۰۰۹). فیکوسیانین در دو گونه ردوفیت و کریپتوفیت به وفور یافت می شود که دارای خواص فلورسنت و آنتی اکسیدانی قابل توجهی است (Eriksen, ۲۰۰۸). این رنگدانه شامل (دربگیرنده) انواع مختلف R-PC, C-PC, B-PC هستند که C-PC معمول ترین نوع فیکوسیانین است در واقع R, C و B هر یک برگرفته از کلمات ردوفیت^۲، کریپتوفیت و بنگیفیس^۳ است (Gan, ۲۰۰۵). فایکوبیلی پروتئین های رنگی و آنتنی این ریزجلبک از سه گروه اصلی فیکواریترین (رنگدانه صورتی مایل به قرمز با نماد علمی PE)، فیکوسیانین (رنگدانه آبی با نماد علمی PC) و آلفوفیکوسیانین (رنگدانه سبز با نماد علمی APC) تشکیل شده است (MacColl, ۱۹۹۸). شکل ۳ ساختار پروتئین های رنگی فایکوبیلی زوم را نشان داده است. آلفوفیکوسیانین موجود در هسته مرکزی از یک سر به غشا تایلاکوئیدی و از سر دیگر به فیکوسیانین و فیکواریترین با ساختار میله ای متصل شده است. فایکوبیلی پروتئین ها توسط پروتئین های پیونددهنده غیر رنگی های^۴ به یکدیگر متصل شده اند که در مجموع ساختار فایکوبیلی زوم را تشکیل داده است. حداکثر جذب فیکواریترین، فیکوسیانین و آلفوفیکوسیانین به ترتیب در طول موج های ۵۶۵، ۶۲۰ و ۶۵۰ نانومتر قرار دارد که هر یک از این ساختارها وظیفه جذب نور را در محدوده ای که توان جذب نور کلروفیل محدود است را بر عهده دارند (Grossman et al, ۱۹۹۴). (جذب نور در بخش های استوانه ای از فیکواریترین به فیکوسیانین و سپس به آلفوفیکوسیانین انتقال یافته و بعد از آن کلروفیل انرژی نور در محدوده طیف خورشیدی را جذب می کند.)



شکل ۳. ساختار فایکوبیلی زوم ریز جلبک اسپیرولینا

میزان فایکوبیلی پروتئین ها در اسپیرولینا ۴۰ تا ۶۰ درصد از کل پروتئین محلول تخمین زده شده است که درصد رنگدانه های فیکوسیانین، کلروفیل و کارتنوئیدها به ترتیب ۲۰-۱۵، ۱/۷-۱/۳ و ۰/۴-۰/۳ درصد کل رنگدانه هست (Leema et al, ۲۰۱۰). به طور کلی فایکوبیلی پروتئین ها از واحد پلی پپتید آلفا و بتا تشکیل شده است (Raja et al, ۲۰۰۸). فیکوسیانین با وزن جرمی ظاهری ۲۱۰-۱۴۰ KDa از دو زیر واحد پروتئینی نسبتاً مشابه آلفا (α) و بتا (β) جهت اتصال فیکوسیانو بیلین به آپوپروتئین تشکیل شده است (Stec et al, ۱۹۹۹). زیر واحدها می تواند در ابتدا در ساده ترین حالت مونومر ($\alpha\beta$) ظاهر شود و سپس به ترتیب به فرم های تراپلمر^۵ ($(\alpha\beta)_3$) و هگزامر^۶ ($(\alpha\beta)_6$) تبدیل شوند (Marx and Adir, ۲۰۱۳).

^۲ . Rhodophyta

^۳ . Cyanophyta and Bangiophyceae

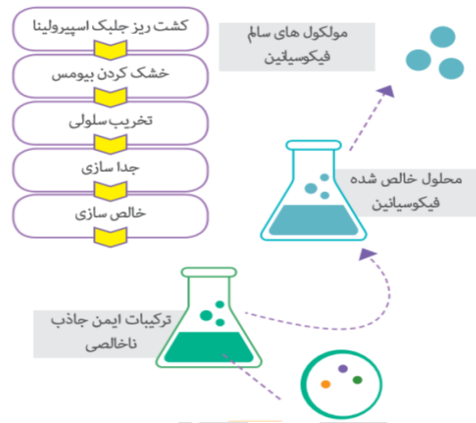
^۴ . Linker

^۵ . Trimer

^۶ . Hexamers

نتیجه‌گیری

بعد از انتخاب نوع سیانوباکتری، کشت ریز جلبک، روش استخراج یکی از فاکتورهای مهم برای بازیابی ماکزیمم فایکوبیلی پروتئین‌ها از ریز جلبک‌ها است و عواملی مانند روش تخریب سلولی، نوع حلال، نسبت حلال به توده تعیین‌کننده می‌باشند (Silveira et al, ۲۰۰۷). روش‌های جداسازی فیکوسیانیین توسط نویسندگان مختلف گزارش شده است. شهبازی و همکاران مراحل استخراج و خالص‌سازی فیکوسیانیین را مطابق شکل ۴ به تصویر کشیده است (شهبازی و همکاران، ۱۳۹۸).



شکل ۴. مراحل استخراج و خالص‌سازی فیکوسیانیین

کمبل و دیگران استخراج فیکوسیانیین را طی مراحل زیر خلاصه کرده است:

- تخریب سلولی: حل شدن فیکوسیانیین در حلال به‌منظور تخریب و شکست دیواره سلولی
- آزادسازی: آزادسازی اولیه پروتئین فیکوسیانیین از درون سلول
- جداسازی: سانتریفیوژ کردن در سرعت بالا و یا ته‌نشینی با محلول سولفات آمونیوم و کروماتوگرافی تبادل یونی (Kamble et al, ۲۰۱۳)

خالص‌سازی (Kamble et al, ۲۰۱۳; Kuddus et al, ۲۰۱۳)

روش‌های فیزیکی و شیمیایی استخراج، مزایا و معایب آن در جداول ۵ و ۶ لیست شده است (در صفحات ده و یازده این مقاله). روش‌های قدیمی استخراج فیکوسیانیین همانند جداسازی در هاون، ذوب و انجماد هزینه‌بر و کم بازده بوده‌اند (Dey and Rathod, ۲۰۱۲).

جدول ۵. خلاصه‌ای از روش‌های فیزیکی تخریب سلولی

انجماد و ذوب (Duangsee et al, ۲۰۰۹)	سوکسله کردن (Morales et al, ۲۰۱۱)	همگن‌سازی با هاون (Morales et al, ۲۰۱۱)
انجماد سبب تشکیل سلول‌های یخ و تخریب دیواره سلولی می‌شود. روش ساده‌ای است که بازده بالایی دارد و سبب افت پروتئینی نمی‌شود.	مصرف حلال زیاد، بازده پایین و زمان استخراج طولانی از معایب این روش است. با افزایش سطح تماس بازده افزایش و با کاهش زمان استخراج مصرف حلال کاهش می‌یابد.	پودر اسپیرولینا در هاون با حضور ماسه و یا بافر فسفات کوبیده می‌شود تا سلول شکسته شود.
امواج صوتی (Duangsee et al, ۲۰۰۹)	همگن‌سازی در فشار بالا (Vernès et al, ۲۰۱۵)	شوک اسمزی (Vernès et al, ۲۰۱۵)

سبب تشکیل حباب‌های ریز در تکنیک قدیمی است که اولین بار در سال سلول‌ها هنگامی که محلول نمکی در محیط کشت می‌شود. دیواره سلولی ۱۸۹۰ توسط Gaulin به ثبت رسید. غلظت متفاوت با محیط کشت قرار طی انفجار از داخل سلول تخریب و جداسازی فشار بالا سبب بهبود فرایند می‌گردد شکسته می‌شود. آب به ترکیب موردنظر جدا می‌شود. استخراج و کیفیت رنگ‌دانه می‌شود. داخل سلول راه‌یافته و سبب ورم کاهش سایز ذره نتیجه شوک مکانیکی سلولی شده که سیتوپلاسم بیش از افزایش فشار است. این تحمل نمی‌کند و حل می‌شود.

بچه‌ها و همکاران روش ماسیراسیون را بعد از بررسی روش استخراج سنتی ماسیراسیون سرمایه‌ی^۷ (مدت ۲۴ ساعت خیساندن در دمای ۴ °C) و امواج صوتی یا ریزموج با آب مقطر (تحت تابش ۴۰ kHz طی مدت‌زمان ۴۰ دقیقه) آن را تکنیکی ساده با بازده مناسب معرفی کردند. اما برای دسترسی به بالاترین بازده با حداقل انرژی و زمان برای استخراج فیکوسیائین در ابتدا نمونه‌های هر دو روش به مدت ۱۵ دقیقه برای حذف بقایای سلولی سانتریفیوژ شده است و به این نتیجه رسیدند که استخراج به روش ریزموج به‌منظور جلوگیری از خطر آلودگی باید در کمترین زمان و دما ممکن صورت گیرد. علاوه بر این بیان کردند که تغییرات بازده با زمان استخراج به‌صورت نمایی افزایش می‌یابد. همچنین آنان به منظور افزایش بازده استخراج، فیکوسیائین را ابتدا به روش ریزموج و پس‌از آن با کمک محلول شکر جداسازی فازی نمودند که حداکثر استخراج فیکوسیائین در مدت‌زمان ۴ دقیقه گزارش شده است. نویسندگان این روش را به دلیل کاهش زمان استخراج موثرترین روش برای مقیاس‌های بزرگ بیان کردند (Bachchhav et al, ۲۰۱۷). هادیانو و سوتریسنورهادی، فیکوسیائین را از پودر اسپیرولینا نیمه‌خشک حاوی ۱۱ درصد رطوبت با قرارگیری در دستگاه فراصوت حمامی تحت شدت جریان ۲۸ تا ۴۲ کیلوهرتز جداسازی نمودند و در مقایسه با روش سنتی سونیکاسیون بر پایه حلال اتانولی این روش بالاترین بازده استخراج و کیفیت رنگ‌دانه را داشت که بازده از ۱۱/۱۳ تا ۱۳/۶۱ درصد افزایش یافت (Hadiyanto and Suttrisorhadi, ۲۰۱۶). به‌کارگیری پودر مرطوب در روش امواج فراصوت از کاهش قدرت امواج جلوگیری می‌کند و کاهش اندازه ذرات سبب افزایش بازده محصول می‌گردد (Romdhane et al, ۱۹۹۵). سیلورا نسبت بهینه توده به حلال را در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد ۰/۰۸ اعلام کردند که تحت این شرایط غلظت فیکوسیائین ۳/۸۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و درصد خلوص آن ۰/۴۶ گزارش شد (Silveira et al, ۲۰۰۷). روش ریزموج ترکیبی از روشهای فیزیکی و شیمیایی است. ریزموج روش مناسبی برای استخراج مواد حساس به درجه حرارت بالا است. تخریب دیواره سلولی سبب کاهش سایز و افزایش بازده می‌شود و با تشکیل حباب درون سلول سبب تخریب سلولی می‌شود (Salisova et al, ۱۹۹۷).

جدول ۶. خلاصه‌ای از روش‌های شیمیایی تخریب سلولی (Moraes, ۲۰۱۱)

استفاده از حلال	بهبود آنزیمی
قطبیت و تشابه ساختاری مولکول عامل تعیین‌کننده در انتخاب حلال هست. فیکوسیائین قطبی از حلال‌های قطبی استفاده می‌شود. متانول، استون و تتراهیدروفوران حلال‌های آلی استخراج فیکوسیائین از توده خشک و هگزان حلال استخراج فیکوسیائین از توده تازه است.	روش سازگار با محیط‌زیست است که با استفاده از آنزیم‌هایی برای شکستن دیواره سلولی کاربرد دارد که سبب از بین رفتن پروتئین‌های پیونددهنده دیواره می‌شود. به‌طور مثال با استفاده از آنزیم لیزوزیم که از منابعی همانند سفیده تخم‌مرغ تهیه می‌شود استخراج انجام می‌شود.

^۷ Cold Maceratio

بهبود با اسید	ماسیراسیون
اسیدها به منظور حل کردن فسفولپید و تخریب دیواره سلولی اسپیرولینا بکار می‌رود. اسید استیک اسید آلی و اسید کلریک یک اسید معدنی رایج مورد استفاده برای استخراج از توده تازه است.	روش سنتی استخراج است. از مزایای این روش سادگی تجهیزات است. تخریب دیواره سلولی و پذیرش حلال بر اثر خیساندن صورت می‌گیرد.

انتخاب حلال در این روش حائز اهمیت است که اتانول نسبت به حلال‌های آب، هگزان و اتر بهترین انتخاب است. از مزایای این روش، استخراج در دما و فشار پایین است. افزایش نرخ جداسازی در دمای پایین، کاهش در زمان استخراج و میزان حلال سبب کاهش هزینه عملیاتی می‌شود. ساران و همکارانش بهترین شرایط انجماد و ذوب را طی ۳ دوره انجماد نمونه در دمای 20°C - به مدت ۳ ساعت و ذوب در دمای 4°C به مدت ۵ دقیقه اعلام کردند و محلول بافر فسفات سدیم در میان بافرهای استات، سترات، فسفات سدیم و آب مقطر به‌عنوان بهترین بافر برای دستیابی بالاترین بازده استخراج انتخاب شد (Saran, 2016). به‌طور کلی روش‌های فیزیکی، شیمیایی و یا ترکیبی از روش‌های شیمیایی و فیزیکی می‌تواند برای شکستگی سلول‌ها مورد استفاده قرار گیرد و پس از شکستگی مایع شفاف و یا آبی رنگ توسط سانتریفیوژ از مایع رویی^۸ جدا می‌شود. خلوص فیکوسیانیین که از رابطه ۲ بدست می‌آید، بسته به خلوص آن دارای درجه‌بندی متعدد برای مصارف غذایی، بهداشتی و دارویی است. درجه‌بندی‌های کمتر از ۰/۷ برای مصارف غذایی، درجه‌بندی ۲/۱ برای مصارف لوازم آرایشی، ۳/۹ درجه واکنش‌پذیر، درجه‌بندی بزرگتر از ۴ برای مصارف دارویی و درجه تحلیلی کاربرد دارد (Figueira et al., 2018).

به‌طور کلی هنگامی که محیط کشت، مواد مغذی، شرایط محیطی مناسب باشد تراکم و تقسیم سلول‌ها با گذشت زمان افزایش می‌یابد که نتیجه آن افزایش زیست توده خواهد بود. همچنین در صورت بهبود تولید ریزجلبک و پس از آن انتخاب مناسب روش استخراج به بالاترین میزان خلوص رنگدانه فیکوسیانیین خواهیم رسید که می‌تواند دامنه کاربرد آن را افزایش می‌دهد. بدین منظور برای محاسبه محتوای رنگدانه، خلوص و بازده استخراج فیکوسیانیین از روابط ۱ تا ۳ استفاده می‌شود (Silveira et al, 2007; Bennett and Bogorad, 1973; Abalde et al., 1998). ماکزیمم جذب فیکوسیانیین در دو طول موج ۶۱۵ و ۶۲۰ نانومتر متغیر است (Bennett and Bogorad, 1973).

$$PC \text{ (g/L)} = A_{620} - 0.474 A_{652}/5.34 \quad (1)$$

$$PE = A_{620} / A_{280} \quad (2)$$

$$Y = PC \text{ (g/L)} \times V_f \text{ (L)} / PC_i \text{ (g/L)} \times V_i \text{ (L)} \quad (3)$$

میزان پایداری رنگدانه فیکوسیانیین به حرارت، نور و pH بستگی دارد. شهبازی و همکاران اثبات کردند که فیکوسیانیین در دمای بالاتر از 45°C تخریب می‌شود و حتی رنگ آبی فیکوسیانیین با افزایش دما ناپدید می‌شود. علاوه بر این نشان دادند که فیکوسیانیین در محلول‌های اسیدی و قلیایی شدید ناپایدار می‌باشد (شهبازی و همکاران، ۱۳۹۸).

علائم اختصاری:

A_{280}	جذب کل پروتئین‌ها در طول موج ۲۸۰ نانومتر
A_{620}	ماکزیمم جذب فیکوسیانیین در طول موج ۶۲۰ نانومتر
A_{652}	جذب در طول موج ۶۵۲ نانومتر
PC	غلظت فیکوسیانیین

^۸ . Supernatant

PC _i	غلظت اولیه فیکوسیائین
PE	خلوص فیکوسیائین
V _i	حجم اولیه
V _f	حجم جمع‌آوری شده
Y	بازده استخراج فیکوسیائین

مراجع:

داورنژاد، ر. نجف‌پور، ق.د. پیرهادی، م. مثمیری، ه. ۱۳۸۵. مهندسی بیوشیمی و بوتکنولوژی، انتشارات دانشگاه اراک. ص ۴۸۷-۴۸۹.
 فرجی، د. رضایی، ک.ا. کلاتتری، م. هاشمی روان، م. گل مکانی، م.ت، فرجی، ن. زمستان ۱۳۹۳. بهینه سازی شرایط مختلف (دما، تغییر شدت نور، روش های کشت (غیرمداوم و نیمه مداوم) و نوع منبع کربنی) برای تولید حداکثر فایکوسیائین توسط ریز جلبک اسپیرولینا پلاتنسیس (*Arthrospira platensis*). دوره ۱۲، شماره ۱، ص ۹۹-۹۱.
 شهبازی، م. فکرت، ف. نامی، ب. غفاری، ا. ۱۳۹۸. استخراج و خالص سازی رنگدانه فیکوسیائین از ریزجلبک اسپیرولینا. پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی، ص ۱۶-۱.

- Abu Zaid, AA., Hammad, D.M. and Sharaf E.M., ۲۰۱۵. Antioxidant and Anticancer Activity of Spirulina platensis Water Extracts. International Journal of Pharmacology, ۱۱(۷): ۸۴۶-۵۱.
 Andrade, M.R. and Costa, J.A.V., ۲۰۰۷. Mixotrophic cultivation of microalga Spirulina platensis using molasses as organic substrate. Aquaculture, ۲۶۴(۱-۴): ۱۳۰-۱۳۴.
 Abalde, J., Betancourt, L., Torres, E., Cid, A., and Barwell, C., ۱۹۹۸. Purification and characterization of phycocyanin from the marine cyanobacterium Synechococcus sp. Plant Science, ۱۳۶(۱): ۱۰۹-۱۲۰.
 Abert, S., ۱۹۹۷. Microalgal Biotechnologies: Recent Developments and Prospects for Developing Countries. Paris. food and agriculture organization of the united nation France: Scientific and Cultural Organization (UNESCO): ۱۱-۳۱.
 Bachchhav, M.B, Kulkarni, M.V, Ingale, A.G., ۲۰۱۷. An efficient extraction of phycocyanin by ultrasonication and separation using 'sugaring out'. Phycological Society, ۴۷(۲): ۱۹-۲۴.
 Bagheri, Sh. and Masoumi, S.Z., ۲۰۱۶. Investigation the growth of Chlorella Sp microalgae in TMRL and Conway medium in different waters. JWE Islamic Azad University, Ahvaz Branch, ۸(۳۰): ۹۵-۱۰۴.
 Chisti, Y., Biodiesel from microalgae., ۲۰۰۷. Biotechnology Advance. ۲۵(۳): ۲۹۴-۳۰۶.
 Belay, A., ۲۰۰۲. The potential application of spirulina (*Arthrospira*) as a nutritional and therapeutic supplement in health management. The Journal of the American Nutraceutical Association, ۵(۲): ۲۷-۴۸.
 Bennett, A. and Bogorad, L., ۱۹۷۳. Complementary chromatic adaptation in a filamentous blue-green alga. Journal of Cell Biology. ۵۸(۲): ۴۱۹-۴۳۵.
 Cano-Europa, E., Memije-Lazaro, I.N., Blas-Valdivia, V. and Franco-Colín, M., ۲۰۱۸. *Arthrospira maxima* (*Spirulina*) and C-phycocyanin prevent the progression of chronic kidney disease and its cardiovascular complications. Journal of Functional Foods. ۴۳: ۳۷-۴۳.
 Cano-Europa, E., Blas-Valdivia, V., Franco-Colin, M. and Ortiz-Butron, R., ۲۰۱۲. The Relationship Between Thyroid States, Oxidative Stress and Cellular Damage, Dr. Volodymyr Lushchak (Ed.) INTECH open science. ۴۳۶-۴۱۳.
 Cano-Europa, E., Ortiz-Butron, R., Gallardo-Casas, C.A., Franco-Colin, M. and Blas-Valdivia, V. ۲۰۱۰. Phycobiliproteins from *Pseudanabaena tenuis* rich in c-phycoerythrin protect against HgCl₂-caused oxidative stress and cellular damage in the kidney. Journal of Applied Phycology ۲۲(۴): ۴۹۵-۵۰۱.
 Çelekli, A., Yavuzatmaca, M., Bozkurt H., ۲۰۰۹. Modeling of biomass production by *Spirulina platensis* as function of phosphate concentrations and pH regimes. Bioresource Technology, ۱۰۰(۱۴): ۳۶۲۵- ۲۹.
 Chojnacka, K. and Noworyta, A., ۲۰۰۴. Evaluation of *Spirulina* sp. growth in photoautotrophic, heterotrophic and mixotrophic cultures. Enzyme and Microbial Technology, ۳۴(۵): ۴۶۱-۶۵.
 Cohen, Z., ۱۹۹۷. *Spirulina platensis* (*Arthrospira*): physiology, Cell-Biology and Biotechnology. chapter ۱۰: The chemical of Spirulina. Avigad Vonshak (Eds). Taylor & Francis. CRC Press ۱۹۶.
 Chen, F., Zhang Y. and Guo S., ۱۹۹۶. Growth and phycocyanin formation of *Spirulina platensis* in photoheterotrophic culture. Biotechnology Letters, ۱۸(۵): ۶۰۳-۰۸.
 Ciferri, O., ۱۹۸۳. *Spirulina*, the Edible Microorganism. Microbiology Reviews. ۴۷(۴): ۵۵۱-۷۸.
 Dalirynezhad, S., Hallajisani, A., Nouri, H. and Golzary, A., ۲۰۱۷. Effects of Environmental Factors on *Chlorella* Sp . Microalgae for Bio- Diesel Production Purpose : Enhanced Lipid and Biomass Productivity. Recent Innovations in Chemical Engineering, ۱۰(۲): ۱-۸.

- Dineshkumar, R., Narendran, R. and Sampathkumar, P., ۲۰۱۶. Cultivation of *Spirulina platensis* in different selective media. *Indian journal of Geo Marine. Science*, ۴۵(۱۲): ۱۷۴۹-۵۴.
- Dey S., Rathod V. K., ۲۰۱۲. Simultaneous extraction of phenolic compounds of citrus peel extracts: Effect of ultrasound. *Ultrasonics Sonochemistry*, ۲۰: ۲۷۱-۲۷۶.
- Duangsee, R., Phoopat, N. and Ningsanond, S., ۲۰۰۹. Phycocyanin Extraction from *Spirulina platensis* and Extract Stability under Various pH and Temperature. *Asian Journal of Food and Agro-Industry*, ۲(۴): ۸۱۹-۸۲۶.
- Danesi, E.D.G., Yagui C.O.R., Carvalho J.C.M., Sato S., ۲۰۰۲. An investigation of effect of replacing nitrate by urea in the growth and production of chlorophyll by *Spirulina platensis*. *Biomass and Bioenergy*, ۲۲(۴): ۲۶۱-۲۶۹.
- Eriksen, NT., ۲۰۰۸. Production of phycocyanin as a pigment with applications in biology, biotechnology, foods and medicine. *Applied Microbiology Biotechnology*, ۸۰(۱): ۱-۱۴.
- C-PHYCOCYANIN PURIFICATION: MULTIPLE PROCESSES FOR DIFFERENT APPLICATIONS
 Figueira, F.D.S., Moraes, C.C., and Kalil, S.J., ۲۰۱۸. C-PHYCOCYANIN PURIFICATION: MULTIPLE PROCESSES FOR DIFFERENT APPLICATIONS. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, ۳۵(۳): ۱۱۱۷-۱۱۲۸.
- Falquet, J., ۲۰۰۳. report: the nutritional aspects of spirulina. *Antenna Technol: Hippocrates*.
- FDA, Agency Response Letter GRAS Notice No. GRN ۰۰۰۱۲۷.
- Ghaeni, M. and Roomiani L., ۲۰۱۶. Review for Application and Medicine Effects of *Spirulina*, *Spirulina platensis* Microalgae. *Journal of advanced Agricultural technologies*, ۳(۲): ۱۱۴-۱۱۷.
- Ghaeni, M., Matinfar, A., Soltani, M., Rabbani, M. and Vosoughi, A., ۲۰۱۱. Comparative effects of pure spirulina powder and other diets on larval growth and survival of green tiger shrimp, *Peneus semisulcatus*. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, ۱۰(۲).
- Ghaeni, M., Matinfar, A., Soltani, M. and Rabbani, M., ۲۰۰۹. Experimental culture of *Arthrospira platensis* in Iran. *Journal of Marine Biology*, ۱(۲): ۳۸-۵۱.
- Gouveia, L., ۲۰۰۹. Microalgae as a Feedstock for Biofuel Production; *Vigrina Tech*. ۱-۷.
- Grobbelaar, J.U., ۲۰۰۷. Photosynthetic characteristics of *Spirulina platensis* grown in commercial-scale open outdoor raceway ponds: what do the organisms tell us?. *Journal of Applied Phycology*, ۱۹: ۵۹۱-۹۸.
- Gershwin, M.E. and Belay, A., ۲۰۰۷. *Spirulina in Human Nutrition and Health: Introduction*. ۱st Edition. CRC Press Book: ۲.
- Gan, C.H., ۲۰۰۵. The relations between structure and function of the phycobiliprotein which can autoassembly with phycobilin. Wuhan: Huazhong University of Science and Technology.
- Gitelson, A., Qiuang, H. and Richmond, A., ۱۹۹۶. Photic volume in photobioreactors Supporting Ultrahigh Population Densities of the Photoautotroph *Spirulina platensis*. *Applied Environmental Microbiology*, ۶۲(۵): ۱۵۷۰-۱۵۷۳.
- Grossman, R., Schaefer, MR., Chiang, GG. and Collier J.L., ۱۹۹۴. The responses of cyanobacteria to environmental conditions: light and nutrients. *The molecular biology of cyanobacteria*. ۶۴۱-۷۵.
- Hadiyanto, H. and Sutrisnorhadi, S., ۲۰۱۶. Response surface optimization of ultrasound assisted extraction (UAE) of phycocyanin from microalgae *Spirulina platensis*. *Emirates Journal of food and Agricultural*, ۲۸(۴): ۲۲۷-۳۴.
- Henrikson, R., ۲۰۱۱. *Algae Industry Magazine*. <http://www.algaeindustrymagazine.com/the-future-of-algae-pt-۱/>.
- Hong, SS., and Lee, NH., ۱۹۹۳. Growth of *Spirulina platensis* in effluents from wastewater treatment plant of pig farm. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, ۳: ۱۹-۲۳.
- Hwang, D., ۱۹۸۹. Essential fatty acids and immune response. *Federation of American Societies for Experimental Biology Journal*, ۳(۹): ۲۰۵۲-۶۱.
- Iwata, K., Inayama, T. and Kato T., ۱۹۹۰. Effects of *Spirulina platensis* on plasma lipoprotein lipase activity in fructose-induced hyperlipidemic rats. *Journal of nutritional science and vitaminology*, ۳۶(۲): ۱۶۵-۷۱.
- Jourdan, J.P., ۲۰۰۱. grow your own spirulina, condensed vaersion of Manual of small scale *Spirulina* culture. *Antenna Technology*; ۱۵.
- Koničková, R., Vaňková, K., Vaníková, J., Váňová, K., Muchová, L., Subhanová, Zadinová, M., Zelenka, J., Dvořák, A., Kolář, M., Strnad, H., Rimpelová, S., Ruml, T. J., Wong, R. and Vítek, L., ۲۰۱۴. Anti-cancer effects of blue-green alga *Spirulina platensis*, a natural source of bilirubin-like tetrapyrrolic compounds. *Annals of Hopatology*, ۱۳(۲): ۲۷۳-۸۳.
- Kuddus, M., Singh, P., Thomas, G. and Al-Hazimi A., ۲۰۱۳. Recent Developments in Production and Biotechnological Applications of C-Phycocyanin. *BioMed Research International*, ۱-۹.

- Kamble, S.P., Gaikar, R.B., Padalia, R.B and Shinde K.D., ۲۰۱۳. Extraction and purification of C-phycoyanin from dry Spirulina powder and evaluating its antioxidant, anticoagulation and prevention of DNA damage activity. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, ۳(۰۸): ۱۴۹-۵۳.
- Kaur, G., Khattar, J.I.S, Singh, D.P, Singh, Y. and Nadda J., ۲۰۰۹. Chapter ۱۰: Microalgae: a Source of Natural Colours. ۱۴۰. I. K. International Publishing House Pvt. Ltd. New Delhi.
- Kim, Cj., Jung, Yh., Ko, Sr., Kim, Hi., Park, Yh. and Oh, Hm., ۲۰۰۷. Raceway Cultivation of Spirulina platensis Using Underground Water. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, ۱۷(۵): ۸۵۳-۵۷.
- Kula, M.R. and Schütte, H., Purification of Proteins and the Disruption of Microbial Cell. *Biotechnology Progress* ۱۹۸۷; ۳(۱): ۳۱-۴۲.
- Leema, J.T., Kirubakaran R, Vinithkumar N.V, Dheenan P.S and Karthikayulu S., ۲۰۱۰. High value pigment production from Spirulina platensis cultured in seawater. *Bioresource Technology*, ۱۰۱(۲۳): ۹۲۲۱-۹۲۲۷.
- Lun, FD., and Cheng, WZ., ۲۰۰۶. Culture of Spirulina platensis in human urine for biomass production and O₂ evolution. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B*. ۷:۳۴-۳۷.
- Marrez, D.A, Naguib, M.M., Sultan, Y.Y., Daw, Z.Y. and Higazy A.M., ۲۰۱۳. Impact of culturing media on biomass production and pigment content of spirulina platensis. *International Journal of Advanced Research*, ۱(۱۰): ۹۵۱-۶۱.
- Munawaroh, H.S.H., Darojatun, K., Gumilar, G.G., Aisyah, S. and Wulandari A.P., ۲۰۱۸. Characterization of phycocyanin from Spirulina fusiformis and its thermal stability. *Journal of Physics: Conference Series*, ۱۰۱۳:۱-۷.
- Marx, A. and Adir N., ۲۰۱۳. Allophycocyanin and phycocyanin crystal structures reveal facets of phycobilisome assembly. *Biochimica et Biophysica Acta*, ۱۸۲۷(۳): ۳۱۱-۱۸.
- Moraes, C.C, Sala, L., Cerveira, G.P. and Kalil S.J., ۲۰۱۱. C-phycoyanin extraction from spirulina platensis wet biomass. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, ۲۸(۰۱): ۴۵-۴۹.
- Murugan, T. and radhamadhavan., ۲۰۱۰. Media Optimization for the Enhanced Growth and Yield of Spirulina platensis Biomass and Determination of Generation Time. *International Journal of Medical Sciences (India)*, ۲۰۱۰; ۳(۱-۲): ۳۴-۳۹.
- MacColl, R., ۱۹۹۸. Cyanobacterial phycobilisomes. *Journal of Structural Biology*, ۱۲۴(۲-۳): ۳۱۱-۳۴.
- Marquez, F.J., Nishio, N., Nagai, S., ۱۹۹۵. Enhancement of biomass and pigment production during growth of Spirulina platensis in mixotrophic culture. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*. ۶۲: ۱۵۹-۱۶۴.
- Marquez, F.J., Sasaki, K., Kakizono, T., Nishio, N., Nagai, S., ۱۹۹۳. Growth characteristics of Spirulina platensis in mixotrophic and heterotrophic conditions. *Journal of Fermentation and Bioengineering*. ۷۶: ۴۰۸-۴۱۰.
- Noori, H., Dalirynejad, S., Halaji Sani, A., ۲۰۱۶. Evaluation of the Effect of Glucose, Nitrate and Weber PH on the Production of Biosphere Biomass of Native Gulf Algae in order to produce biodiesel by surface response method. ۳rd International Conference on New Advances in Chemistry and Chemical Engineering.
- Naji, M., ۲۰۱۴. Micro-algae instruction or method. Iran Fisheries Organization. Shrimp and Shrimp Aquatic Resources Office. ۴-۴۱.
- Nandar Aung, K.L., ۲۰۱۱. Effect of Spirulina Biofertilizer Suspension on Growth and Yield of Vigna radiata (L.) Wilczek. *Universities Research Journal*, ۴(۱): ۳۵۱-۶۳.
- Pourkarimi, S., Hallajisani, A., Alizadehdakhel, A. and Nouralishahi, A., ۲۰۱۹. Biofuel Production through Micro- and Macroalgae Pyrolysis-A Review of Pyrolysis Methods and Process Parameters. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, ۱-۱۹.
- Patra, J.K., Das, G., Shin, H.S (Eds), ۲۰۱۸. *Microbial Biotechnology: Volume ۲: Application in Food and Pharmacology*. Springer, ۲; ۱۲۷-۳۱.
- Patro, N., Sharma, A., Kariaya, K. and Patro, I., ۲۰۱۱. Spirulina platensis protects neurons via suppression of glial activation and peripheral sensitization leading to restoration of motor function in collagen induced arthritic rats. *Indian Journal of Experimental Biology*. ۴۹(۱۰): ۷۳۹-۴۸.
- Pometto, A., Shetty, K., Paliyath, G., Levin, R.E., ۲۰۰۸. *Food Biotechnology*. ۲nd edition. Taylor and Francis Group. Food Science and Technology series. CRC Press Book ۲۰۰۸, New York.
- Raja, R., Hemaiswarya, S., Ashok Kumar, N., Sridhar S. and Rengasamy, RA., ۲۰۰۸. A Perspective on the Biotechnological Potential of Microalga. *Critical Reviews in Microbiology*. ۳۴(۲): ۷۷-۸۸.
- Romdhane, M., Gourdon, C. and Casamatta G., ۱۹۹۵. Local investigation of some ultrasonic devices by means of a thermal sensor. *Ultrasonics*. ۳۳(۳): ۲۲۱-۲۷.
- Richmond, A., Karg, S., Boussiba, S., ۱۹۸۲. Effects of Bicarbonate and Carbon Dioxide on the Competition between Chlorella vulgaris and Spirulina platensis. *Plant and Cell Physiology*. ۲۳(۸): ۱۴۱۱-۱۷.

- Rippka, R., Deruelles, J., Waterbury, B., Herdman, M. and Stanier, Y., ۱۹۷۹. Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *J. Gen. Microb.* ۱۱۱: ۱-۶۱.
- Sukumaran, P., Nulit, R., Halimoon, N., Simoh, S., Omar, H., and Ismail, A., ۲۰۱۸. Formulation of Cost-effective Medium Using Urea as a Nitrogen Source for *Arthrospira platensis* Cultivation under Real Environment. *Annual Research & Review in Biology*, ۲۲(۲): ۱-۱۲.
- Sathasivam, R., Ramalingam, R.R., Hashem, A., AbdAllah, E.F., ۲۰۱۷. Microalgae metabolites: A rich source for food and medicine. *Saudi Journal of Biological Sciences*. ۱-۱۴.
- Saran, S., Puri, N., Jasuja, N.D., kumar, M. and Sharma G., ۲۰۱۶. Optimization, Purification and characterization of Phycocyanin from *Spirulina platensis*. *International Journal of Applied and Pure Science and Agriculture*. ۲(۳): ۱۵-۲۰.
- Sheykhi Nejad, A., Lababpour, A.M. and Moazami N., ۲۰۱۵. Increasing Cyanobacteria *Spirulina* Production with Mixing and Chemical Composition of Culture Medium. *Journal of Plant Research*. ۲۸(۲): ۳۴۴-۵۳.
- Silveira, S.T., Burkert, J.F.M., Costa, J.A.V., Burkert, C.A.V., Kalil, S.J., ۲۰۰۷. Optimization of phycocyanin extraction from *Spirulina platensis* using factorial design. *Bioresource Technology*. ۹۸(۸): ۱۶۲۹-۳۴.
- Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E., Isambert, A., ۲۰۰۶. Commercial applications of microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. ۱۰۱(۲): ۸۷-۹۶.
- Stec, B., Troxler, RF. and Teeter, MM., ۱۹۹۹. Crystal structure of C-phycocyanin from *Cyanidium caldarium* provides a new perspective on phycophycobilisome assembly. *Biophysical Journal*. ۷۶ (۶): ۲۹۱۲-۲۹۲۱.
- Salisova, M., Toma, S. and Mason T.J., ۱۹۹۷. Comparison of conventional and ultrasonically assisted extractions of pharmaceutically active compounds from *Salvia officinalis*. *Ultrasonics Sonochemistry*. ۴(۲): ۱۳۱-۱۳۴.
- Tietze, HW., ۲۰۰۴ *Spirulina* micro food macro blessing ۴th edition. Australia: Harald W. ۲۴-۴۵.
- Tseng, C.K., ۲۰۰۴. Asian Pacific Phycology in the ۲۱st Century: Prospects and Challenges: The past, present and future of phycology in china. *Ang Jr., Put O (Ed). Hydrobiology*; ۵۱۲: ۱۱-۲۰.
- Tomaselli, L., ۱۹۹۷. *Spirulina platensis* (*Arthrospira*): physiology, cell-biology and biotechnolog. Chapter ۱: Morphology, ultrastructure and taxonomy of *Arthrospira* (*Spirulina*) *maxima* and *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis*. Avigod Vonshak (Eds). London, Taylor and Francis: ۱-۱۶.
- Tredici, M.R., Zittelli, G.C., Biagiolini, S., Materassi, R., ۱۹۹۳. Novel photobioreactors for the mass cultivation of *Spirulina* spp. *Bulletin de l'Institut océanographique*. ۱۲: ۸۹-۹۶.
- Vernès, L., Granvillain, P., Chemat, F. and Vian M., ۲۰۱۵. Phycocyanin from *Arthrospira Platensis*. Production, Extraction and Analysis. *Current Biotechnology*. ۴(۴): ۱-۱۱.
- Walter, A., Carvalho, J.C.D., Soccol, V.T., de Faria, A.B.B., Ghiggi, V. and Soccol C.R., ۲۰۱۱. Study of Phycocyanin Production from *Spirulina platensis* Under Different Light Spectra. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. ۵۴(۴): ۶۷۵-۸۲.
- Zarrouk, C., ۱۹۶۶. 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.

Spirulina Cultivation, Process and Extraction of Phycocyanin: A review

Neda Mirhosseini^۱, Ahmad Halajisani^۲, Reza davarnejad^۱, Edgar Cano Europa^۳, Haleh Baghernouh C^۳

۱. Department of Chemical Engineering, Faculty of Chemical Engineering, Arak University, P.O.Box. ۳۸۱۵۶-۸-۸۳۴۹, Arak, Iran

۲. Caspian faculty of Engineering, Tehran University, Rezvanshahr, Gilan, Iran.

۳. Metabolism Laboratory I, Department of Physiology, Institute of National Polytechnic (IPN), Mexico City, Mexico
n.mir89@yahoo.com

Abstract

Today, life of all people in the world depends on drugs, herbal products and herbal-derived products to live healthy. Therefore, the use of herbal products instead of harmful artificial products is generally accepted. In this regard, it is important to have the technical knowledge of cultivating and choicing the conditions of growth. For this purpose, this research has reviewed the micro-algae cultivation method for the extraction of phycocyanin. In this review article, valid scientific articles are indexed in various databases such as Science Direct, Springer, Scopus and others, which have one of the key words of Spirulina platensis, phycocyanin pigment, cultivation and extraction methods were investigated. According to the results of the studies, Spirulina Platensis is a filamentous microalga with a variety of applications in the fields of food, pharmacy, fertilizer, which is a rich source of protein, B-group vitamins, essential amino acids and minerals. Spirulina Platensis is a non-heterocysts and autotrophic photosynthetic algae. Phycocyanin one of the Spirulina pigment uses as a drug pill for cancer treatment, anti-inflammation, AIDS treatment, or an additive as a supplement to the diet are the four main advantages of this substance, which emphasizes the need to extract this microalgae. The production of algae with high levels of Phycocyanin is due to several factors, including growth conditions of algae, the ability to accumulate pigmentation, production technology and the efficiency of the downstream process. Numerous mediums like Zarrouk, Modified Zarrouk, Conway, Jordan, F^۲, and Schussler have been used for cultivation of this microalga, but the best medium for cultivation of this microalgae is Zarrouk medium at ۲۸-۳۵°C, ۱۵۰۰-۴۵۰۰ lux, pH = ۹-۹,۵.

Keywords: Culture, Phycocyanin, Spirulina, non-heterocysts, autotrophic

بررسی تولید رنگ دانه لیکوپن از جلبک *دونالینا سالیئا*

اعظم عباسی^۱، حمیدرضا صمدلویی^{۱*} و احمد رجایی^۲

^۱دانش اموخته دانشگاه صنعتی شاهرود، دانشکده کشاورزی گروه علوم و صنایع غذایی

^۲استادیار دانشگاه صنعتی شاهرود، دانشکده کشاورزی گروه علوم و صنایع غذایی

hsamadlouie@yahoo.com

چکیده

هدف از این پژوهش اندازهگیری لیکوپن موجود در جلبک *دونالینا سالیئا* در شرایط متفاوت محیط کشت بود. نتایج آزمون تأثیر pHهای مختلف در محیط کشت دارای منبع کربنی گلوکز و منبع نیتروژنی پپتون گوشت نشان داد که بیشترین میزان تولید رنگدانه لیکوپن و رشد توده زیستی در pH=۷/۵ بود. منبع کربنی معدنی دی‌اکسیدکربن تأثیر اندکی در تولید لیکوپن و توده زیستی داشت که افزودن نانوذره منیزیم باعث افزایش تولید لیکوپن و رشد توده زیستی در این نمونه‌ها شد. در ادامه با افزودن سویا به عنوان منبع نیتروژنی آلی به این محیط افزایش بیشتر توده زیستی و تولید رنگدانه لیکوپن مشاهده شد. از سوی دیگر افزودن منبع نیتروژنی همراه منبع کربنی آلی به محیط کشت حاوی دی‌اکسیدکربن باعث افزایش توده زیستی و کاهش میزان تولید لیکوپن گردید. نتایج حاصل از تأثیر ۳ نانوذره تیتانیوم (Ti)، نقره (Ag) و منیزیم (Mn) نشان داد که بیشترین میزان لیکوپن در نمونه‌های دارای ۱۰۰۵ میلی‌گرم در لیتر نانوذره بود. که در مجموع تأثیر تیتانیوم در بین این ۳ نانوذره در تولید لیکوپن بیشتر بود. نتایج حاصل از تأثیر مقدار نمک بر میزان تولید توده زیستی و رنگدانه در دو محیط نیتروژنی سویا و پپتون گوشت نشان داد که در هر دو منبع نیتروژنی تولید لیکوپن در غلظت ۵ درصد نمک افزایش داشت که با افزایش بیشتر غلظت نمک تولید لیکوپن کاهش داشت در حالی که غلظت ۱۰ درصد نمک باعث افزایش رشد توده زیستی شد.

کلمات کلیدی: *دونالینا سالیئا*، لیکوپن، نمک، رشد و نانوذره

مقدمه

جلبک *دونالینا سالیئا* اولین بار در سال ۱۸۳۸ توسط Michel Felix Dunal در فرانسه مشاهده و در سال ۱۹۰۵ Teodorese این جلبک شناسایی شده توسط دونال را به نام *دونالیه‌لا* معرفی کرد. اولین مطالعات اساسی پیرامون تاکسونومی جنس *دونالیه‌لا* توسط Teodorese در سال‌های ۱۹۰۵ تا ۱۹۰۶ روی *دونالینا سالیئا* آغاز شد (Preisig, ۱۹۹۲) و برای نخستین بار نام *دونالینا* را به عنوان یک جنس جدید توصیف نمود و ثابت کرد که این جنس به طور واضح و مشخصی از سایر جنس‌های خویشاوند نظیر هماتوکوکوس و کلامیدوموناس^۱ متفاوت و مجزا می‌باشد (Borowitzk and Siva, ۲۰۰۷). *دونالینا* جلبکی است تک‌سلولی و سبز که در آب‌های شور زندگی می‌کند. دارای دو تاژک^۲ می‌باشد که از نظر آناتومی از قطب جلویی سلول خارج می‌شوند (Preisig, ۱۹۹۲). این جلبک فاقد دیواره سلولی می‌باشد و بنابراین به سرعت نسبت به تغییرات و فشارهای اسمزی خارج و داخل سلولی واکنش نشان می‌دهد (Bental and Degani, ۱۹۹۲). مقاومت بالای گونه‌های *دونالینا* نسبت به تنش‌های محیطی، مستلزم وجود مکانیسم‌های به خصوص جهت سازگار شدن با محیط می‌باشد (شریعتی و مصطفوی، ۱۳۸۰). از جمله مکانیسم‌هایی که سلول‌های *دونالینا* را نسبت به محدوده وسیعی از شوری مقاوم نمود مربوط به توانایی این جلبک در تغییر غلظت گلیسرول درون سلولی می‌باشد.

^۱ chlamydomonas

^۲ flagella

(Avron, ۱۹۹۲; Shariati and Lilley, ۱۹۹۴). هنگامی که سلول در محیطی با شوری بالا قرار دارد، مقدار گلیسرول درون سلولی بالغ بر ۵۰٪ افزایش می‌یابد، که این مقدار برای مواجه شدن با بالاترین مقدار فشار اسمزی نیز کافی می‌باشد. در این شرایط گلیسرول آنزیم‌ها را در مقابل ممانعت‌کننده‌ها و هم‌چنین غیر فعال‌کننده‌ها حفظ می‌نماید (Hosseini Tafreshi and Shariati, ۲۰۰۹). جلبک *دونالینا سالینا* قادر است تحت شرایط ویژه مقادیر زیادی بتاکاروتن ذخیره کند. هنوز نمی‌توان درباره وظایف بتاکاروتن و علل افزایش سنتز آن در جلبک *دونالینا سالینا* به صراحت اظهار نظر کرد. فرضیاتی که در این رابطه وجود دارد این است که نقش بتاکاروتن به عنوان یک مخزن ذخیره کربن جهت استفاده در شرایط محدودیت رشد، فرونشاندن اکسیژن رادیکالی کاتالیز شده توسط کلروفیل و مقابله با صدمات حاصل از نور شدید با جذب تشعشعات اضافی باشد (Avron and Ben-Amotz, ۱۹۹۲). با توجه به نکات ذکر شده هدف این تحقیق اندازه‌گیری رنگدانه در شرایط متفاوت رشد می‌باشد

مواد و روش‌ها

تهیه نمونه:

استوک خالص میکرو جلبک *دونالینا سالینا* از آزمایشگاه کشت جلبک گروه پژوهشی شیلات و آلاینده‌های آبی خزر (کاسپین) ساری تهیه گردید. نمونه در یک ظرف یک لیتری درون یخچال با دمای حدود ۴+ نگه‌داری شد.

تهیه محیط توسعه تلقیح:

جهت تهیه محیط توسعه تلقیح گلوکز (۵۰ gr/l) و عصاره مخمر (۵ gr/l) و نمک‌های معدنی با ۱۰۰ میلی‌لیتر آب به حجم رسانیده pH محیط با استفاده از اسید کلریدریک و هیدروکسید سدیم ۰/۱ مولار بین ۷ تا ۷/۵ تنظیم گردید. سپس محیط توسعه تلقیح توسط دستگاه اتوکلاو به مدت ۲۰ دقیقه استریل گردید. آنگاه تحت شرایط کاملاً استریل از نمونه جلبک اولیه به میزان ۳۰ سی‌سی به آن اضافه گردید. درب ارلن با پنبه استریل مسدود شده و سپس در دستگاه شیکر به مدت ۴ روز در دمای ۲۴ درجه و دور ۲۴۰ rpm گذاشته شد.

کشت جلبک در محیط مایع:

جهت بهینه‌سازی شرایط موثر در تولید لیکوپن و میزان زیست توده جلبکی از چند فاکتور مهم و تأثیرگذار نظیر PH و غلظت‌های مختلف نمک و نانوذرات استفاده شد.

رسوب‌گذاری و استخراج توده زیستی

سانتریفیوژ کردن مستقیم‌ترین روش برای جداسازی جلبک رشد یافته از محیط کشت پس از شیکرگذاری می‌باشد. برای این منظور در این مرحله ارلن‌های حاوی توده زیستی در محیط کشت فرموله شده در روز ۷ به فالكون‌های مخصوص سانتریفیوژ انتقال پیدا کرد و در دور ۲۵۰۰ rpm به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند و توده زیستی از آب حاوی محیط کشت جدا گردید در ادامه پس از خروج آب رویی از فالكون‌ها توده زیستی باقی مانده در ته فالكون‌ها را در پلیت‌هایی با وزن مشخص منتقل شدند (Loeblich, L.A. ۱۹۷۲).

فرآیند خشک کردن توده زیستی

بعد از انتقال به پلیت‌ها نمونه‌ها درون آون گذاشته شد تا خشک شوند. این فرآیند در دمای ۳۷ تا ۴۰ درجه به مدت ۵ ساعت انجام شد.

استخراج رنگدانه لیکوپن

بعد از اینکه نمونه‌ها خشک شدند پس از توزین با هاون آزمایشگاهی به صورت پودر در آورده زیرا برای استخراج لیکوپن بایستی اندازه ذرات بسیار کوچک شود تا حلال به راحتی در آن نفوذ کند و مقدار مورد نیاز از پودرها را با توجه به میزان داده شده در جدول به داخل میکروتیوپ‌ها منتقل و در داخل آن استن به میزان یک سی‌سی برای هر نمونه ریخته شد و بعد از ورتکس کردن (این مرحله به استخراج بهتر کمک می‌کند) نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه، در داخل سانتریفیوژ به مدت ۵ دقیقه با دور ۵۰۰۰rpm گذاشته سپس محلول رویی با دقت و با استفاده از سمپلر به میکروتیوپ‌های جدید منتقل شد (Loeblich, L.A. ۱۹۷۲).

اندازه گیری میزان لیکوپن موجود

برای این کار از دستگاه اسپکتروفتومتری استفاده شد. ابتدا برای صفر کردن دستگاه، حلال استن به کار گرفته شد. محلول استاندارد تهیه شده براساس غلظت‌های (۱،۲/۵،۵،۱۰) در دستگاه اسپکتروفتومتری در طول موج ۴۶۱ خوانده شد به این صورت که در طول موج برابر ۴۶۱ که مربوط به رنگدانه لیکوپن می‌باشد بیشترین میزان جذب نور صورت گرفت و پس از صفر کردن یا به اصطلاح blank کردن دستگاه در طول موج ۴۶۱ نانومتر و ریختن نمونه‌ها در کووت‌های شیشه‌ای میزان جذب نور نمونه‌ها خوانده شد و براساس میزان نور جذب شده مقدار لیکوپن موجود در نمونه‌ها اندازه‌گیری شد. (Amotz, A., Avron, M., ۱۹۸۳)

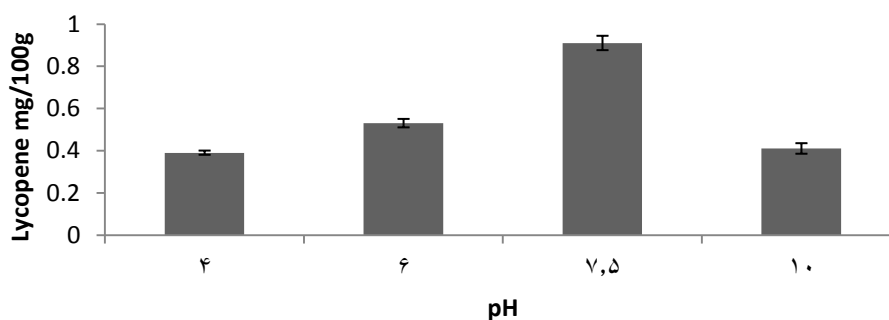
نتایج و بحث

نوع رنگدانه تولیدی از جلبک *دونالینا سالینا*

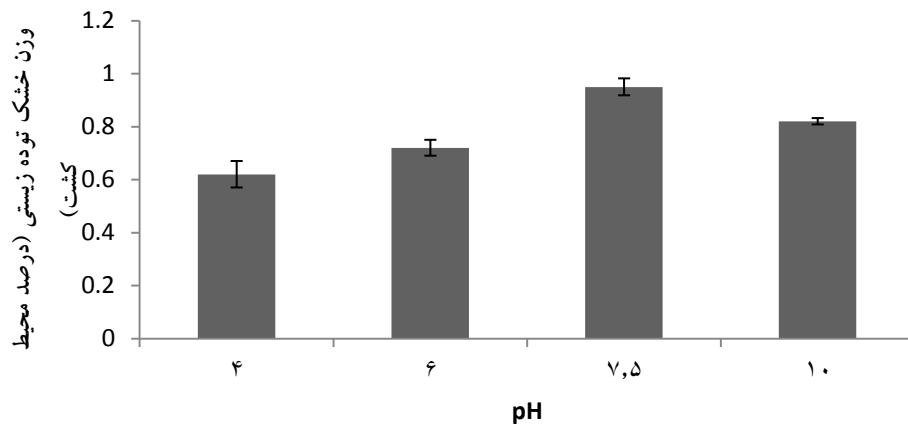
جلبک *دونالینا سالینا* به منظور محافظت از فعالیت حیاتی‌اش در مقابله اکسیژن‌های رادیکالی شروع به تجمع رنگدانه کرده که این رنگدانه‌ها رادیکال‌های اکسیژن تولید شده در اثر فعالیت‌های حیاتی را غیرفعال می‌کنند (Telfer ۲۰۰۲). آنالیز اولیه رنگدانه تولیدی از جلبک *دونالینا سالینا* نشان داد که تنها رنگدانه غالب این جلبک لیکوپن می‌باشد.

بررسی اثر pH بر تولید رنگدانه لیکوپن و رشد توده زیستی

در این مرحله از تحقیق منبع نیتروژنی پپتون گوشت در سطح ۱۵ گرم در لیتر و منبع کربنی گلوکز که در سطح ۵۰ گرم در لیتر تنظیم شد. با افزایش pH توده زیستی تا pH برابر ۷/۵ افزایش یافت افزایش بیشتر pH باعث شد که میزان توده زیستی کاهش یابد همین روند برای میزان رنگدانه لیکوپن مشاهده شد که بیشترین میزان رنگدانه لیکوپن در pH برابر ۷/۵ بدست آمد. این نتایج با نتایج Leoblich (۱۹۷۲) و Gimmler و همکاران (۱۹۸۱) مطابقت داشت.



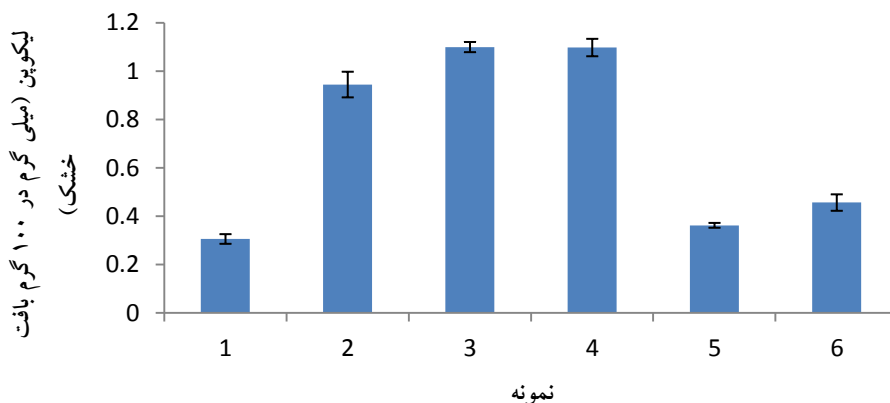
شکل ۱. تأثیر pH بر میزان تولید رنگدانه لیکوپن بوسیله گونه جلبک *دونالینا سالینا*



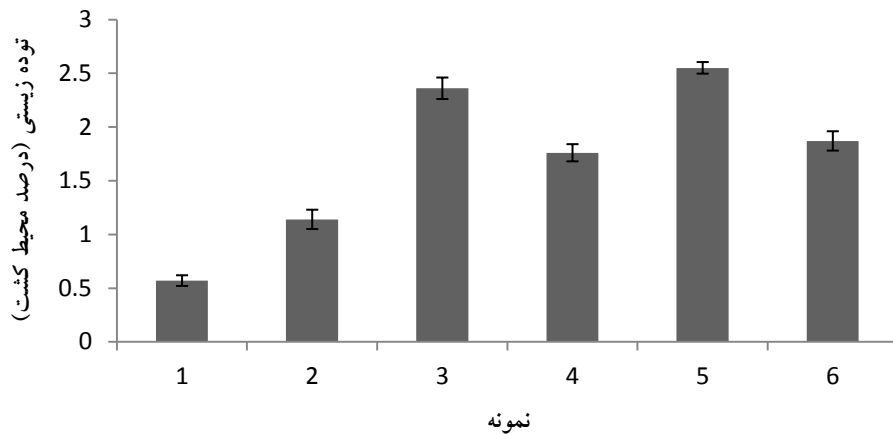
شکل ۲. تأثیر pH بر میزان تولید توده خشک زیستی بوسیله گونه جلبک دونالیناسالینا

تأثیر منبع کربنی دی اکسید کربن بر رشد توده زیستی و رنگدانه لیکوپن

در این مرحله از تحقیق از دی اکسید کربن با میزان ۱۲٪ حجمی استفاده شد سطوح متفاوت سویا، گلوکز و نانوذره منیزیم نیز برای بررسی بیشتر تأثیر همزمان کربن آلی و معدنی بر میزان لیکوپن انجام شد. عناصر معدنی ذکر شده نیز استفاده شد و pH بر روی ۷/۵ تنظیم شد. نتایج نشان داد که کمترین میزان لیکوپن (۰/۳mg/۱۰۰gr) در نمونه بدست آمد که فقط از دی اکسید کربن به همراه عناصر معدنی استفاده شد. افزودن نانو ذره منیزیم به تنهایی علاوه بر محرک رشد سلول باعث شد میزان لیکوپن تا ۰/۹۴ میلی گرم در ۱۰۰ گرم وزن خشک نمونه افزایش یابد. افزودن منبع نیتروژنی سویا به محیط دی اکسید کربن تأثیر قابل توجهی در افزایش توده زیستی و رنگدانه لیکوپن داشت. افزودن منبع کربنی و نیتروژنی به این محیط باعث شد میزان وزن خشک توده زیستی افزایش قابل توجهی پیدا کرده در حالیکه تأثیر منفی در میزان تجمع لیکوپن در توده زیستی داشت. بیشترین میزان لیکوپن در نمونه‌های بدست آمد که علاوه بر دی اکسید کربن، گلوکز و سویا نیز به عنوان منبع کربنی و نیتروژنی آلی به محیط کشت اضافه شده بود. وزن خشک توده زیستی با افزایش نانو ذره منیزیم افزایش یافت و افزودن سویا و گلوکز به این محیط محرک بیشتر توده زیستی بود. نتایج نشان داد افزایش بیشتر میزان نیتروژن و کربن باعث شد که میزان توده زیستی کاهش یابد. این نتایج با نتایج Srinivasan و همکاران (۲۰۱۵) و Giordino (۱۹۹۷) و AL-Adali (۲۰۱۲) مطابقت داشت.



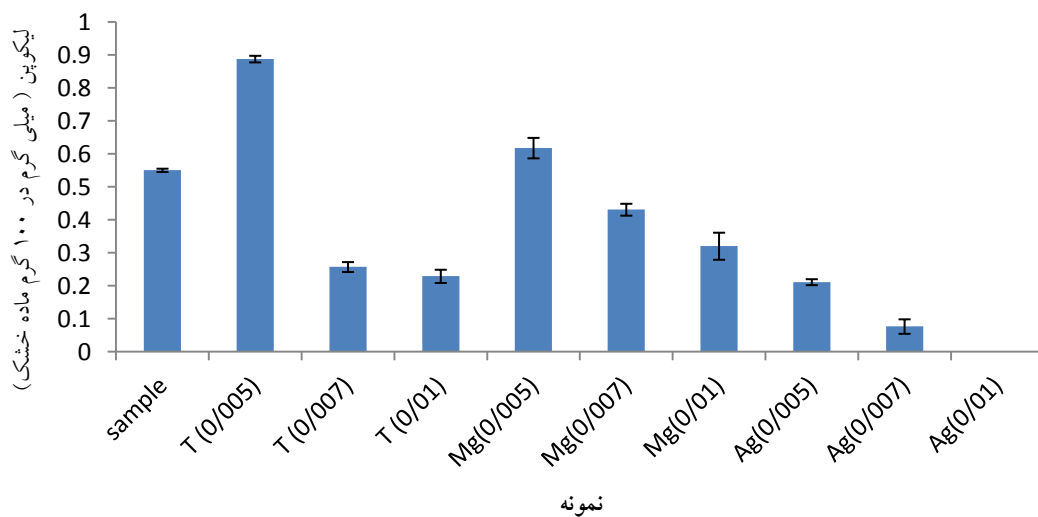
شکل ۳- تأثیر منبع کربنی دی اکسید کربن بر تولید لیکوپن بوسیله جلبک دونالیناسالینا



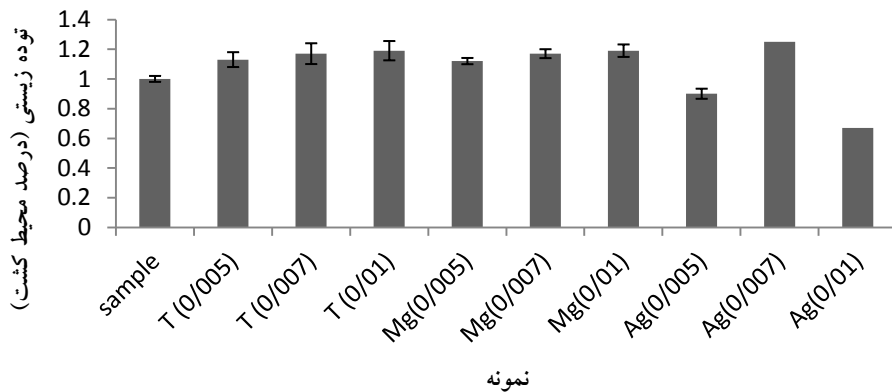
شکل ۴- تأثیر منبع کربنی دی اکسید کربن بر تولید توده زیستی بوسیله گونه جلبک *Dunaliella salina*

تأثیر نانوذرات نقره، منیزیم و تیتانیوم بر تولید رنگدانه و رشد توده زیستی

گلوکز، پپتون گوشت و ۵ گرم نمک و pH برابر ۷/۵ برای هر نمونه و افزودن سه نانوذره نقره، منیزیم و تیتانیوم در مقادیر مختلف جهت رشد و تولید رنگدانه بررسی شد. نتایج نشان داد که افزایش نانو ذره از سطح ۰/۰۰۵ تا ۰/۰۱ درصد باعث شده که میزان رنگدانه کاهش یابد بیشتر بین میزان رنگدانه در سطح ۰/۰۰۵ درصد بدست آمد. افزودن نانو ذره تأثیر قابل توجه بر روی رشد و وزن خشک توده زیستی نداشت. نانو ذره تیتانیوم ما بین نانو ذره‌ها بیشتر تأثیر را در تولید رنگدانه‌ها داشت. این نتایج با نتایج Clark در سال ۲۰۰۱ مطابقت داشت.



شکل ۵- تأثیر نانوذرات نقره، منیزیم و تیتانیوم بر تولید رنگدانه لیکوپین در جلبک *Dunaliella salina*

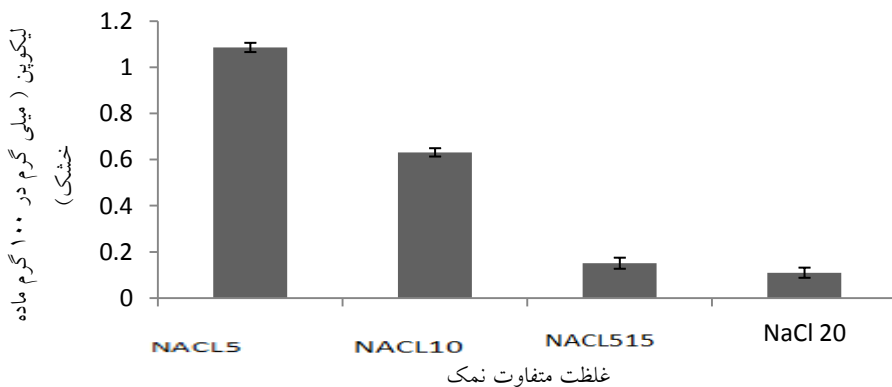


شکل ۶- تأثیر نانوذرات نقره، منیزیم و تیتانیوم بر تولید توده زیستی در جلبک دونالیناسالینا

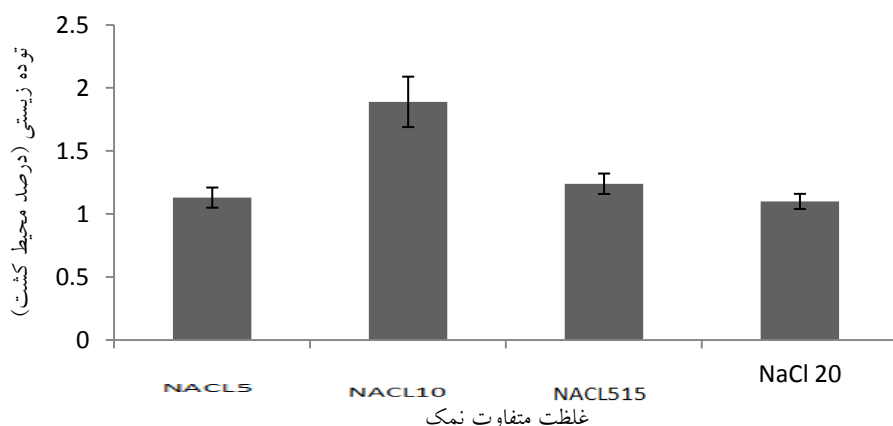
تأثیر مقدار نمک بر میزان تولید توده زیستی و رنگدانه در دو محیط نیتروژنی پپتون گوشت و سویا

در شرایط فشار اسمزی بالا بسیاری از جلبک‌های هالوفیلیک شروع به تجمع K^+ و Cl^- می‌کنند (Oren-Shamir, ۱۹۸۹). در حالیکه در جلبک دولینیا به علت فعالیت بالای پمپ Na^+ محتوی یون‌های داخل سلول کاهش می‌یابد (Katz et al., ۲۰۰۷) از اینرو در فشار اسمزی بالا جلبک شروع به تجمع گلیسرول کرده که فشار اسمزی داخل سلول را حفظ کند (Chitlaru and Pick ۱۹۹۱). تجمع و متورم شدن جلبک *Dunaliella* به عنوان نشانه‌ای به تغییرات اسمزی محیط کشت می‌باشد که باعث فعالیت آنزیم‌های غشاء شده و محرک تجمع گلیسرول در سلول است جریان کربن در تولید و تجمع نشاسته در کلروپلاست یا وارد شدن در فرایند تجمع رنگدانه و گلیسرول تحت تأثیر شوک‌های اسمزی محیط است (OrenShamir et al. ۱۹۸۹). تحقیقات نشان داده که میزان نمک محرک تولید رنگدانه می‌باشد کمتر از بهینه نمک به منظور رشد سلول می‌باشد (Borowitzka et al. ۲۰۰۷; Borowitzka and Borowitzka ۱۹۸۸).

مقالات زیادی بر تأثیر نمک بر تولید رنگدانه انجام شده و تأثیر این محرک بر روی رشد و تولید رنگدانه انجام شده است از اینرو در این تحقیق از دو منبع نیتروژنی متفاوت به همراه نمک و تأثیر آن بر روی رشد و تولید رنگدانه بررسی شد. نتایج نشان داد که بالاترین میزان لیکوپن در سطح ۵ درصد نمک در محیط کشتی که با منبع پروتئینی سویا غنی شده بود بدست آمد. در حالی که روند رشد نشان می‌دهد بیشترین میزان رشد در سطح ۱۰ درصد نمک مشاهده شد. افزایش بیشتر نمک بالای ۵ درصد باعث شد که میزان لیکوپن کاهش یافت.

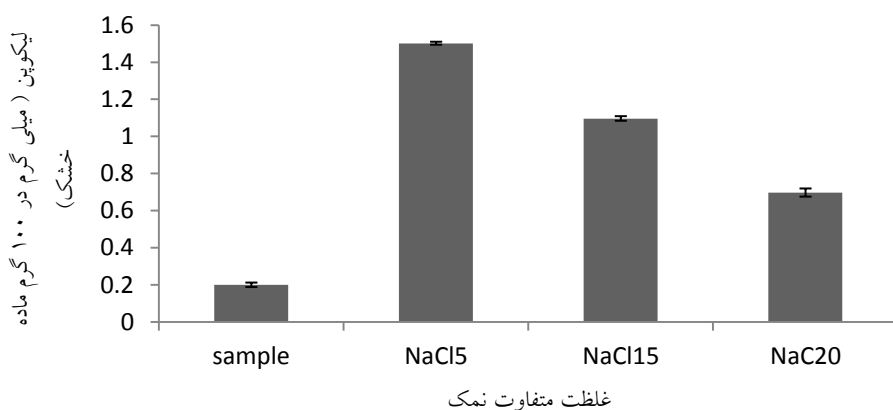


شکل ۷- تأثیر میزان نمک بر میزان تولید رنگدانه لیکوپن در محیط نیتروژنی سویا

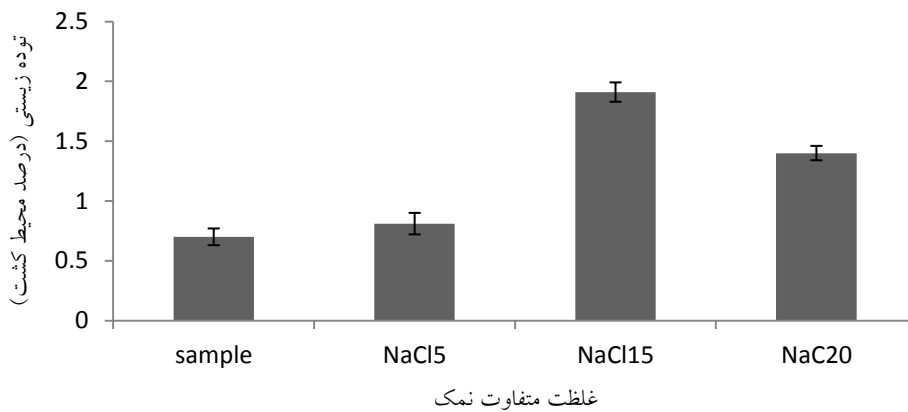


شکل ۸- تأثیر میزان نمک بر میزان تولید توده زیستی در محیط نیتروژنی سویا

در مرحله بعد تحقیق از همان منابع و متغییر نمک مرحله قبل استفاده شد با این تفاوت که منبع نیتروژنی پپتون گوشت بود. نتایج نشان داد که همانند مرحله قبل سطح ۵ درصد نمک محرک تولید لیکوپین بود و افزایش بیشتر نمک تأثیر منفی در تولید لیکوپین داشت و همچنین سطح ۱۵ درصد نمک محرک رشد جلبک بود که در سطوح بالاتر میزان رشد کاهش یافت. تفاوت در این بود که منبع نیتروژنی پپتون محرک تولید بالاتر لیکوپین بود. این نتایج با نتایج Al-(۲۰۱۲) Adali مطابقت داشت.



شکل ۹- تأثیر میزان نمک بر تولید رنگدانه لیکوپین در جلبک دونالیناسالینا در محیط نیتروژنی پپتون گوشت



شکل ۱۰- تأثیر میزان نمک بر تولید توده زیستی در جلبک *دونالینا سالینا* در محیط نیتروژنی پپتون گوشت

نتیجه گیری

با توجه به نتایج بدست آمده از تحقیق فوق چنین نتیجه گیری می شود که می توان از جلبک *دونالینا سالینا* به عنوان منبع خوب لیکوپن استفاده نمود. نتایج نشان داد که افزایش pH بیشتر از مقدار ۷/۵ تأثیر منفی بر تولید لیکوپن و رشد توده زیستی در محیط فرموله شده داشت و همین طور در pH پائین تر از ۷/۵ نیز همین روند را شاهد بودیم. این نتیجه ممکن است به حالیت بیشتر لیکوپن در این pH نسبت به pH های دیگر نسبت داده شود. نتایج بدست آمده از استفاده از گاز دی اکسید کربن به عنوان منبع کربنی معدنی به همراه منبع کربنی آلی گلوکز و نیتروژنی آلی پپتون گوشت نشان داد که میزان تولید لیکوپن در این محیط کشت افزایش یافته بود. در حالی که استفاده از گاز دی اکسید کربن بدون اضافه کردن منبع کربنی آلی گلوکز و منبع نیتروژنی آلی پپتون گوشت تأثیر اندکی در تولید لیکوپن و رشد توده زیستی داشت. نتایج نشان داد که اضافه کردن نانوذره منیزیوم به محیط کشت، محرک تولید لیکوپن بود به طوری که (۰/۰۰۵ mg/l) از این نانو ذره باعث افزایش تولید لیکوپن در محیط کشت حاوی منبع کربنی معدنی دی اکسید کربن شد. استفاده ۳ نانوذره منیزیوم، تیتانیوم و نقره در محیط کشت نشان داد که افزودن این سه نانو ذره تأثیر قابل ملاحظه ای در رشد توده زیستی نداشتند. نتایج نشان داد که استفاده از نانوذره تیتانیوم در سطح ۰/۰۰۵ درصد در محیط کشت تأثیر مثبت در میزان تولید لیکوپن در این گونه جلبک نسبت به نمونه شاهد داشت. مقایسه بین تأثیر این سه نانو ذره در محیط کشت نشان داد که استفاده از نانوذره تیتانیوم در رقت ۰/۰۰۷ در محیط کشت باعث کاهش تولید لیکوپن در این جلبک نسبت به نانوذره نقره و منیزیوم شد. نتایج مقایسه بین دو محیط نیتروژنی سویا و پپتون گوشت نشان داد که افزایش نمک تأثیر مثبت در تولید لیکوپن در نمونه دارای منبع نیتروژنی سویا داشت.

References

- Al-Adali, K. (۲۰۱۲). Effect of Salinity, Temperature, Nutrients and CO₂ on Growth of Two Species Journal of King Abdulaziz University. ۲۳(۱): p.۵۷.
- Avron, M. and Ben-Amotz, A. (۱۹۹۲). *Dunaliella*, physiology, biochemistry and biotechnology. CRC Press, Boca Raton, pp: ۱-۱۵.
- Ben-Amotz A, Katz A, Avron M, ۱۹۸۲. Accumulation of β -carotene in the halotolerant algae: purification and characterization of β -carotene-rich globules from *Dunaliella bardawil*(chlorophyceae), J Physiol ۱۸: ۵۲۹-۵۳۷

- Bental, M. and Degani, H. (۱۹۹۲). NMR studies of *Dunaliella*, In: *Dunaliella: physiology, biochemistry and biotechnology*, (Avron, M. and Ben-Amotz, A.). CRC Press, Boca Raton, ۱۶۵-۱۹۴.
- Borowitzka, M. A. And. Siva, Ch. J. ۲۰۰۷. The taxonomy of the genus *Dunaliella* (chlorophyta, Dunaliellales) with emphasis on the marine and halophilic species. *Journal of Applied Phycology*. ۱۱۹, ۵۵۹-۵۶۷
- Borowitzka, M. A., Borowitzka, L. J. and Kessly, D. ۱۹۹۰. Effect of salinity increase on crotenoid accumulation in the green alga *Dunaliella salina*. *Journal of Applied Phycology*. ۲(۲), ۱۱۱-۱۱۹
- Borowitzka MA, Borowitzka LJ (۱۹۸۸) *Dunaliella*. In: Borowitzka MA, Borowitzka LJ (eds) *Microalgal biotechnology*, Cambridge University Press, New York, p ۴۷۷
- Borowitzka, A. M. and Siva, C. J. ۲۰۰۷. The taxonomy of the genus *Dunaliella*, *Journal of Applied Phycology*. ۱۹, ۵۶۷-۵۹۰.
- Chitlaru, E. and Pick, U. ۱۹۹۱. Regulation of glycerol synthesis in response to osmotic changes in *Dunaliella*. *Plant Physiology*. ۹۶, ۵۰-۶۰.
- Gimmler, H., E. M. Moller (۱۹۸۱): salinity-dependent regulation of starch and glycerol metabolism in *dunaliella parva*. *plant cell and environment*, ۴, p. ۳۶۷-۳۷۵.
- Giordano, M and G. Bowes (۱۹۹۷). Gas exchange and C Allocation in *Dunaliella salina* cells in response to the N source and CO_2 concentration used for growth., *plant physiol.*, ۱۱۵, p. ۱۰۴۹-۱۰۵۶.
- Hosseini Tafreshi, A. and Shariati, M. ۲۰۰۹. *Dunaliella* biotechnology, methods and applications. *Journal of Applied Microbiology*. ۱۰۷, ۱۴-۳۵.
- Katz, A., Waridel, P., Shevchenko, A. and Pick, U. ۲۰۰۷. Salt-induced changes in the plasma membrane proteome of the halotolerant alga *Dunaliella salina* as revealed by blue native gel electrophoresis and Nano-LC-MS/MS analysis. *Molecular and Cellular Proteomics*. ۶(۹), ۱۴۵۹-۱۴۷۲
- loeblich, L.A. (۱۹۷۲). *Studies on the Brine Flagellate Dunaliella salina*. ph.D. thesis, university of California san Diego.
- Oren-Shamir M, Pick U, Avron M (۱۹۸۹) Involvement of the plasma membrane ATPase in the osmoregulatory mechanism of the alga, *Dunaliella salina*. *Plant Physiol* ۸۹: ۱۲۵۸-۱۲۶۳
- Preisig, H. R. ۱۹۹۲. Morphology and Taxonomy. In: *Dunaliella: physiology, biochemistry and biotechnology*. Boca Raton, CRC Press. ۱-۲۶.
- Shariati, M. ۲۰۰۳. Characterization of three species of *Dunaliella salina*, *Dunaliella parva* and *Dunaliella pseudosalina* isolated from salt marsh of Gave Khoni of Isfahan-IRAN. *Iranian Journal of Science and Technology* ۱۹۰-۱۸۵, ۲۷
- Srinivasan, R., et al. (۲۰۱۵). Effect of dissolved inorganic carbon on β -carotene and fatty acid production in *Dunaliella* sp. *Applied biochemistry and biotechnology*, ۱۷۵(۶): p. ۲۸۹۵-۲۹۰۶.
- Telfer, A. ۲۰۰۲. What is beta-carotene doing in the photosystem II reaction centre?. *Journal of Biology Science*. ۳۵۷, ۱۴۳۱-۱۴۳۹

Abstract

The prime objective of this research was to evaluate the lycopene production in *Dunaliella salina* using various media. The results indicated that the highest content of lycopene and dry weight biomass was achieved in media containing glucose and beef peptone which pH was adjusted at 7.0. CO_2 as inorganic carbon had a negligible effect on lycopene and biomass production while adding nano magnesium and soybean protein in mentioned media caused the lycopene and biomass production to improve. On the other hand, adding organic carbon (glucose) at the high quantity had positive effect on biomass production while that reduced lycopene content comparing to low glucose containing media. Three treatments which titanium, Magnesium and Ag nanoparticles were used as variable factors on lycopene and biomass production enhanced lycopene productions at 0.00 g/l. in overall evaluations, titanium was more effective on lycopene production than the rest. NaCl as a metabolic regulator stimulate *Dunaliella salina* to produce higher content of secondary metabolisms so two defined media containing soybean and beef pepton were considered to evaluate the effect of various contents of NaCl on lycopene and biomass productions. In two media, 0 percent of NaCl had positive effects on lycopene production and higher content of it had deteriorated effect on it. Considering the biomass productions, the highest quantity of biomass were attained in 10 percentage of NaCl and the trend had reversed at the any higher content.

Key words: *Dunaliella salina*, lycopene, NaCl, Growth and nano particles

مطالعه جمعیت زئوپلانکتون در استخرهای پرورش ماهیان گرمابی به عنوان تغذیه کننده های

جلبک های میکروسکوپی _ استان مازندران

فاطمه سادات تهامی^{۱،۲}، مژگان روشن طبری^۱، علیرضا کیهان ثانی^۱

۱- پژوهشکده اکولوژی دریای خزر، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و

ترویج کشاورزی، فرح آباد، ساری، ایران

۲- گروه پژوهشی شیلات و آلاینده های آبی خزر (کاسپین)، وزارت علوم، تحقیقات و فناوری، ساری،

ایران.

*Farnaztahamy@Gmail.com

چکیده

شناخت زئوپلانکتون های هر اکوسیستم آبی در مدیریت بهتر آن اکوسیستم بسیار موثر است و از آنجایی که زئوپلانکتون ها نقش انتقال مواد اولیه فتوسنتز شده توسط فیتوپلانکتون ها به سایر موجودات در سطوح بالاتر را دارند دارای اهمیت بسزایی هستند. این مطالعه نتیجه تحقیقی در سال ۱۳۹۱ است. در این تحقیق زئوپلانکتون از چهار استخر گرمابی واقع در استان مازندران، با موقعیت جغرافیایی "۶۸°۳۶ شمالی و "۷۶'۴۱" ۵۳ شرقی مورد مطالعه قرار گرفتند. هر یک از استخرها به مساحت ۳ هکتار و مستطیل شکل بودند که هر یک جداگانه از آب چاه آبرگیری می شدند و تحت یک مدیریت قرار داشتند. نمونه برداری توسط تور با چشمه ۵۵ میکرون طی ماه های تیر، مرداد و شهریور، هر ۱۵ روز نمونه برداری شد و سپس در آزمایشگاه شناسایی، شمارش و اطلاعات داده پردازی گردید. در تحقیق حاضر ۶ گروه زئوپلانکتونی شامل ۱ جنس Copepoda (پاروپایان)، ۹ جنس Rotifera (گردان تنان) و ۵ جنس Protozoa (آغازیان)، ۱ جنس Cladocera (انتن منشعبان)، ۱ جنس Mollusca (نرم تنان) و ۲ جنس Cirripedia (مژه پایان) شناسایی شد. بیشترین درصد گروه های مختلف زئوپلانکتون در استخرهای ماهیان گرمابی مربوط به Protozoa (۴۴٪) بود که مربوط به دو جنس Ciliata با میانگین تراکم $8544/7 \pm 7$ (تعداد در مترمکعب) و Vorticella با میانگین تراکم $5128/05 \pm 05$ (تعداد در مترمکعب) بود ولی از آنجایی که این گروه از نظر سایز و اندازه کوچکند لذا روتیفرها بیشترین زی توده را داشتند که *Brachionus sp.* غالب بود که ۶۵٪ کل زی توده به این جنس اختصاص داشت که نشان دهنده شرایط نسبتاً مناسب تغذیه ماهیان در استخرها می باشد.

کلمات کلیدی: زئوپلانکتون؛ استخرهای گرمابی؛ تنوع زیستی؛ تراکم؛ زی توده

مقدمه

جوامع زئوپلانکتونی به طور دایم در منابع آبی مختلف حضور فعال داشته و یکی از بخش های مهم اکوسیستم های آبی همچون استخرهای پرورشی آبزیان هستند و نقش مهمی را در این اکوسیستم ها دارند. زئوپلانکتون های اکوسیستم های آبی شامل گروه های مختلفی همچون روتیفرها، کلا دوسرها و کوپه پودها و غیره می باشند (Salavatian *et al.*, ۲۰۱۴). زئوپلانکتون ها موقعیت کلیدی در زنجیره غذایی دارند به این صورت که زئوپلانکتون های گیاه خوار از فیتوپلانکتون ها تغذیه می کنند و خود، غذای مهمی برای جانوران در سطوح بالاتر و بالاخره ماهی ها و غیره می شوند. در واقع آنها انرژی که به وسیله فیتوپلانکتون ها با استفاده از نور خورشید ساخته می شود را به سطوح بالاتر جانوری (ماهی ها و غیره) که برای انسان ها مفیدند، انتقال می دهند (Shinde *et al.*, ۲۰۱۲). در این میان کوپه پودها و کلا دوسرها جزء رژیم اصلی غذایی ماهیان بوده و نقش مهمی در رشد بسیاری از گونه های ماهیان ایفا می کنند و به دلیل اندازه مناسب، ایجاد رشد و

بازماندگی قابل قبول، افزایش کارایی سیستم ایمنی و مقابله با عوامل بیماریزا و استرس‌های انگلی و محیطی اهمیت بالایی در تغذیه گونه‌های کپور به‌خصوص گونه‌های فیلتر فیدر دارند (Chinavenmeni & Munuswamy, ۲۰۰۷). تفاوت‌ها در فراوانی و ترکیب زئوپلانکتونی، تابع زمان، مکان و مدیریت تغذیه‌ای و کارگاهی در طی دوره پرورش است (Verma *et al.*, ۲۰۱۳). همچنین حضور و یا عدم حضور گونه‌های معین ماهی نقش تعیین کننده‌ای بر روی تراکم جمعیتی زئوپلانکتون‌ها دارد. تعیین فراوانی قابل استناد جمعیت زئوپلانکتون‌ها و بررسی نقش کلیدی آنها در تولید و پویایی استخرهای پرورش ماهی نیاز به انجام تحقیقات علمی بیشتر می‌باشد (Verreth, ۱۹۹۰). در سراسر جهان مطالعات مختلفی روی تنوع زیستی جوامع پلانکتونی در استخرهای پرورش ماهی و آبی‌پروری صورت گرفته است (Cook, *et al.*, ۲۰۰۹) به طوری که در داخل کشور نیز پژوهش‌های متعددی درباره جوامع زئوپلانکتونی استخرهای پرورش ماهیان گرم آبی و خاویاری انجام شده است (Mehdi Zadeh, *et al.*, ۲۰۰۶ و Yousefian, *et al.*, ۲۰۰۸). از اینرو با اعمال مدیریت صحیح جمعیت پلانکتون‌ها در استخرهای پرورش ماهی می‌توان به‌نتایج مطلوبی دست یافت (Asghari & Motahari, ۲۰۰۹). مطالعات متعددی بر روی انواع مختلف از زئوپلانکتون‌ها در استخرهای پرورشی انجام گرفته است که از آن جمله می‌توان به مطالعات (اسلامزاده و همکاران، ۱۳۹۶) بررسی ترکیب گونه‌ای جوامع زئوپلانکتونی در استخرهای پرورش ماهیان گرمابی و نیز مطالعه زئوپلانکتون‌ها و فیتوپلانکتون‌ها در استخرهای خاکی پرورش میگو پارسفید (Park & Shin, ۲۰۰۷) و همچنین مطالعات (Verma *et al.*, ۲۰۱۳) بر روی تنوع ماهیانه جمعیت زئوپلانکتونی در مزارع پرورش ماهی را اشاره نمود. هدف از این مطالعه بررسی ترکیب زئوپلانکتون استخرهای پرورش ماهی گرم‌آبی است، از این‌رو در مطالعه حاضر ساختار و دینامیک ۴ استخر مزارع پرورش توام ماهی کپور معمولی و کپور ماهیان چینی در منطقه مازندران مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

این مطالعه نتیجه تحقیقی در سال ۱۳۹۱ است. برای انجام این مطالعه زئوپلانکتون‌های چهار استخر گرم‌آبی مزارع پرورش توام ماهی کپور معمولی و کپور ماهیان چینی واقع در استان مازندران، با موقعیت جغرافیایی "۶۸°۱۲' شمالی و ۴۱°۴۱' شرقی مورد مطالعه قرار گرفتند. هر یک از استخرها به مساحت ۳ هکتار و مستطیل شکل بودند که هر یک جداگانه از آب چاه آبیگری می‌شدند و دارای شرایط یکسان بوده و تحت یک مدیریت قرار داشتند. نمونه برداری زئوپلانکتون‌ها توسط تور زئوپلانکتون‌گیر با اندازه چشمه ۵۵ میکرون صورت گرفت. بدین طریق که از فاصله سه متری کنار استخر حدود ۴۰ لیتر آب استخر توسط تور زئوپلانکتون‌گیر از چهار نقطه استخر فیلتر گردید و سپس نمونه را در شیشه ریخته و توسط فرمالین ۴٪ فیکس گردید (Zhong *et al.*, ۲۰۱۱) و (Thompson, ۱۹۹۷). نمونه‌برداری از زئوپلانکتون‌ها نیز در یک دوره پرورش (خرداد تا مرداد ماه) مدت ۳ ماه، در فواصل ۱۵ روز یک بار و در ساعات ۱۲:۳۰ تا ۱۳ ظهر انجام گرفت. سپس تمام نمونه‌ها به آزمایشگاه انتقال داده شدند. در آزمایشگاه، ابتدا آب بالای نمونه‌ها تخلیه و در یک استوانه مدرج ریخته شد و سپس محتویات با دقت بهم زده شده و همگن شدند، سپس نیم سی سی را توسط نمونه بردار (sampler) گرفته و با احتیاط بداخل لام بوگارف ریخته شد. به‌منظور دقت در کار نمونه‌ها دو بار نیم سی سی و یکبار ۱۰ سی سی شناسایی و شمارش گردیدند تا خطای کار کاهش یابد و سپس تعداد هر یک از گونه‌ها در لیتر محاسبه گردید. نمونه‌ها با استفاده از منابع معتبر شناسایی و شمارش شدند (Pontin, ۲۰۱۳), (Kotykova, ۱۹۷۰) و (Prescott, ۱۹۷۰). سپس تعداد به دست آمده به حجم آب فیلتر شده و نهایتاً به استخر تعمیم داده شد. جهت محاسبه فراوانی زئوپلانکتون‌ها در یک لیتر نمونه آب از فرمول زیر استفاده گردید (Salavatian *et al.*, ۲۰۱۴).

$$(N \cdot v) / V = D$$

D=تعداد کل زئوپلانکتون‌ها در هر لیتر آب فیلتر شده

N = تعداد گونه‌های زئوپلانکتون شمارش شده در ۱ سی سی از نمونه
 V = حجم نمونه شمارش شده بر حسب سانتیمتر مکعب
 V = حجم آب برداشت شده بر حسب سانتیمتر مکعب
 سپس تراکم (A) با استفاده از رابطه $A = [N / (V_1 \times V_2) / V]$ محاسبه شد
 (Southwood et al., ۲۰۰۰).

اطلاعات بدست آمده پس از تنظیم داده‌ها، در برنامه Excell و SPSS نسخه ۱۶، میانگین و انحراف معیار نمونه‌ها محاسبه و مورد مقایسه قرار گرفت و در جداول مربوط ارائه گردیده‌است و نیز برای تحلیل داده‌ها از جنبه تجزیه و تحلیل آماری، تراکم نهایی استخرهای مختلف توسط آنالیز واریانس یکطرفه (One Way ANOVA) در سطح احتمال ۰/۰۵ درصد مقایسه شد (Sokal & Rohlf, ۱۹۸۱).

نتایج

طی بررسی‌های انجام شده در آب استخر، مجموعاً ۲۷ گونه از ۶ گروه مشاهده شده‌است که شامل Copepoda (۲ گونه)، Rotifera (۱۱ گونه)، Protozoa (۵ گونه)، Cladocera (۱ گونه)، Mollusca (۱ گونه) و لارو موجودات بنتیک (۴ گونه)، Cirripedia (مژه‌پایان) (۳ گونه) بوده‌است. لارو حشرات نیز در آب استخرهای مورد مطالعه مشاهده گردیده‌است (جدول ۱).

در این مطالعه از گروه‌های مختلف زئوپلانکتونی، جنس‌هایی Ciliata, Vorticella, Arcella, Foraminifera, Tintinopsis از خانواده Protozoa و جنس‌های Brachionus, Harringia, Trichotria, Euchlanis, Synchaeta, Cephalodella, Lecana, Keratella, Notommata از خانواده Rotifera مشاهده شد که بیشترین میانگین تراکم و زی‌توده $9862/9 \pm 9$ عدد در متر مکعب بود و $19/73 \pm 0/06$ میلی گرم در متر مکعب بود که به Brachionus sp. تعلق داشت و جنس Cyclopoida از خانواده Copepoda و جنس Cladocera از خانواده Cladocera مشاهده شد که کمترین تراکم و زی‌توده به این گروه تعلق داشت. همچنین Lamellibranchiata از Mollusca تراکم $2476/34 \pm 4483/98$ عدد در متر مکعب و زی‌توده $8/97 \pm 7/91$ میلی گرم در متر مکعب بود و نیز جنس‌های Sypris و Balanus از گروه Cirripedia مشاهده شد که تراکم چندانی نداشت (جدول ۱).

در استخرهای مورد مطالعه شاخه Mollusca با حداکثر میانگین تراکم (9824 ± 17865) عدد در متر مکعب در استخر شماره ۱ حداکثر گروه مروپلانکتون را در استخرهای مورد مطالعه تشکیل می‌دادند و سپس شاخه Rotifera با حداکثر تراکم $(87/52 \pm 9/37)$ عدد در متر مکعب در استخر شماره ۴ گروه دوم را از نظر تراکم زئوپلانکتونی تشکیل می‌دادند و گروه Cladocera با حداکثر تراکم (74 ± 169) عدد در متر مکعب در استخر شماره ۱ گروه سوم و سپس Copepoda با حداکثر تراکم $(67/16 \pm 1/13)$ عدد در متر مکعب در استخر شماره ۴ گروه چهارم را از نظر تراکم زئوپلانکتونی تشکیل می‌دادند و گروه‌های Bentic, Protozoa و Cirripedia تراکم ناچیزی داشتند که این تغییرات با آزمون آماری (One Way ANOVA) معنی دار بوده است ($P < 0/05$) (جدول ۲).

جدول ۱. فهرست و میانگین تراکم (تعداد در متر مکعب) و زی‌توده (میلی گرم در متر مکعب) زئوپلانکتون‌های مشاهده شده در

استخرهای مورد مطالعه در در استان مازندران در یک دوره پرورش			
شاخه	گونه	میانگین تراکم	میانگین زی‌توده
Copepoda	Cyclopoida N ₂	33/88 ± 88	0/07 ± 0/01
	Cyclopoida N ₃	27/6 ± 6	0/08 ± 0/01
Brachionus sp.	Brachionus (ova)	9862/9 ± 9	19/73 ± 0/06
	Harringia sp.	1837/53 ± 53	3/68 ± 0/22
		739/15 ± 15	1/48 ± 0/01

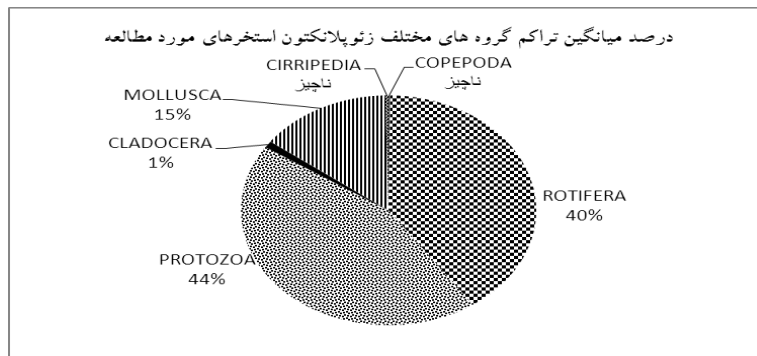
۰/۰±۰/۰	۱۱/۵±۵	<i>Trichotria pocillum</i>	
۰/۰±۰/۰	۸/۱۸±۱۸	<i>Euchlanis sp.</i>	
۰/۰±۰/۰	۲۲/۲۵±۲۵	<i>Notommata sp.</i>	Rotifera
۰/۰±۰/۰	۰/۲۵±۲۵	<i>Keratella quadrata</i>	
۰/۰±۰/۰	۰/۰۵±۰۵	<i>Lecana bulba</i>	
۰/۰±۰/۰	۰/۳۸±۳۸	<i>Cephalodella</i>	
۰/۰±۰/۰	۰/۶۵±۶۵	<i>Synchaeta stylata</i>	
۰/۰±۰/۰	۶/۹۸±۹۸	Unknown	
۵/۹۸±۰/۴۵	۸۵۴۴/۷±۷	Ciliata	
۳/۵۹±۰/۲۷	۵۱۲۸/۰۵±۰۵	<i>Vorticella</i>	
۰/۰±۰/۰	۳/۳۳±۳۳	Foraminifera	Protozoa
۰/۰±۰/۰	۰/۱۸±۱۸	<i>Arcella vulgaris</i>	
۰/۰±۰/۰	۰/۰۳±۰/۸	<i>Tintinopsis sp.</i>	
ناچیز	ناچیز	Cladocera	Cladocera
۸/۹۷±۷/۹۱	۲۴۷۶/۳۴ ± ۴۴۸۳/۹۸	Lamellibranchiata	Mollusca
۰/۰±۰/۰	۰/۰۵±۱	Balanus N _۱	
۰/۰±۰/۰	۰/۰۷±۰/۹۵	Balanus N _۲	Cirripedia
۱/۳۱±۰/۲۱	۱۷/۶۳±۱۰۹/۳۸	<i>Sypris balanus</i>	
۰/۰±۰/۰	۰/۰۵±۰۵	Nereis larvae	
۰/۰±۰/۰	۰/۰۱±۰۱	Nematoda	BENTIC
۰/۰±۰/۰	۰/۰۲±۰۱	Chironomid sp	
۰/۰±۰/۰	۰/۰۵±۰۳	Unknown	

جدول ۲. فهرست و میانگین تراکم (تعداد در مترمکعب) و زی توده (میلی گرم در مترمکعب) زئوپلانکتون های مشاهده شده در استخرهای مورد مطالعه در استان مازندران در یک دوره پرورش

نام گروه زئوپلانکتون	تراکم/زی توده	استخر ۱	استخر ۲	استخر ۳	استخر ۴
Copepoda	تراکم	۷±۳/۶	۷/۳±۷/۶۳	۶/۵±۸/۴۴	۶۷/۱۶±۱/۱۳
	زی توده	۰/۱۳±۰/۰۱		۰/۱۱±۰/۰۲	۰/۳۵±۰/۰۵
Rotifera	تراکم	۸/۹۲±۷/۴۳	۱/۸±۵/۲۱	۵/۴۶±۱/۳	۸۷/۵۲±۹/۳۷
	زی توده	۰/۰۴±۰/۰۱		۶/۵۱±۰/۹۱	۷/۳۸±۰/۱۰
Protozoa	تراکم	۳/۴±۱/۶	۳/۰±۵/۱	۷/۲±۶/۲	۱۱/۰±۵/۰
	زی توده	۰/۰۱±۰/۰۰		۰/۱۱±۰/۰۱	۰/۰۴±۰/۰۰
Cladocera	تراکم	۷۴±۱۶۹	۳±۹	۱۱±۵۳	۴/۸±۷/۲
	زی توده	ناچیز	ناچیز	ناچیز	ناچیز
Mollusca	تراکم	۹۸۲۴±۱۷۸۶۵	۱/۰±۲/۰	۸۱±۴/۷	۲۵/۰±۳/۳
	زی توده	ناچیز		۰/۱۶±۰/۱۶	ناچیز
Bentic	تراکم	۲/۸±۱/۱۲	۴/۳±۵/۳	۸/۴±۱/۵	۳۷/۷±۰/۰۷
	زی توده	۶/۳۲±۵/۱۵		۰/۰۱±۰/۰۱	۰/۰۷±۰/۰۰
Cirripedia	تراکم	۰±۰	۲/۰±۴/۲	۶/۷±۶/۴	۱۷/۱±۳/۵
	زی توده	۰/۰۱±۰/۰۰		۵/۲۲±۰/۸۳	۰/۰۴±۰/۰۱

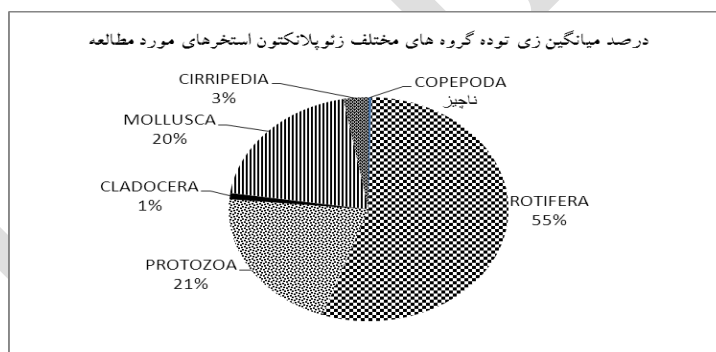
از نظر مقدار زی توده، گروه Rotifera با میانگین زی توده ۸۵/۸۷±۰/۱۹ میلی گرم در متر مکعب بیشترین زی توده را در استخر شماره ۱ داشت. دو گروه Protozoa و Mollusca به ترتیب با میانگین زی توده ۳۸/۱۳۵±۲/۸۶۳ و ۳۱/۴۸±۳۱/۴۸ میلی گرم در مترمکعب در رتبه های دوم و سوم از نظر زی توده قرار داشتند و گروه های Cladocera، Bentic و Cirripedia سهم ناچیزی را در میزان زی توده استخرهای مورد مطالعه داشتند. از جنبه میانگین تراکم

نهایی در جوامع زئوپلانکتونی در گروه‌های مختلف زوپلانکتون با آزمون آماری (One Way ANOVA) اختلاف معنی‌داری وجود داشت ($P < 0.05$) (جدول ۲).



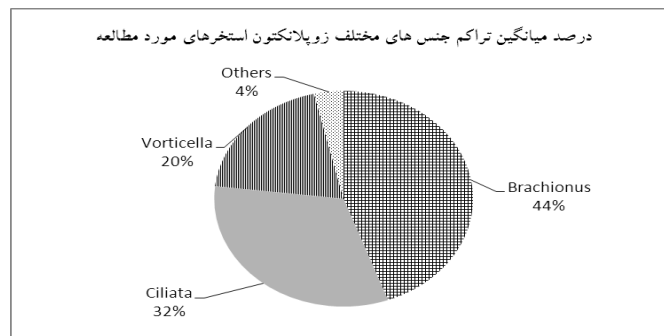
شکل ۱. درصد میانگین تراکم گروه‌های مختلف زوپلانکتون مشاهده شده در استخرهای مورد مطالعه در استان مازندران در یک دوره پرورش

بیشترین درصد گروه‌های مختلف زوپلانکتون در استخرهای ماهیان گرمابی مربوط به Protozoa (۴۴٪) و سپس Rotifera (۴۰٪) بوده است. Mollusca با ۱۵٪ جمعیت در رتبه سوم قرار داشت و گروه‌های Cladocera و Cirripedia و Copepoda ناچیز بودند (شکل ۱).



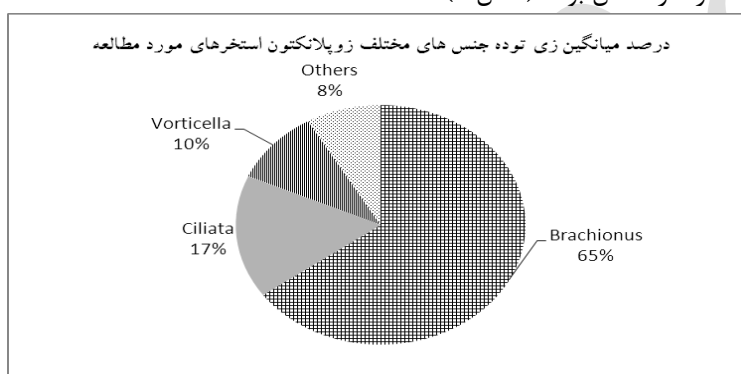
شکل ۲. درصد میانگین زی‌توده گروه‌های مختلف زوپلانکتون مشاهده شده در استخرهای مورد مطالعه در استان مازندران در یک دوره پرورش

اگر چه Protozoa بیشترین تراکم را داشت ولی گروه Rotifera بیشترین زی‌توده را داشتند (۵۵٪) و گروه Protozoa ۲۱٪ و Mollusca ۲۰٪ کل زی‌توده را تشکیل می‌دادند و سه گروه Cladocera، Copepoda و Cirripedia زی‌توده ناچیزی داشتند (شکل ۲).



شکل ۳. درصد میانگین تراکم جنس های مختلف زوپلانکتون های مشاهده شده در استخرهای مورد مطالعه در استان مازندران در یک دوره پرورش

در این مطالعه بیشترین جنس های مشاهده شده *Brachionus*، *Vorticella* و *Ciliata* بودند به طوری که این سه جنس به تنهایی ۹۶٪ کل جمعیت را تشکیل می دادند. و کل جنس های دیگر فقط ۴٪ کل جمعیت زوپلانکتون های شناسایی شده در این استخرها را شامل بودند (شکل ۳).



شکل ۴. درصد میانگین زی توده گروه های مختلف زوپلانکتون های مشاهده شده در استخرهای مورد مطالعه در استان مازندران در یک دوره پرورش

در این مطالعه بیشترین زی توده همانند تراکم مربوط به *Brachionus* بود که ۶۵٪ کل زی توده به این جنس اختصاص داشت و *Ciliata* ۱۷٪ و *Vorticella* ۱۰٪ کل زی توده را تشکیل می دادند به طوری که سه جنس *Brachionus*، *Ciliata* و *Vorticella* مجموعاً ۹۲٪ کل زی توده را تشکیل می دادند و کل جنس های دیگر در مجموع فقط ۸٪ زی توده این اکوسیستم را شامل بودند (شکل ۴).

بحث

شناخت خصوصیات فیزیکی، شیمیایی و هیدروبیولوژی استخرهای پرورش ماهی موجب افزایش بازده تولید و استفاده بهینه از پتانسیل غذایی خواهد شد (Hadadi Moghadam *et al.*, ۲۰۰۱). در تحقیق حاضر ۶ گروه زوپلانکتونی شامل ۱ جنس *Copepoda*، ۹ جنس *Rotifera* و یک جنس ناشناخته (*Unknown*) از این گروه و نیز ۵ جنس *Protozoa*، ۱ جنس *Cladocera* و ۱ جنس *Mollusca* و ۲ جنس *Cirripedia* شناسایی شد. در مجموع در این مطالعه *Protozoa* بیشترین تراکم و *Rotifera* بیشترین زی توده را داشتند (۵۵٪) که به دلیل درشت سائزتر بودن *Rotifera* نسبت به *Protozoa* است (Sulehria, ۲۰۱۰). نتایج به دست آمده از تحقیق (Kumar *et al.*, ۲۰۱۲) بیانگر آن است که تعداد ۵۱ گونه زئوپلانکتونی از گروه های مختلف همچون *Protozoa*، *Rotifera*

Copepoda و Cladocera با میانگین فراوانی ۱۴ و ۷ درصد، به ترتیب شناسایی شدند و در این میان Rotifera به عنوان گروه غالب معرفی شده‌اند. که می‌توان دلایل حضور دائمی و غالب روتیفرها به‌عنوان مهمترین گروه‌های زئوپلانکتونی در منابع آبی مختلف را بر اساس گزارشات محققین شرایط مطلوب دمایی، قدرت تکثیر و بازسازی کوتاه مدت آنها نسبت به گروه‌های دیگر همچون بندپایان و سخت‌پوستان (کلادوسراها و کوبه پودها)، رقابت درون‌گونه‌های، منابع فیتوپلانکتونی، بهره‌مندی از فراوانی سطح حذقلی منابع مورد نیاز و تغذیه ماهیان پلانکتون‌خوار از گونه‌های زئوپلانکتونی بزرگ دانست که دلایل احتمالی جمعیت پایین‌تر Copepoda و Cladocera نسبت به روتیفرها می‌تواند همین عوامل باشد (Steiner, ۲۰۰۴ و Mehdi Zadeh et al., ۲۰۰۶).

(Sulehria et al., ۲۰۰۹a, ۲۰۰۹b, ۲۰۱۲) در استخرهای پرورش ماهی نواحی Bahawalnagar، Mianwali و Balloki در کشور پاکستان تعداد ۱۰ گونه از ۷ جنس، ۱۶ گونه از ۱۱ جنس و ۱۲ گونه از ۷ جنس مختلف از روتیفرها را شناسایی و گزارش کردند. بیشترین میانگین تراکم و زی‌توده گروه رتیفر متعلق به *Brachionus* sp. با میانگین تراکم 9 ± 9862 عدد در مترمکعب و میانگین زی‌توده $0.06 \pm 19/73$ میلی‌گرم در متر مکعب بود که بیشترین تراکم و زی‌توده کل زوپلانکتون‌ها را نیز شامل بود. طبق ارزیابی تنوع جوامع زئوپلانکتونی استخرهای ذخیره آب دائمی منطقه Tamilnadu کشور هند توسط (Rajagopal et al., ۲۰۱۰)، در مجموع ۴۷ جنس زئوپلانکتونی مورد شناسایی قرار گرفت که به روتیفرها، کوبه پودها، کلادوسراها، استرآکودها و پروتوزوآها تعلق داشت. در میان گروه‌های مختلف مانند تحقیق حاضر، جنس *Brachionus* sp. در روتیفرها مشاهده گردید.

همچنین در این مطالعه Copepoda از درصد تراکم و زی‌توده پایینی برخوردار بود و تنها جنس Cyclopoida از این گروه زوپلانکتونی مشاهده شد و از آنجایی که زئوپلانکتون‌ها به خصوص کوبه پودها، در مقایسه با سایر زئوپلانکتون‌ها عمده‌ترین غذا برای بچه ماهیان در استخر هستند، لذا مورد تغذیه ماهیانی مانند بیگ هد قرار گرفتند و در نتیجه در این تحقیق مشاهده نشدند و از طرفی از آنجایی که سیکلوپس ارزش غذایی چندانی ندارد به این دلیل به‌طور احتمالی بچه ماهیان تمایلی به تغذیه از این موجودات نداشتند. در مطالعه (آقایی مقدم و اصلان پرویز، ۱۳۸۲) رده Copepoda کمترین درصد فراوانی را در طول دوره در مقایسه با سایر رده‌ها داشت.

بیشترین درصد تراکم گروه‌های مختلف زوپلانکتون در استخرهای ماهیان گرمابی مربوط به Protozoa (۴۴٪) بود که مربوط به دو جنس Ciliata با میانگین تراکم $7 \pm 8544/7$ (تعداد در متر مکعب) و Vorticella با میانگین تراکم $0.5 \pm 5128/0$ (تعداد در متر مکعب) بود. که می‌تواند این طور بیان داشت که از آنجایی که این گروه زوپلانکتون برای تغذیه مناسب نبودند مورد تغذیه بچه ماهیان قرار نگرفتند و در نتیجه شرایط بهتری را برای ازدیاد داشتند. (Mehdi Zadeh et al., ۲۰۰۶) نیز دلیل احتمالی حضور جنس‌هایی همچون *Zoothamnium* sp.، *Paramecium* sp. و *Acanthocystis* sp. از خانواده پروتوزوآها را به اندازه کوچک و نامناسب آن‌ها برای تغذیه بچه ماهیان دانستند. (Ipki et al., ۲۰۱۳) تنوع و پراکنش زئوپلانکتون‌ها را در استخرهای خاکی نواحی تروپیکال مورد بررسی قرار دادند. در تحقیق آنها ۵ گونه زئوپلانکتون از ۲ خانواده Rotifera و Ciliata شناسایی شد. از رده روتیفر گونه‌های *Chromogaster*، *Euchlanis species* و *Asplanchna species* شناسایی شدند، که هم در رده و هم از لحاظ گونه‌های شناسایی شده با این تحقیق تفاوت داشتند.

(Pahwa & Mehrotra, ۱۹۶۶) گزارش کردند که جمعیت روتیفر در رودخانه گنگ، ۵/۶۱ تا ۴/۹۴ درصد را به خود اختصاص می‌دهد. مقایسه این نتایج با نتایج تحقیق حاضر به عنوان یک محیط مصنوعی نشان‌دهنده برتری روتیفر برای زیست در هر دو محیط است، که علت آن را مقاومت فیزیولوژیک این جنس در برابر تغییرات شوری و دوره کوتاه تکثیر و بازسازی جمعیت در آنها نسبت به سایر گروه‌های زئوپلانکتون مرتبط دانست (Sulehria, et al., ۲۰۱۳).

جنس دافنی‌ها و تقریباً اکثر کلادوسراها کوچک و کوبه‌پودها معمولاً نیاز بالایی به فسفر موجود در آب نسبت به بسیاری از جنس‌های زئوپلانکتونی با اندازه کوچک دارند و در آب‌های غنی از مواد آلی همچون استخرهای پرورش ماهی با عمل

کوددهی این مواد مغذی به سهولت در اختیار آنها قرار می‌گیرد (Steiner, ۲۰۰۴) در حالی که در این تحقیق این گروه‌ها هم از نظر تنوع و هم از نظر تراکم و زی‌توده قابل توجه نبودند که نشان‌دهنده شرایط نامناسب برای زیست این زئوپلانکتون‌ها است.

تحقیق مشابهی که در استخرهای پرورش ماهیان گرم آبی استان گیلان داشتند (کمالی سنزیمی و همکاران، ۱۳۹۳)، در مجموع ۲۴ جنس از سه شاخه روتیفرها، بندپایان و آغازیان را شناسایی نمودند. و طبق گزارشات این محققین، شاخه روتیفرها، پروتوزوآها و بندپایان با ۱۶، ۵ و ۳ جنس به عنوان شاخه‌های با فراوانی بالا و پایین معرفی شدند. محتویات گوارشی لاروهای ماهیانی همچون *Lepomis macrochirus* و *Perca flavescens* و نیز گونه‌هایی نظیر کپور معمولی نشان داده‌است که روتیفرها بخش قابل توجهی از رژیم غذایی آنها را تشکیل می‌دهد (Verma et al., ۲۰۱۳) و از آنجایی که در این تحقیق گروه روتیفر از جمله گونه گونه *Brachionus sp.* فراوانترین گونه بود این نشان‌دهنده شرایط نسبتاً مناسب تغذیه ماهیان در این استخرها می‌باشد. بررسی استخرهای پرورش ماهیان گرمابی استان مازندران نشان داد که پلانکتون‌های جانوری از تنوع، تراکم و زی‌توده مناسبی برخوردارند و *Rotifera* بیشترین تنوع و تراکم را در بین گروه‌های زئوپلانکتون داشت که به دلیل افزایش *Brachionus* و تا ۴۴٪ از جمعیت و ۶۵٪ زی‌توده، نقش اصلی را در استخرهای مورد مطالعه داشتند. در مجموع جمعیت زئوپلانکتون‌های استخرهای مورد مطالعه از شرایط قابل قبول برخوردار بوده‌است.

پیشنهادات

بدین‌وسیله پیشنهاد می‌گردد که سازمان شیلات ایران اعتبارات لازم را تخصیص دهد تا از طریق غنی‌سازی استخرهای پرورش ماهی توسط پلانکتون‌های خوش‌خوراک کیفیت و بازده تولید استخرهای ماهیان گرمابی افزایش یابد.

یافته ترویجی

باید در نظر داشت که حتی حضور یک گونه مضر می‌تواند پتانسیل خطر بالایی داشته باشد. در مجموع آب استخرهای مورد مطالعه شرایط نسبتاً خوبی را دارند لکن می‌توان از طریق فراهم آوردن شرایط بهینه برای رشد گونه‌های خوش‌خوراک به تولید بهتر دسترسی یافت.

منابع

- اسلامزاده، ا.، جواهری بابلی، م.، دهقان مدیسه، س. ۱۳۹۶. بررسی ترکیب گونه‌ای جوامع زئوپلانکتونی در استخرهای پرورش ماهیان گرمابی. فصلنامه علمی پژوهشی محیط زیست جانوری - سال نهم، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۶.
- آقایی مقدم، ع. و اصلان پرویز، ح.، ۱۳۸۲. نقش زئوپلانکتونها در مناسبات تغذیه‌ای بچه‌ماهیان خاویاری گونه قهریون در استخرهای پرورش مرکز تکثیر و پرورش ماهی شهید رجایی ساری. پژوهش و سازندگی. شماره ۶۰، صفحات ۷۷ تا ۸۳.
- کمالی سنزیمی، ب. و رحیمی، ا.، ۱۳۹۳. جوامع فیتوپلانکتونی و شاخص آلودگی ساپروبی استخرهای پرورشی ماهیان گرم آبی شرق استان گلستان (مطالعه موردی: شهر گنبد کاووس) مجله بوم‌شناسی آذربایجان. شماره ۴، صفحات ۶۲ تا ۷۲.

Asghari, M.A. and Motahari, A., ۲۰۰۹. Management of zooplankton production at fish ponds. 1st student's conference of Fishery Sciences, University of natural resources and agricultural sciences of Sari. ۲۰ May ۲۰۰۹.

Cook, S., Hill, W.R. and Meyer, K.P. ۲۰۰۹. Feeding at different plankton densities alters invasive bighead carp (*Hypophthalmichthys nobilis*) growth and zooplankton species composition. *Hydrobiologia*, ۶۲۵(۱): ۱۸۵-۱۹۳. Doi: ۱۰.۱۰۰۷/s۱۰۷۵۰۰۰۹-۹۷۰۷-y. Print ISSN: ۰۰۱۸-۸۱۵۸. Online ISSN: ۱۵۷۳-۵۱۱۷.

- Chinavenmeni, S.V. and Munuswamy, N., ۲۰۰۷.** Composition and nutritional efficacy of adult fairy shrimp *Streptocephalus dichotomus* as live feed. Food Chemistry. Vol. ۱۰۰, pp: ۱۴۳۵-۱۴۴۲.
- Hadadi Moghadam, K., Ahmadi, M. and Keyvan, A., ۲۰۰۱.** Study of effective zooplankton at sturgeon fingerling nutrition of (*Acipenser Stellatus*) at earthen fish ponds. Iranian Scientific Fisheries Journal, ۱۰(۲): ۱-۱۴.
- Ikpi, G.U.; Offem, B. and Okey, I.B., ۲۰۱۳.** Plankton distribution and diversity in tropical earthen fish ponds. Environmental and Natural Resources Research. Vol. ۳, pp: ۴۵-۵۱.
- Kumar, P., Wanganeo, A., Sonallah, F. and Wanganeo, R., ۲۰۱۲.** Limnological study on two high altitudes Himalayan ponds, Badrinath, Uttarakhand.
- Kotykova, L.A., ۱۹۷۰.** Eurotatoria .CCCP.Leningrad.۷۴۳ P.
- Mehdi Zadeh, GH. R., Ahmadi, M. R. Saberi, H. Kiabi, B. and Vosoughi, Gh.H., ۲۰۰۶.** Distribution and frequency of zooplankton in earthen ponds of warm water fishes in Guilan Province. Journal of Marine Sciences and Technology, ۵(۳-۴): ۷۷-۸۵.
- Park, K.S. and Shin, H.W., ۲۰۰۷.** Studies on phyto-and-zooplankton composition and its relation to fish productivity in a west coast fish
- Pahwa, D.V. and Mehrotra, S.N., ۱۹۶۶.** Observations on fluctuations conditions of river Ganga.Proc. Natural Academe Science Indian. Vol. ۳۶, pp: ۱۵۷-۱۸۹.
- Pontin, R.M., ۱۹۷۸.** Akey ti the fresh water plankton semiplankton rotifer of the British Isles. Titus Wilson and Son. Ltp. ۱۷۸ p. Popescu, A., fetecau, M. and Cristea, V. ۲۰۱۲. Preliminary aspects concerning zooplankton structure in ecosystems of the fish farms. Journal of Lucrari Stiintifice-Seria Zootehnie, University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Iasi, Romania, ۵۸: ۱۲۱-۱۲۵.
- Prescott, G.W., ۱۹۷۰.** The fresh water algae. W.M.C. Brown company publishing, Iowa. U.S.A. ۳۸ p. pond ecosystem. Journal of Environmental Biology. Vol. ۲۸, pp: ۴۱۵-۴۲۲.
- Rajagopal, T., Thangamani, A., Sevarkodiyone, S.P., Sekar, M. and Archunan, G., ۲۰۱۰.** Zooplankton diversity and physico-chemical conditions in three perennial ponds of Virudhunagar district, Tamilnadu. Journal of Environmental Biology, ۳۱(۳): ۲۶۵-۲۷۲. Available online at www.jeb.co.in.
- Salavatian, S.M.; Sabkara, J.; Azari Takami, G.; Rajab Nezhad, R.; Elmi, A.M. ;Saraji, F.; Wan Maznah, W.; Ebrahimi, M.; Jokarak, G.A. and Akbazadeh, G.A., ۲۰۱۴.** Seasonal variation of phytoplankton community in the northern of Oman Sea. (Part of Iranian Waters). International Journal of Botany. Vol. ۴, pp: ۱۹-۲۸.
- Shinde, S.E.; Pathan, T.S. and Sonawane, D.L., ۲۰۱۲.** Seasonal variations and biodiversity of phytoplankton in Harsool-Savangi dam, Aurangabad, India. Journal of Environmental Biology. Vol. ۳۳, pp: ۶۴۳-۶۴۷.
- Sokal, R.R. and Rohlf, F. J., ۱۹۸۱.** Biometry. Freeman and Co., San Franc. USA, ۷۷۶p.
- Southwood, T.R.E. and Henderson, P.A., ۲۰۰۰.** Ecological methods, Third Edition.Blackwell Science. ۵۷۵ p.
- Steiner, C.F., ۲۰۰۴.** Daphnia dominance and zooplankton community structure in fishless ponds. Journal of Plankton Research, ۲۶ (۷): ۷۹۹-۸۱۰. Doi: ۱۰. ۱۰۹۳/plankt/fbh۰۶۷, Available online at www.plankt.oupjournals.org
- Sulehria, A.Q.K.; Qamar, M.F.; Haider, S.; Ejaz, M. and Hussain, A., ۲۰۰۹a.** Water quality and rotifer diversity in the fish pond at district Mianwali, Pakistan. Biologia (Pakistan). Vol. ۵۵, pp: ۷۹-۸۵.
- Sulehria, A.Q.K.; Qamar, M.F.; Anjum jaz, M. and Hussain, A., ۲۰۰۹b.** Seasonal fluctuations of rotifers in a fish pond at district Bahawalnagar, Pakistan. Biological (Pakistan). Vol. ۵۵, pp: ۲۱-۲۸.
- Sulehria, A.Q.K., ۲۰۱۰.** Planktonic rotifers and their role in fish growth and farm fisheries. Thesis in Zoological Sciences. Provided by: Pakistan Research Repository. OAI identifier: oai:generic.eprints.org:۶۹۷۶/core۴۴۷. Available Online at [http:// core. kmi. open. ac. uk/ display/ ۱۲۱۱۴۷۷۳](http://core.kmi.open.ac.uk/display/۱۲۱۱۴۷۷۳).
- Sulehria, A.Q.K.; Mushtaq, R. and Ejaz, M., ۲۰۱۲.** Abundance and composition of rotifers in a pond near Balloki Headworks. Journal of Animal and Plant Sciences. Vol. ۲۲, pp: ۱۰۶۵-۱۰۶۹.
- Sulehria, A.Q.K.; Ejaz, M.; Mushtaq, R. and Saleem, S., ۲۰۱۳a.** Analysis of planktonic rotifers by Shannon Weaver index in Muraliwala (Sistt. Gujranwala). Pakistan Journal of Science. Vol. ۶۵, pp: ۱۵-۱۹.
- Thompson R.H., ۱۹۹۷.** Fresh water biology. Science Publishers, Enfield.
- Verma, H.; Pandey, D.N. and Shukla, S.K., ۲۰۱۳.** Monthly variations of zooplankton in a freshwater body, Futera Anthropogenic Pond of Damoh District (M.P.). International Journal of Innovative Research in Science, Engineering and Technology. Vol. ۷۵, pp: ۴۷۸۱-۴۷۸۸.
- Verreth, J., ۱۹۹۰.** The accuracy of population density estimates of a horizontally distributed zooplankton community in Dutch fish ponds. Hydrobiologia, ۲۰۲(۱-۲): ۵۳-۶۱.

Yousefian, M., Abdolhay, H., Makhdomi, C. and Soleimaniroudi, A. ۲۰۰۸. Rearing of sturgeon fingerlings (*Acipenser persicus* Borodin, ۱۸۹۷) in terrestrial ponds, and investigation on factors effecting its growth. Pajouhesh and Sazandeghi Journal, ۷۸: ۱۵۶-۱۶۶.

Zhong, F.; Gao, Y.; Yu, T.; Zhang, Y.; Xu, D.; Xiao, E.; He, F.; Zhou, Q. and Wu, Z., ۲۰۱۱. The management of undesirable cyanobacteria blooms in channelcatfish ponds using a constructed wetland: Contribution to the control of offalvoroccurances. Water Research. Vol. ۴۵, pp: ۶۴۷۹-۶۴۸۸.

Study on abundance and biodiversity of zooplankton communities in Warm Fishes pools of Mazandaran province

Abstract

Knowing the zooplankton of any aquatic ecosystem is very effective in managing this ecosystem and since zooplankton plays an important role in the transfer of the photosynthetic material transmitted by phytoplankton to other organisms at higher levels. The recognition of each aquatic ecosystem is very effective in better management of the ecosystem, and since it has a significant role in the transmission of photosynthetic raw materials by phytoplankton to other organisms at higher levels. This study was a research result in ۱۳۹۱ years. In this study, Zooplankton of four water pools located in Mazandaran province, with the geographical position of "۱۲ ' , ۶۸ ° ۳۶ north and" ۷۶ ' ۴۱ ° ۵۳ in the east were studied. Each of the pools was in the area of ۳ hectares and rectangular, each of which was mishdend from water wells and under one management. Sampling was sampled by a sampler with mesh size ۵۵-micron, in July, August and September, every ۱۵ days and then data was collected at the Laboratory for identification, counting and data. In the present study, six groups of zooplankton including ۱ genus Copepoda, ۹ genera Rotifera and ۵ genera Protozoa, ۱ Cladocera, ۱ Mollusca and ۲ Cirripedia genuses were identified. The highest percentage of zooplankton groups in hydrothermal pools was related to Protozoa (۴۴%), which belonged to two genera Ciliata with a mean density of $۸۵۴۴,۷ \pm ۷$ (number per cubic meter) and Vorticella with a mean density of $۵۱۲۸,۰۵ \pm ۰,۵$ Number in m^۳), and since this group of zooplankton was not suitable for feeding, they were not fed to infants, resulting in better conditions for growth, and the rotifers had the most masses, of which *Brachionus* sp dominated that ۶۵% of this genus is devoted to the relatively good conditions for feeding fish in these pools.

Keywords: Zooplankton, Warm Fishes, biodiversity, density, Biomass