



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

ARTICLE INFO

Article Type

Original Research

Authors

Mirhosseini N.^{*1} MSc,
Davarnejad R.¹ PhD,
Hallaji Sani A.² PhD,
Cano-Europa E.³ PhD,
Tavakoli O.⁴ PhD

How to cite this article

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

¹Chemical Engineering Department, Engineering Faculty, Arak University, Arak, Iran

²Caspian Faculty of Engineering, College of Engineering, University of Tehran, Tehran, Iran

³Physiology Department, Faculty of Physiology, Institute of National Polytechnic (IPN), Mexico City, Mexico

⁴School of Chemical Engineering, College of Engineering, University of Tehran, Tehran, Iran

*Correspondence

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

Article History

Received: November 14, 2019

Accepted: May 11, 2020

ePublished: June 10, 2020

ABSTRACT

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

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

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

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

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

CITATION LINKS

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

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

ندا میرحسینی* MSc

گروه مهندسی شیمی، دانشکده مهندسی، دانشگاه اراک، اراک، ایران

رضا داوودنژاد PhD

گروه مهندسی شیمی، دانشکده مهندسی، دانشگاه اراک، اراک، ایران

احمد حلاجی ثانی PhD

دانشکده فنی کاسپین، پردیس دانشکده‌های فنی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

یدگار کانو پروپا PhD

گروه فیزیولوژی، دانشکده فیزیولوژی، دانشگاه پلی‌تکنیک، مکزیکوسیتی، مکزیک

امید توکلی PhD

گروه مهندسی شیمی، دانشکده مهندسی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

چکیده

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

مواد و روش‌ها: کشت در قالب ۱۱ تیمار و ۳ تکرار در محدوده دمایی آزمایشگاه (۲۸±۳°C) و شدت نور ۱۰۰±۳۵۰ لوکس (نوردهی ۲۴ ساعته) انجام شد. حداکثر ضریب رشد ویژه و زمان دوبرابر شدن مطابق با روش مدل‌سازی غیرخطی با کمک نرم‌افزار Wolfram Mathematica 11.3 در فاصله اطمینان ۹۹٪ محاسبه شد. **یافته‌ها:** بیشترین میزان غلظت زیست‌توده در بالاترین غلظت منبع کربن (بر حسب گرم بر لیتر) در ۵ روز اول به ترتیب متعلق به نمونه‌های ملاس (۳/۰۸۳)، گلوکز (۲/۰۹۴)، کربنات سدیم (۵/۸۶۹) و بی‌کربنات سدیم (۵/۸۳۵) است. افزایش غلظت نمونه‌ها به جز گلوکز از ۱۶ تا ۳۲ گرم بر لیتر در محیط کشت سبب افزایش زیست‌توده شد. اگرچه نمونه رشدیافته در ملاس دارای بالاترین میزان غلظت زیست‌توده در روزهای ابتدایی است اما بیشترین تاثیر بر ضریب رشد ویژه متعلق به نمونه گلوکز است.

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

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

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۸/۲۳

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۲/۲۲

*نویسنده مسئول: n.mir89@yahoo.com

مقدمه

امروزه استفاده از ریزجلبک‌ها برای تولید مواد غذایی و دارویی به‌منظور برطرف‌شدن نیاز تغذیه‌ای بشر بسیار مورد توجه واقع شده است. از سویی همه انواع جلبک‌ها می‌توانند به‌عنوان منبعی از پروتئین استفاده شوند. همچنین می‌توان مواد شیمیایی بالارزش مانند رنگدانه و آنزیم‌ها را از آنها استخراج کرد. تا به امروز چندین

هزار جلبک در طبیعت یافت شده است اما فقط تعداد محدودی از آنها به‌دلیل توانایی رشد در محیط کشت صنعتی، تنوع در تعداد رنگدانه‌ها، ویتامین، پروتئین‌ها و امثال آن، جداسازی ساده اجزای سازنده، پایداری در برابر خشک‌شدن، کم‌هزینه‌بودن محیط رشد و عناصر سازنده تشکیل‌دهنده آنها صنعتی شده‌اند^[1]. اسپیرولینا نیز یک فیکوبیلی‌پروتئین قابل حل در آب و یک پروتئین با خاصیت فلورسنتی بالا است که در pH فیزیولوژیکی پایداری زیادی دارد^[2]. اولین قبایل شکارچی جلبک اسپیرولینا را در حاشیه دریاچه‌ها یافتند و از آن به‌عنوان غذا استفاده کردند و حتی امروزه بومی‌های آفریقا از این جلبک رشدیافته در دریاچه آفریقا استفاده می‌کنند^[3]. طی ۲-۳ دهه گذشته، میلیون‌ها انسان در سراسر جهان از اسپیرولینا به‌عنوان یک مکمل غذایی در خوراک دام و طیور استفاده کرده‌اند. البته امروزه به‌دلیل داشتن ترکیباتی همچون کاروتن، امگا ۳ و ۶، اسیدهای چرب اشباع‌نشده برای مصارف دارویی نیز کاربرد یافته است^[4]. اسپیرولینا همچنین منبع بسیار خوبی از ویتامین B12 است که همین امر سبب به‌وجودآمدن اثرات تقویت‌کننده سیستم ایمنی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن شده است^[5]. امروزه از آنها به‌دلیل خاصیت غیرسمی به‌عنوان رنگدانه طبیعی برای مواد خوراکی و آرایشی استفاده می‌شود^[6]. فیکوسیانین سبز-آبی در میان رنگدانه‌های استخراج‌شده از اسپیرولینا به‌دلیل خواص ضدسرطانی، ضدتوموری و ضدآنتی‌اکسیدانی از اهمیت بالایی برخوردار است^[7]. مزیت‌های زیادی برای کشت و پرورش ریزجلبک اسپیرولینا وجود دارد که از جمله می‌توان به منبع غنی پروتئین اشاره کرد و همچنین عدم پردازش فرآورده‌های جانبی، محصول مناسب برای کشت در مناطق خشک و یا نیمه‌خشک جهان و حتی کشت در آب شور از مزایای کشت این ریزجلبک هستند. با این حال، معایبی هم وجود دارد که عمده‌تاً مربوط به تهیه مواد معدنی برای محیط کشت آن است که معمولاً گران‌قیمت هستند^[11]. اسپیرولینا به‌طور متداول در محیط زاروک یا اصلاح‌شده زاروک کشت داده می‌شود که برای رشد به مقادیر زیادی نیترات سدیم، کربنات سدیم و بی‌کربنات سدیم نیاز دارد. زاروک به‌عنوان اولین محیط کشت استاندارد صنعتی شناخته شده است که امروزه نیز بسیار مورد استفاده قرار می‌گیرد^[12]. محیط کشت اردار انسانی و پساب حاصل از تصفیه‌خانه‌های فاضلاب پرورش خوک به‌عنوان یک محیط پیشنهادی برای تولید *Spirulina platensis* گزارش شده‌اند^[13]. *Spirulina maxima* و *Spirulina platensis* دو گونه رایج این ریزجلبک هستند^[15]. *Spirulina maxima* به‌راحتی در آب شور رشد می‌کند و اولین بار در سال ۱۹۸۴ توسط مترسی و همکاران با استفاده از آب دریا بدون غنی‌سازی با دیگر عناصر در شرایط آزمایشگاهی رشد کرد^[16, 17]. محققین دیگر تاثیر میزان شوری را روی رشد ریزجلبک *Spirulina platensis* بررسی کردند. بر این اساس بالاترین میزان رنگدانه فیکوسیانین، آلفوفیکوسیانین و فیکواریترین از این جلبک در غلظت ۰/۴ مولار کلرید سدیم نسبت به غلظت استاندارد محیط کشت و دیگر غلظت‌ها (۰/۲، ۰/۶ و ۰/۸ مولار)

مطالعه حاضر قرار گرفت. افزون بر آن، به منظور افزایش تولید زیست توده، منابع کربنی (گلوکز، ملاس و کرینات سدیم) در سه غلظت مختلف (۱۶، ۲۴ و ۳۲ گرم بر لیتر) به عنوان منبع کربنی جایگزین در شرایط محیطی یکسان به محیط کشت افزوده شدند و از منبع کربنی بی کرینات سدیم در غلظت های ۱۶ و ۲۴ گرم بر لیتر به عنوان نمونه کنترلی استفاده شد.

مواد و روش ها

آماده سازی محیط کشت

در مطالعه حاضر، از محیط کشت زاروک با کمی تغییرات برای آماده سازی تیمارهای مرجع و نگهداری مایع تلقیح استفاده شد [28]. ترکیب شیمیایی این محیط کشت و سایر محیط کشت های سنتزی به کاررفته بر حسب گرم بر لیتر در جدول ۱ آورده شده است. کلیه عناصر شیمیایی برای ساخت محیط کشت از شرکت مرک خریداری شدند. برای تهیه محیط کشت زاروک (به عنوان شاهد) ابتدا کلرید کلسیم هیدراته، سولفات آهن هیدراته و سولفات پتاسیم هر یک به صورت جداگانه به ۲۵ میلی لیتر آب دی یونیزه استریل اضافه شدند تا کاملاً حل شوند. بقیه ترکیبات شیمیایی به جز ریزمغذی ها در ۵۰۰ میلی لیتر آب دی یونیزه استریل حل و از کاغذ صافی عبور داده شدند. سپس محلول های آماده شده در ارلن های ۲۵۰ میلی لیتری به ارلن ۵۰۰ میلی لیتر حاوی محلول اضافه شدند و در انتها (میلی لیتر ریزمغذی که قبلاً در حجم ۱۰۰۰ میلی لیتر تهیه شده بود به ارلن حاوی محیط زاروک اضافه و بعد از اختلاط به حجم رسانده شد.

گزارش شده است [18]. از دهه های پیشین گلوکز و استات به عنوان سوبسترای کربنی آلی مناسب برای رشد ریزجلبک *Spirulina platensis* در شرایط هتروتروفیک و میکسوتروفیک معرفی شد [19]. به سبب اینکه فیکوسیانیین یک رنگدانه فتوسنتزکننده است رشد هتروتروفیک برای تولید آن نامناسب گزارش شد [21]. از طرفی باید دقت کرد که شدت نوردهی و غلظت سوبسترای کربنی نباید خیلی زیاد یا کم باشد که مانع رشد سلولی شود [19]. همچنین نتایج تحقیقات نشان داد که تولید *Spirulina platensis* با استفاده از منابع کربنی مختلف (گلوکز، اتانول و اسیداستیک) در خوراک دهی به صورت ناپیوسته در شرایط میکسوتروفیک می تواند سبب افزایش زیست توده شود [22]. استفاده از گلوکز به عنوان منبع کربنی مازاد با غلظت بهینه ۲/۴۷۱ گرم بر لیتر در محیط کشت زاروک میزان نرخ رشد زیست توده *Spirulina platensis* را افزایش می دهد [23]. محققین دست یافتند که *Spirulina platensis* در هر دو شرایط هتروتروفیک و میکسوتروفیک با کمک سوبستراهای گلوکز و ملاس قادر به رشد است [24-27]. محققین مدعی شدند که افزودن گلوکز در غلظت های بالاتر از ۵/۰ گرم بر لیتر به محیط کشت زاروک در شرایط کشت میکسوتروفیک سبب افزایش میزان نرخ رشد ریزجلبک *Spirulina platensis* خواهد شد [24]. همچنین افزودن ملاس سبب چندبرابری رشد زیست توده *Spirulina platensis* در محیط کشت زاروک می شود [27].

با توجه به اهمیت ویژه افزایش زیست توده جلبک *Spirulina maxima* و نبود اطلاعات دقیق از آن، تاثیر منابع کربنی آلی (گلوکز و ملاس) بر سرعت رشد و مقدار زیست توده این ریزجلبک، موضوع

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

نام و ترکیب شیمیایی	گلوکز (G)	ملاس (M)	کرینات سدیم (C)	بی کرینات سدیم (B)	زاروک اصلاح شده
سدیم بی کرینات (NaHCO_3)	۰/۵	۰/۵	۰/۵	a	۱۶
دی پتاسیم فسفات (K_2HPO_4)	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵
سدیم نیترات (NaNO_3)	۲/۵	۲/۵	۲/۵	۲/۵	۲/۵
پتاسیم سولفات (K_2SO_4)	۱	۱	۱	۱	۱
سدیم کلرید	۱	۱	۱	۱	۱
منیزیم سولفات ۷آبه ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	۰/۲	۰/۲	۰/۲	۰/۲	۰/۲
کلسیم کلرید ۲آبه ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	۰/۰۴	۰/۰۴	۰/۰۴	۰/۰۴	۰/۰۴
آهن (II) سولفات ۷آبه	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۱
EDTA	۰/۰۸	۰/۰۸	۰/۰۸	۰/۰۸	۰/۰۸
ریزمغذی	۱	۱	۱	۱	۱
سدیم کرینات (Na_2CO_3)			d		
ملاس		c			
گلوکز	b				

a: از منبع کربنی استاندارد بی کرینات سدیم در غلظت های مختلف استفاده شد؛ b: از گلوکز، c: از ملاس و d: از کرینات سدیم به جای منبع کربنی استاندارد بی کرینات سدیم در غلظت های مختلف استفاده شد.

سرد شد. پس از سرد شدن، ظروف حاوی آب مقطر دوباره به ازای هر میلی لیتر آب به مدت ۷۲٪ ثانیه با همان درجه حرارت در آون قرار گرفت. برای آماده سازی محلول های کرینات سدیم (C)، ملاس (M) و گلوکز (G) ابتدا هر یک از عناصر محیط کشت زاروک به غیر از

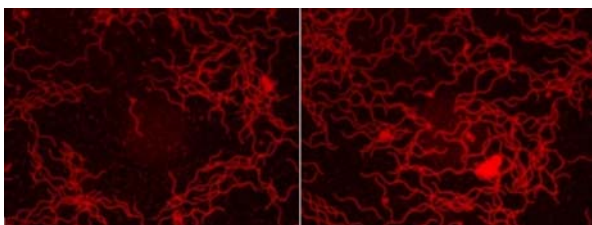
کلیه ظروف در دمای 121°C به مدت ۱۵ دقیقه در اتوکلاو استریل شدند. برای تهیه آب استریل و از بین بردن هر نوع باکتری، ظرف حاوی آب مقطر به ازای هر میلی لیتر آب به مدت ۱/۲ ثانیه در دمای 50°C در آون قرار گرفت. سپس ظرف حاوی آب مقطر در حمام یخ

محیط‌های کشت اضافه شدند. کل دوره کشت ۱۳ روز بوده است. برای تامین میزان آب تبخیرشده روزانه آب استریل به ارلن‌ها افزوده شد. کلیه آزمایشات به‌منظور بررسی عملکرد منابع کربنی متعدد در شرایط یکسان محیطی آزمایشگاه انجام شده است.

از کلیه نمونه‌ها در طول دوره کشت برای تعیین آنالیز جذب با دستگاه اسپکتروفتومتری مدل Thermo Multiscan Go (Thermo Scientific؛ انگلستان) به‌صورت روزانه نمونه‌برداری شد. برای مشاهده ریزجلبک از میکروسکوپ‌های نوری فلورسانس 50i (Nikon؛ ژاپن) و نوری معمولی (Carl Zeiss؛ مکزیک) استفاده شد. از میکروسکوپ فلورسانس به‌منظور مشاهده ساختار زیست‌توده نمونه اولیه (نمونه‌ای که برای تلقیح کلیه تیمارها استفاده شد) و مطمئن‌شدن از صحت سلامتی ریزجلبک استفاده شد. بدین منظور ابتدا نمونه طی سه مرحله و هر مرحله به مدت ۱۰ دقیقه با دستگاه سانتریفیوژ 17 LEGEND MICRO (Thermo Scientific؛ آلمان) و با سرعت ۱۳۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. برای ثابت‌ماندن خواص بیولوژیکی ریزجلبک طی سانتریفیوژ امیلی‌لیتر فرمالین اضافه شد. شکل ۱ تصویر فلورسنت نمونه اولیه *Spirulina maxima* با دانسیته نوری ۰/۲۲۱ را نشان می‌دهد. برای مشاهده رشد *Spirulina maxima* بقیه تیمارها از میکروسکوپ نوری استفاده شد. برای اندازه‌گیری pH از دستگاه pH متر مدل pH21 (Hanna؛ ایالات متحده) استفاده شد.

جدول ۲) غلظت منابع کربنی در تیمارهای مختلف محیط کشت

تیمار	ترکیب محیط کشت	غلظت منبع کربنی (گرم بر لیتر)
۱	بی‌کربنات سدیم (B)	۱۶
۲		۳۲
۳	گلوکز (G)	۱۶
۴		۲۴
۵		۳۲
۶	کربنات سدیم (C)	۱۶
۷		۲۴
۸		۳۲
۹	ملاس (M)	۱۶
۱۰		۲۴
۱۱		۳۲



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

آنالیز داده‌ها

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

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

آماده‌سازی اتاقک رشد

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

کشت ریزجلبک *Spirulina maxima*

کشت ریزجلبک در ارلن‌مایرهای ۱۲۵ میلی‌لیتری با ۹۵ میلی‌لیتر محیط کشت انجام شد. همه تیمارها با ۳۰ میلی‌لیتر سوسپانسیون حاوی ریزجلبک *Spirulina maxima* با دانسیته نوری (OD) اولیه ۰/۲۲۱ تلقیح شدند. در این مطالعه جلبک *Spirulina maxima* با کد شناسایی CIB 79 از کلکسیون دانشکده فیزیولوژی دانشگاه پلی‌تکنیک مکزیک جمع‌آوری شد. کشت در دمای آزمایشگاه (۲۸±۳°C) و شدت نور ۱۰۰±۳۵۰ لوکس انجام شد. کلیه نمونه‌ها تحت جریان هوادهی استریل و تناوب نوردهی ۲۴ ساعته قرار گرفتند که رشد جلبک آغاز شد. در طول مدت کشت شدت هوادهی توسط پمپ‌های هوا، مدل AC-9602 (RESUN؛ مکزیک) تنظیم شد و دی‌اکسیدکربن مورد نیاز از طریق هوادهی و شیلنگ هوای ۳۰ میلی‌متری متصل به ارلن محتوی آب استریل تزریق شد [28]. بدین منظور ۱۱ تیمار مختلف با دو تکرار براساس جدول ۲ در شرایط محیطی کاملاً مشابه کشت داده شدند.

در این مطالعه از منبع کربنی کربنات سدیم به‌عنوان یک منبع کربنی رایج برای مقایسه بیشتر و از منابع کربنی ارزان‌قیمت گلوکز و ملاس به‌عنوان منابع کربنی جایگزین در غلظت‌های ۱۶، ۲۴ و ۳۲ گرم بر لیتر محیط کشت استاندارد زاروک استفاده شد و همچنین منبع کربنی بی‌کربنات سدیم به‌عنوان منبع کربنی شاهد به کار برده شد. خوراک‌دهی منبع کربنی جایگزین به‌صورت ناپیوسته انجام شد. بدین صورت که در روز صفر منابع کربنی به‌طور کامل به هر یک از

معمولاً از روش رنگ آمیزی سلول های چسبیده از طریق کریستال بنفش مطابق الگوی زیر استفاده می شود:

۱- ابتدا قطره بسیار کوچکی از جلبک های رشد یافته در محلولی که از ملاس و گلوکز به عنوان منبع کربنی استفاده شده نمونه برداری و روی لام نئوبار میکروسکوپ ریخته شد. پس از گذشت ۱۰ دقیقه آب روی لام نئوبار تبخیر و مواد باقیمانده بر روی شعله خشک شد. البته باید توجه داشت که در صورت داغ شدن زیاد شعله، باکتری از بین می رود.

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

۳- بعد از یک دقیقه، کریستال بنفش به آرامی با آب شیر شست و شو داده شد تا اینکه میزان بیشتری از آن از روی لام چکه نکند.

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

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

یافته ها

میزان زیست توده روزانه با کمک نمودار کالبراسیون به دست آمد. منحنی استاندارد کالبراسیون رابطه بین غلظت *Spirulina maxima* خشک و میزان جذب در طول موج بهینه را نشان می دهد (نمودار ۱). به منظور تعیین طول موج جذب بهینه ابتدا میزان جذب ریز جلبک در محدوده طول موج ۳۰۰ تا ۸۰۰ نانومتر رسم و بهترین طول موج جذب ۶۷۴ نانومتر شناسایی شد و سپس جذب کلیه نمونه ها در این طول موج مورد محاسبه قرار گرفت. برای رسم منحنی کالبراسیون، *Spirulina maxima* در ۶ غلظت و با ۳ تکرار مختلف تهیه شد. برای آماده سازی غلظت های مختلف از محیط کشت زاروک مشابه این کار تحقیقاتی استفاده شد. بهترین محدوده جذب برای رشد ریز جلبک *Spirulina maxima* بین ۲۷۱٪ تا ۷۰٪ گزارش شد. از این پس جذب کلیه تیمارها در طول موج بهینه اندازه گیری شد. در این مطالعه نمونه خشک *Spirulina maxima* به منظور رسم منحنی کالبراسیون از شرکت اسپیرال اسپرینک خریداری شد. نمودار رسم شده در توافق نسبی با نمودار رسم شده توسط دیگر محققین است [34].

حدود ۴ روز پس از کشت آب موجود در ارلن ها به سبز تغییر رنگ داد که این میزان تغییر رنگ در نمونه های ملاس و گلوکزی بسیار بیشتر بود. نقاط تجربی در تمام نمودارها و جدول ها نشان دهنده میانگین نتایج سه تکرار است.

اثر تغییر غلظت با استفاده از منبع کربنی بی کربنات سدیم

نمودار ۲ اثر تغییر غلظت خوراک دهی ناپیوسته روی میزان رشد سلول و pH را نمایش داده است. تیمار ۱ تا ۴ از محیط استاندارد

روی نمودارها نمایش داده شد. تجزیه و تحلیل کلیه تیمارها با استفاده از نرم افزار Wolfram Mathematica 11.3 و براساس دستورالعمل مدل معادلات غیرخطی (nonlinear model fit) با سطح اطمینان ۹۹٪ انجام شد.

ضریب رشد ویژه

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

(۱)

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

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

تعیین زمان دوبرابر شدن

زمان دوبرابر شدن جمعیت ریز جلبک از فرمول ۲ محاسبه شد [32]:

(۲)

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

محاسبه راندمان زیست توده تولید شده

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

(۳)

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

C_s^t : مقدار زیست توده در انتهای دوره، C_s^0 : مقدار زیست توده در ابتدای دوره

برای کلیه تیمارها حداکثر ضریب رشد ویژه، زمان دوبرابر شدن و راندمان زیست توده روز پایانی براساس معادلات رایج ۱ تا ۳ محاسبه شد. از آنجایی که صحت نتایج به دست آمده از روابط مورد تردید است بنابراین حداکثر ضریب رشد ویژه و زمان دوبرابر شدن با کمک فرمول ۴ به روش رگرسیون غیرخطی برای بررسی صحت نتایج شبیه سازی شد.

(۴)

$$x_a = x_0 + \frac{a}{1 + e^{b - ct^n}}$$

در این رابطه x_0 برابر با غلظت در روز صفر است. همچنین a ، b و c پارامترهای مدل هستند که از طریق مدل سازی به طور جداگانه برای هر یک از تیمارها برآورد شد. n در این معادله برابر با ۱ فرض شده است.

تست میکروپ شناسی

حالت پلی مورفیک جلبک طی دوره های مختلف با استفاده از میکروسکوپ بررسی و از نظر باکتری و آلاینده های کلی فرمی ارزیابی شد. برای انجام تست میکروپ شناسی در زیست شناسی مولکولی

داد که با رشد ریزجلبک و تکثیر آن، pH محیط کشت به تدریج افزایش یافت و در زمان برداشت به حدود ۱۰ رسید که تا حدود معینی مشابه با نمونه کشت داده شده با منبع کربنی بی-کربنات سدیم است.

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

در روند تغییرات غلظت متوسط زیست توده در روز نهم برای تیمار ۸ (۸۶۹/۰ گرم بر لیتر) و تیمار ۲ (۸۳۵/۰ گرم بر لیتر) اختلاف ناچیزی دیده شد. با این حال، مشاهده شد که تیمار ۱ تاثیر مثبت کمتری بر رشد و تکثیر سلولی نسبت به تیمار ۶ دارد، در حالی که هر دو تیمار از پایین ترین غلظت آزمون برخوردار هستند. شکل ۳ تصویر میکروسکوپی *Spirulina maxima* کشت داده شده را نشان می دهد.

اثر تغییر غلظت با استفاده از منبع کربنی گلوکز

نمودار ۴ تغییرات جذب و pH با زمان در محیط کشت G روی میزان رشد سلول را نشان می دهد. میزان تغییر غلظت منبع کربنی گلوکز با رشد سلول با گذشت زمان بررسی شد و نتایج نشان داد که طی ۶ روز اول، غلظت سلولی همزمان با رشد سلولی و تا رسیدن به حداکثر به طور مداوم افزایش یافت و سپس سیر ثابت و نزولی را پیش گرفت، در حالی که pH به جز برای نمونه با غلظت ۳۲ گرم بر لیتر که دارای نوساناتی است رو به افزایش است.

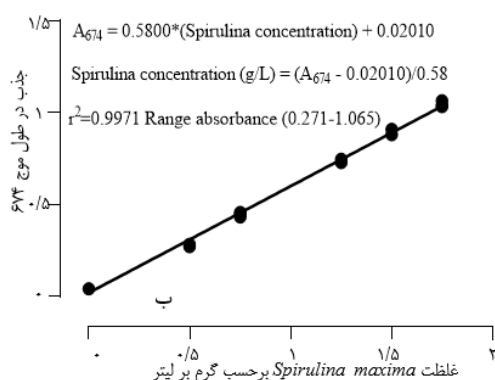
زاروک با کمی اصلاحات در غلظتی برابر با غلظت بی-کربنات سدیم (نمونه شاهد) و غلظت دو برابر غلظت محیط استاندارد برای کشت *Spirulina maxima* و مقایسه آن با تیمارهای دیگر استفاده شد.

بررسی ها نشان داد که میزان رشد زیست توده طی ۴ روز اولیه آزمایش در محیط کشت B رشد چندانی نداشته است و سلول ها بعد از ۴ روز از دوره تاخیر به منظور سازگاری با شرایط فتوسنتز روند صعودی را طی کرده اند.

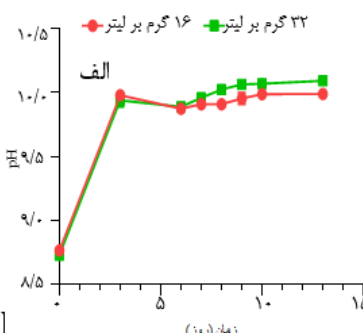
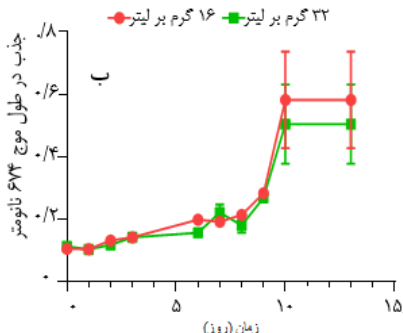
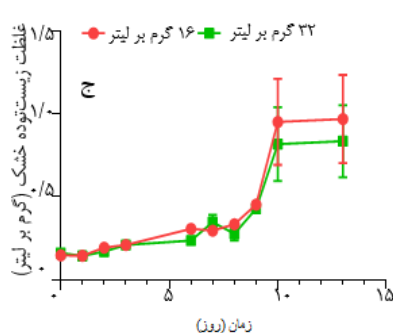
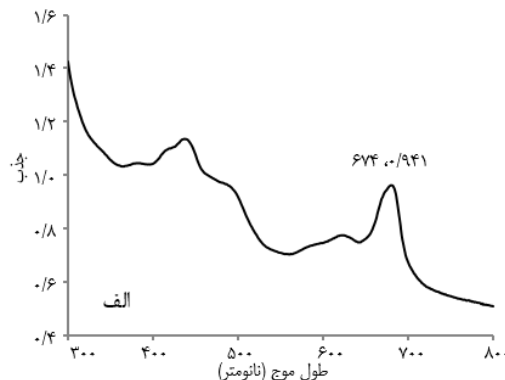
با توجه به نتایج به دست آمده از محیط کشت B، غلظت منبع کربنی بی-کربنات سدیم به عنوان یک عامل مهم و تاثیرگذار در پروسه رشد سلولی است. میزان جذب طی ۱۰ روز اول کشت همان طور که انتظار می رفت افزایش یافت که این میزان از روز ۱۰ تا ۱۳ تقریباً ثابت مانده است و میزان جذب در انتهای رشد برای نمونه با غلظت ۱۶ گرم بر لیتر (تیمار ۱) نسبت به نمونه ۳۲ گرم بر لیتر (تیمار ۲) کمی بیشتر است که از لحاظ اقتصادی نیز استفاده از نمونه با غلظت کمتر ترجیح داده می شود. بیشترین افزایش pH در ۳ روز اول مشاهده شد که این میزان از ۸/۷ به ۱۰ افزایش یافت که طی ۱۰ روز آتی افزایش و کاهش چندانی نداشته است. با مشاهده نمونه در زیر میکروسکوپ (شکل ۲) شکست بافت سلولی در تیمار ۲ دیده شد ولی در تیمار ۱ نمونه های بلند فنری شکل ریزجلبک به وضوح قابل مشاهده بود.

اثر تغییر غلظت با استفاده از منبع کربنی کربنات سدیم

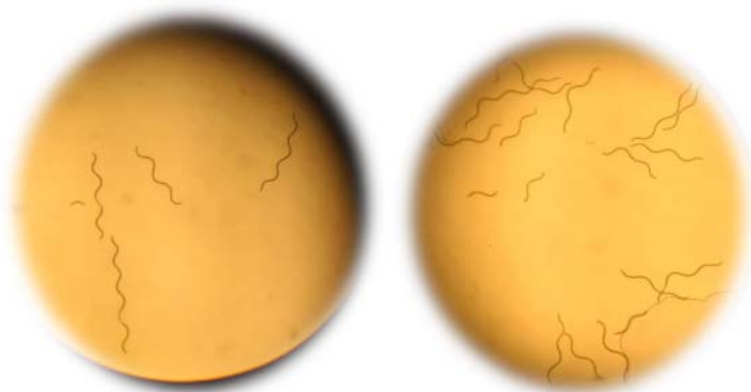
نمودار ۳ روند تغییرات جذب و pH با زمان در محیط کشت C روی میزان رشد سلول را نشان می دهد. نتایج حاصل از این نمودار نشان



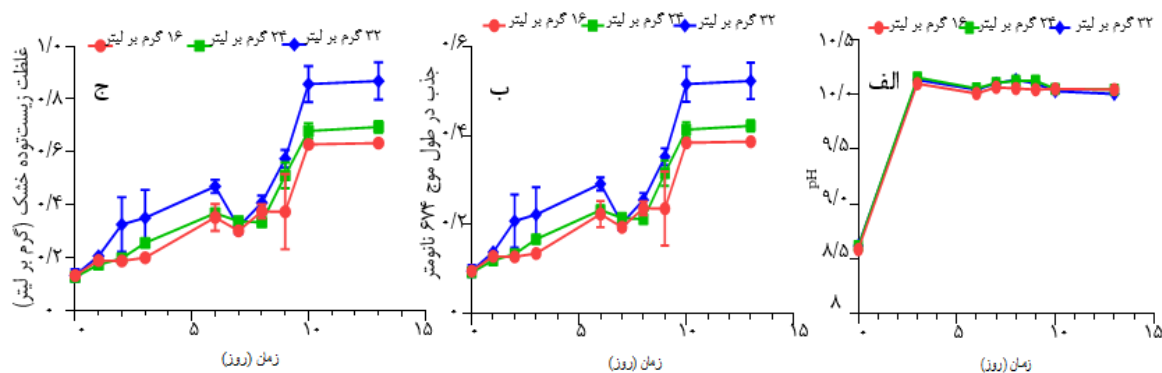
نمودار (الف) نمودار تعیین طول موج بهینه جذب؛ (ب) نمودار کالیبراسیون استاندارد *Spirulina maxima* در طول موج بهینه ۶۷۴ نانومتر



نمودار (۲) روند تغییرات pH (الف)، میزان جذب (ب) در طول موج ۶۷۴ نانومتر و غلظت زیست توده خشک (ج) با زمان در محیط کشت B



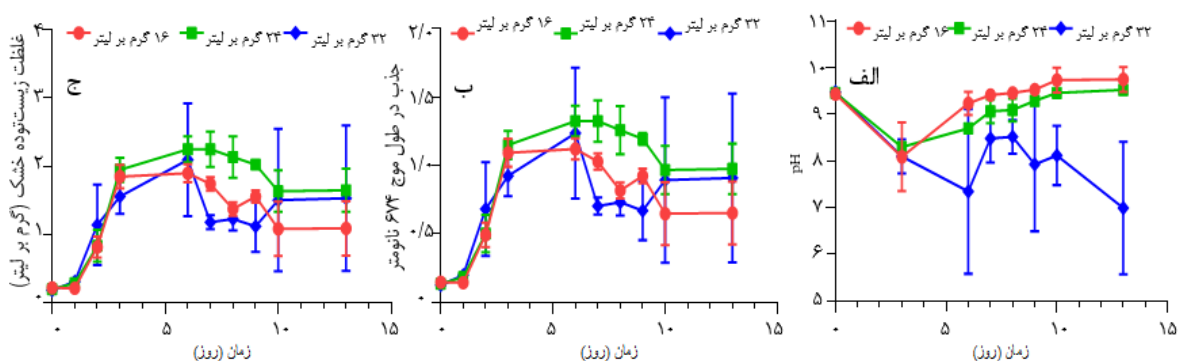
شکل ۲) تصویر میکروسکوپی *Spirulina maxima* با بزرگنمایی ۱۰ در محیط کشت B (از راست به چپ مربوط به غلظت ۳۲ و ۱۶ گرم بر لیتر)



نمودار ۳) روند تغییرات pH (الف)، میزان جذب (ب) در طول موج ۶۷۴ نانومتر و غلظت زیست‌توده خشک (ج) با زمان در محیط کشت C



شکل ۳) تصویر میکروسکوپی *Spirulina maxima* با بزرگنمایی ۱۰ در محیط کشت C (از راست به چپ مربوط به غلظت ۳۲، ۲۴ و ۱۶ گرم بر لیتر)



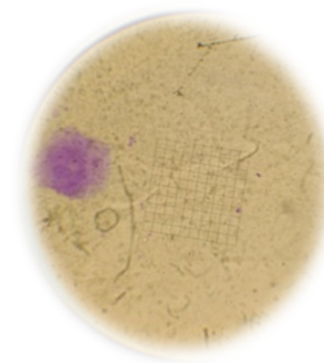
نمودار ۴) روند تغییرات pH (الف)، میزان جذب (ب) در طول موج ۶۷۴ نانومتر و غلظت زیست‌توده خشک (ج) با زمان در محیط کشت G

و پس از آن روند رشد سلولی نزولی بوده است. نمودار جذب و متقابلاً نمودار وزن خشک زیست‌توده نوسانات زیادی داشته است. افت جذب زیادی به‌ویژه برای نمونه با غلظت ۳۲ گرم بر لیتر دیده شد که پس از ارزیابی تست میکروبی مشخص شد که از روز ۶ میزان رشد باکتری شروع و در روزهای پایانی به حدی زیاد شد که باکتری، جلبک محیط کشت را به‌عنوان ماده مغذی استفاده کرد. هر دو محیط کشت منابع کربنی گلوکز و ملاس حاوی نوع باکتری یکسان بوده‌اند اما باکتری رشدیافته در محیط کشت M بسیار بیشتر از محیط کشت G است. به‌طور کلی، به نظر می‌رسد که در هر دو محلول M و G، در اغلب اوقات، اوایل کشت سبب افزایش تقسیمات سلولی و افزایش غلظت شده ولی با افزایش دوره کشت این میزان کاهش یافته است. مقایسه نمودارهای ۴ و ۵ نشان می‌دهد که روند تقسیمات و رشد سلولی در هر دو محیط کشت از روز تلقیح اولیه یک روند افزایشی داشته است و فاز تاخیری مشاهده نشد. البته این مساله در خصوص دو منبع کربنی دیگر صدق نمی‌کند. در روز هفتم ریزجلبک که از ملاس به‌عنوان منبع کربنی استفاده کرده است از نظر باکتری و آلاینده‌های کلی‌فرمی ارزیابی و توده‌های باکتری گرم مثبت هوازی میله‌ای باسیلوس از جنس‌های لاکتوباسیلوس و باکتری کروی‌شکل کوکسی مشاهده شد که میزان تراکم باکتری نمونه ملاسی بسیار بیشتر از زیست‌توده رشد یافته در منبع کربنی گلوکزی بوده است (شکل ۵).

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

ضریب رشد ویژه نمونه ملاس در غلظت‌های مختلف در این بررسی با نتایج حاصل از کار محققین در غلظت‌های ۵٪ و ۷۵٪ گرم بر لیتر برای رشد ریزجلبک *Spirulina platensis* در شرایط میکسوتروفیک برابری کرده است [26]. در طول یک دوره ۱۳ روزه، بالاترین ضریب رشد ویژه به ترتیب مربوط به تیمارهای ۵ و ۴ بود که متعلق به محلول گلوکز است و پس از آن مربوط به تیمار ۸ بوده است. تیمارهای ۷ و ۲ که هر یک به ترتیب متعلق به محلول‌های C و B بودند از میزان ضریب رشد ویژه یکسانی برخوردار هستند و تقریباً زمان دوبرابر شدن سلول آنها هم مشابه است. مطالعه فرجی و همکاران با نتایج مطالعه حاضر همخوانی داشت و آنها گلوکز را به‌عنوان منبع کربنی موثر بر رشد ریزجلبک *Spirulina platensis* و تولید رنگدانه فیکوسیاینین دانستند [35]. طی تست‌های روزانه ضریب رشد ریزجلبک با استفاده از عامل کربنی ملاس چغندر در غلظت‌های مختلف نسبت به نمونه شاهد (تیمارهای ۱ و ۲) کمتر است، به‌طوری که رشد در غلظت ۱۶ گرم بر لیتر، ۷۷٪ کمتر از نمونه شاهد است و تغییر غلظت ملاس هم در این امر تاثیر چندانی

در روز اول بالاترین pH را محیط کشت G نسبت به دیگر محیط‌های کشت به خود اختصاص داد و نمودار سیر نزولی را طی چند روز اول طی کرده است تا اینکه ریزجلبک شروع به رشد کرد و خود را با محیط تطبیق داد. نتایج نمودار ۴ حاکی از آن است که طی روزهای اولیه سلول رشد بسیار خوبی داشته است که تقریباً در روز ۶ تا ۷ (به جز برای نمونه با غلظت ۳۲ گرم بر لیتر) ثابت باقی مانده است اما پس از آن با افت شدیدی در میزان رشد مواجه شد. بعد از بررسی تست باکتری به‌منظور ارزیابی آلاینده‌های کلی‌فرمی، رشد باکتری باسیلوس و کوکسی در این نمونه دیده شد که همین امر سبب کاهش میزان رشد ریزجلبک شد (شکل ۴).



شکل ۴ تراکم رشد باکتری باسیلوس و کوکسی در نمونه رشدیافته با منبع کربنی گلوکز

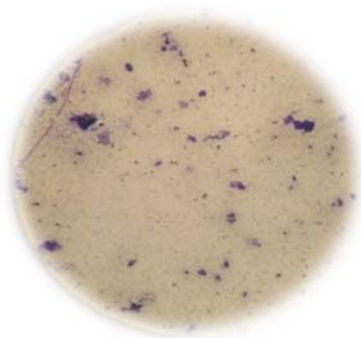
در روزهای ۶ به بعد که رشد اولیه باکتری شروع شد pH (با در نظر نگرفتن برخی نوسانات) رشد صعودی یافت و جذب رشد نزولی را طی کرد. بنابراین میزان pH با جذب رابطه عکس دارد یعنی نمونه با بالاترین pH کمترین میزان جذب و زیست‌توده خشک را به همراه دارد. البته نتایج و مشاهدات عینی نشان داد که ممکن است این تغییرات در میزان جذب به‌علت شرایط کشت میکسوتروفیک باشد یعنی در مراحل نخست کشت بخش هتروتروفیک عامل تعیین‌کننده سرعت رشد جلبک بوده است و پس از ۷ روز به‌دلیل افزایش غلظت سلولی به حد ماکزیمم خود سبب کاهش نفوذ نور به داخل بافت سلولی می‌شود و بخش فتوتروفیک نتوانسته است بر بخش هتروتروف چیره شود و پدیده فتوسنتز تسلط پیدا نکرده است و البته رشد باکتری در این نمونه هم را نباید نادیده گرفت.

اثر تغییر غلظت با استفاده از منبع کربنی ملاس

نمودار ۵ اثر منبع کربنی ملاس چغندر بر میزان رشد و pH در سه غلظت متفاوت را نشان داده است. نتایج نشان داد که میزان جذب طی روزهای اولیه در کلیه نمونه‌ها مشابه نمونه‌های آماده‌سازی شده در محیط کشت G یک روند افزایشی داشته است که میزان افزایش در نمونه با غلظت ۳۲ گرم بر لیتر بیشتر از ۲۴ گرم بر لیتر و همچنین بیشتر از ۱۶ گرم بر لیتر بوده است که این میزان در روزهای ۶ و ۷ تغییرات چندانی نداشته است. البته در روز ۸ یک کاهش بسیار جزئی در کلیه نمونه‌های ملاسی دیده شد که دوباره در روز ۹ برای هر ۳ نمونه افزایش یافت ولی این افزایش و کاهش چشمگیر نبوده

کاهش برای نمونه گلوکزی (۳۱٪ افت نرخ حداکثر رشد ویژه) نسبت به سایر بیشتر بود. حداکثر نرخ رشد محاسبه شده با استفاده از روش رگرسیون اختلاف معنی داری با میزان محاسبه شده از روابط ۱ و ۲ را نشان داده است و از آنجایی که در روش رگرسیون طول خط با بهترین برازش نموداری از میان داده ها را نشان می دهد و در مدل رگرسیونی حاصل، ضریب تعیین بالاتر از ۹۹٪ بوده است، لزوماً صحت یک مدل مناسب را نشان می دهد.

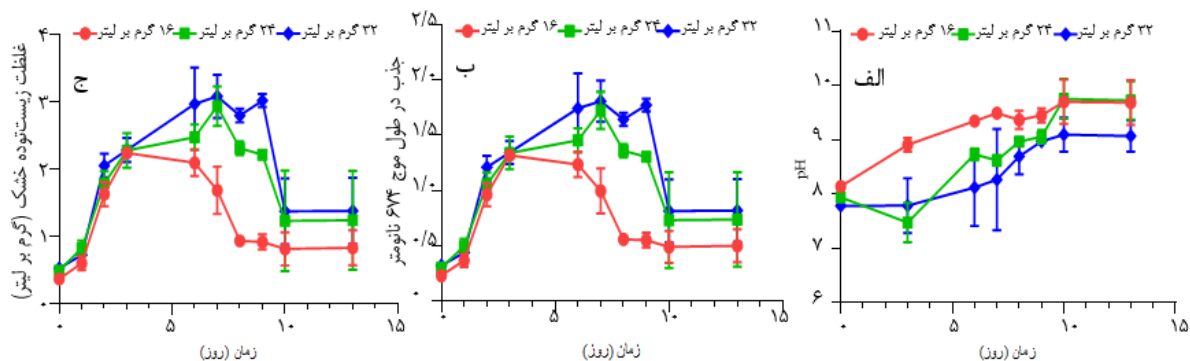
نمودار ۷ سطح زیر منحنی در منابع کربنی مختلف با غلظت های متفاوت را ارائه می دهد. از آنجایی که میزان رشد نمونه ملاسی طی چند روز اول سیر صعودی داشته است بنابراین سطح زیر منحنی رشد یافته با منبع کربنی ملاس بیشتر از سایر نمونه ها است.



شکل ۵: تراکم رشد باکتری باسیلوس و کوکسی در نمونه رشد یافته با منبع کربنی ملاس

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

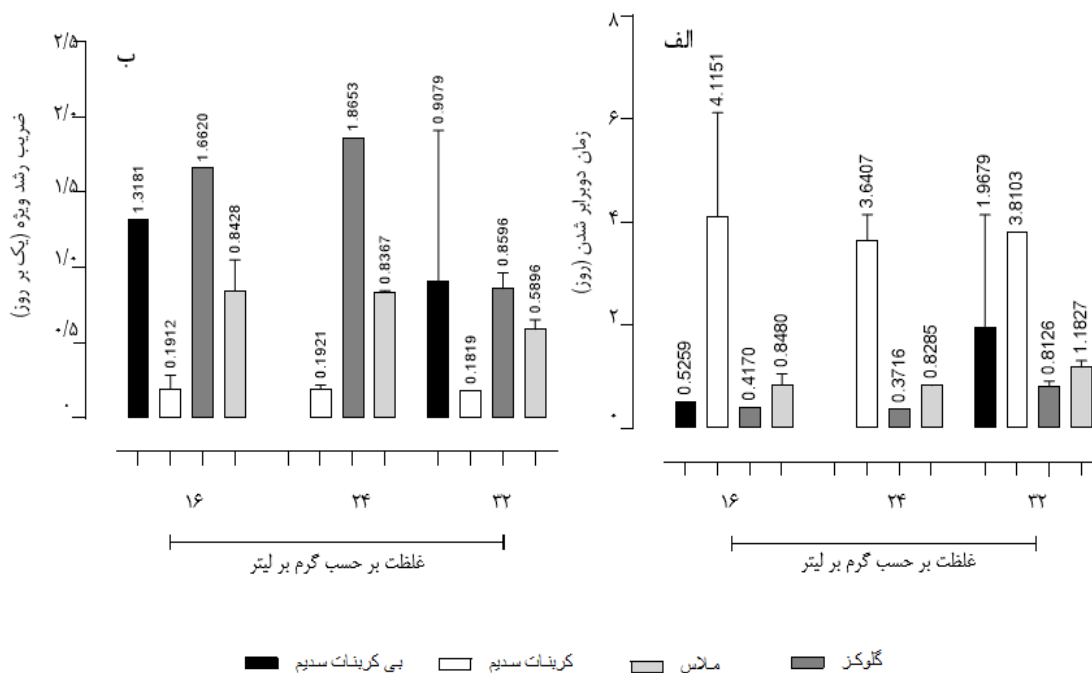
نمودار ۶ به وضوح نشان داده است که با افزایش ضریب نرخ رشد ویژه، زمان دوبرابر شدن رشد جلبک کاهش یافته است. بالاترین ضریب رشد یعنی کمترین زمان دوبرابر شدن رشد متعلق به نمونه گلوکزی است. در میان تیمارها نمونه رشد یافته در محیط کشت با منبع کربنی کرینات سدیم بالاترین زمان دوبرابر شدن رشد و کمترین ضریب رشد ویژه را به خود اختصاص داده است. افزایش غلظت ملاس باعث کاهش حداکثر ضریب رشد ویژه شده است. تحقیقات پژوهشگران ثابت کرد که افزایش غلظت ملاس از ۲۵٪ تا ۵۰٪ گرم بر لیتر تاثیری در حداکثر ضریب رشد ویژه ریزجلبک *Spirulina platensis* ندارد ولی افزایش غلظت بیش از ۵۰٪ گرم بر لیتر سبب افزایش میزان حداکثر ضریب رشد ویژه خواهد شد که با نتایج مطالعه حاضر تناقض دارد [26]. نتایج حاکی از آن است که موثرترین غلظت رشد جلبک ۲۴ گرم بر لیتر است و کلیه نمونه ها در غلظت بالا کاهش حداکثر ضریب رشد ویژه را نشان داده اند که این میزان



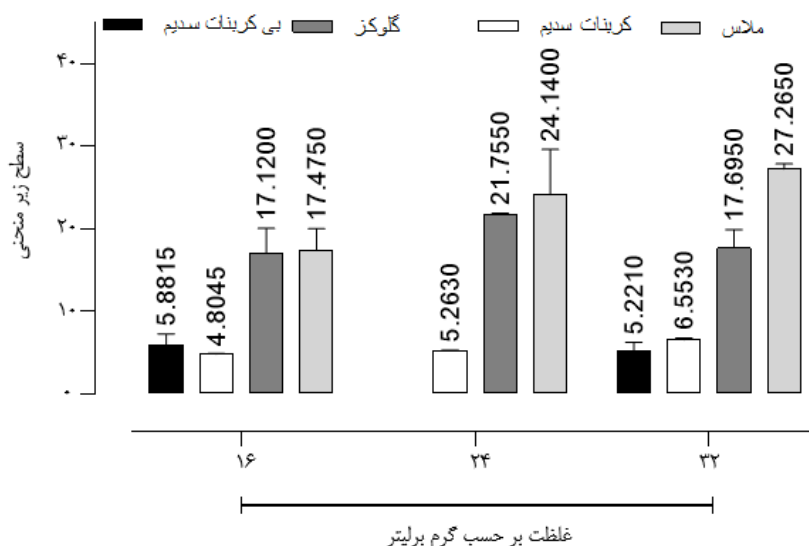
نمودار ۵) روند تغییرات pH (الف)، میزان جذب (ب) در طول موج ۶۷۴ نانومتر و غلظت زیست توده خشک (ج) با زمان در محیط کشت M

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

تیمار	ماکزیمم غلظت (گرم بر لیتر)	روز	غلظت روز نهایی (گرم بر لیتر)	ضریب رشد روز نهایی (یک بر روز)	زمان دوبرابر شدن (روز)	راندمان
۱	۰/۹۶۸	۱۳	۰/۹۶۸	۰/۱۳۲	۵/۲۶۲	۰/۵۷۴
۲	۰/۸۳۵	۱۳	۰/۸۳۵	۰/۱۲۷	۵/۴۵۸	۰/۸۲۳
۳	۱/۸۹۸	۶	۱/۰۹۲	۰/۱۲۲	۵/۶۷۴	۱/۰۷۵
۴	۲/۲۴۹	۷	۱/۶۴۸	۰/۱۵۴	۴/۵۰۶	۱/۶۳
۵	۲/۰۹۴	۶	۱/۵۳۲	۰/۱۶۳	۴/۲۶۶	۱/۵۱۷
۶	۰/۶۳۳	۱۳	۰/۶۳۳	۰/۱۲۰	۵/۷۶۳	۰/۶۲۳
۷	۰/۶۹۵	۱۳	۰/۶۹۵	۰/۱۲۷	۵/۴۴۲	۰/۶۸۴
۸	۰/۸۶۹	۱۳	۰/۸۶۹	۰/۱۴۵	۴/۷۹۴	۰/۸۵۸
۹	۲/۲۸۴	۴	۰/۸۲۹	۰/۰۶۳	۱۰/۹۳۳	۰/۸۰۱
۱۰	۲/۹۴۰	۷	۱/۲۳۷	۰/۰۶۷	۱۰/۴۲۲	۱/۱۹۷
۱۱	۳/۰۸۳	۷	۱/۳۷۷	۰/۰۷۵	۹/۲۷۵	۱/۳۳۷



نمودار ۶) حداقل زمان دوبرابر شدن (الف) و حداکثر ضریب نرخ رشد ویژه (ب) در تیمارهای مختلف



نمودار ۷) سطح زیر منحنی در تیمارهای مختلف

بحث و نتیجه‌گیری

منبع کربنی یکی از مهمترین عوامل محدودکننده رشد و کنترل‌کننده رشد ریزجلبک است. اگرچه سیانوباکتری‌های تک‌سلولی می‌توانند از منابع کربنی متعددی برای رشد استفاده کنند. محدود مطالعاتی روی ریزجلبک *Spirulina maxima* انجام شده است. محققین اثبات کردند که گلوکز سبب افزایش نرخ رشد *Spirulina platensis* در روش‌نمایی خواهد شد اما *Spirulina platensis* محیط با غلظت ۰/۵٪ می‌تواند به‌خوبی رشد کند [36]. براساس دیگر مطالعات، *Spirulina platensis* در محیط با منبع کربنی گلوکز نسبت به منبع کربنی استات رشد بهتری دارد [37]. در پژوهشی اثرات

مختلف کربنات‌سدیم، گلوکز، مانیتول، ساکاروز، کربنات‌آمونیم و کربنات‌کلسیم به‌عنوان منابع کربنی جایگزین به جای منبع کربنی محیط‌های کشت CS-1 و SP، S-10، S-10، SM-2 بررسی شد. در این بررسی منابع کربنی با غلظتی برابر با غلظت کربنات به محیط کشت افزوده و برای مدت ۳۰ روز کشت داده شدند و هر ۱۰ روز میزان زیست‌توده به‌منظور بررسی تاثیر منبع کربنی جایگزین اندازه‌گیری شد. بی‌کربنات‌سدیم و کربنات‌سدیم برجسته‌ترین منابع کربنی معرفی شده هستند که سبب افزایش میزان زیست‌توده شدند. به‌طور کلی میزان زیست‌توده زمانی افزایش یافت که کربنات‌سدیم جایگزین بی‌کربنات‌سدیم در محیط‌های کشت شد. بیشترین و

منظور تعیین بهترین منبع کربنی جایگزین در فرآیند ناپیوسته که سبب افزایش میزان زیست توده شود از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. نتایج حاکی از افزایش زیست توده و ضریب رشد ویژه است که بسته به غلظت گلوکز برخی تفاوت‌ها میان مقادیر قابل مشاهده بود اما میزان زمان دوبرابر شدن سلول‌ها با افزایش غلظت کاهش یافت. نتایج به دست آمده در این مطالعه نشان داد که غلظت ملاس تاثیر به سزایی در حداکثر ضریب رشد آن داشته، در حالی که غلظت منابع کربنی دیگر عامل موثری بر تغییرات حداکثر ضریب رشد نداشته است. اگرچه نمونه ملاس دارای بیشترین میزان غلظت زیست توده است ولی ماکزیمم میزان نرخ رشد ویژه متعلق به نمونه گلوکز است که با افزایش غلظت گلوکز به حداکثر ضریب رشد ویژه منجر شد.

تشکر و قدردانی: بدین وسیله از دانشگاه پلی تکنیک مکزیک (SIP-IPN) که زمینه انجام مطالعه حاضر با شماره پروژه‌های ۲۰۱۹۵۳۲۰، ۲۰۱۹۵۵۸۴ و ۲۰۱۹۶۳۰۴ تعریف شده در دانشگاه نامبرده را فراهم کردند سپاسگزاری می شود.

تاییدیه اخلاقی: موردی توسط نویسندگان گزارش نشده است.

تعارض منافع: موردی توسط نویسندگان گزارش نشده است.

سهم نویسندگان: ندا میرحسینی (نویسنده اول)، پژوهشگر اصلی/تحلیلگر آماری (۴۰٪)؛ رضا داورنژاد (نویسنده دوم)، نگارنده مقدمه (۱۰٪)؛ احمد حلاجی ثانی (نویسنده سوم)، تحلیلگر آماری (۲۰٪)؛ ادگار کائو ایروپا (نویسنده چهارم)، پژوهشگر کمکی (۲۰٪)؛ امید توکلی (نویسنده پنجم)، روش شناس (۱۰٪)

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

منابع

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

کمترین میزان زیست توده به ترتیب از محیط کشت های CS-1 و S-10 گزارش شد. *Spirulina platensis* در استفاده از منابع کربنی گلوکز، مانیتول و اوره به عنوان منبع کربنی جایگزین رشد چندان نداشته است^[38]. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که افزودن گلوکز و ملاس هرچند با غلظتی برابر با غلظت کربنات محیط کشت زاروک با کمی اصلاحات تاثیرات خوبی برای رشد ریز جلبک *Spirulina maxima* برای کشت های کوتاه مدت خواهد داشت، اگرچه در طولانی مدت این تاثیر کاهش می یابد. البته این نتایج در توافق با نتایج دیگران نیست. به طور مثال محققین ثابت کردند که به ازای تولید ۱ کیلوگرم *Spirulina platensis* نیاز به ۵۰ کیلوگرم شکر به عنوان منبع کربنی جایگزین است^[39]. نتایج مطالعه حاضر شامل افزودن منبع کربنی گلوکز به جای منبع بی کربنات سدیم محیط کشت زاروک به منظور رشد ریز جلبک *Spirulina maxima* با نتایج این محققین مغایرتی ندارد. هرچند به نظر می رسد که با افزایش میزان قندی بهتر است که دوره کشت را کاهش داد، به طوری که پرورش این گونه در محیط کشت G در تیمار ۵ بالاترین راندمان را نسبت به محیط کشت زاروک نشان داده است که تقریباً بیش از ۲/۵ برابر تیمار ۱ بود. همچنین دیگر محققین ماکزیمم رشد ریز جلبک و تولید بیشترین میزان فیکوسیائین را زمانی گزارش کردند که منبع کربنی گلوکز به عنوان منبع کربنی مازاد (۲ گرم بر لیتر) به صورت نیمه پیوسته و نه ناپیوسته به محیط کشت زاروک در شرایط میکسوتروفیک افزوده شد^[26, 40]. نتایج این مطالعه حاکی از آن است که افزودن گلوکز به عنوان منبع کربنی جایگزین در غلظت های بالا به صورت ناپیوسته در شرایط میکسوتروفیک بر رشد ریز جلبک *Spirulina maxima* موثر است. نتایج تیمارهای ۳، ۴ و ۵ نشان دهنده واکنش مطلوب ریز جلبک *Spirulina maxima* در غلظت ۳۲ گرم بر لیتر است و برای تولید انبوه با اضافه کردن این غلظت می توان زیست توده بیشتری را تولید کرد. دیگر محققین تاثیر منابع کربنی مختلف (گلوکز، اتانول و اسید استیک) را در خوراک دهی به صورت ناپیوسته و نیمه پیوسته در شرایط میکسوتروفیک بررسی کردند و به این نتیجه رسیدند که افزایش غلظت منبع کربنی در خوراک دهی ناپیوسته سبب افزایش زیست توده می شود. اگرچه افزودن منابع کربنی در غلظت های بالاتر از ۱ گرم در لیتر در محیط تغذیه ای نیمه پیوسته تاثیر معنی داری بر پارامترهای فوق نداشته است^[23]. بررسی رشد سلول ها در روزهای مختلف آزمون نشان داد که افزایش غلظت ملاس در رشد ریز جلبک بسیار موفق بوده اما در میزان ضریب رشد ویژه نامطلوب بوده است که نتایج در توافق با کار دیگر محققین بوده است^[26]. کلیه تیمارهای رشد یافته در محیط کشت G از روز شروع آزمایش یا تلقیح اولیه روند صعودی داشته اند، هرچند طی روزهای پایانی این میزان رشد بسیار کاهش یافت اما (سوسپانسیون جلبکی در محیط کشت زاروک اصلاح شده این مطالعه) در همان روز داشته است که این امر نشان دهنده تاثیر بسیار محرک تیمارهای گلوکز بر رشد و تقسیمات سلولی است. بدین

- of *Spirulina platensis* on glucose for phycocyanin production using a fed-batch system. *Enzyme Microb Technol.* 1997;20(3):221-4.
- 26- Andrade MR, Costa JA. Mixotrophic cultivation of microalga *Spirulina platensis* using molasses as organic substrate. *Aquaculture.* 2007;264(1-4):130-4.
- 27- Dineshkumar R, Umamageswari P, Jayasingam P, Sampathkumar P. Enhance the growth of *Spirulina platensis* using molasses as organic additives. *World J Pharm Res.* 2015;4(6):1057-66.
- 28- Memije-Lazaro IN, Blas-Valdivia V, Franco-Colín M, Cano-Europa E. *Arthrospira maxima* (*Spirulina*) and C-phycocyanin prevent the progression of chronic kidney disease and its cardiovascular complications. *J Funct Foods.* 2018;43:37-43.
- 29- Shahini Z, Farhadian O, Kadivar M. Combine effects of temperature and photoperiod on growth and biomass of green algae *Scenedesmus quadricauda*. *J Plant Res.* 2018;31(1):169-81. [Persian]
- 30- Soni RA, Sudhakar K, Rana RS. Comparative study on the growth performance of *Spirulina platensis* on modifying culture media. *Energy Rep.* 2019;5:327-36.
- 31- Ndjouondo GP, Dibong SD, Wamba FO, Taffouo VD. Growth, productivity and some physico-chemical factors of *spirulina platensis* cultivation as influenced by nutrients change. *Int J Bot.* 2017;13(2):67-74.
- 32- Ranjith L, Shukla SP, Vennila A, Purushothaman CS. Growth performance of *Spirulina (Arthrospira) platensis* in a low cost medium: An assessment. *Acta Biologica Indica.* 2013;2(1):335-42.
- 33- Pereira MI, Chagas BM, Sassi R, Medeiros GF, Aguiar EM, Borba LH, et al. Mixotrophic cultivation of *Spirulina platensis* in dairy wastewater: Effects on the production of biomass, biochemical composition and antioxidant capacity. *PLoS One.* 2019;14(10):e0224294.
- 34- Dmytryk A, Saeid A, Chojnacka K. Biosorption of microelements by *spirulina*: Towards technology of mineral feed supplements. *Sci World J.* 2014;2014:356328.
- 35- Faraji D, Rezaei K, Hashemiravan M, Kalantari M, Sharifi A, Golmakani MT, et al. Optimization of Fedbatch cultivation of new two carbon resources (ethanol and acetic acid) in Phycocyanin Production by *Spirulina Microalgae*. *Innov Food Sci Technol.* 2015;7(2):78-87. [Persian]
- 36- Moraes ID, Arruda RD, Maresca NR, Antunes AD, Moraes RD. *Spirulina platensis*: process optimization to obtain biomass. *Food Sci Technol.* 2013;33(supl.1):179-83.
- 37- Chen T, Zheng W, Wong YS, Yang F, Bai Y. Accumulation of selenium in mixotrophic culture of *Spirulina platensis* on glucose. *Bioresour Technol.* 2006;97(18):2260-5.
- 38- Soundarapandian P, Vasanthi B. Effects of chemical parameters on *Spirulina platensis* biomass production: Optimized method for phycocyanin extraction. *Int J Zool Res.* 2008;4(1):1-11.
- 39- Venkataraman GS, Subramanian G, Kaushik BD. *Cyanobacterial biotechnology*. Enfield: Science Publishers; 1998.
- 40- Ciferri. *Spirulina, the edible microorganism*. *Microbiol Rev.* 1983;47(4):551-78.
- 9- Li B, Zhang X, Gao M, Chu X. Effects of CD59 on antitumoral activities of phycocyanin from *Spirulina platensis*. *Biomed Pharmacother.* 2005;59(10):551-60.
- 10- Colla LM, Furlong EB, Costa JA. Antioxidant properties of *Spirulina (Arthrospira) platensis* cultivated under different temperatures and nitrogen regimes. *Braz Arch Biol Technol.* 2007;50(1):161-7.
- 11- Lamela T, Rocha FJ. Phycocyanin production in seawater culture of *Arthrospira maxima*. *Ciencias Marinas.* 2000;26(4):607-19.
- 12- Amara AA, Steinbüchel A. New medium for pharmaceutical grade *Arthrospira*. *International J Bacteriol.* 2013;2013:203432.
- 13- Feng DL, Wu ZC. Culture of *Spirulina platensis* in human urine for biomass production and O₂ evolution. *J Zhejiang Univ Sci B.* 2006;7(1):34-7.
- 14- Olguín EJ, Galicia S, Mercado G, Pérez T. Annual productivity of *Spirulina (Arthrospira)* and nutrient removal in a pig wastewater recycling process under tropical conditions. *J Appl Phycol.* 2003;15(2-3):249-57.
- 15- ScholarlyEditions. Alkaline Phosphatase. Degradation of chlorphrifos by an alkaline phosphatase from the cyanobacterium *Spirulina Platensis*. In: ScholarlyEditions. Phosphoric monoester hydrolases: Advances in research and application. Atlanta: Scholarly Editions; 2011. pp. 41-90.
- 16- De Oliveira MA, Monteiro MP, Robbs PG, Leite SG. Growth and chemical composition of *Spirulina maxima* and *Spirulina platensis* biomass at different temperatures. *Aquac Int.* 1999;7(4):261-75.
- 17- Materassi R, Tredici M, Balloni W. *Spirulina* culture in sea-water. *Appl Microbiol Biotechnol.* 1984;19(6):384-6.
- 18- Sharma G, Kumar M, Ali MI, Jasuja ND. Effect of carbon content, salinity and pH on *Spirulina platensis* for phycocyanin, allophycocyanin and phycoerythrin accumulation. *J Microb Biochem Technol.* 2014;6(4):202-6.
- 19- Chen F, Zhang Y, Guo S. Growth and phycocyanin formation of *Spirulina platensis* in photoheterotrophic culture. *Biotechnol Lett.* 1996;18(5):603-8.
- 20- Marquez FJ, Sasaki K, Kakizono T, Nishio N, Nagai Sh. Growth characteristics of *Spirulina platensis* in mixotrophic and heterotrophic conditions. *J Ferment Bioeng.* 1993;76(5):408-10.
- 21- Bogorad L. Phycobiliproteins and complementary chromatic adaptation. *Annu Rev Plant Physiol.* 1975;26(1):369-401.
- 22- Golmakani MT, Rezaei K, Mazidi S, Razavi SH. Effect of alternative C₂ carbon sources on the growth, lipid, and γ -linolenic acid production of *spirulina (Arthrospira platensis)*. *Food Sci Biotechnol.* 2012;21(2):355-63.
- 23- Zhang XW, Zhang YM, Chen F. Application of mathematical models to the determination optimal glucose concentration and light intensity for mixotrophic culture of *Spirulina platensis*. *Process Biochem.* 1999;34(5):477-81.
- 24- Chojnacka K, Noworyta A. Evaluation of *Spirulina* sp. growth in photoautotrophic, heterotrophic and mixotrophic cultures. *Enzyme Microb Technol.* 2004;34(5):461-5.
- 25- Chen F, Zhang Y. High cell density mixotrophic culture