امکان کشت جلبک اسپیرولینا پلاتنسیس با استفاده از آب دریای خلیج فارس

محمد حسن مرتضوی[۱]، مهدی گنج‌خانلو*[۱]، ابوالفضل زالی[۱]، محمد علی نعمت اللهی[۲]

[۱]گروه علوم دامی دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران، کرج، تهران.

[۲]گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، تهران.

*نویسندگان مسئول: ganjkhanlou@ut.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۸/۳/۱۴ تاریخ پذیرش: ۹۸/۱۰/۲۴

چکیده

جلبک اسپیرولینا پلاتنسیس به‌دلیل توازن اسید آمینه‌های ویژه در تغذیه انسان و دام می‌تواند مفید واقع شود. این مطالعه به‌منظور بررسی امکان پرورش جلبک اسپیرولینا پلاتنسیس به وسیله غنی‌سازی آب دریای خلیج فارس با منابع نیتروژنی و کربنی در قالب طرح کاملاً تصادفی به‌مدت ۲۱ روز انجام شد. تیمارهای آزمایشی عبارت بودند از (۱) آب دریا (شاهد)، (۲) آب دریا غنی شده با اوره، (۳) آب دریا غنی شده با بی‌کربنات سدیم و (۴) آب دریا غنی شده با اوره و بیکربنات سدیم. نتایج نشان داد که هرچند تغییرات pH در بین تیمارها معنی‌دار نبود ولی تفاوت معنی‌داری در تولید زیست‌توده بین تیمارهای ۱ با ۳ و ۱ با ۴ ($P<۰/۰۵$) وجود داشته و افزایش تولید زیست توده در تیمار ۴ حداکثر می‌باشد. دلیل آن ممکن است وجود مشترک هر دو منبع تامین کننده نیتروژن و کربن نسبت به تیمارهای دیگر باشد. با توجه به نتایج می‌توان نتیجه گرفت که غنی‌سازی آب دریای خلیج فارس و با توجه به موقعیت جغرافیایی می‌توان از سواحل دریا برای پرورش جلبک اسپیرولینا پلاتنسیس استفاده کرد.

واژگان کلیدی: پرورش جلبک، آب دریا، محیط کشت، اسپیرولینا پلاتنسیس.

مقدمه

تقاضا برای افزایش محصولات دامی به‌دلیل افزایش جمعیت کره زمین رو به افزایش است (Myers and Kent, 2003). از این‌رو شناسایی منابع تغذیه‌ای جدید برای حیوانات ضروری می‌باشد. منابع تغذیه‌ای جدید باید ارزش غذایی بالا، ضریب تبدیل بالا، توانایی بهبود کیفیت تولیدات دامی و استفاده از زمین و آب با بازدهی بالا داشته باشند (Poppi and Mclennan, 2010). در کنفرانس جهانی غذای سازمان ملل سال ۱۹۷۰ به اسپیرولینا عنوان بهترین غذای آینده داده شد. بعد از حدود چهار دهه است که دنیا به پروش انواع جلبک‌ها روی آورد (Patel and Goyal, 2013)، ولی اسپیرولینا به‌دلیل وجود فیبر پائین قابلیت هضم بالایی و همچنین اسیدهای چرب ضروری، ویتامین‌های گروه B، انواع ریز مغذی‌ها که خاصیت فراوان از جمله خاصیت آنتی اکسیدانی دارند و پروفایل آمینو اسیدهای ضروری که بر طبق نظریه آمینو اسید ایده‌آل، نزدیک‌ترین پروفایل اسیدآمینه‌ای را به بافت ماهیچه‌ای و پروتئین شیر گاو دارد، به‌عنوان غذایی با ماده مغذی بالا معرفی شده است (Moorhead *et al*., 2011). میزان اسیدهای آمینه ضروری محتوی جلبک اسپیرولینا در جدول ۱ نشان داده شده است (Moorhead *et al*., 2011).

در مطالعه‌ای که برروی گاوهای اوایل زایش انجام شد و طول دوره ۹۰ روز بود. در گروه آزمایشی که با ۲۰۰ گرم پودر جلبک اسپیرولینا در روز تغذیه شدند افزایش ۲۴ درصدی تولید شیر نسبت به گروه کنترل مشاهده شد (Kuplys *et al*., 2009). در مطالعه‌ای دیگر جوجه‌های گوشتی یک روزه با وزن حدود ۴۲ گرم به‌مدت شش هفته انجام شد. تغذیه پودر جلبک اسپیرولینا به میزان ۰/۱ درصد جیره در مقایسه با پری‌بیوتیک لاکتوز و پری‌بیوتیک مایکو بودند، مورد بررسی قرار گرفت و نتایج نشان داد که وزن انتهای دوره در تیمار تغذیه شده با اسپیرولینا ۲/۳۲۲ کیلوگرم بود که نسبت به سایر تیمارها افزایش معنی‌داری داشت (Kaoud, 2015).

اسپیرولینا پلاتنسیس (*Spirulina platensis*) جلبکی تک سلولی است که در آب‌هایی با pH قلیایی رشد می‌کند. برای کشت این جلبک در شرایط آزمایشگاهی محیط کشت‌های متفاوتی از جمله زاروک وجود دارد (Sanchez *et al*., 2003; Lababpour, 2018). ریز جلبک‌ها به شیوه‌های

جدول ۱ - آنالیز اسید های آمینه ضروری جلبک اسپیرولینا.

آمینو اسیدهای ضروری	درصدی از کل	آمینو اسیدهای ضروری	درصدی از کل
	۱۴/۷	فنیل آلانین	۱۱/۸
لوسین	۲۲/۱	ترئونین	۱۲/۷
لیزین	۱۱/۸	تریپتوفان	۳/۸۴
متیونین	۶	والین	۱۷

جدول ۲ – تیمارهای این تحقیق (لیتر).

تیمار	ترکیبات
۱	آب دریا (شاهد)
۲	آب دریا + ۰/۶ گرم اوره
۳	آب دریا + یک گرم بی کربنات سدیم
۴	آب دریا + ۰/۶ گرم اوره + یک گرم بی کربنات سدیم

مختلفی از جمله فتوبیوراکتورها و استخرهای روباز پرورش می‌یابند. اگرچه استفاده از استخرهای روباز نسبت به فتوبیوراکتورها بازدهی کمتری دارد، اما در تولید صنعتی استفاده از استخرهای روباز از لحاظ اقتصادی به صرفه‌تر است (Molinuevo-Salcas *et al.*, 2010). در مطالعه‌ای که در ایالات متحده انجام شد، با بررسی کشت ریز جلبک در استخرهای روباز با آب‌شیرین، لب‌شور و آب دریا گزارش کردند که استفاده از آب دریا بیشترین بازده را دارد که دلیل آن وجود انواع مواد معدنی و آلی در آب دریا می‌باشد (Venteris *et al.*, 2013). در کشور ایران در مطالعه مقدماتی امکان کشت ریزجلبک در سواحل خلیج فارس و دریای عمان مورد بررسی قرار گرفت. پژوهش‌ها عمدتاً با بررسی ویژگی‌های کیفی به این نتیجه رسید که سواحل خلیج فارس و دریای عمان پتانسیل زیادی برای گسترش تولید ریزجلبک دارند (Lababpour, 2018). از این‌رو تحقیق حاضر با توجه به نیاز روز افزون صنعت دام و طیور به منابع پروتئینی، این پژوهش در جهت تولید گسترده جلبک اسپیرولینا با استفاده از آب دریا به‌عنوان پایه برای محیط کشت که به‌عنوان منبع سرشار از مواد معدنی و غنی‌سازی آن با اوره به‌عنوان منبع نیتروژن و بی-کربنات سدیم به‌عنوان منبع کربن طراحی شد.

مواد و روش‌ها

در این پژوهش جلبک اسپیرولینا پلاتنسیس از کلکسیون میکروبی دانشکده منابع طبیعی دانشگاه تهران دریافت شد. آب دریا به‌عنوان پایه برای محیط کشت از ساحل جزیره هنگام در آبان‌ماه با مختصات "۲۶°۴۰'۱۴ شمالی و "۵۵°۵۴'۳۴ شرقی جمع‌آوری شد. آب دریا در ظرف‌های ۴۰ لیتری پلاستیکی غیرشفاف درب‌دار ریخته شد و با هواپیما به تهران و سپس با اتوبوس در دمای اتاق به پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران منتقل شد. در آزمایشگاه غلظت‌های کلسیم، پتاسیم، منیزیم، سدیم، روی، آهن، منگنز، کلر و گوگرد آب توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر UV-2100 اندازه‌گیری شدند. pH با استفاده از دستگاه pH متر مدل MP-103 اندازه-گیری شد. با توجه به منابع مختلف (White *et al.*, 2013; Rodrigues *et al.*, 2010; Costa *et al.*, 2001)، اوره و بیکربنات سدیم برای غنی‌سازی آب دریا انتخاب شدند. چهار تیمار با سه تکرار تهیه گردید (جدول ۲).

مدت زمان اجرای آزمایش ۲۱ روز بود و کشت در دمای اتاق انجام گرفت. برای گندزدایی ۴۰ لیتر آب دریا از ۰/۱۶ گرم (۴ گرم در ۱۰۰۰ لیتر) پرکلرین استفاده شد (Pagheh *et al.*, 2015). شوری آب دریای استفاده شده ۵۵/۶۵ mS/cm بود که توسط دستگاه USP 27 سنجش و تنظیم شد. محیط کشت ارلن مایرهای درب‌دار با حجم کاری یک لیتر که قبلاً به‌مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد اتوکلاو شد بودند، در نظر گرفته شد. کشت در دمای اتاق با دو رشته لامپ LED با دو رنگ آبی و قرمز با نوردهی 60W در دوره زمانی ۱۲ ساعت روشنایی، ۱۲ ساعت تاریکی نوردهی شدند. قبل از تلقیح جلبک برای خنثی‌سازی اثر کلر، هوادهی به‌مدت ۲۴ ساعت با استفاده از پمپ هوا صورت گرفت. غلظت استوک اولیه که با لام هماسیتومتر شمارش شد، ۲۳۰۰۰

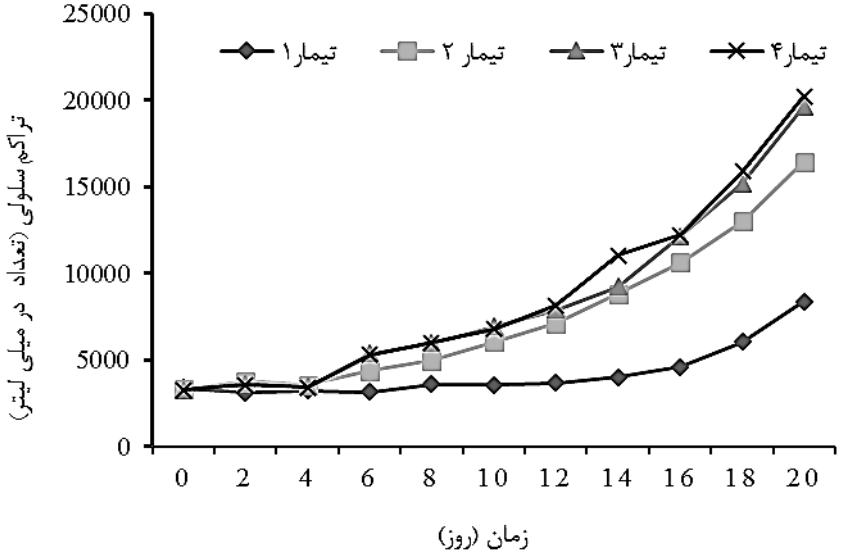
جدول ۳ – میزان مواد معدنی آب خلیج فارس در این تحقیق.

عنصر	میزان	عنصر	میزان
N	~۵	Mn*	۰/۰۳۷
Ca	~۵۲۶	Cl	۲۰/۹۵۵
K	~۵۵	S	۰/۸۳۲
Mg	۱/۳۰۶	So_4	۲/۴۹۸
Na	۸/۱۹۴	CO_3	۰/۱۵۷
F*	۰/۰۰۱	Mo	۰/۰۰۸
Zn*	۰/۱۳	Cu	۰/۵

همه غلظت ها برحسب ppm (mg/L) به‌جز آن‌هایی که با علامت * مشخص شده‌اند که برحسب µg/L می‌باشند

جدول ۴ – مقایسه میانگین تولید زیست توده بین محیط های کشت.

تیمار	درجه آزادی	t Value	Pr > |t|
۱×۲	۸	-۲/۱۶	۰/۰۶۲۶
۱×۳	۸	-۲/۸۳	۰/۰۲۲۱
۱×۴	۸	-۳/۰۳	۰/۰۱۶۳
۲×۳	۸	-۰/۶۷	۰/۵۱۹۴
۲×۴	۸	-۰/۸۷	۰/۴۰۷۳
۳×۴	۸	-۰/۲	۰/۸۴۵۹



شکل ۱ - میزان تراکم سلولی در تیمارهای مورد مطالعه.

سلول در هر میلی‌لیتر بود. استوک جلبک به نسبت ۱:۱۰ (۱۰۰ میلی‌لیتر استوک با ۱۰۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت) مخلوط شد. هوادهی با جریان ۱/۲۵ لیتر در دقیقه صورت گرفت. در طول آزمایش قبل از نمونه‌گیری، آب دریا به ازای آب تبخیر شده به ظرف‌های کشت اضافه شد. نمونه‌گیری هر ۴۸ ساعت یک مرتبه با استفاده از سمپلر ۱ میلی‌لیتر از هر ارلن مایر برداشت و با ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر رقیق شد. در هفت روز منتهی به پایان دوره به‌دلیل افزایش تعداد سلول‌ها به‌جای ۱۰ میلی‌لیتر از ۲۰ میلی‌لیتر آب مقطر برای رقیق‌سازی استفاده شد و به‌مدت ۲۰ ثانیه با دستگاه شیکر هم‌زده شد و در نهایت برداشت نمونه رقیق شده با سمپلر یک میلی‌لیتر صورت گرفت و برای شمارش سلولی به لام هماسیتومتر منتقل و با میکروسکوپ نوری با بزرگ‌نمایی ۴۰۰ برابر شمارش سلولی انجام شد (Gami *et al.*, 2011).

آنالیز داده‌ها: داده‌ها در قالب مدل خطی تعمیم یافته با استفاده از نرم‌افزار SAS (2001) رویه Mixed مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند. مدل آماری این طرح به صورت زیر بود:

$$Yijk = \mu + Ti + Pj + TPij + eijk$$

که در آن Yijk = مشاهده، µ = میانگین، Ti = اثر تیمار، Pj = اثر زمان، TPij = اثر متقابل تیمار و زمان، eijk = اثر اشتباه آزمایشی هستند. برای مقایسه معنی‌داری نیز $P<۰/۰۵$ در نظر گرفته شد.

نتایج و بحث

میزان تولید زیست‌توده در شکل ۱، میزان مواد معدنی آب دریا در جدول ۳ و مقایسه میانگین بین محیط‌های کشت در تولید زیست‌توده با استفاده از آزمون mixed در جدول ۴ نشان داده شده است. اگرچه تراکم سلولی در تیمار دو نسبت به تیمار یک افزایش داشت، اما اختلاف معنی‌داری بین تیمار یک با تیمار دو وجود نداشت. معنی‌داری بین تیمارهای سه و چهار با تیمار یک مشاهده شد که دلیل آن می‌تواند کمبود منابع نیتروژنی و کربنی برای تولید

جدول ۵ – ترکیبات محیط کشت زاروک.

ترکیب	میزان ($g\ l^{-1}$)
$NaHCO_3$	۱۶/۸
K_2HPO	۰/۵
$NaNO_3$	۲/۵
K_2SO_4	۱
NaCl	۱
$MgSO_4.7H_2O$	۰/۲
$CaCl_2.2H_2O$	۰/۰۴
$FeSO_4.7H_2O$	۰/۰۱
EDTA	۰/۰۸
H_3BO_3	۲/۸۶
$MnCl_2.4H_2O$	۱/۸۱
$ZnSO_4.4H_2O$	۰/۲۲۲
$Na_2MoO_4.2H_2O$	۰/۰۱۷۷
$CuSO_4.5H_2O$	۰/۰۷۹

زیست‌توده در آب دریا باشد. افزایش تولید زیست‌توده در تیمار یک نشان دهنده مناسب بودن آب دریا به‌عنوان محیط کشت پایه برای تولید جلبک اسپیرولینا است. استفاده از آب دریا به‌عنوان محیط کشت پایه با افزودن ۱/۵ گرم در لیتر بی‌کربنات سدیم، ۰/۰۰۲ گرم در لیتر FeEDTA و ۱۵ گرم در لیتر فضولات خشک شده طیور به‌عنوان منبع نیتروژن منجر به تولید ۰/۶۰۸ میلی‌گرم در میلی‌لیتر نسبت به گروه شاهد که از محیط کشت زاروک با تولید ۰/۶۲۳ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بود برسد (Devanathan and Ramanathan, 2012). این مطالعه نشان دهنده تاثیرات مکمل نیتروژنی و عناصر معدنی که در فضولات طیور وجود داشت، برای تولید اقتصادی جلبک اسپیرولینا بود (Devanathan and Ramanathan, 2012). محیط کشت زاروک (جدول ۵) به‌عنوان محیط کشت استاندارد این گونه است (Zarrouk, 1966).

مهم‌ترین عوامل محیطی تاثیرگذار روی رشد جلبک اسپیرولینا میزان مواد معدنی، PH، دما و نور می‌باشد. pH یکی از پارامترهای محدودکننده است که بر فعالیت‌های متابولیکی جلبک اسپیرولینا تاثیر دارد. pH آب دریا استفاده شده در این مطالعه ۸/۰۶ بود. با توجه به این که حداکثر تولید زیست‌توده در pH ۹/۵ بود (Shi *et al.*, 2016)، پس می‌توان نتیجه گرفت دلیل دیگر افزایش تولید زیست‌توده در تیمار های سه و چهار می‌تواند افزایش pH به‌دلیل استفاده از بی‌کربنات سدیم باشد. دما هم روی تولید زیست‌توده تاثیرگذار است. حداکثر تولید زیست‌توده در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد است (Shi *et al.*, 2016). با مقایسه عناصر موجود در محیط کشت زاروک و آب دریا (جدول ۳) می‌توان با غنی‌سازی آب دریا به تولید انبوه با هزینه کمتر دست یافت.

با توجه به میزان بالای اسیدهای آمینه این جلبک و افزایش روزافزون منابع پروتئینی گیاهی وارداتی از جمله دانه سویا و کنجاله سویا به کشور ایران و همچنین مناسب بودن سواحل خلیج فارس برای پرورش گسترده و کم هزینه این جلبک و مطالعات انگشت شمار برای پرورش این جلبک در آب خلیج فارس، نتایج دقیقی از میزان تولید زیست توده این جلبک در دسترس نبود، پس نیاز به آزمایش آب دریا به‌عنوان محیط کشت پایه برای این جلبک بود. استفاده از آب دریای خلیج فارس به‌دلیل میزان بالای عناصر سدیم، کلر و کلسیم دارای شبهاتی بود که با انجام این آزمایش مشخص شد که این جلبک در آب دریا قابلیت تولید دارد. در واقع پیشنهاد می‌شود با غنی‌سازی آب دریا از طریق نزدیک کردن ترکیب آن به محیط کشت زاروک می‌توان به حداکثر تولید رسید.

نتیجه‌گیری کلی

با توجه به نتایج و موقعیت جغرافیایی دریای خلیج فارس از لحاظ طول روز و دمای هوا، با غنی‌سازی آب دریا با ترکیب اوره به‌عنوان منبع نیتروژنی و بی‌کربنات سدیم به‌عنوان منبع کربن، به‌نظر می‌رسد پرورش جلبک اسپیرولینا پلاتنسیس در فضای باز اقتصادی است، اما برای رسیدن به حداکثر تولید نیاز به مطالعات بیشتری دارد.

منابع

Costa J.A.V., Cozza K.L., Oliveira L., Magagnin G. 2001. Different nitrogen sources and growth responses of Spirulina platensis in microenvironments. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 17, 439–442.

Devanathan J., Ramanathan N. 2012. Pigment production from *Spirulina platensis* using seawater supplemented with dry poultry manure. *Journal of Algal Biomass Utilization*, 3, 66-73.

Gami B., Naik A., Patel B. 2011. Cultivation of Spirulina species in different liquid media. *Journal of Algal Biomass Utilization*, 2(3), 15-

26.
Kaoud H.A. 2015. Effect of *Spirulina platensis* as a dietary supplement on broiler performance in comparison with prebiotics. *Journal of Biological Sciences*, 1(1), 1-6.
Kulpys J., Paulauskas E., Pilipavicius V., Stankevicius R. 2009. Influence of cyanobacteria *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis* biomass additive towards the body condition of lactation cows and biochemical milk indexes. *Agronomy Research*, *7*, 823-835.
Lababpour A. 2018. Site assessment for industrial mass cultivation of microalgae: case studies from Persian Gulf and Oman Sea coastal areas. *Researches in Geographical Sciences*, 17(47): 227-239.
Molinuevo-Salces B., García-González M.C., González-Fernández C. 2010. Performance comparison of two photobioreactors configurations (open and closed to the atmosphere) treating anaerobically degraded swine slurry. *Bioresource Technology*, 101(14), 5144-5149.
Moorhead K., Capelli B., Cysewski G.R. 2011. *Spirulina: Nature's Superfood*. Cyanotech Corporation.
Myers N., Kent J. 2003. New consumers: the influence of affluence on the environment. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(8), 4963-4968.
Pagheh E., Ghafleh Marammazi J., Zabayeh Najafabadi M., Hekmatpour F., Hosseini Malayeriasl S.J. 2015. Feasibility of mass cultivation on *Nannochloropsis oculata* microalgae in tubular culture system. Iranian Fisheries Science Research Institute. 50 p.
Patel S., Goyal A. 2013. Current and prospective insights on food and PHarmaceutical applications of spirulina. *Current Trends in Biotechnology and Pharmacy*, 7(2), 681-695.
Poppi, D. P.; McLennan, S. R., 2010: Nutritional research to meet future challenges. *Animal Production Science*, 50, 329–338.
Rodrigues M. S., Ferreira L.S., Converti A., Sato S., Carvalho J.C.M. 2010. Fed-batch cultivation of *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis*: potassium nitrate and ammonium chloride as simultaneous nitrogen sources. *Bioresource Technology*, 101(12), 4491-4498.
Sánchez M., Bernal-Castillo J., Rozo C., Rodríguez I. 2003. Spirulina (Arthrospira): an edible microorganism: a review. *Universitas Scientiarum*, 8(1), 7-24.
Shi W.Q., Li S.D., Li G.R., Wang W.H., Chen Q.X., Li Y.Q., Ling X.W. 2016. Investigation of main factors affecting the growth rate of *Spirulina*. *Optik*, 127(16), 6688-6694.
Venteris E.R., Skaggs R.L., Coleman A.M., Wigmosta M.S. 2013. A GIS cost model to assess the availability of freshwater, seawater, and saline groundwater for algal biofuel production in the United States. *Environmental Science and Technology*, 47(9), 4840-4849.
White D.A., Pagarette A., Rooks P., Ali S.T. 2013. The effect of sodium bicarbonate supplementation on growth and biochemical composition of marine microalgae cultures. *Journal of Applied Phycology*, 25(1), 153-165.
Zarrouk C. 1966. Contribution a l'etude d'une CyanoPHyceeCyanophycee. Influence de Divers Facteurs PHysiques et Chimiques sur la croissance et la PHotosynthese photosynthese de Spirulina mixima. *Thesis. University of Paris, France.*

Cultivation possibility of *Spirulina platensis* algae in Persian Gulf water

Mohammad Hasan Mortazavi[1], Mahdi Ganjkhanlou[*1], Aboalfazl Zali[1], Mohammad Ali Nematollahi[2]

[1]Department of Animal science, Faculty of Agriculture, University of Tehran, Karaj, Iran.
[2]Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran.

*Corresponding authors: ganjkhanlou@ut.ac.ir
Received: 2019/6/4 Accepted: 2020/1/14

Abstract

Spirulina platensis is useful because of having special amino acids balance for human and animal nutrition. This study was conducted to investigate the possibility of cultivating *S. platensis* by enriching the Persian Gulf water by nitrogen and carbon sources in a completely randomized design for 21 days. The experimental treatments were (1) seawater (control), (2) seawater enriched with urea, (3) seawater enriched with sodium bicarbonate, and (4) seawater enriched with sodium bicarbonate and urea. The results showed that there was a significant effect on biomass production between treatments 1 with 3, and 1 with 4 ($P<0.05$). An increase in biomass of the treatment four was maximized due to nitrogen and carbon supply, in comparison to others. According to the results, it can be concluded that the enrichment of the Persian Gulf water and its geographical location, the sea shores can be used for cultivation of *S. platensis*.

Keywords: Algae cultivate, Seawater, Culture medium, *Spirulina platensis*.