**Research Article**
**www.aquaculturesciences.ir**

**مقاله پژوهشی**
**نشریه علوم آبزی پروری**

# تأثیر شدت نور و محیط کشت بر روند رشد، تولید زی‌توده و محتوای رنگدانه‌های ریز جلبک *Cyanothece* sp.

**زهرا امینی‌خوئی*، الناز عرفانی‌فر، اشکان اژدری**

مرکز تحقیقات شیلات آب‌های دور، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، چابهار، ایران.

*نویسنده مسئول zamini.41@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۰/۵ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۱/۲۸

**چکیده**

ریزجلبک‌های ساکن در شورزارها و تالاب‌های فوق شور از غنی‌ترین و با ارزش‌ترین منابع زیستی به‌شمار می‌آیند. این مطالعه با هدف تعیین شدت نور مورد نیاز و محیط کشت مناسب برای رشد و تولید زی‌توده و رنگدانه‌های ارزشمند اقتصادی در ریزجلبک نمک دوست *Cyanothece* sp. طراحی شد. در این آزمایش توان رشد و تولید زی‌توده و محتویات رنگدانه‌های ریزجلبک *Cyanothece* sp. در سه سطح شدت نور مختلف (۳۰۰۰، ۵۰۰۰ و ۸۰۰۰ لوکس) و سه محیط کشت استاندارد (BBM، F/2 وBG11) مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که افزایش شدت نور از ۳۰۰۰ تا ۵۰۰۰ لوکس روند رشد و تولید زی‌توده را در هر سه محیط کشت (BBM، F/2 و BG11) مورد بررسی به‌طور معنی‌داری افزایش داده است. شدت نور و محیط کشت به‌تنهایی و به‌صورت متقابل بر تولید رنگدانه‌های کلروفیل a، کارتنوئید کل، بتاکاروتن، فیکوسیانین و فیکواریترین تأثیر معنی‌دار نشان دادند. بالاترین محتوای رنگدانه کلروفیل a در محیط کشت BG11 در دو شدت نور ۵۰۰۰ و ۸۰۰۰ لوکس برآورد شد. در حالی‌که کارتنوئید کل و بتاکاروتن در شدت نور ۸۰۰۰ لوکس و محیط کشت F/2 به بالاترین میزان خود رسید. میزان فیکوسیانین و فیکواریترین در محیط کشت BG11 و BBM بالاتر از F/2 و در شدت نور ۵۰۰۰ و ۸۰۰۰ بالاتر از ۳۰۰۰ لوکس مشاهده شد. براساس نتایج حاصل، شدت نور ۵۰۰۰ لوکس و محیط کشت BG11 برای پرورش *Cyanothece* sp. توصیه می‌گردد.

**واژگان کلیدی:** ریزجلبک، *Cyanothece* sp.، فوق شور، شدت نور، محیط کشت.

## مقدمه

یکی از چالش‌های جدی بشر در عصر حاضر تأمین غذا و انرژی با کیفیت و سالم مورد نیاز جمعیت در حال رشد جهان است. بکارگیری و بهره‌برداری از انرژی‌های تجدیدپذیر زیستی از جمله انرژی‌های مشتق از میکروارگانیسم‌ها؛ به‌طور ویژه ریزجلبک‌ها، از راهکارهای مناسب برای برون‌رفت از این چالش است. در میان ریزجلبک‌ها، سویه‌های نمک‌دوست که زیستگاه آن‌ها نمکزارها و دریاچه‌های فوق‌اشباع نمک است، به‌علت حضور ترکیبات فراسودمند مانند رنگدانه‌های آنتی‌اکسیدانی قوی، اسیدهای چرب غیر اشباع و پلی ساکاریدهای ایمنی‌زا در آن‌ها ارزش زیستی و اقتصادی نسبتاً بالاتری دارند (Hejazi *et al*., 2002). از آنجا که اکوسیستم فوق اشباع نمک همواره در معرض شوری بالا، نور شدید و اشعهUV، نوسانات تبخیر زیاد و خشک‌شدن قرار دارند، تعدادی مکانیسم‌های‌های سازگاری و مقاومت در آن‌ها به‌وجود آمده است که این ژن‌های مقاومت به شوری و تنظیم‌کننده اسمزی از جمله این مکانیسم‌های سازگارکننده می‌باشد. علاوه بر این، طیف گسترده از رنگدانه‌های متنوع برای سازگاری در برابر نوسانات نور و دما نیز در آن‌ها تولید شده است که در سازگاری و بقاء بیشتر آن‌ها اهمیت دارد (Azachi *et al*., 2002). به‌عنوان مثال برخی سویه‌های ریزجلبک نمک‌دوست

دونالیلا سالینا (*Dunaliella salina*) قادرند تا ۱۴ درصد وزن خشک خود، رنگدانه محافظ بتاکاروتن را ذخیره کنند. رنگدانه‌های کارتنوئیدی به‌ویژه بتاکاروتن، آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی بسیار قوی هستند که فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضد التهابی بالایی از خود نشان داده‌اند. مطالعات متعدد نشان داده‌اند که ریزجلبک‌های شورزی طیف گسترده‌ای از رنگدانه‌ها را سنتز می‌کنند (امینی خوئی و همکاران، ۱۴۰۰). به جهت تولید انبوه تجاری و اقتصادی نیز ریزجلبک‌های نمک‌دوست نسبت به سایر ریزجلبک‌ها ارجحیت دارند. در انتخاب سویه‌های کاندید (انتخابی) برای تولید انبوه همواره سعی می‌شود تا ریزجلبک‌های مقاوم به نوسانات نور، دما، شوری و pH در اولویت قرار گیرند زیرا در صورتی که سیستم کشت روباز برای پرورش انتخاب شود، امکان کنترل شرایط محیطی مانند نور و دوره نوری و دما وجود ندارد. از نظر مدیریت وکنترل زیستی در زمان تولید نیز از آنجا که شوری مطلوب برای کشت ریزجلبک‌های نمک‌دوست عموماً بالا (تا حدود ۱/۵ مولار نمک کلرید سدیم) است سایر ریزجلبک‌های رقیب امکان بقاء و رشد در این شوری را نداشته و کشت‌های تک گونه‌ای عاری از آلودگی با سایر ریزجلبک‌ها و باکتری‌ها تولید می‌گردد (Ben-Amotz, 2004).

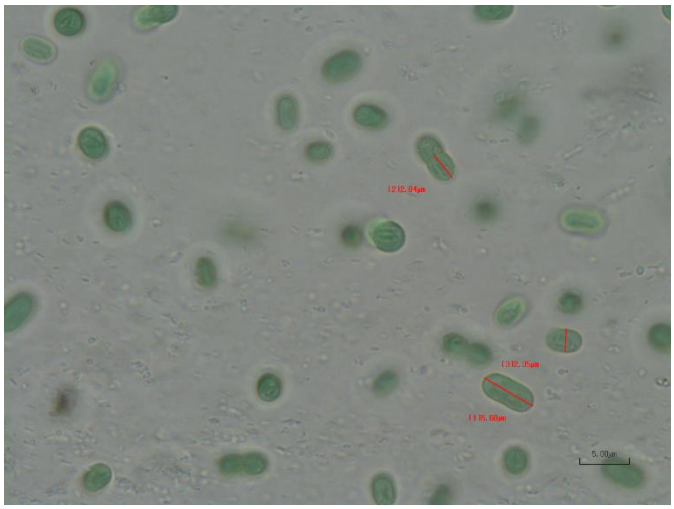
امینی خوئی و همکاران (۱۴۰۱)، ریزجلبک نمک‌دوست *Cyanothece* sp.، را از کشندان پشت سدی فوق‌شور لیپار از سواحل دریای عمان جداسازی و شناسایی کردند. براساس مطالعات صورت گرفته شوری مناسب برای رشد مطلوب این سویه در ۱/۵ مولار نمک عنوان شده است (امینی خوئی و همکاران، ۱۴۰۰). مرور مطالعات صورت گرفته روی سویه‌های مختلف جنس *Cyanothece* در سایر نقاط نشان داد که این سویه پراکنش گسترده‌ای در اکوسیستم‌های متنوع از آب‌های شیرین تا بسیار شور داشته است به‌طوری که از شالیزارهای برنج در ویتنام (Ohki *et al.*, 2014) تا نمکزارهای فوق‌اشباع نمک در کشور سومالی (De Philippis *et al.*, 1993) گزارش شده است. مطالعاتی نیز در رابطه با ویژگی‌های رشد و فیزیولوژی جنس *Cyanothece* در شرایط آزمایشگاهی صورت گرفته است. برای مثال براساس مطالعه Ohki و همکاران (۲۰۱۴) ایزوله جلبک *Cyanothece* sp. جدا شده از مزارع برنج توانایی رشد در شرایط فتواتوتروف (فتوسنتزی) یا میکسوتروفیک و هتروتروفیک را دارا می‌باشد. مطالعه De Philippis و همکاران (۱۹۹۳) نیز بیان داشتند که سویه *Cyanothece* sp توسط یک کپسول ضخیم پلی ساکاریدی احاطه شده که بخشی از آن در حین رشد در محیط حل شده و باعث افزایش تدریجی ویسکوزیته محیط کشت می‌گردد. Feng و همکاران (۲۰۱۰) نیز عنوان کردند که در شرایط نور پیوسته، *Cyanothece* sp. ATCC 51142 می‌تواند به‌طور مؤثر از گلیسرول برای رشد هوازی استفاده کند. افزودن منابع کربنی خارجی به محیط کشت نیز سبب افزایش رشد سلول خواهد شد.

در راستای شناخت بیشتر ویژگی‌های سویه بومی *Cyanothece* sp. جداسازی شده از سواحل چابهار مطالعه حاضر با هدف تعیین محیط کشت مناسب و شدت نور مطلوب برای یافتن مناسب‌ترین شرایط کشت و تولید زی‌توده و رنگدانه‌های اقتصادی صورت گرفت.

## مواد و روش‌ها

**تهیه استوک (حجم) اولیه ریزجلبک *Cyanothece* sp.**: ریزجلبک سبز-آبی نمک‌دوست *Cyanothece* sp. (شکل ۱) از کشندان پشت سدی لیپار (سواحل دریای عمان) جداسازی، خالص‌سازی و شناسایی شد (امینی خوئی و همکاران، ۱۴۰۱)، که در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفت.

**کشت روی محیط جامد آگار:** کشت ریزجلبک *Cyanothece* sp. در آزمایشگاه جلبک‌شناسی مرکز تحقیقات شیلاتی آب‌های دور چابهار صورت گرفت. به‌منظور تهیه استوک تلقیح عاری از آلودگی کشت اولیه ابتدا روی محیط جامد آگار انجام شد. برای تهیه



شکل ۱- تصویر میکروسکوپی ریزجلبک نمک‌دوست *Cyanothecec* sp.

جدول ۱- محیط کشت F/2.

| ترکیبات شیمیایی | میزان مصرف (گرم در لیتر) |
|---|---|
| $NaNO_3$ | ۷۵ |
| $NaH_2PO_4.2H_2O$ | ۵ |
| $CuSO_4.5H_2O$ | ۱ |
| $ZnSO_4.7H_2O$ | ۲/۲ |
| $CoCl_2.6H_2O$ | ۱ |
| $MnCl_2.4H_2O$ | ۱۸ |
| $Na_2MoO_4.2H_2O$ | ۰/۶ |
| $FeCl_3.6H_2O$ | ۳/۱۵ |
| $Na_2$ EDTA | ۴/۳۶ |
| ویتامین‌ها | میلی‌گرم در لیتر |
| Thiamine HCl (Vitamin B1) | ۲۰۰ |
| Cyanocobalamin (Vitamin B12) | ۱۰ |

محیط کشت جامد، ۱۵ گرم آگار در یک لیتر از سه محیط کشت استاندارد آزمایشی شامل محیط، BBM F/2 و BG11. ترکیبات و مقادیر مورد استفاده برای هر محیط کشت در جدول های ۱ تا ۳ ارائه شده است (Andersen and Kawachi, 2005). محیط‌های کشت اتوکلاو و استریل شدند. محیط‌های کشت قبل از سرد و سفت شدن درون ظروف شیشه ای پتری‌دیش از قبل اتوکلاو شده ریخته و درب آن‌ها مسدود شد. پس از سرد شدن و سفت شدن آگار، ریزجلبک به محیط‌های کشت جامد مورد نظر تلقیح شد. نمونه‌ها در معرض شرایط نوری (۳۰۰۰، ۵۰۰۰ و ۸۰۰۰ لوکس) قرار گرفتند. پس طی ۱۴ روز، تک کلنی‌های رشد یافته ریزجلبک *Cyanothece* sp. به محیط کشت مایع در ارلن ۱۰۰ و ۵۰۰ میلی‌لیتری منتقل شدند.

**کشت استوک اولیه در محیط مایع:** نمونه‌های خالص در ارلن‌های ۵۰۰ میلی‌لیتری در شرایط کاملًا استریل آماده‌سازی شده و دهانه آن‌ها با فویل استریل مسدود شد. به‌منظور جلوگیری از ترسیب و ایجاد اختلاط نمونه‌ها هوادهی صورت گرفت. pH محیط کشت با افزودن NaOH برای کنترل آلودگی در حدود ۹ تنظیم شد و دمای آزمایشگاه به‌صورت کنترل‌شده برای سویه گرمادوست *Cyanothece* sp. در محدوده ۲۸±۱/۵ درجه سانتی‌گراد تنظیم شد (De Philippis *et al.*, 1993).

**کشت ریزجلبک *Cyanothece* sp. در تیمارهای**

جدول ۲- محیط کشت BG11.

| ترکیبات شیمیایی | میزان مصرف (گرم در لیتر) |
|---|---|
| $K_2HPO_4 * 3H_2O$ | ۰/۰۰۴ |
| $MgSO_4 * 7H_2O$ | ۰/۰۷۵ |
| $CaCl_2 * 2H2O$ | ۰/۰۲۷ |
| Citric acid ($C_6H_8O_7$) | ۰/۰۰۶ |
| Ammonium ferric citrate ($C_6H_8O_7 * nFe * nNH_3$) | ۰/۰۰۶ |
| EDTANa2Mg | ۰/۰۰۱ |
| $Na_2CO_3$ | ۰/۰۲ |
| محلول عناصر میکرو | ۱ میلی‌یتر |
| $H_3BO_3$ | ۲/۸۶۰ |
| $MnCl_2 * 4H_2O$ | ۱/۸۱۰ |
| $ZnSO_4 * 7H_2O$ | ۰/۲۲۲ |
| $Na2MoO_4 * 2H_2O$ | ۰/۳۹۰ |
| $CuSO_4 * 5H_2O$ | ۰/۰۷۹ |
| $Co(NO3)_2 * 6H_2O$ | ۰/۰۴۹۴ |

جدول ۳- محیط کشت BBM.

| ترکیبات شیمیایی | محلول استوک (گرم در لیتر) | میزان مصرف در محیط کشت (میلی لیتر در لیتر) |
|---|---|---|
| $KH_2PO_4$ | ۷/۵ | ۱۰ |
| $CaCl_2•2H_2O$ | ۲/۵ | ۱ |
| $MgSO_4•7H_2O$ | ۱۷/۵ | ۱ |
| $NaNO_3$ | ۲۵ | ۱ |
| $K_2HPO_4$ | ۷/۵ | ۱ |
| $Na_2EDTA•2H_2O$ | ۱۰ | ۱ |
| KOH | ۳۱ | |
| $FeSO_4•7H_2O$ | ۴/۹۸ | ۱ |
| $ZnSO_4$ (concentrated) | ۸/۸۲ | |
| $H_3BO_3$ | ۵/۷۵ | ۰/۷ |
| محلول ویتامین محیط کشت F/2 | | ۱ |

**آزمایشی محیط کشت:** ریزجلبک *Cyanothece* sp. در ارلن‌های ۵۰۰ میلی‌لیتری در دو محیط استاندارد آزمایشی F/2، BBM و BG11 کشت داده شدند. ترکیبات شیمیایی و میزان مصرف هر یک از آن‌ها در هر لیتر به ترتیب در جدول‌های ۱، ۲ و ۳ ارائه شده است.

**کشت ریزجلبک *Cyanothece* sp. در تیمارهای آزمایشی شدت نور:** در آزمایش دوم که به‌منظور تأثیر سطوح مختلف شدت نور صورت گرفت. ارلن‌های ۵۰۰ میلی‌لیتری حاوی ریزجلبک در محیط‌های کشت مختلف در معرض سه شدت نور ۳۰۰۰، ۵۰۰۰ و ۸۰۰۰ لوکس قرار گرفتند. تنظیم سطوح مختلف شدت نور با استفاده از نورسنج و تنظیم فاصله ارلن‌ها نسبت به منبع نور صورت گرفت. لامپ‌های سفید LED برای تأمین روشنایی مورد استفاده قرار گرفتند.

**اندازه‌گیری روند رشد ریزجلبک *Cyanothece* sp.:** برای بررسی روند رشد نمونه‌برداری از محیط کشت ریزجلبک هر روز در ساعت مشخص انجام شد. برای شمارش سلولی ۱ میلی‌لیتر از هر تیمار محیط کشت مایع ریزجلبک‌ها در زیر میکروسکوپ نوری

روی لام هموسایتومتر قرار داده شد. شمارش با استفاده از شمارشگر (کانتر) دستی صورت گرفت. برای شمارش سلولی، پس از همگن کردن سوسپانسیون ریزجلبک، در شرایط استریل نمونه گیری شد. یک قطره روی محفظه مخصوص لام هموسایتومتر قرار داده و پس از قرار دادن لامل مخصوص، تعداد سلول‌ها با استفاده از میکروسکوپ نوری شمارش شدند. تعداد سلول‌ها در هر میلی‌لیتر از سوسپانسیون جلبکی با استفاده از رابطه زیر محاسبه گردید (Andersen and Kawachi, 2005).

۱۰^۴×میانگین تعداد سلول‌ها در مربع‌های لام هموسایتومتر =تعداد سلول‌ها

**اندازه‌گیری غلظت زی‌توده**: به‌منظور اندازه‌گیری زی‌توده به‌دست آمده در پایان دوره رشد، حجم ۱۰ میلی‌لیتر از سوسپانسیون جلبک را از کاغذ صافی واتمن GF/C، ۰/۴۵میکرون تحت شرایط خلاء عبور داده شد و در دمای ۱۰۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ ساعت قرار داده شد تا کاملاً خشک گردد. فیلتر حاوی زی‌توده خشک شده پس از خروج از آون در دسیکاتور قرار داده شده و در نهایت با ترازوی دیجیتالی (مدل، HR-200) وزن شد (Sing *et al*., 2014).

**استخراج و اندازه‌گیری محتوای کلروفیل‌a، کارتنوئید کل و بتاکاروتن ریزجلبک**: در ابتدا ۰/۱۶۵ گرم از پودر خشک شده ریزجلبک در دستگاه خشک‌کن (Jalteb، ایران) تا حد ممکن آسیاب شده و به‌شکل پودر همگن درآمد. سپس ۱۰ میلی‌لیتر استون ۸۰٪ به پودر اضافه و به‌خوبی تکان داده شد سپس به‌مدت ۶ دقیقه در ۴۵۰۰ دور سانتریفیوژ قرار داده شد. محتویات کلروفیل a، کاروتنوئید کل، بتاکاروتن در مایع رویی با اندازه‌گیری میزان جذب در طول موج ۶۳۰، ۶۴۷، ۶۶۴ و ۶۹۱ نانومتر در دستگاه اسپکتروفوتومتر (Evolution™ 300 UV-Vis Spectrophotometer) تعیین شد. غلظت‌های کلروفیل a، کارتنوئید کل (Yang *et al*., 1998) و بتاکاروتن (Nagata and Yamashita, 1992) با توجه به رابطه‌های زیر محاسبه شد.

Chlorophyll-a (µg/ mL)= ۰/۰۶۰۴ A۶۳۰ - ۴/۵۲۲۴ A ۶۴۷+ ۱۳/۲۶۹۶ A۶۶۴ -۱/۷۴۵۳A ۶۹۱

Carotenoids (µg/ mL)= ۴/۶۹(A۴۴۰)−۰/۲۶۷ Chl (a + b)

β-carotene (µg/ mL) = ۰/۲۱۶(A۶۶۳)− ۱/۲۲ (A۶۴۵)−۰/۳۰۴ (A۵۰۵)+۰/۴۵۲ (A۴۵۳)

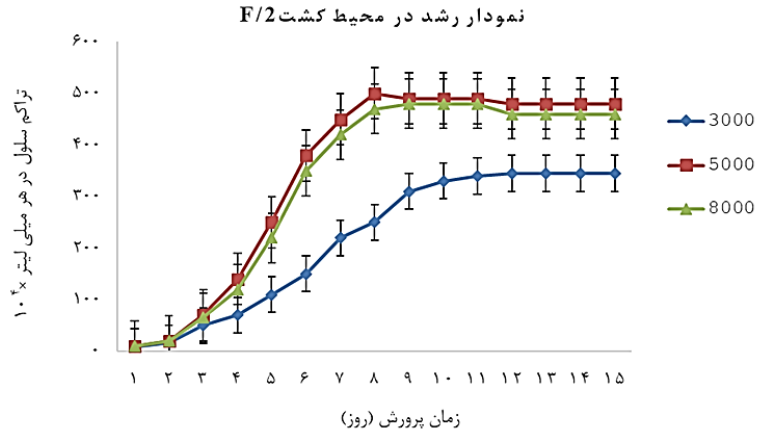
**استخراج و اندازه‌گیری فیکوبیلی پروتئین‌ها**: ابتدا ۰/۲ گرم از زی‌توده خشک ریزجلبک به ۲۰ میلی‌لیتر بافر فسفات سدی ۰/۱ مولار اضافه کرده و به مدت ۱ ساعت معرض گرما و همزن قرار داده شد تا سوسپانسیون یکنواختی به‌دست آید. سپس با روش انجماد سوسپانسیون به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و پس از آن در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، انجمادزدایی صورت گرفت. این فرآیند سه بار تکرار شد. پس از انجام فرآیند، نمونه‌ها روی هم‌زن در دمای ۳۷ درجه به مدت ۳ ساعت همگن شدند. پس از انجام مراحل فوق، نمونه‌ها در دور ۵۰۰۰ به مدت ۲۵ دقیقه سانتریفوژ شده و مایع رویی برای اندازه‌گیری رنگدانه‌های فیکوبیلی پروتئین جمع‌آوری شدند. برای محاسبه غلظت فیکوسیانین، آلوفیکوسیانین و فیکواریترین جذب نوری محلول در طول موج‌های ۶۱۵،۶۵۲ و ۵۶۲ نانومتر خوانش و غلظت آن‌ها برحسب میلی‌گرم در لیتر طبق رابطه زیر محاسبه شد (Hotos and Antoniadis, 2022):

فیکوسیانی(PC) =A۶۱۵-۰/۴۷۴ A۶۵۲/۵/۳۴

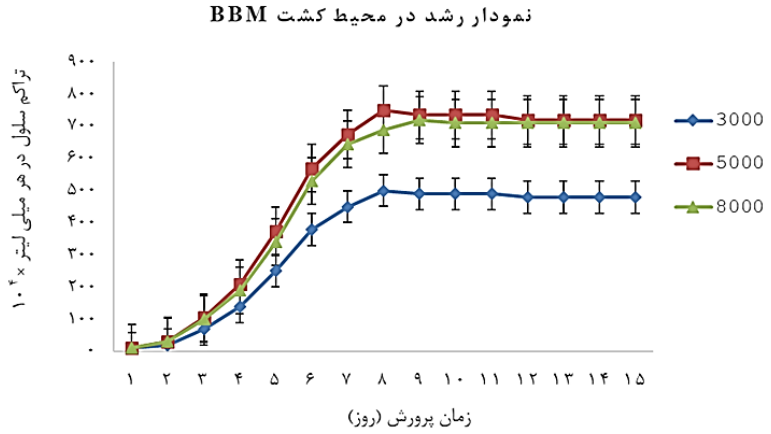
فیکواریترین (PE)=A۵۶۲- (۲/۴۱ PC)-(۰/۸۴۹ APC)/۹/۶۲

آلوفیکوسیانین (APC)=A۶۵۲-۰/۲۰۸ A۶۱۵/۵/۰۹

**تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها**: تجزیه و تحلیل داده‌های حاصل از این مطالعه با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۹ و رسم نمودارها با استفاده از Excel نسخه ۲۰۱۶ نجام شد. داده‌های به‌دست




شکل ۲- منحنی رشد ریزجلبک *Cyanothece* sp. در محیط کشت F/2 در سه شدت نور مختل. (نتایج نشان‌دهنده سه تکرار با انحراف معیار می‌باشد).



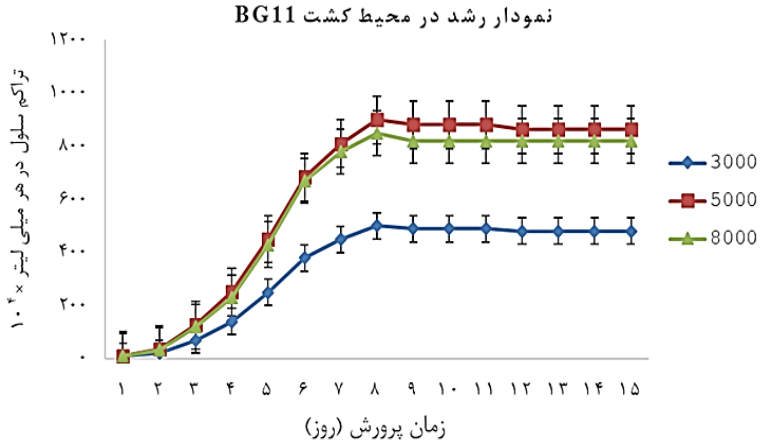

شکل ۳- منحنی رشد ریزجلبک *Cyanothece* sp. در محیط کشت BBM در سه شدت نور مختلف (نتایج‌نشان دهنده سه تکرار با انحراف معیار می‌باشد).

آمده در قالب آزمایش فاکتوریل ۲ عاملی با طرح پایه کاملاً تصادفی با ۳ تکرار تجزیه واریانس شدند. از آزمون دانکن جهت مقایسه میانگین‌ها برای فاکتور های شدت نور و محیط کشت در سه سطح استفاده شد. سطح معنی‌داری با اطمینان ۹۵ درصد در نظر گرفته شد.

## نتایج

تأثیر سه شدت نور ۳۰۰۰، ۵۰۰۰ و ۸۰۰۰ و سه محیط کشت استاندارد BBM، F/2 و BG11 بر روند رشد و ازدیاد سلولی در ریزجلبک *Cyanothece* sp. در شکل‌های۲، ۳ و ۴ ارائه شده است. نتایج نشان داد که تقسیم و ازدیاد سلول‌ها در معرض سه شدت نور مختلف و در سه محیط کشت مورد آزمایش تفاوت معنی‌داری ($P<۰/۰۵$) با یکدیگر داشتند. به‌طوری که افزایش شدت نور از ۳۰۰۰ تا ۵۰۰۰ لوکس باعث تحریک تقسیم سلولی در هر سه محیط کشت استاندار شده است. با افزایش شدت نور تا ۸۰۰۰ لوکس ازدیاد سلولی روند ثابتی داشت و تفاوت معنی‌داری با شدت نور ۵۰۰۰ لوکس مشاهده نشد ($P<۰/۰۵$). در مقایسه سه محیط کشت استاندار مورد استفاده نیز نتایج آنالیز داده‌ها نشان داد که محیط کشت مورد استفاده تأثیر معنی‌داری بر روند تقسیم سلولی داشته است ($P<۰/۰۵$) به‌طوری که بالاترین تعداد سلول تا روز ۸ دوره رشد در محیط کشت BG11 به‌دست آمده است.

در جدول ۴، تأثیر سه شدت نور ۳۰۰۰، ۵۰۰۰ و ۸۰۰۰ و سه محیط کشت BBM، F/2 و BG11 بر




شکل ۴- منحنی رشد ریزجلبک *Cyanothece* sp. در محیط کشت BG11 در سه شدت نور مختلف (نتایج نشان‌دهنده سه تکرار با انحراف معیار می‌باشد).

جدول ۴- تأثیر شدت نور و محیط کشت بر زی‌توده بر محتوای کلروفیل a ریزجلبک *Cyanothecec* sp. (نتایج نشان‌دهنده سه تکرار با انحراف معیار می‌باشد).

| شدت نور (لوکس) | محیط کشت استاندارد | زی‌توده (گرم بر لیتر) | کلروفیل a (میکرگرم بر میلی لیتر) |
|---|---|---|---|
| ۳۰۰۰ | f/2 | ۰/۸ ±۰/۰۵$^{c}$ | ۲۶/۳ ±۰/۰۶$^{c}$ |
| | BBM | ۱/۰ ±۰/۰۴$^{b}$ | ۲۷/۱ ±۰/۰۲$^{b}$ |
| | BG11 | ۱/۱ ±۰/۰۳$^{b}$ | ۲۷/۵ ±۰/۰۴$^{b}$ |
| ۵۰۰۰ | f/2 | ۱/۱ ±۰/۰۲$^{b}$ | ۲۷/۲ ±۰/۰۳$^{b}$ |
| | BBM | ۱/۳ ±۰/۰۴$^{ab}$ | ۲۸/۴ ±۰/۰۴$^{ab}$ |
| | BG11 | ۱/۶ ±۰/۰۳$^{a}$ | ۳۲/۳ ±۰/۰۵$^{a}$ |
| ۸۰۰۰ | f/2 | ۰/۹ ±۰/۰۴$^{bc}$ | ۲۶/۱ ±۰/۰۳$^{c}$ |
| | BBM | ۱/۳ ±۰/۰۴$^{ab}$ | ۲۸/۷ ±۰/۰۳$^{ab}$ |
| | BG11 | ۱/۵ ±۰/۰۵$^{a}$ | ۲۹/۳ ±۰/۰۲$^{a}$ |

جدول ۵- تأثیر شدت نور و محیط کشت بر محتوای رنگدانه کارتنوئید کل و بتاکاروتن ریزجلبک *Cyanothecec* sp.

| شدت نور (لوکس) | محیط کشت استاندارد | کارتنوئید کل (میکروگرم بر میلی‌لیتر) | بتاکاروتن (میکروگرم بر میلی‌لیتر) |
|---|---|---|---|
| ۳۰۰۰ | f/2 | ۴/۳ ±۰/۰۴$^{b}$ | ۰/۳۵ ±۰/۰۰۳$^{b}$ |
| | BBM | ۳/۱ ±۰/۰۲$^{b}$ | ۰/۳۴ ±۰/۰۰۳$^{b}$ |
| | BG11 | ۳/۲ ±۰/۰۴$^{b}$ | ۰/۳۰ ±۰/۰۰۴$^{b}$ |
| ۵۰۰۰ | f/2 | ۴/۴ ±۰/۰۳$^{b}$ | ۰/۳۱ ±۰/۰۰۵$^{b}$ |
| | BBM | ۲/۲ ±۰/۰۴$^{c}$ | ۰/۲۸ ±۰/۰۰۳$^{c}$ |
| | BG11 | ۲/۱±۰/۰۲$^{c}$ | ۰/۲۹ ±۰/۰۰۴$^{c}$ |
| ۸۰۰۰ | f/2 | ۵/۲ ±۰/۰۵$^{a}$ | ۰/۴۵ ±۰/۰۰۳$^{a}$ |
| | BBM | ۴/۱ ±۰/۰۴$^{b}$ | ۰/۳۸ ±۰/۰۰۳ $^{b}$ |
| | BG11 | ۴/۹/±۰/۰۳$^{b}$ | ۰/۳۹ ±۰/۰۰۵ $^{b}$ |

زی‌توده ریزجلبک *Cyanothece* sp. نشان داده شده است. نتایج نشان داد که تغییر شدت نور و محیط کشت تأثیر معنی‌داری بر تولید زی‌توده داشته است ($P$<۰/۰۵). به‌طوری که افزایش شدت نور از ۳۰۰۰ تا ۵۰۰۰ لوکس باعث افزایش تولید زی‌توده شده است اما افزایش شدت نور تا ۸۰۰۰ لوکس سبب القاء بیشتر تولید زی‌توده در ریزجلبک نشده است و تفاوت معنی‌داری با شدت نور ۵۰۰۰ لوکس مشاهده نشد ($P$<۰/۰۵). مقایسه سه محیط کشت استاندارد مختلف نشان داد که نوع محیط کشت مورد استفاده

جدول ۶- تأثیر شدت نور و محیط کشت بر محتوی رنگدانه آلو فیکوسیانین، فیکوسیانین و فیکواریترین ریزجلبک *Cyanothecec* sp. (نتایج نشان‌دهنده سه تکرار با انحراف معیار می‌باشد).

| شدت نور (لوکس) | محیط کشت استاندارد | آلو فیکوسیانین (میلی گرم بر لیتر) | فیکوسیانین (میلی گرم بر لیتر) | فیکواریترین (میلی گرم بر لیتر) |
|---|---|---|---|---|
| ۳۰۰۰ | f/2 | ۴/۱ ±۰/۰۱$^{d}$ | ۲/۱ ±۰/۰۱$^{c}$ | ۱/۹ ±۰/۰۱$^{c}$ |
| | BBM | ۵/۷ ±۰/۰۳$^{b}$ | ۳/۲ ±۰/۰۳$^{b}$ | ۳/۱ ±۰/۰۲$^{b}$ |
| | BG11 | ۵/۸ ±۰/۰۱$^{b}$ | ۳/۵ ±۰/۰۴$^{b}$ | ۳/۳ ±۰/۰۳$^{b}$ |
| ۵۰۰۰ | f/2 | ۴/۸ ±۰/۰۴$^{c}$ | ۳/۸ ±۰/۰۲$^{b}$ | ۳/۶ ±۰/۰۱$^{b}$ |
| | BBM | ۶/۵ ±۰/۰۵$^{a}$ | ۴/۱ ±۰/۰۴$^{a}$ | ۳/۹ ±۰/۰۱$^{a}$ |
| | BG11 | ۶/۹ ±۰/۰۱$^{a}$ | ۴/۵ ±۰/۰۲$^{a}$ | ۴/۲ ±۰/۰۱$^{a}$ |
| ۸۰۰۰ | f/2 | ۴/۹±۰/۰۳$^{c}$ | ۲/۵ ±۰/۰۱$^{c}$ | ۲/۲ ±۰/۰۱$^{c}$ |
| | BBM | ۶/۴ ±۰/۰۱$^{a}$ | ۳/۱ ±۰/۰۴$^{b}$ | ۴/۰ ±۰/۰۱$^{a}$ |
| | BG11 | ۶/۷ ±۰/۰۱$^{a}$ | ۳/۳ ±۰/۰۳$^{b}$ | ۴/۱ ± ۰/۰۱$^{a}$ |

بر میزان تولید زی‌توده تأثیر معنی‌داری داشته است به‌طوری که بالاترین میزان زی‌توده در محیط کشت BG11 به‌میزان ۱/۶ گرم در لیتر و کمترین زی‌توده در محیط کشت F/2 در شدت نور ۳۰۰۰ لوکس به میزان ۰/۸ گرم در لیتر به‌دست آمده است. تغییرات محتوای رنگدانه‌های کلروفیل a، کارتنوئید کل و بتاکاروتن در جدول ۵ ارائه شده است. نتایج آنالیز سنجش رنگدانه‌ها نشان داد که در تیمارهای مختلف رنگدانه‌های استخراج شده از ریزجلبک *Cyanothece* sp. تحت تأثیر شدت نور دریافتی و محیط کشت مورد استفاده تغییرات معنی‌داری با یکدیگر دارند ($P$<۰/۰۵). به‌طوری که میزان کلروفیل a در شدت نور ۵۰۰۰ و ۸۰۰۰ لوکس بالاتر از ۳۰۰۰ لوکس به‌دست آمد. اختلاف معنی‌دار در سه محیط کشت مورد استفاده نیز مشاهده شد ($P$<۰/۰۵). به‌طوری که بالاترین میزان کلروفیل a در محیط کشت BG11 و در شدت نور ۵۰۰۰ لوکس به‌میزان ۳۲/۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر مشاهده شد. آنالیزهای کارتنوئید کل و بتاکاروتن نیز نشان داد که محتوای کارتنوئید کل و بتاکاروتن در محیط کشت F/2 و شدت نور ۸۰۰۰ لوکس به بالاترین میزان خود به‌ترتیب ۵/۲ و ۰/۴۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر رسید.

تاثیر شدت نور دریافتی و محیط کشت مورد استفاده بر محتوای رنگدانه های فیکوبیلی پروتئین در جدول ۶ نشان داده شده است. بر اساس نتایج به‌دست آمده از آنالیز رنگدانه‌ها، تولید آلوفیکوسیانین، فیکوسیانین و فیکواریترین در تیمارهای مختلف محیط کشت مورد استفاده تأثیر معنی‌داری بر محتوای فیکوبیلی پروتئین‌های ریزجلبک مورد آزمایش داشت ($P$<۰/۰۵). به‌طوری که در هر سه شدت نور میزان آلوفیکوسیانین، فیکوسیانین و فیکواریترین در محیط کشت F/2 پایین‌تر از دو محیط کشت BG11 و BBM مشاهده شد.

## بحث و نتیجه‌گیری

برای موفقیت در فرآیند تولید انبوه ریزجلبک‌ها، لازم است اطلاعات جامع مورد نیاز برای کشت بهینه ریزجلبک‌ها در شرایط کشت ابتدایی به‌دست آید. با توجه به اینکه سویه ریزجلبک *Cyanothece* sp. برای نخستین بار از اکوسیتسم‌های فوق‌اشباع نمک در سواحل دریای عمان گزارش شده و تاکنون اطلاعات مورد نیاز برای کشت آن در دسترس نبوده است بنابراین، مطالعه حاضر با هدف تعیین نور مورد نیاز و محیط کشت مناسب برای تولید این ریزجلبک طراحی شد. یکی از مهم‌ترین عوامل تأثیرگذار بر روند رشد ریزجلبک‌ها میزان نور دریافتی توسط سلول‌های آن‌ها است (Ben-Amotz, 2004). بنابراین، برای بهبود سرعت رشد و تولید زی‌توده مناسب،

ریزجلبک‌ها نیازمند دریافت نور کافی و مطلوب هستند. شدت بیش از حد نور دریافتی ممکن است به اکسیداسیون و مهار نور منجر شود، در حالی‌که سطوح کم آن باعث محدود شدن رشد می‌شود. با این حال، شدت نور مطلوب در سویه‌های مختلف ریزجلبک متفاوت است (Amini Khoeyi *et al*., 2012). برخی از ریزجلبک‌ها در نورهای بسیار کم رشد بهینه دارند و در برخی سویه‌های دیگر، تولید زی‌توده نیازمند دریافت شدت نور بالاتر می‌باشد. در صورتی که میزان نیازمندی نور هر ریزجلبک در مقیاس آزمایشگاهی سنجش و مشخص گردد، علاوه بر اینکه راهنمای مناسبی برای نگهداری حجم‌های اولیه و کشت‌های مراحل ابتدایی ۱ تا ۵ لیتری در فضای آزمایشگاه در اختیار قرار می‌دهد، راهنمای مناسبی برای کشت ریزجلبک‌ها در مقیاس انبوه و در استخرهای روباز بیرون نیز به‌دست می‌آید (Matos, 2017).

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که ریزجلبک *Cyanothece* sp. قادر به رشد و تکثیر و تحمل شدت نور در دامنه ۳۰۰۰ تا ۸۰۰۰ لوکس می‌باشد، اما تغییر در شدت نور دریافتی تأثیر معنی‌داری بر روند تکثیر و ازدیاد سلولی داشت، به‌طوری که با افزایش شدت نور از ۳۰۰۰ تا ۵۰۰۰ لوکس روند رشد افزایش معنی‌داری داشت اما این روند با افزایش شدت نور تا ۸۰۰۰ لوکس افزایش نشان نداد و به‌صورت ثابت باقی ماند. از طرفی تولید زی‌توده نیز به‌دنبال افزایش تکثیر سلولی از ۳۰۰۰ تا ۵۰۰۰ لوکس روند رو به افزایش داشت و اما این روند با افزایش شدت نور تا ۸۰۰۰ لوکس به‌صورت ثابت باقی ماند. نتایج مربوط به نور مطلوب رشد هر سویه ریزجلبک کمک قابل ملاحظه‌ای به مدل‌سازی و طراحی استخرهای پرورش و تنظیم عمق کشت آن‌ها می‌کند (Seyfabadi *et al*., 2011). مطالعات نشان داده است که سلول‌های ریز جلبکی توانایی سازگاری فیزیولوژیک ویژه‌ای در خود ایجاد کرده‌اند. برای مثال در سلول‌های در معرض نور زیاد اندازه آنتن‌های برداشت کننده نور کاهش یافته است که به‌دنبال آن سرعت انباشتگی فوتون‌های تابشی بر کشت را کاهش داده است. برای مثال، یک کاهش ۶۰ ٪ در اندازه آنتن PSII ظرفیت فتوسنتزی و رشد کشت‌ها در تابش‌های زیاد را دو برابر کرد (Polle *et al*. 2002).

در مطالعه حاضر تأثیر شدت نور بر محتوای رنگدانه‌های کلروفیل، کارتنوئید کل و بتاکاروتن نیز مورد بررسی قرار گرفت و نتایج نشان داد که با افزایش شدت نور از ۵۰۰۰ تا ۸۰۰۰ لوکس محتوی کلروفیل به‌طور معنی‌داری کاهش در حالی که کارتنوئید کل و بتاکاروتن افزایش معنی‌داری داشته‌اند. مطالعات پیشین روی سایر ریزجلبک‌ها از جمله ریزجلبک کلرلا ولگاریس (*Chlorella vulgaris*) نیز نشان داد که تغییرات شدت نور سبب القاء تغییرات در محتوای رنگدانه‌های آن شده است (Amini Khoeyi *et al*., 2012). کلروفیل رنگدانه اصلی برای جذب نور و کارتنوئیدها رنگدانه‌های فرعی و محافظ کلروفیل محسوب می‌شوند. بدین‌ترتیب توانایی ریزجلبک‌ها در سازگاری نسبت به تغییرات شدت نور به‌طور مستقیم بستگی به محتوی رنگدانه‌های آن‌ها دارد (Amini Khoeyi *et al*., 2012). با علم به این موضوع می‌توان تولید رنگدانه‌ها در ریزجلبک‌ها را مهندسی کرد و بسته به هدف و برنامه تولید، رنگدانه‌های با ارزش‌تر و اقتصادی‌تر تولید کرد.

یکی دیگر از مهمترین داده‌های مورد نیاز برای تولید حداکثر زی‌توده ریزجلبک محیط کشت مناسب و اختصاصی آن می‌باشد. در مطالعه حاضر، سه نوع محیط کشت استاندارد BBM، F/2 و BG11 برای کشت ریزجلبک *Cyanothece* sp. مورد بررسی قرار گرفتند که نتایج نشان داد روند رشد و تکثیر سلولی و تولید زی‌توده در محیط استاندارد BG11 به‌طور معنی‌داری بالاتر از F/2 و BBM بوده است. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که محیط کشت‌های مورد استفاده در تولید ریزجلبک‌ها تأثیر معنی‌داری بر محتوای رنگدانه‌های آن‌ها داشته است، به‌طوری که میزان کلروفیل در محیط کشت استاندارد BG11

بالاتر از F/2 و BBM بوده است، در حالی که محتوای کارتنوئید کل و بتاکاروتن در محیط F/2 بالاتر از دو محیط کشت استاندارد دیگر مشاهده شد. علت این تغییرات را می‌توان به میزان متفاوت نیترات و فسفات در این محیط‌های کشت مورد استفاده نسبت داد. نتایج مطالعات متعدد نشان دادند که ریزجلبک‌هایی که درمعرض محیط‌های کشت با منابع نیترات پائین قرار می‌گیرند به حالت گرسنگی و فقر نیترات دچار می‌شوند که در این حالت تولید رنگدانه‌های ذخیره‌ای کارتنوئید به جای کلروفیل یک مکانیسم سازگاری در آن‌ها می‌باشد (Khatoon *et al*., 2018).

رنگدانه‌های ریزجلبکی مولکول‌هایی هستند که مسئول برداشت نور و انتقال انرژی به مراکز واکنش‌ها و فرآیندهای ضروری برای فتوسنتز هستند. در ریزجلبک‌های یوکاریوتی، این غشاء در داخل کلروپلاست‌ها قرار دارد، در حالی که در سیانوباکتری‌ها یا ریزجلبک‌های پروکاریوتی، نزدیک و موازی سطح سلول قرار می‌گیرد. رنگدانه‌ها معمولاً به سه دسته اصلی شامل: کلروفیل‌ها، کاروتنوئیدها و فیکوبیلی پروتئین‌ها گروه‌بندی می‌شوند. به‌دلیل استفاده گسترده از رنگدانه‌های ریزجلبکی در صنایع غذایی، بهداشتی، آرایشی و نساجی بازار جهانی آن‌ها در حال توسعه سریع می‌باشد. در این میان بازار رنگدانه‌های کاروتنوئیدی پر رونق‌تر (۱/۵ بیلیون دلار در سال ۲۰۱۶) گزارش شده است (Markets and Markets, 2019). بر اساس نتایج این مطالعه بالاترین میزان رشد و تولید زی‌توده برای ریزجلبک *Cyanothece* sp. در شدت نور ۵۰۰۰ لوکس و محیط کشت BG11 قابل دستیابی است. برای تولید رنگدانه با ارزش بتاکاروتن تولید در شدت نور ۸۰۰۰ و محیط کشت F/2 توصیه می‌گردد.

## منابع


امینی خوئی ز.، عرفانی‌فر ا.، اژدری ا.، ابیر س. ۱۴۰۰. بررسی اثرات شوری‌های مختلف بر میزان رنگدانه‌های ارزشمند ریزجلبک نمکدوست *Cyanothece* sp. شناسایی شده از کشندان پشت سدی لیپار (چابهار) در شرایط آزمایشگاهی. مجله علمی شیلات ایران. ۳۰(۵): ۱۳۳-۱۲۱.

امینی خوئی ز.، نادری سامانی م.، طاهرپناه س.، رحیمی قره میرشاملو ق. ۱۴۰۱. جداسازی، خالص‌سازی و شناسایی ریختی و مولکولی دو گونه ریزجلبک نمک‌دوست از کشندان پشت سدی لیپار (سواحل دریای عمان، چابهار). مجله علوم آبزی پروری. ۱۰(۱)، ۵۵-۴۵.

Amini Khoeyi Z., Seyfabadi J., Ramezanpour Z. 2012. Effect of light intensity and photoperiod on biomass and fatty acid composition of the microalgae, *Chlorella vulgaris*. *Aquaculture International* 20(1), 41-49.

Andersen R.A., Kawachi M. 2005. Algal culturing techniques. Elsevier/Academic Press, New York. pp. 205-218.

Azachi M., Sadka A., Fisher M., Goldshlag P., Gokhman I., Zamir A. 2002. Salt induction of fatty acid elongase and membrane lipid modifications in the extreme halotolerant alga *Dunaliella salina*. *Plant Physiology* 129: 1320-1329.

Ben-Amotz A. 2004. Industrial production of microalgal cell-mass and secondary products major industrial species: *Dunaliella*. In: Richmond A (ed) Microalgal culture: biotechnology and applied phycology. *Blackwell Science Oxford* pp. 273-280

De Philippis R., Margheri M.C., Pelosi, E., Ventura S. 1993. Exopolysaccharide production by a unicellular cyanobacterium isolated from a hypersaline habitat. *Journal of Applied Phycology* 5(4), 387-394.

Feng X., Bandyopadhyay A., Berla B., Page, L., Wu, B., Pakrasi H.B., Tang Y.J. 2010. Mixotrophic and photoheterotrophic metabolism in *Cyanothece* sp. ATCC 51142 under continuous light. *Microbiology* 156(8), 2566-2574.

Hejazi M.A., De Lamarliere C., Rocha J.M.S., Vermue M., Tramper J., Wijffels R.H. 2002. Selective extraction of carotenoids from the microalga *Dunaliella salina* with retention of viability. *Biotechnology and Bioengineering* 79(1), 29-36.

Hotos G.N., Antoniadis T.I. 2022. The Effect of Colored and White Light on Growth and Phycobiliproteins, Chlorophyll and Carotenoids Content of the Marine Cyanobacteria *Phormidium* sp. and *Cyanothece* sp. in Batch Cultures. *Life* 12(6), p.837.

Khatoon H., Haris H., Rahman N.A., Zakaria M.N., Begum H., Mian, S. 2018. Growth, proximate composition and pigment production of *Tetraselmis chuii* cultured with aquaculture wastewater. *Journal of Ocean University of China* 17 (3), 641-646.

Markets and Markets. Carotenoid Market: By Type (Astaxanthin, Beta-Carotene, Canthaxanthin, Lutein, Lycopene, and Zeaxanthin), Source (Synthetic and Natural), Application (Supplements, Food, Feed, and Cosmetics), and by Region-Global Trends and Forecast to 2021. 2015, pp. 1–172. Available online: https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/carotenoid-market-158421566.html (Accessed on 30 June 2019).

Matos Â.P., 2017. The impact of microalgae in food science and technology. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 94(11), 1333-1350.

Nagata M., Yamashita I. 1992. Simple method for simultaneous determination of chlorophyll and carotenoids in tomato fruit. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaish* 39(10), 925–928.

Ohki, K., Le, N.Q.T., Yoshikawa, S., Kanesaki, Y., Okajima, M., Kaneko, T. and Thi, T.H., 2014. Exopolysaccharide production by a unicellular freshwater cyanobacterium *Cyanothece* sp. isolated from a rice field in Vietnam. *Journal of Applied Phycology* 26(1), 265-272.

Polle J.E., Kanakagiri S., Jin E., Masuda, T., Melis, A. 2002. Truncated chlorophyll antenna size of the photosystems—a practical method to improve microalgal productivity and hydrogen production in mass culture. *International Journal of Hydrogen Energy* 27(11-12), 1257-1264.

Seyfabadi J., Ramezanpour Z., Amini Khoeyi Z. 2011. Protein, fatty acid, and pigment content of *Chlorella vulgaris* under different light regimes. *Journal of Applied Phycology* 23(4), 721-726.

Sing S.F., Isdepsky A., Borowitzka M.A., Lewis, D.M. 2014. Pilot-scale continuous recycling of growth medium for the mass culture of a halotolerant *Tetraselmis* sp. in raceway ponds under increasing salinity: a novel protocol for commercial microalgal biomass production. *Bioresource Technology* 161, 47-54.

Yang, C.M., Chang, K.W., Yin, M.H. and Huang, H.M., 1998. Methods for the determination of the chlorophylls and their derivatives. *Taiwania* 43(2), 116-122.

# Effect of light intensity and medium culture on the growth rate, biomass production and pigments component of microalgae *Cyanothece* sp.

**Zahra Aminikhoei*, Elnaz Erfanifar, Ashjan Ajdari**

Offshore Water Research Center (OWRC), Iranian Fisheries Science Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Chabahar, Iran.
*Corresponding author: zamini.41@gmail.com
Received: 2022/12/26 Accepted: 2023/2/17

**Abstract**

Microalgae living in salt marshes and hypersaline lagoons are among the richest and most valuable biological resources. This study aims to determine the required light intensity and the suitable culture medium for the growth and production of economically valuable pigments in hypersaline microalgae *Cyanothece* sp. In this experiment, the ability to grow, biomass production and the pigments contents of microalgae *Cyanothece* sp in three different light intensity levels (3000, 5000 and 8000 lux) and three standard culture environments (BBM, F/2 and BG11) were investigated. The results of this research showed that increasing the light intensity from 3000 to 5000 lux in three medium BBM, F/2 and BG11 have significantly increased the growth and biomass production. Light intensity and culture medium alone and also mutually showed a significant effect on the production of chlorophyll a pigments, total carotenoid, beta-carotene, phycocyanin and phycoerythrin. The highest content of chlorophyll a pigment was obtained in BG11 medium at two light intensities of 5000 and 8000 lux. While the total carotenoids and beta-carotene reached their highest levels in the light intensity of 8000 lux and F/2 medium. The amount of phycocyanin and phycoerythrin observed in BG11 and BBM culture medium were higher than F/2 and in light intensity of 5000 and 8000 higher than 3000 lux. Based on the results, the light intensity of 5000 lux and culture medium BG11 are recommended for growing *Cyanothece* sp.

**Keywords:** Microalgae, *Cyanothece* sp., Hhypersaline, Light intensity, Culture medium.