افزایش تولید سیانو باکتری اسپیرولینا با کنترل هم زدن و ترکیب شیمیایی محیط کشت

علی شیخی نژاد[۱]، عبدالمجید لباب پور[۱*] و نسرین معظمی[۲]

[۱] تهران، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، پژوهشکده صنعت و محیط زیست

[۲] تهران، سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران، پژوهشکده زیست فناوری

تاریخ دریافت: ۹۲/۱۰/۳ تاریخ پذیرش: ۹۳/۵/۱۶

چکیده

در این پژوهش، اثر هم زدن با هوا و هم زدن با چرخش ظرف کشت بر میزان تولید زیست توده ی اسپیرولینا در ۵ محیط کشت متفاوت بررسی شد. اسپیرولینا در محیط کشت های زاروک، جردن، اف ۲، شولسر و نیز نمک دریا به مدت ۱۴ روز کشت شد. در سامانه هم زدن با هوا، هم زدن با جریان هوا با فلوی ۰/۲ vvm و در سامانه هم زدن با چرخش ظرف کشت، هم زدن با شیکر با سرعت ۱۵۰rpm به طور مداوم ویکنواخت به کاررفت. دما و نوررسانی در همه ی کشت ها یکسان و برابر با ۲ºC ± ۲۶ و $۴۰\mu E\ m^{-2}s^{-1}$ بود. اسپیرولینا در همه ی محیط های کشت رشد کرد. بیش ترین میزان رشد و تولید زیست توده خشک اسپیرولینا در هم زدن با چرخش ظرف کشت به $۴/۰g\ L^{-1}$ و در هم زدن با هوا، به $۳/۶۸g\ L^{-1}$ رسید. درهم زدن با چرخش محیط کشت، بیش ترین تولید زیست توده $۴/۰g\ L^{-1}$ در محیط کشت زاروک و کم ترین تولید در محیط کشت نمک دریا و برابر با $۲/۴۹g\ L^{-1}$ بود. بیش ترین تولید زیست توده در هم زدن با هوا $۳/۶۹g\ L^{-1}$ در محیط کشت نمک دریا و کم ترین تولید زیست توده در محیط کشت اف ۲ و برابر با $۲/۳g\ L^{-1}$ بود. در طول دوره ی کشت در هم زدن با چرخش ظرف کشت، pH به طور مداوم و تدریجی افزایش یافت و در بیش ترین مقدار به ۱۰/۹ رسید اما در کشت های هم زدن با هوا، pH از روز هفتم و در ۱۰/۱ بدون تغییر ماند. در محیط کشت نمک دریا، میزان تولید زیست توده در شرایط هم زدن با هوا بیش تر از حالت هم زدن با چرخش ظرف کشت بود. بر اساس نتایج این مطالعه، تنش، اثر زیادی بر رشد و تولید زیست توده اسپیرولینا دارد و با کاهش تنش، راندمان تولید صنعتی زیست توده در کشت اسپیرولینا افزایش می یابد.

واژه های کلیدی: اسپیرولینا، هم زدن، تولید زیست توده، سیانوباکتری، محیط کشت.

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۲۱۴۴۷۸۷۳۰۳ ، پست الکترونیکی: labab pour@nigeb.ac.ir

مقدمه

قرن هاست که سیانوباکتری اسپیرولینا برای مصرف غذایی به کار می رود. در سال ۱۹۷۴ م، درکنفرانس جهانی غذای سازمان ملل متحد، به اسپیرولینا عنوان "بهترین غذای آینده" داده شد (۱ و ۲). ازآن جایی که زیست توده ی اسپیرولینا حاوی مقادیر قابل توجهی از مولکول های فعال زیستی (Bioactive)، پروتئین های دارای اسید آمینه های ضروری، اسیدهای چرب اشباع نشده مانند لینولئیک اسید، ویتامین ها (B12 و E)، پلی ساکاریدها، املاح معدنی (Na, K, Ca, Fe, Mn, Se)، رنگدانه ها (کلروفیل، فیکوسیانین، آلو فیکوسیانین، بتا-کاروتن، لوتئین و زازانتین و ...) است، درچند دهه ی گذشته، افزون بر مصارف غذایی، برای مصارف جدیدتری مورد توجه پژوهشگران و صنعتگران قرار گرفته است (۳ و ۴). برخی از کاربردهای غذایی و خاصیت های اسپیرولینا در حوزه ی سلامت عبارتند از: غذا، آنتی اکسیدانت، آنتی ترومبیوتیک، مهندسی بافت، مکمل غذایی در شیلات، آنتی میکروبیال، آنتی آرتروز، محافظ عصبی، محافظ قلب، ضد سرطان و محرک سیستم عصبی (۱). بیش تر تمرکز فعالیت ها و تلاش ها در زمینه

اسپیرولینا، تولید فراورده های گوناگون دارویی و زیست محیطی از اسپیرولینا است (۱). این فراورده ها در صورتی می توانند وارد بازار شوند که روش تولید آن ها اقتصادی شود (۵ و ۶). ماده ی اولیه این فراورده ها، زیست توده اسپیرولینا است که در سامانه های بسته و یا باز تولید می شود (۷ و ۸). بهینه سازی شرایط رشد و تولید زیست توده ی اسپیرولینا سبب می شود که فراورده هایی با ارزش اقتصادی بیش تر و هزینه ی کم تر فراهم شود (۹ و ۱۰).

کشت اسپیرولینا در بیو راکتورهای زیستی نوری (Photobioreactors) مانند سایر سیانو باکتری ها نیاز به هم زدن دارد تا سلول ها به حالت تعلیق باقی بمانند و از ته نشینی آنها جلوگیری شود. این شرایط برای میکروارگانیسم های فتوسنتز کننده که به جذب نور نیاز دارند اهمیت بیش تری دارد (۱۱). اما از طرفی هم زدن با تنش و استرس هیدرودینامیکی بر سلول ها همراه است و بر تولید زیست توده تاثیر منفی دارد (۹). یکی از راه ها در کاهش تنش، به کارگیری روش های مناسب تر در هم زدن محیط کشت است (۱۲ و ۱۳) که در میان راه حل ها، گزینه ی به کارگیری بیوراکتورهای چرخان (Shaken bioreactors) گزارش شده است که اغلب در کشت سلول های انسانی به کارمی رود (۱۴). این نوع راکتورها با مقیاس یزرگ نیز تولید شده و به کاررفته اند (۱۵). هم چنین برای کاهش تنش، به کارگیری مواد شیمیایی افزودنی به محیط کشت نیز در کشت ریزجلبک به کاررفته است (۱۶ و ۱۷) . میتسو هاشی گزارش کرد که اسپیرولینا نسبت به تنش حساسیت زیادی دارد (۱۸). تاکنون اثر تنش در بیو راکتورهای زیستی نوری بررسی شده است (۱۹) هم چنین اثر تنش در کشت ریزجلبک کلامیدوموناس بررسی و گزارش شده است (۲۰ و ۲۱)، اما این اثر در هم زدن با چرخش محیط کشت در مورد اسپیرولینا گزارش نشده است. نیاز به یافتن سامانه کشت با تنش کم تر، انگیزه این پژوهش است و چالش هم زدن با چرخش ظرف کشت و هوا بررسی و مقایسه شده است. افزون برآن، به منظور افزایش و بهینه سازی تولید زیست توده، اسپیرولینا در ۴ محیط کشت سنتزی و محیط کشت نمک دریا کشت و ارزیابی شد.

مواد و روشها

میکروارگانیسم و شرایط کشت: سویه ی اسپیرولینا از مرکز تحقیقات میگوی بوشهر، بوشهر، ایران تهیه شد. منشا سویه، آب های خلیج فارس است. این سویه در ارلن مایر حاوی ۱L محیط کشت زاروک در دمای اتاق کشت و نگهداری شد. ترکیب شیمیایی محیط کشت زاروک و سایر محیط کشت های سنتزی به کار رفته برحسب $g\ L^{-1}$ در جدول ۱ آمده است. محیط کشت نمک دریا، از حل کردن ۳۵g نمک دریا با ترکیب شیمیایی معلوم در ۱L آب مقطر تهیه شد. دما در طول دوره آزمایش ثابت و برابر با $۲۶ \pm ۲^{o}C$ نگه داشته شد. نوررسانی به کشت ها با لامپ فلوئورسنت (OSRAM L, 36W/77, FLUORA, 1400 lm, Germany) و شدت نوری $۴۰\mu E\ m^{-2}s^{-1}$ انجام شد. شدت نور با دستگاه لوکس متر (TES 1332A Digital LUX Meter, Taiwan) تنظیم شد. زمان نوردهی ۱۶h روشنایی و ۸h تاریکی تنظیم شد. درشرایط هوادهی، کشت ها به طور مداوم و یکنواخت توسط پمپ هوا با فلوی ۰/۲vvm، هوادهی شدند. بالن های ته گرد ۲L و با حجم کاری ۱L برای کشت اسپیرولینا به کاررفت. محیط کشت ابتدا به مدت ۲۰min در دمای $۱۲۱^{o}C$ اتوکلاو شد. تنها محیط کشت آب دریا به منظور حفظ حالت طبیعی خود، اتوکلاو نشد وبا عبور از فیلتر استریل شد تا پتانسیل تولید اسپیرولینا در محیط طبیعی ارزیابی شود. تلقیح از سلول های در حال رشد تهیه شد. اسپیرولینا در همه آزمایشها به محیط کشت ها درشرایط استریل و به میزان ۱۰ درصد حجمی در بالن کشت تلقیح شد . کشت اسپیرولینا به مدت ۱۴ روز ادامه یافت. این زمان براساس آزمایش های پیشین و زمانی که محیط کشت به بالاترین میزان رشد رسید، انتخاب شد.

جدول ۱ ترکیب شیمیایی محیط کشت های به کاررفته برای کشت اسپیرولینا برحسب $g\ L^{-1}$

نام و ترکیب شیمیایی	زاروک	جردن	اف ۲	شولسر
$NaHCO_3$	۱۶/۸	۱۶		۱۳/۶۱
Na_2CO_3				۴/۰۳
K_2HPO_4	۰/۵			۰/۵
$NaNO_3$	۲/۵		۷/۵	۲/۵
K_2SO_4	۱	۰/۵	۱	۱
NaCl	۱	۱	۱	۱
$MgSO_4.7H_2O$	۰/۲	۰/۱		۰/۲
$CaCl_2.2H_2O$	۰/۰۴	۰/۱	۰/۴	۰/۰۴
$FeSO_4.7H_2O$	۰/۰۱	۰/۰۱		
EDTA	۰/۰۸			
KNO_3		۲		
$(NH_4)_2\ HPO_4$		۰/۱		
Na_2SO_4				
H_3BO_3	۲/۸۶		۰/۰۰۶۲	۰/۶۲
$MnCl_2.4H_2O$	۱/۸۱			۰/۰۱۲
$ZnSO_4.4H_2O$	۰/۲۲۲		۰/۰۲۲	۰/۰۴۴
$Na_2MoO_4.2H_2O$	۰/۰۱۷۷			۰/۰۱۲
$CuSO_4.5H_2O$	۰/۰۷۹		۰/۰۰۹۸	۰/۰۲
$BaCl_2.2H_2O$				
$CoCl_2.6H_2O$			۰/۰۰۱	۰/۰۲
$SeCl_2.2H_2O$				
$SnCl_2.2H_2O$				
LiCl				
$NiSO_4.5H_2O$				
$Na_2EDTA.2H_2O$			۰/۰۴۳۶	۰/۰۵
$FeCl_3.6H_2O$			۰/۰۳۶	۰/۰۹۷
$MnCl_2.4H_2O$			۰/۰۰۱۸	۰/۰۴۱
$ZnCl_2$			۰/۰۰۵	۰/۰۰۵
$Na_2MoO_4.2H_2O$			۰/۰۶۴	۰/۰۰۴
$FeSO_4.7H_2O$				۰/۰۱۲
pH	۹/۳ ± ۰/۲	۹/۲ ± ۰/۲	۹/۴ ± ۰/۲	۹/۲ ± ۰/۲

هم زدن کشت های اسپیرولینا: کشت اسپیرولینا با دو سامانه هم زدن با هوا و هم زدن چرخش ظرف کشت در بالن ته گرد انجام شد. در هم زدن با هوا گازپخش کن (Gas sparger) و لوله های شیشه ای برای ورود و خروج هوا به کار رفت و در بالن ها با درپوشی که دارای دو سوراخ بود، بسته شد. بالن ها به قفسه های نوری کشت انتقال یافت و جریان هوا به وسیله پمپ هوا و ازراه شلنگ های سیلیکونی، با فلوی ۰/۲ vvm به داخل بالن ها هدایت

شد. برای هم زدن با چرخش ظرف کشت، دِر بالن ها با پنبه بسته شد و بالن ها با گیره بر روی شیکر محکم شدند و هم زدن با سرعت ۱۵۰rpm انجام شد. همه آزمایش ها به استثنای محیط نمک دریا در شرایط استریل انجام شد.

اندازه گیری ها: نمونه گیری برای بررسی رشد و میزان تولید با ۳۰ mL نمونه، روزانه انجام شد و پس از نمونه گیری، به اندازه نمونه برداشته شده، آب مقطر به بالن های کشت اضافه شد تا حجم کلی محیط کشت ثابت بماند. نمونه گیری از کشت ها در شرایط استریل انجام شد. نمونه ها در لوله های فالکون ۵۰mL ریخته شد و درشرایط g ۱۵۰۰ سانتریفوژ (XL-90 Ultracentrifuge, Beckman, USA) شد. مایع رویی دور ریخته شد و پس از افزودن ۳۰mL آب مقطر و هم زدن، دوباره سانتریفوژ شد تا جذب سایر مواد محیط کشت در جذب سلول ها تاثیر نگذارد. میزان رشد با اندازه گیری جذب نوری (OD) در طول موج ۵۶۰nm با دستگاه اسپکتروفوتومتر (Spectronic 20D, USA, Miltonroy Co.) اندازه گیری شد. سپس مقادیر جذب نوری با توجه به رابطه به دست آمده میان جذب و وزن خشک زیست توده به وزن خشک زیست توده برحسب $g\ L^{-1}$ تبدیل شد. این کار با اندازه گیری توام جذب نوری و وزن خشک زیست توده نمونه های با غلظت متفاوت، انجام شد تا میزان رشد بر اساس وزن خشک اسپیرولینا گزارش شود. برای اندازه گیری وزن خشک زیست توده، نمونه ها پس از سانتریفوژ و ۲ بار شستن با آب مقطر، با کاغذ صافی واتمن فیلتر شد و سپس سلول های روی کاغذ صافی در آون با دمای$۶۰^{o}C$ و در زمان h ۲۴خشک شد، سپس مقدار وزن خشک زیست توده با ترازوی آزمایشگاهی با دقت g۰/۰۰۰۱ اندازه گیری شد. تغییرات pH در مدت کشت، روزانه با دستگاه pH متر دیجیتالی (MP225, Mettler Toledo, UK) معین شد. مرفولوژی سلول ها با میکروسکوپ نوری (Eclipse 80i, Japan, Nikon) با بزرگنمایی ۱۰۰۰ بررسی شد. همه آزمایش ها در ۳ تکرار انجام و میانگین آن ها گزارش شده است. این آزمایش در قالب آزمایش فاکتوریل در قالب طرح پایه کاملا تصادفی و با سه تکرار انجام و جهت انجام تجزیه واریانس و مقایسه میانگین داده‌ها از نرم‌افزار آماری SAS (۲۰۰۳-۲۰۰۲) استفاده شد. هم چنین یون های کربنات و بیکربنات نمک دریا با تیتراسیون، آنیون ها با کروماتوگرافی یونی و کاتیون های اصلی با طیف سنجی جذب اتمی اندازه گیری شد. از آن جایی که هدف این پژوهش برتولید زیست تودهاسپیرولینا و بررسی رژیم های هم زدن تمرکز داشت، رنگدانه های تولید شده درون سلولی مورد بررسی قرارنگرفت. ترکیب شیمیایی نمک دریا به کاررفته در آزمایش ها در جدول ۲ آمده است.

جدول ۲ - ترکیب شیمیایی محیط کشت نمک دریا

کاتیون ها	غلظت درمحیط کشت ($g\ L^{-1}$)	آنیون ها	غلظت درمحیط کشت ($g\ L^{-1}$)
Na^{+}	۳/۵۳۸۵	Cl^{-}	۴/۵۹۲
K^{+}	۰/۱۱۵۵	$HCO_{۳}^{-}$	۰/۳۴۳
$Mg^{۲+}$	۰/۳۸۵	$CO_{۳}^{۲-}$	۰/۰۵۲۵
$Ca^{۲+}$	۰/۱۰۸۵	$SO_{۴}^{۲-}$	۰/۸۴۳۵
		$PO_{۴}^{۳-}$	< ۰/۰۱ ppm
		$NO_{۳}^{-}$	< ۲ ppm

نتایج و بحث

رشد و تولید زیست توده اسپیرولینا در ۵ محیط کشت، در شرایط هم زدن با هوا و با چرخش ظرف کشت بررسی شد. در هم زدن با چرخش ظرف کشت، در همه محیط های کشت به استثنای محیط کشت نمک دریا، در مدت زمان کمتری به بالاترین میزان رشد و زیست توده رسیدند. در مورد میزان رشد اسپیرولینا در آب دریا نتیجه برعکس بود یعنی میزان رشد در هم زدن با هوا از میزان رشد در هم زدن باچرخش ظرف کشت بیش تر و به ترتیب برابر با ۳/۵ $g\ L^{-1}$ و ۲/۴۹ بود. در هم زدن با هوا، کشت در محیط نمک دریا، جردن، شولسر، زاروک و در انتها اف ۲ به ترتیب با ۳/۵$g\ L^{-1}$، ۲/۶، ۲/۳، ۲/۲۱، ۲/۲ به بالاترین میزان رشد خود و مقدار زیست توده رسیدند. در هم زدن با چرخش ظرف کشت بیش ترین میزان رشد و تولید زیست توده به ترتیب برای محیط کشت های زاروک، جردن، اف ۲، شولسر و نمک دریا و برابر با ۳/۸۹$g\ L^{-1}$، ۳/۸، ۳/۶، ۳/۳۷ و ۲/۴ بود. نتایج نشان داد که دو فاکتور محیط کشت و هم زدن می تواند اختلاف معنی‌داری را در تولید زیست توده به ترتیب در سطح احتمال یک و پنج درصد به‌وجود آورند. برهم کنش بین محیط کشت و هم زدن نیز در تحلیل آماری بررسی شده است و اثر آن نیز معنا دار بوده است. مقایسه میانگین اثر عاملهای هم زدن و محیط کشت و نیز بر هم کنش های آن ها به ترتیب در جدول های ۴، ۵ و ۶ نشان داده شده است. همان طور که جدول ۵ نشان می دهد تغییرات محیط کشت اثر بسیار زیادی بر تولید زیست توده داشته است و محیط کشت جردن در این آزمایش ها تولید زیست توده بیش تری ۳/۲۱ $g\ L^{-1}$ داشته است و محیط کشت شولسر کم ترین مقدار تولید زیست توده ۲/۸۸ $g\ L^{-1}$ را داشته است. هم چنین در هم زدن با چرخش ظرف کشت، مقدار میانگین ۳/۴۲ $g\ L^{-1}$ زیست توده تولید کرده است و در هم زدن با هوامقدار میانگین آن ۲/۵ $g\ L^{-1}$ بوده است. در بین ۵ محیط کشت بررسی شده به طور کلی هم زدن با چرخش ظرف کشت برای تولید زیست توده مناسب تر بوده است. جدول ۶ برهم کنش بین هم زدن و محیط کشت را نشان می دهد وجود بر هم کنش بدین معنی است که اثر یک عامل با تغییر سطوح عامل دیگر تغییر می کند. در آزمایش های انجام شده در ۴ محیط کشت زاروک، جردن، اف ۲، و شولسر نوع هم زدن با چرخش ظرف کشت تنش کم تری به سلول ها وارد شده است و تولید زیست توده بیش تر بوده است، در حالی که در محیط کشت نمک دریا، هم زدن در با هوا بهتر بوده است. با توجه به اثر محیط کشت و هم زدن، می توان به این نتیجه رسید که با انتخاب محیط کشت و سامانه هم زدن مناسب، زیست توده بیش تری تولید می شود و با گزارش های دیگر هم خوانی دارد (۲۲، ۲۳، ۲۴ و ۲۵).

جدول۳ – نتایج تجزیه واریانس تولید زیست توده بین عامل‌های محیط کشت و روش هم‌زدن

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات
محیط کشت	۴	۰/۱*
روش به هم‌زدن	۱	۵/۲**
محیط کشت × روش به هم‌زدن	۴	۱/۸**
خطا	۲۰	۰/۰۳

*- دارای اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد **- دارای اختلاف معنی‌دار در سطح ۱ درصد

جدول ۴ – مقایسه میانگین بین روش‌های هم‌زدن محیط کشت در تولید زیست توده با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد

روش به‌هم‌زدن	میانگین تولید زیست توده	
هم‌زدن با چرخش ظرف کشت	۳/۴۲	A
هم‌زدن با هوا	۲/۵	B

جدول ۵ – مقایسه میانگین بین محیط‌های کشت در تولید زیست توده با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد

محیط کشت	میانگین تولید زیست توده	
جردن	۳/۲۱	A
زاروک	۳/۰۴	AB
نمک دریا	۲/۹۵	B
اف ۲	۲/۹۲	B
شولسر	۲/۸۸	B

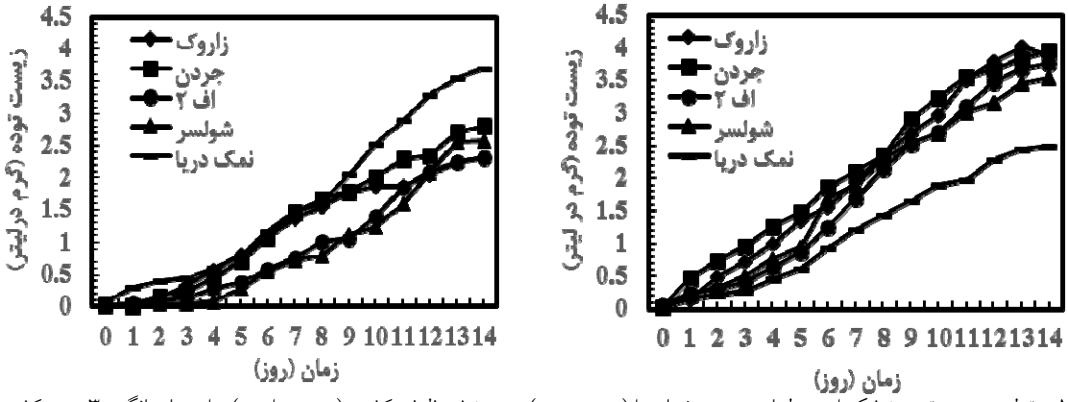
محیط کشت‌های دارای حروف مشترک، اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد با یکدیگر ندارند.

جدول۶ – مقایسه میانگین برهمکنش بین عامل‌های هم‌زدن و محیط کشت در تولید زیست توده با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال پنج درصد

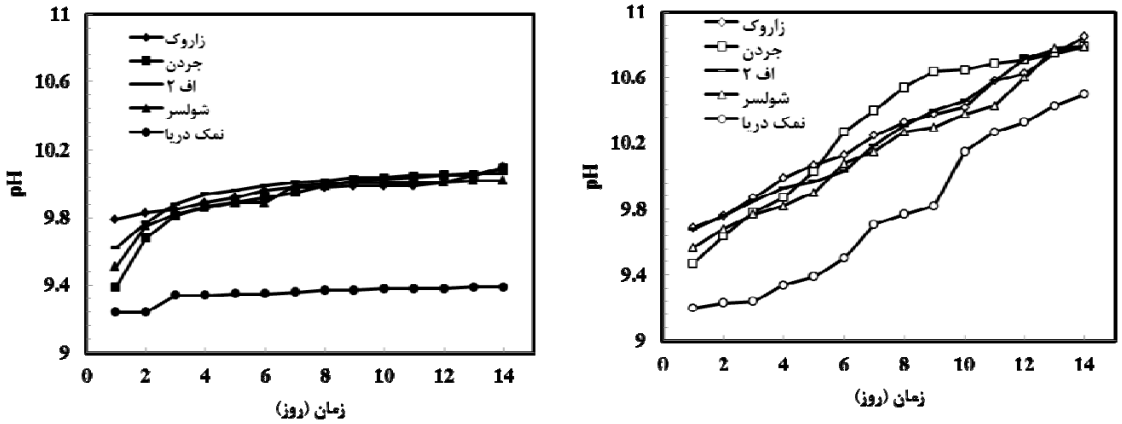
برهمکنش روش به‌هم‌زدن و محیط کشت	میانگین تولید زیست توده	
زاروک × هم‌زدن با چرخش ظرف کشت	۳/۸۹	A
جردن × هم‌زدن با چرخش ظرف کشت	۳/۸	AB
اف ۲ × هم‌زدن با چرخش ظرف کشت	۳/۶۳	ABC
نمک دریا × هم‌زدن با هوا	۳/۵۱	BC
شولسر × هم‌زدن با چرخش ظرف کشت	۳/۳۷	C
جردن × هم‌زدن با هوا	۲/۶۲	D
نمک دریا × هم‌زدن با چرخش ظرف کشت	۲/۴	DE
شولسر × هم‌زدن با هوا	۲/۳۹	DE
اف ۲ × هم‌زدن با هوا	۲/۲۱	E
زاروک × هم‌زدن با هوا	۲/۲	E

برهمکنش‌های دارای حروف مشترک، اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد با یکدیگر ندارند.

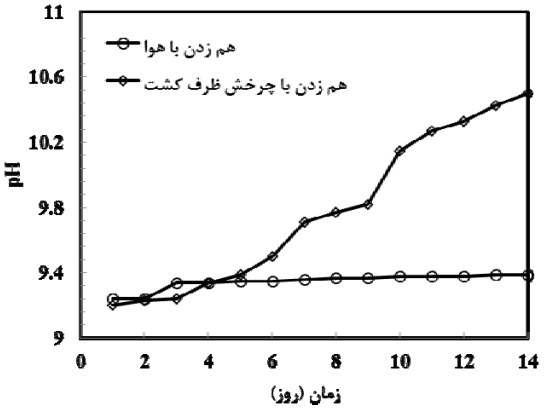
pH یکی از پارامترهای محدود کننده است که برفعالیت های متابولیکی سیانوباکتری ها تاثیردارد و بر رشد فیزیولوژیکی و تولید زیست توده اثر می گذارد. بیش ترین رشد اسپیرولینا در محدوده pH بازی ۱۰–۹ گزارش شده است (۲۶). دراین پژوهش، روند تغییر pH محیط کشت ها در هم زدن با هوا و چرخش ظرف کشت، متفاوت بود. pH محیط های کشت در هم زدن با چرخش محیط کشت به طور تدریجی و مداوم افزایش یافت در حالی که در کشت های با هم زدن با هوا، از روز هفتم pH بدون تغییر و حدود ۱۰/۱ باقی ماند (به جز محیط کشت نمک دریا که در ۹/۴ ثابت ماند) اما در شرایط هم زدن با چرخش ظرف کشت روند افزایش pH تا پایان مدت کشت ادامه یافت (شکل ۲). در کشت با هم زدن به وسیله هوا تغییرات pH معادل با ۰/۷ واحد و از ۱۰/۱–۹/۴ و در کشت های با چرخش ظرف کشت، تغییرات معادل با ۱/۵ و از ۱۰/۹–۹/۴ بود. بالاترین میزان pH در کشت های با چرخش ظرف کشت، و درهم زدن با هوا، به ترتیب در شولسر، اف ۲، جردن، زاروک و در انتها نمک دریا به بالاترین میزان رسید. در هم زدن باهوا، کم ترین تغییرات pH در مدت کشت در محیط کشت نمک دریا مشاهده شد (۰/۲). روند تغییر pH در محیط کشت نمک دریا در دو حالت هم زدن با هوا و چرخش ظرف کشت در شکل ۳ مقایسه شده است. نتایج حاصله نشان داد که شیوه ی هم زدن سبب تفاوت هایی در میزان رشد، pH و تولید زیست توده اسپیرولینا شده است. پژوهش بیش تری لازم است تا دلیل تفاوت روند تغییر pH در دو حالت هم زدن بررسی شود.



شکل ۱ – تولید زیست توده خشک اسپیرولینا در هم زدن با هوا (سمت چپ) و چرخش ظرف کشت (سمت راست). داده ها میانگین ۳ دوره کشت را نشان می دهند.



شکل ۲ – تغییرات pH محیط کشت اسپیرولینا در هم زدن با هوا (سمت چپ) و چرخش ظرف کشت (سمت راست). داده ها میانگین ۳ دوره کشت را نشان می دهند.



شکل ۳ – تغییرات pH محیط کشت نمک دریا در هم زدن با هوا و چرخش ظرف کشت

اثر شرایط عملیاتی کشت به ویژه تنش ناشی از هم زدن در کشت میکروارگانیسم های فتوسنتز کننده بر میزان رشد و تولید زیست توده گزارش شده است (۷). از آن جایی که شرایط کشت درآزمایش ها ی تولید زیست توده ی اسپیرولینا مشابه بود، تولید بیش تر زیست توده در کشت با چرخش ظرف کشت، به کاهش تنش ناشی از هم زدن محیط کشت نسبت داده شد. نتایج این مطالعه نشان داد که هم زدن با چرخش ظرف کشت، تنش کم تری بر سلول ها وارد کرده و رشد اسپیرولینا و تولید زیست توده در مقایسه با هم زدن با هوا بیش تر است. نتایج این پژوهش با گزارش گارسیا و همکاران (۲۱) برای باکتری زانتاموناس و پژوهش های انجام شده در بیوراکتورهای چرخان هم خوانی دارد (۱۴). هم چنین کاهش تنش در هم زدن با چرخش ظرف کشت در مقایسه با روش های دیگر هم زدن با مکانیک سیالات محاسباتی(Computational fluid dynamics) تایید و گزارش شده است (۲۷). البته هم زدن با هوا در شرایط گوناگون نیز اثرات متفاوتی را ایجاد می کند برای نمونه اندازه حباب ها در هوادهی، سرعت هوادهی و ترکیب شیمیایی گازهای هوادهی هم زن می توانند تنش ایجاد شده را افزایش و یا کاهش دهند. اما در هر حال، هم زدن با چرخش ظرف کشت تنش کم تری را بر سلول ها ایجاد می کند و با این سامانه می توان به تولید بیش تر زیست توده اسپیرولینا دست یافت. در مقایسه با هم زدن با هوا، هم زدن با چرخش ظرف کشت، تنش کم تری بر سلول ها ایجاد می کند. این مطالعه نشان می دهد که میزان تنش القا شده با هم زدن با هوا بر رشد و تولید زیست توده تاثیر داشته و در هنگام طراحی فرایند باید مورد نظر قرار گیرد.

نتیجه گیری

در این پژوهش، رشد اسپیرولینا در۵ محیط کشت متفاوت و با شرایط گوناگون هم زدن بررسی شد. نتایج این مطالعه به درک بیش تر پاسخ سیانوباکتری اسپیرولینا به اثر همزمان نوع محیط کشت و هم زدن کمک می کند. داده های آزمایش ها نشان دادکه هم زدن با چرخش محیط کشت

برای تولید بیش تر اسپیرولینا از هم زدن با هوا مناسب تر است. هم چنین رشد قابل ملاحظه اسپیرولینا در محیط کشت نمک دریا، امکان پذیری تولید اسپیرولینا را در شرایط آب و هوایی کشورهایی مانند ایران که کمبود منابع آب شیرین و منابع فراوان آب دریا دارند را تاکید کرد. براساس نتایج به دست آمده، در پژوهش های بعدی، ساخت بیو راکتورهای زیستی نوری لوله ای با تنش مکانیکی کم در کشت اسپیرولینا بررسی خواهد شد.

قدردانی

از حمایت مالی پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری و سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران در انجام این پژوهش تشکر و قدردانی می شود (طرح شماره ۴۷۶).

منابع

1. Patel S, Goyal A: Current and Prospective Insights on Food and Pharmaceutical Applications of Spirulina. *Curr Trends Biotechnol Pharm* 2013, 7(April):696–707.

2. Jitendra M, Priyanka S, Madhulika J, Mohsina S, Komal M, Neha K: Impact of different Physical and Chemical Environment for mass Production of Spirulina pletensis - An Immunity Promoter. *Int Res J Biol Sci* 2012, 1:49–56.

3. Martha Sanchez, Jaime Bernal-Castillo, Camilo Rozo IR: Spirulina (Arthrospira): An edible microorganism. A review. 2007:1–25.

4. Platensis A, Chen Y: The effect of shifts in medium types on the growth and morphology of Spirulina platensis (Arthrospira platensis). *J Mar Sci Technol* 2011, 19:565–570.

5. Article R, Saleh AM, Dhar DW, Singh PK, Delhi N: Comparative pigment profiles of different Spirulina strains. 2011, 2:67–74.

6. Chojnacka K, Noworyta A: Evaluation of Spirulina sp. growth in photoautotrophic, heterotrophic and mixotrophic cultures. *Enzyme Microb Technol* 2004, 34:461–465.

7. Ravelonandro PH, Ratianarivo DH, Joannis-Cassan C, Isambert A, Raherimandimby M: Improvement of the growth of Arthrospira (Spirulina) platensis from Toliara (Madagascar): Effect of agitation, salinity and CO2 addition. *Food Bioprod Process* 2011, 89:209–216.

8. Chauhan UK, Pathak N: Effect of different conditions on the production of chlorophyll by Spirulina platensis. *J Algal Biomass Util* 2010, 1:89–99.

9. Mirón AS, García MCC, Gómez AC, Camacho FG, Grima EM, Chisti Y: Shear stress tolerance and biochemical characterization of Phaeodactylum tricornutum in quasi steady-state continuous culture in outdoor photobioreactors. *Biochem Eng J* 2003, 16:287–297.

10. Fisheries, F A O AC: *A Review on Culture, Production and Use of Spirulina as Food for Human and Feeds for Domestic Animals and Fish*. *Volume 1034*. FAO Fisheries and Aquaculture Circular No . 1034; 2008.

11. Pegallapati AK, Nirmalakhandan N: Energetic evaluation of an internally illuminated photobioreactor for algal cultivation. *Biotechnol Lett* 2011, 33:2161–7.

12. Jain S, Singh SG: Optimization of biomass yield of Spirulina platensis grown in petha (Benincasa hispida Thunb .) waste in different culture conditions. *Indian J Biotechnol* 2012, 11(October):498–501.

13. Srinivasa R, Ronda C, Bokka S, Ketineni C, Binod R, Allu PR: Aeration effect on Spirulina platensis growth and y-linolenic acid production. *Brazilian J Microbiol* 2012:12–20.

14. Tissot S, Reclari M, Quinodoz S, Dreyer M, Monteil DT, Baldi L, Hacker DL, Farhat M, Discacciati M, Quarteroni A, Wurm FM: Hydrodynamic stress in orbitally shaken bioreactors. *BMC Proc* 2011, 5 Suppl 8(Suppl 8):P39.

15. Zhang X, Stettler M, Sanctis D De, Perrone M, Parolini N, Discacciati M, Jesus M De, Hacker D, Quarteroni A, Wurm F: Use of orbital shaken disposable bioreactors for mammalian cell cultures from the milliliter-scale to the 1,000-liter scale. In *Dispos Bioreact Adv Biochem Eng / Biotechnol*. *Volume 115*; 2010:33–53.

16. Camacho FG, Grima EM, Mirón AS, Pascual VG, Chisti Y: Carboxymethyl cellulose protects algal cells against hydrodynamic stress. *Enzyme Microb Technol* 2001, 29:602–610.

17. Gallardo Rodríguez JJ, Sánchez Mirón A, García Camacho F, Cerón García MC, Belarbi EH, Chisti Y, Molina Grima E: Carboxymethyl cellulose and Pluronic F68 protect the dinoflagellate Protoceratium reticulatum against shear-associated damage. *Bioprocess Biosyst Eng* 2011, 34:3–12.

18. Mitsuhashi S, Fujimoto M, Muramatsu H, Tanishita K: Effect of simple shear flow on photosynthesis rate and morphology of micro algae. *Acta Astronaut* 1994, 33(null):179–187.

19. Scarsella M, Torzillo G, Cicci A, Belotti G, De Filippis P, Bravi M: Mechanical stress tolerance of two microalgae. *Process Biochem* 2012, 47:1603–1611.

20. Hodaifa G, Martínez ME, Órpez R, Sánchez S: Influence of hydrodynamic stress in the growth of Scenedesmus obliquus using a culture medium based on olive-mill wastewater. *Chem Eng Process Process Intensif* 2010, 49:1161–1168.

21. Garcia-Ochoa F, Gomez E, Alcon A, Santos VE: The effect of hydrodynamic stress on the growth of Xanthomonas campestris cultures in a stirred and sparged tank bioreactor. *Bioprocess Biosyst Eng* 2013, 36:911–25.

22. Rodrigues MS, Ferreira LS, Converti A, Sato S, de Carvalho JCM: Influence of ammonium sulphate feeding time on fed-batch Arthrospira (Spirulina) platensis cultivation and biomass composition with and without pH control. *Bioresour Technol* 2011, 102:6587–92.

23. Murugan T, Radhamadhavan: Media optimization for enhanced growth and yield of Spirulina platensis biomass and determination of generation time. *Int J Med Sci* 2010, 3:34–39.

24. Perkebunan M: Optimization media from low-cost nutrient sources for growing Spirulina platensis and carotenoid production. *Menara Perkeb* 2001, 69:18–28.

25. Jain S, Singh SG: A Laboratory Scale Cultivation of Spirulina platensis using Cooling Tower Water (CTW) Supplemented with Standard Medium (CFTRI). *J Algal Biomass Util* 2013, 4:42–49.

26. Mustafa Y, Fagiri A, Salleh A, El-nagerabi SAF: Influence of chemical and environmental factors on the growth performance of Spirulina platensis strain SZ100. *J Algal Biomass Util* 2013, 4:7–15.

27. Bai G, Bee JS, Biddlecombe JG, Chen Q, Leach WT: Computational fluid dynamics (CFD) insights into agitation stress methods in biopharmaceutical development. *Int J Pharm* 2012, 423:264–80.

28. SAS. 2002-2003. User's guide: Statistics, version 9.1. SAS Institute, Inc. Cary, NC, USA.

Increasing Cyanobacteria *Spirulina* Production with Mixing and Chemical Composition of Culture Medium

Sheykhi Nejad A.[1], Lababpour A.M.[1] and Moazami N.[2]

[1] Industrial and Environmental Biotechnology Dept., National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB), Tehran, Iran

[2] Biotechnology Dept., Iranian Research Organization for Science and Technology (IROST), Tehran, Iran

Abstract

In this research, the effects of aeration and agitation of culture vessel on *Spirulina* biomass production were studied in five various culture media. *Spirulina* was cultivated in Zarrouk, Jourdan, F2, Schlosser, and seawater salt culture media. In the cultivation system with aeration, mixing was performed with air flow of 0.2 vvm, and in cultivation system with agitation of culture vessel, shaking was performed continiously at 150 rpm using a shaker. Temperature and lighting were kept constant in all cultures and at 26 ± 2ºC and 40 µE m-2s-1, respectively. *Spirulina* was grown in all cultures, reached to highest cell concentrations of 4.0 g L^{-1} by agitation system and 3.68 g L^{-1} by aeration system. In agitation, highest level of biomass production obtained in Zarrouk culture medium equal to 4.0 g L^{-1} wheares lowest level was obtained in seawater salt culture medium equal to 2.49 g L^{-1}. In aeration, the highest level of biomass production of 3.69 g L^{-1} was obtained in seawater salt culture medium wheares lowest of 2.3 g L^{-1} was obtained in F2 culture medium. The pH increased continuously up to 10.9 during cultivation in agitation system, but in the aeration system, the pH increase up to the 7th cultivation day and then stopped at 10.1. In the seawater salt culture medium, biomass production in the aeration system was higher than in the agitation of culture vessel. The finding of this study indicate that stress has high effects on *Spirulina* growth and biomass production, and by reducing the stress, the yield of *Spirulina* production can be increased for commercial purposes.

Key words: *Spirulina*, mixing, biomass production, cyanobacteria, culture medium