مجله علمی ـ پژوهشی زیست‌شناسی جانوری تجربی
سال هفتم، شماره دوم، پیاپی بیست و ششم، پاییز ۱۳۹۷ (۱۱۳-۱۰۵)

غنی‌سازی مواد غذایی جلبک کلرلا *Chlorella sorokiniana* (Shihira & R.W. Krauss)

آمنه جمشیدی[۱*]، محمدعلی ابراهیمی[۲]، طیبه رجبیان[۳]، غلامرضابخشی خانیکی[٤]، شهلا مظفری[٥]

۱. مربی گروه زیست‌شناسی، دانشگاه پیام نور، صندوق پستی ۳۶۹۷-۱۹۳۹۵، تهران، ایران.

۲. دانشیار گروه بیوتکنولوژی، دانشگاه پیام نور، صندوق پستی ۳۶۹۷-۱۹۳۹۵، تهران، ایران.

۳. دانشیار گروه زیست‌شناسی، دانشگاه شاهد، صندوق پستی ۳۳۱۹۱۱۸۶۵۱، تهران، ایران.

٤. استاد گروه کشاورزی، دانشگاه پیام نور، صندوق پستی ۳۶۹۷-۱۹۳۹۵، تهران، ایران.

۵. استادیار گروه شیمی، دانشگاه پیام نور، صندوق پستی ۳۶۹۷-۱۹۳۹۵، تهران، ایران.

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۲/۲۳ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۷/۸/۲۶)

چکیده

جلبک کلرلا (*Chlorella sorokiniana*) حاوی متابولیت‌های ارزشمندی مانند پروتئین‌ها، ترکیبات آنتی‌اکسیدان، لیپیدها، ویتامین‌ها و مواد معدنی است و به‌عنوان غذای جانوران ودارو مورد استفاده قرار می‌گیرد. به همین دلیل در پژوهش حاضر، اثر تغییر شرایط کشت، جهت تولید مکمل غذایی مغذی‌تر از جلبک برای تغذیه آبزیان بررسی شد. بدین منظور، جلبک‌ها در محیط کشت پایه بولد اصلاح‌شده Bold (BBM) کشت شد و به‌عنوان منبع کربن به آن۵ گرم در لیتر گلوکز افزوده شد. سپس اثر pH، افزودن تیامین پیروفسفات، تغییر مقدار نیترات و فسفات، افزودن مخمر و فقدان گلوکز، بر روی رشد و محتویات متابولیت‌های جلبک مورد بررسی قرار گرفت. بیشترین میزان افزایش رشد، محتوای آنتی‌اکسیدان‌ها، پروتئین وبرخی موادمعدنی در کشت‌های جلبکی، در محیط‌های کشت حاوی غلظت دو برابر نیترات و فسفات واجد تیامین پیروفسفات و بدون تیامین پیروفسفات به‌دست آمد. افزودن مخمر به شکل غیرمعنی‌داری سبب افزایش وزن خشک و کاهش آنتی‌اکسیدان‌ها شد. افزودن تیامین پیروفسفات به تنهایی و کاهش اندک اسیدیته اثر چندانی بر رشد و محتوای متابولیت‌ها در جلبک مورد مطالعه نداشت. فقدان گلوکز سبب کاهش چشمگیر رشد جلبک شد.

واژه‌های کلیدی: *Chlorella sorokiniana*، نیترات، فسفات، آنتی اکسیدان، پروتئین.

Food enrichment of *Chlorella sorokiniana* (Shihira & R.W. Krauss)

Ameneh Jamshidi[1*], Mohammad Ali Ebrahimi[2], Tayebeh Rajabian[3], Gholam Reza Bakhshikhaniki[4], Shahla Mozaffari[5]

1. Instructor, Department of Biology, Payame Noor University, P.O. Box 19395-3697, Tehran, Iran.
2. Assiocate Professor, Department of Agriculture, Payame Noor University, P.O. Box 19395-3697, Tehran, Iran.
3. Assiocate Professor, Department of Biology, Faculty of Basic Scienses, Shahed University, P.O. Box 331911865, Tehran, Iran.
4. Professor, Department of Agriculture, Payame Noor University, P.O. Box 19395-3697, Tehran, Iran.
5. Assistant Professor, Department of Chemistry, Payame Noor University, P.O. Box 19395-3697, Tehran, Iran.

(Received: May 13, 2017 - Accepted: Nov. 17, 2018)

Abstract

Chlorella sorokiniana contains valuable metabolites such as proteins, antioxidants, lipids, vitamins and minerals, and is used as a food for animals and medicine. Therefore, in the present study, the effect of some culture factors and conditions on nutrient supplementation of algal levels for aquaculture was investigated. For this purpose, algae were cultured in modified Bold Basal Media (BBM) and 0.5 gram of glucose was added as carbon source. Then, the effect of pH, addition of thiamine pyrophosphate, changes in nitrate and phosphate levels, addition of yeast and lack of glucose, were studied on growth and content of algal metabolites. The highest growth rate, antioxidant content, protein and some algal mineral content were obtained in medium containing twice the nitrate and phosphate with or without thiamine pyrophosphate. Adding yeast increased dry weight and decreased none significantly antioxidants. Adding thiamine pyrophosphate alone and low reduction of acidity did not significantly effect on growth and metabolites of alga. Lack of glucose significantly reduced alga growth.

Keywords: *Chlorella sorokiniana*, nitrate, phosphate, antioxidant, protein.

* نویسنده مسئول: E-mail: ameneh.jamshidi@gmail.com

مقدمه

جنس (*Chlorella*) از جلبک‌های بسیار مفیدی تشکیل شده است، که در زنجیره غذایی نقش دارند و علاوه بر مصرف غذایی و دارویی به‌عنوان غذای آرتمیا، روتیفر، سخت‌پوستان و ماهی‌ها مصرف می‌شوند (Khatun *et al*., 2014). ریزجلبک‌ها غنی از پروتئین، رنگیزه، کربوهیدرات، اسیدهای چرب (Renaud *et al*., 1991) و ویتامین ومواد معدنی هستند (Becker, 2007). پروتئین‌ها، کربوهیدرات‌ها و ترکیبات چرب موجود در جلبک می توانند به متان تبدیل شوند و باقیمانده مواد که غنی از پروتئین و کربوهیدرات می باشند می توانند به عنوان غذا در پرورش آبزیان مورد مصرف قرار گیرند (Zhu, 2015). رنگیزه‌های کلروفیل (Hsu *et al*., 2013) وکاروتنویید (Fiedor & Burda, 2014) موجود در جلبک‌ها خاصیت آنتی‌اکسیدانی دارند. به علاوه جلبک *C. sorokiniana* ضدسرطان نیز هست (Lin *et al*., 2017). به همین علت افزایش تولید جلبک و غنی کردن محتوای آنتی‌اکسیدان‌ها، پروتئین و مواد معدنی موجود در آن حائز اهمیت است. رشد فیتوپلانکتون‌ها به عوامل مختلفی مانند نور، دما، مواد غذایی، شوری و اسیدیته محیط بستگی دارد (Kobayashi *et al*., 2013). طبق گزارش رشد بهینه *C. vulgaris* در pH معادل ۷/۵، ۸ صورت می‌گیرد (Rachlin & Grossoand, 1991) Wang *et al*. (2010) نشان دادند که بیشترین رشد جلبک *C. vulgaris* در pH حدوداً برابر ۶/۵، ۷ صورت می‌گیرد. تغییرات دما (Krzemiñska *et al*., 2014; Sayegh & Montagenes, 2014) و تغییرمحیط کشت سبب تغییر ترکیبات شیمیایی جلبک‌ها می‌شود (Sharma *et al*., 2012). مواد غذایی به‌ویژه ترکیبات نیتروژنی و فسفری اثر زیادی بررشد وتولید پروتئین و رنگیزه‌ها در جلبک‌ها دارند (Ribeiro *et al*., 2013). نیتروژن یکی از مهمترین مواد غذایی است که بر رشد تأثیر می‌گذارد. محققان معتقدند که افزایش نیترات و فسفات رشد جلبک را افزایش می‌دهد (Fried *et al*., 2003). افزایش مواد نیتروژنی، خصوصاً اوره سبب افزایش بیوماس جلبک *C. Sorokiniana* گردید (Ramanna *et al*., 2014). در مطالعه‌ای نشان داده شد که رشد هتروتروف جلبک *C. sorokiniana* با افزودن گلوکزبه محیط کشت، ۱/۵ تا ۵ برابر بیشتر از رشد اتوتروف آن بود و محتوای لیپید جلبک در کشت هتروتروف بیشتر اتوتروف بود (Rosenberg *et al*., 2014). Hunt *et al*. (2010) اثر ۲۰ppm هومیک اسید، ۲۵۰ppm عصاره کلپ، ۵۰۰ppm متانول، ۳/۲ppm کلرید فریک، ۰/۰۹ppm پوترسین، ۱/۵ ppm اسپرمیدین، را بر روی رشد و مقدار کلروفیل جلبک *C. sorokiniana* بررسی کردند. نتایج نشان داد که عصاره کلپ ۴۴٪ رشد را کاهش داد، پوترسین و اسپرمیدین اثر معنی‌داری بر رشد نداشت و متانول و کلرید فریک و هومیک‌اسید سبب افزایش رشد شد. Mizuno *et al*. (2013) اثر محیط کشت بدون گوگرد را بر سه گونه کلرلا (*C. vulgaris*، *C. sorokiniana* و *C. lobophora*) آزمایش شد. نرخ رشد *C. sorokiniana* در محیط فاقد گوگرد نصف محیط کشت پایه بود. در حالی که پس از ۷ روز مقدار نشاسته در *C. sorokiniana* در محیط فاقد گوگرد ۲۱/۳٪ و در محیط پایه ۹٪ بود و پس از ۳ هفته محتوای لیپید در این جلبک نسبت به شاهد به ۲/۴ برابر رسید تیامین پیروفسفات به‌عنوان کوآنزیم، آنزیم‌های چرخه کربس و پنتوز فسفات عمل می‌کند. به‌همین دلیل افزودن این ماده به محیط کشت احتمالاً باعث سریع تر شدن چرخه‌های رشد جلبک خواهد شد. Mccaffrey *et al*. (2011) گزارش کردند که تیامین پیروفسفات همراه با هورمون‌ها سبب افزایش رشد جلبک کلرلا گردید. یکی دیگر از میکروارگانیسم‌هایی که به‌عنوان مکمل غذایی مورد استفاده قرار می‌گیرد، مخمر است. مخمر نانوایی (*Saccharomyces cerevisiae*) همراه با کلرلا

غذای مناسبی برای روتیفر است (Khatun *et al.*, 2014). کیفیت نور، انباشت لیپیدها را درکشت مخلوط کلرلا و مخمر نانوایی تغییر می‌دهد (Shu, 2012). با توجه به موارد ذکرشده، در این پژوهش اثر استفاده از کشت مخلوط جلبک با مخمر و تغییر غلظت نیتروزن و فسفات و افزودن موادی محرک رشد بر روی افزایش بیوماس جلبکی و محتویات آنتی‌اکسیدان‌ها و پروتئین و مواد معدنی مهم آن مورد بررسی قرار گرفت، تا بهترین شرایط برای تهیه غذای مغذی‌تر، آبزیان معرفی گردد.

مواد و روش‌ها

در این پژوهش نمونه‌های سلولی مورد مطالعه، جلبک *Chlorella sorokiniana* (IBRC-M 5008) و مخمر نانوایی *Saccharomyces cerevisiae* (IBRC-M300 M30069) از مرکز ذخایر ژنتیکی و بیولوژیکی ایران خریداری شد. مواد شیمیایی مورد استفاده در محیط کشت از شرکت مرک آلمان خریداری شد. جلبک‌ها در محیط کشت پایه بولد اصلاح‌شده Bold's (BBM) (Andersen, 2005) با اندکی تغییر (KH_2PO_4: ۰/۰۷۵ گرم در لیتر) کشت شد. pH محیط کشت‌ها با محلول سود ۱ نرمال به ۷ (به‌جز محیط ۵ با اسیدیته ۶/۸) رسانده شد. ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت در فلاسک‌های ۲۵۰میلی لیتری ریخته و سپس اتوکلاو شد. برای کشت نمونه‌ها، یک میلی‌لیتر سوسپانسیون جلبکی در فاز لگاریتمی (۱۲×۱۰^{۷} سلول یا ۰/۰۲ گرم) به ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت تلقیح شد. تعداد سلول‌های مخمر تلقیح‌شده نیز $۳/۱۶\times۱۰^{۷}$ سلول یا ۰/۰۰۷۱ گرم بود. فلاسک‌ها در اتاق کشت بر روی شیکر انکوباتور (GFL, 3031, Germany) با ۱۲۵ دور در دقیقه و دمای ۱±۲۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۷۲ ساعت قرار گرفتند. آزمایشات با ۴ تکرار انجام شد.

محیط کشت‌های استفاده شده عبارت بودند از:

۱) BBM واجد گلوکز و دو برابر نمک نیترات و فسفات (۰/۵ گرم در لیتر نیترات سدیم، ۰/۱۵ گرم در لیتر دی پتاسیم فسفات و ۰/۱۵ گرم در لیتر مونو پتاسیم فسفات)

۲) BBM واجد گلوکز و دو برابر نمک نیترات و فسفات (۰/۵ گرم در لیتر نیترات سدیم، ۰/۱۵ گرم در لیتر دی پتاسیم فسفات و ۰/۱۵ گرم در لیتر مونو پتاسیم فسفات) وتیامین پیروفسفات (۰/۵ میلی‌گرم در لیتر)

۳) BBM واجد گلوکز و مخمر

۴) BBM واجد گلوکز و تیامین پیروفسفات (۰/۵ میلی‌گرم در لیتر)

۵) BBM واجد گلوکز با pH = ۶/۸

۶) BBM فاقد گلوکز

۷) BBM واجدگلوکز (شاهد)

اندازه گیری رشد

تخمین وزن خشک

سنجش وزن خشک به روش Kong *et al.* (2013) با کمی تغییر، انجام پذیرفت. بدین منظور ۴۰ میلی‌لیتر سوسپانسیون جلبک در g ×۴۰۰۰ ده دقیقه سانتریفوژ شد. رسوب جلبکی با آب مقطر شستشو شد، دوباره در g× ۴۰۰۰ ده دقیقه سانتریفوژ شد. سپس رسوب جلبکی ۷۲ ساعت در دمای۴۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و سپس وزن خشک آن اندازه‌گیری گردید (Agrawal & Paridhavi, 2007).

شمارش تعداد سلول

شمارش سلول‌های جلبک توسط لام نئوبار صورت گرفت.

اندازه‌گیری پروتئین .

سنجش محتوای پروتئین به‌روش Kobayashi *et al.* (2013) انجام پذیرفت. بدین منظور سلول‌های جلبکی خشک‌شده، در هاون پودر شد. به ۵ میلی‌گرم از ماده خرد شده ۱میلی‌لیتر سود (۰/۵ نرمال) افزوده شد. نمونه ۱۰ دقیقه در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد

نگهداری شد و گاه‌گاهی به هم زده شد. در مرحله بعد پس از سرد شدن در دمای آزمایشگاه در g ×۲۰۰۰ سانتریفوژ شد و محلول رویی به لوله دیگری انتقال یافت و برای تعیین پروتئین به‌روش برادفورد مورد آزمایش قرار گرفت. منحنی استاندارد با سرم آلبومین گاوی ترسیم شد.

سنجش برخی آنتی‌اکسیدان‌ها (رنگیزه‌ها)

رنگیزه‌های فتوسنتزی آنتی‌اکسیدان‌های عمده جلبک را تشکیل می‌دهند. اندازه‌گیری رنگیزه‌ها به‌روش Hunt *et al.* (2010) با کمی تغییرصورت پذیرفت یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون جلبکی در g × ۴۰۰۰ سانتریفوژ شد و محلول رویی دور ریخته شد. قرص جلبکی به‌مدت ۴۸ ساعت فریزر شد. به سلول‌های جلبکی فریز شده متانول ۹۹/۹٪ افزوده شد تا آن‌ها کاملاً سفید شدند، سپس پس از سانتریفوژ آن در g×۲۰۰۰، جذب محلول متانولی سلول‌های جلبکی با اسپکتروفتومتر (Shimadzu, UV mini 1240) در طول موج‌های ۶۵۲/۴، ۶۶۵/۲ و ۴۷۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. محتوای رنگیزه‌ها با روش Wellburn (1994) و طبق معادلات زیر، محاسبه شد و برحسب میکروگرم در یک میلی‌لیتر سوسپانسیون جلبکی بیان گردید (Hunt *et al.*, 2010).

=کلروفیل a

(جذب در ۶۵۲/۴× ۹/۱۶) – (جذب در ۶۶۵/۲×۱۶/۷۲)

=کلروفیل b

(جذب در ۶۶۵/۲×۱۵/۲۸) – (جذب در ۶۵۲/۴ ×۳۴/۰۹)

= کاروتنویید

(کلروفیلb ×۱۰۴/۹۶)– (کلروفیل a ×۱/۶۳)–

(جذب در ۴۷۰×۱۰۰۰)

۲۲۱

سنجش مواد معدنی

اندازه‌گیری مواد معدنی با استفاده از ASTM-D 4698-92 (2013) صورت پذیرفت. بدین منظور مقدار معینی از نمونه‌های خشک‌شده خاکستر شد. خاکستر به ظرف ۱۰۰ میلی‌لیتری انتقال یافت. به هر نمونه ۱۰ میلی‌لیتر کلریدریک اسید ۶ نرمال افزوده شد. سپس در ۹۰ درجه سانتی‌گراد تا نزدیک خشک شدن حرارت داده شد. بعد ۱۰ میلی‌لیتر نیتریک اسید ۰/۱ مولار به نمونه افزوده شد و در دمای ۹۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد تا هضم کامل شود. سپس حجم به ۵۰ میلی‌لیتر رسانده شد و عناصر کلسیم، مس، پتاسیم، منیزیوم، فسفر و گوگرد با دستگاه ICP-1OES (Vista MPX) اندازه‌گیری شد.

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

محاسبات آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS (version13) با تجزیه واریانس یک‌طرفه (ANOVA) انجام شد. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن و معنی‌داری در سطح P≤۰/۰۵ تعیین شد.

نتایج

جلبک‌ها در محیط کشت فاقد گلوکز رشد بسیار کندی داشتند، به‌طوری‌که وزن خشک و تعداد سلول‌های آن به قدری کم بود که اندازه‌گیری محتوای آنتی‌اکسیدان‌ها و پروتئین آن پس از ۷۲ ساعت میسر نبود. در سایر محیط‌ها صفات مورد نظر اندازه‌گیری شد، آنالیز داده‌ها با استفاده از آزمون دانکن با معنی‌داری در سطح p≤۰/۰۵ نشان داد که در جلبک‌های رشدیافته در محیط کشت حاوی نیترات و فسفات دو برابر واجد و فاقد تیامین پیرو فسفات، وزن خشک، تعداد سلول‌ها در یک میلی‌لیتر محیط کشت، محتوای آنتی‌اکسیدان‌ها وپروتئین به‌طور معنی‌داری نسبت به شاهد افزایش یافت. در محیط کشت حاوی مخمر، وزن خشک و تعداد سلول‌ها نسبت به شاهد افزایش و محتوای آنتی‌اکسیدان‌ها و پروتئین، کاهش غیرمعنی‌داری نشان داد. تغییر اندک اسیدیته از ۷ به ۶/۸ و افزودن تیامین پیروفسفات تنها به محیط کشت اثر معنی‌داری بر روی رشد و محتوای متابولیت‌ها نداشت (جدول‌های ۱ و ۲).

جدول ۱. وزن خشک جلبک، تعداد سلول (۱میلی لیتر سوسپانسیون جلبک)، درصد پروتئین، پس از ۷۲ ساعت کشت

تیمار	وزن خشک (میلی‌گرم)	تعداد سلول $\times 10^{7}$ در یک میلی‌لیتر	درصد پروتئین
نیترات + فسفات + تیامین پیروفسفات	۹۰/۹۶^{a}	۲۰/۸۴^{a}	۱۷/۱۳^{a}
نیترات + فسفات	۸۸/۰۸^{ab}	۱۹/۹۲^{a}	۱۷/۰۴^{a}
مخمر	۷۸/۳^{abc}	۱۵/۴۷^{ab}	۱۱/۷^{b}
تیامین پیروفسفات	۷۸^{abc}	۱۱/۴۶^{b}	۱۰/۵۷^{b}
pH =۶/۸	۷۶/۵۶^{bc}	۱۱^{b}	۱۲/۹۵^{b}
BBM فاقد گلوکز	۰/۰۶^{d}	۰/۱۳^{c}	غیر قابل اندازه‌گیری
شاهد	۶۴/۹۵^{c}	۱۰/۹۸^{b}	۱۲/۶۸^{b}

میانگین‌هایی که در هر ستون و برای هر صفت دارای حروف مشابه می‌باشند براساس آزمون دانکن و $p\leq ۰/۰۵$ اختلاف معنی‌داری با یکدیگر ندارند.

جدول ۲. محتوای آنتی‌اکسیدان‌های موجود در ۱میلی‌لیتر سوسپانسیون جلبک پس از ۷۲ ساعت کشت

تیمار	کلروفیل a (میکروگرم در میلی‌لیتر)	کلروفیل b (میکروگرم در میلی‌لیتر)	کارتنویید (میکروگرم در میلی‌لیتر)
نیترات + فسفات + تیامین پیروفسفات	۲۱/۹۸^{a}	۱۰ /۹^{a}	۵/۶۹^{a}
نیترات + فسفات	۱۷/۶۸^{b}	۸/۹۳^{a}	۴/۱۴^{b}
مخمر	۲/۷^{c}	۱/۵^{b}	۱/۰۹^{c}
تیامین پیروفسفات	۴/۶۵^{c}	۳/۴۷^{b}	۱/۹۹^{c}
pH = ۶/۸	۴/۷۹^{c}	۳/۱۵^{b}	۲/۲۴^{c}
BBM فاقد گلوکز	غیرقابل اندازه‌گیری	غیرقابل اندازه‌گیری	غیرقابل اندازه‌گیری
شاهد	۴/۶۲^{c}	۲/۴۷^{b}	۲/۲۲^{c}

میانگین‌هایی که در هر ستون و برای هر صفت دارای حروف مشابه می‌باشند براساس آزمون دانکن و $p\leq ۰/۰۵$ اختلاف معنی‌داری با یکدیگر ندارند.

برای به‌دست آوردن بهترین مکمل غذایی، جلبک‌های محیط‌هایی که رشد بهتری داشتند مثل، محیط کشت‌های حاوی نیترات و فسفات دو برابر واجد و فاقد تیامین پیروفسفات و محیط کشت حاوی مخمر انتخاب شدند که از نظر وجود مواد معدنی نیز بررسی شوند تا در صورت غنی بودن مواد معدنی به عنوان مکمل غذایی معرفی شوند. بررسی محتوای مواد معدنی بر اساس آزمون دانکن و معنی‌داری در سطح $P\leq ۰/۰۵$ نشان داد، محتوای کلسیم جلبک‌ها در هیچ یک از محیط‌های کشت با یکدیگر تفاوت معنی‌داری نداشت، اما تفاوت‌های معنی‌داری در سایر مواد معدنی مشاهده شد. مثلا محتوای مس در سلول‌های کشت شده در محیط کشت حاوی مخمر ۱۲برابر شاهد، و در محیط واجد دو برابر نیترات و فسفات ۱۲/۳ برابر شاهد بود و افزایش معنی‌داری نشان داد. محتوای منیزیم نیز در محیط کشت حاوی مخمر به طور معنی داری کمتر از همه محیط‌های دیگر بود. محتوای پتاسیم در محیط حاوی دو برابر نیترات و فسفات همراه با تیامین پیروفسفات ۳/۷۹ برابر شاهد بود و نسبت به همه محیط‌ها افزایش معنی‌داری را نشان می‌داد. محتوای فسفر و گوگرد نیز در این محیط نسبت به شاهد به‌ترتیب افزایش معنی‌دار ۱/۱۱ و ۱/۸۶ برابری را نشان می‌داد. محتوای گوگرد در محیط حاوی دو برابر نیترات و فسفات نیزنسبت شاهد افزایش معنی‌دار ۲/۳ برابر را نشان می‌داد (جدول ۳).

جدول۳. آنالیز کمی محتویات مواد معدنی موجود در جلبک‌های رشدیافته در تیمارهای مختلف

مواد معدنی / تیمار	کلسیم (ppm)	مس (ppm)	پتاسیم (ppm)	منیزیوم (ppm)	فسفر (ppm)	گوگرد (ppm)
نیترات + فسفات + تیامین پیروفسفات	۱۱۴۴/۴ ^{a}	۳۱۲/۲^{b}	۱۲۷۴۰^{a}	۱۷۲۲/۹^{a}	۹۳۳۶^{a}	۹۱۴/۸^{a}
نیترات + فسفات	۹۱۵/۷^{a}	۳۳۳۱^{a}	۷۸۱۳^{b}	۱۴۴۶/۶^{a}	۸۸۲۰/۷^{ab}	۱۱۵۹/۹^{a}
مخمر	۱۱۴۱/۸^{a}	۳۲۴۹/۱^{a}	۴۶۹۰^{b}	۹۶۳/۸^{b}	۶۹۲۴/۱^{c}	۲۳۱/۵^{b}
شاهد	۱۰۵۷/۸^{a}	۲۶۸/۸^{b}	۳۳۶۱^{b}	۱۶۸۷/۹^{a}	۸۳۵۲/۳^{b}	۴۸۹/۵^{b}

میانگین‌هایی که در هر ستون و برای هر صفت دارای حروف مشابه می‌باشند براساس آزمون دانکن و ۰/۰۵≥p اختلاف معنی‌داری با یکدیگر ندارند.

بحث و نتیجه‌گیری

نتایجی که از پژوهش حاضر به‌دست آمد، نشان داد که فقدان گلوکز سبب کاهش شدید رشد می‌شود، که با نظر محققین مطابقت دارد. گزارشات نشان می‌دهد، افزودن گلوکز به محیط کشت کلرلا سبب تحریک رشد جلبک در ۳۶ ساعت اولیه گردید (Shugarman & Appleman, 1996). افزودن ۳ گرم در لیتر گلوکز به محیط کشت جلبک *Neochloris oleoabundans* به‌عنوان تنها منبع کربن سبب افزایش رشد جلبک گردید (Morales-Sánchez *et al*., 2013). در موردی گزارش‌شده که در محیط حاوی گلوکز، هورمون‌های اکسینی بیشتری در جلبک *C. minutissima* مشاهده می شود که سبب رشد بیشتر جلبک می‌گردد (Stirk *et al*., 2014). در محیط کشت حاوی دو برابر نیترات و فسفات به تنهایی و واجد تیامین پیروفسفات، همه پارامترهای رشد افزایش یافت، که با نظر محققین مطابقت دارد. نیتروژن و فسفر هر دو در ساختار ماکرومولکول‌های آلی مثل پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک شرکت می‌کنند. افزایش آن‌ها سبب افزایش رشد می‌گردد (Fried *et al*., 2003). در این شرایط نیترات و فسفات به‌شکل‌پروتئین و رنگیزه‌های فتوسنتزی درمی‌آیند (Ribeiro *et al*., 2013) و سبب افزایش معنی‌دار این مواد می‌گردند. افزایش رنگیزه‌های فتوسنتزی هم، سبب افزایش فتوسنتز و رشد می‌گردد. محققین نشان دادند که افزایش نیترات پتاسیم از ۰/۰۵–۰/۴گرم در لیتر سبب افزایش رشد جلبک *C. pyrenoidosa* شد (Nigam *et al*., 2011). در پژوهش کنونی افزایش نیترات و فسفات توام با تیامین پیروفسفات نیز سبب افزایش رشد گردید. محققین نیز از این ویتامین همراه با هورمون‌ها استفاده کردند و سبب رشد بیشتر جلبک کلرلا شدند (Mccaffrey *et al*., 2011). البته کاربرد تنهای این ماده افزایش معنی‌داری ایجاد نمی‌کند که این نشان می‌دهد در صورت کمبود مواد اصلی سازنده ماکرومولکول‌ها، وجود فراوان کوآنزیم کم‌اثر یا بی‌اثر است. کاهش اسیدیته از ۷ به ۶/۸ اثر معنی‌داری بر رشد و محتوای متابولیت‌های جلبک نداشت. این نشان می‌دهد که کاهش یا افزایش جزئی اسیدیته در این بازه اثری بر رشد ندارد. محققین نیز گزارش کردند که بهترین اسیدیته برای رشد *C. vulgaris* ۶/۵ و ۷ (Wang *et al*., 2010) و ۷/۵ و ۸ است (Rachlin & Grosso, 1991). در محیط حاوی مخمر و جلبک رشد (وزن خشک و تعداد سلول) افزایش یافت ولی محتوای رنگیزه‌ها کاهش یافت اما هیچ‌یک معنی‌دار نیست. این نشان می‌دهد مخمر در این محیط رشد می‌کند و تعداد سلول‌ها و وزن خشک بیشتر می‌شود ولی چون فاقد رنگیزه‌های فتوسنتزی است، رنگیزه‌ها کاهش می‌یابد و چون می‌توان در این محیط مخمر را هم کشت داد از این کشت مخلوط می‌توان برای تغذیه آبزیان (Khatun *et al*., 2014) استفاده کرد. محتویات مواد معدنی جلبک نیز در محیط‌های مختلف تغییر کرد، که دلیل آن تغییر رشد و متابولیسم جلبک در محیط‌های متفاوت است. مثلاً افزایش مس در کشت مخلوط

جلبک و مخمر به این سبب است که، مس در مخمر با ترکیبات مختلفی متصل می‌شود در اتصال با ترکیب گلوتاتیون- گلوتاتیون، ترکیبات مشابه متالوتیونین و آنزیم‌هایی مثل سیتوکروم اکسیداز که سبب افزایش ذخیره مس در مخمر می‌گردد (Presta & Stillman, 1997). ولی مقادیر موادی مثل منیزیوم (۹۰۰-۸۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم مخمر) (Stirk *et al*., 2014)، فسفر (۴۱۲۰ میلی‌گرم در کیلوگرم مخمر) (Watanabe *et al*., 2008) در مخمر کمتر از جلبک است به همین علت در کشت مخلوط مخمر و جلبک مقادیر این مواد کمتر از کشت خالص جلبک است. در محیط کشت واجد دو برابر نیترات و فسفات جلبک‌ها به‌طور معنی‌داری مقادیر بیشتری گوگرد و مس را جذب کردند و حاوی مقادیر بیشتری از این عناصر هستند. در محیط کشت دو برابر نیترات و فسفات واجد تیامن پیروفسفات نیز جلبک‌ها دارای مقادیر بیشتر معنی‌دار، گوگرد، فسفات و پتاسیم هستند. چون رشد بیشتر این جلبک‌ها سبب جذب بیشتر مواد معدنی شده است، در نتیجه میزان مواد معدنی در آن‌ها افزایش یافته است. گزارشات محققین نیز تاییدکننده این نتایج است. طبق گزارش Mandalam & Palsson (1998) نیتروژن وفسفر مواد محدودکننده رشد می‌باشند چون این عناصر تشکیل‌دهنده درصد بالایی از ترکیبات سلولی بوده و در صورتی‌که عناصر دیگر در سطح متوسطی تشکیل دهنده‌ی این ترکیبات هستند. Ruiz *et al*. (2011) نیز گزارش کردند که افزودن فسفات و ترکیبات نیتروژنی (آمونیمی و نیتراتی) سبب رشد بیشتر جلبک *C. vulgaris* و کاهش مواد معدنی و آلی محیط گردید. محقق دیگر گزارش کرد که افزایش نیترات و فسفات رشد جلبک را افزایش داد (Hoffmann, 1998). افزایش مواد نیتروژنی، خصوصاً اوره اثر افزایشی بر روی بیوماس جلبک *C. Sorokiniana* داشت (Ramanna *et al*., 2014).

افزایش نیترات و فسفات وتیامین پیروفسفات سبب تولید جلبک مغذی‌تری شد. محیط کشت واجد دو برابر نیترات و فسفات توام با تیامن پیروفسفات مناسب‌ترین محیط برای کشت *C. Sorokiniana* بود، چون در این محیط، وزن خشک، محتوای آنتی‌اکسیدان‌ها، پروتئین و برخی مواد معدنی جلبک، به‌طور معنی‌داری نسبت به شاهد افزایش یافت و سبب مغذی‌تر شدن آن گردید، این جلبک برای تغذیه آبزیان مناسب‌تر است. پس از آن جلبک‌های رشد یافته در محیط کشت واجد دو برابر نیترات و فسفات مناسب است. کشت توام مخمر و جلبک هم قابل انجام است ولی به‌علت کاهش آنتی‌اکسیدان‌ها وبرخی مواد معدنی، بهتر است جلبک و مخمر به‌طور جداگانه کشت شوند و بعد برای استفاده در تغذیه آبزیان، به‌طور مخلوط با هم به‌کار روند.

سپاسگزاری

از آقای مهندس نیستانی که در اندازه‌گیری مواد معدنی جلبک‌ها، مساعدت نمودند، تشکر و قدردانی می‌گردد.

REFERNCES

Andersen, R.A.; (2005). Algal culturing techniques. Elsevier Inc, 589.

Agrawal, S.S.; Paridhavi, M.; (2007). Herbal Drug Technology. Hydrabad, Universities Press; 519-530.

ASTM-D 4698-92, (Standard Practice for Total Digestion of Sediment Samples for Chemical Analysis of Various Metals), (2013). AGA; 5.

Becker, E.W.; (2007). Micro-algae as a source of protein. Biotechnology Advances; 25(2): 207-10.

Chu W., Zhengquan W., Hailong, S.; Shenglei G.; (2006). Effects of different concentrations of nitrogen and phosphorus on chlorophyll biosynthesis, chlorophylla fluoresence, and photos- ynthesis in *Larix olgensis*

seedlings. Frontiers of Forestry in China; 1(2): 170-175

Fiedor, J.; Burda K.; (2014).Potential role of carotenoids as antioxidants in human health and disease. Nutrients; 6(2): 466-488.

Fried, S.; Mackie, B.; Nothwehr, E.; (2003). Nitrate and phosphate levels positively affect the growth of algae species found in Perry Pond. Tillers; 4, 21-24.

Hoffmann, JP.; (1998). Wastewater treatm ent with suspended and nonsuspended algae. Journal of Phycology; 34(5): 757-763.

Hsu, Ch.Y.; Chao, P.Y.; Hu, Sh.P.; Yang, Ch.M.; (2013). The antioxidant and free radical scavenging activities of chlorophylls and pheophytins. Food and Nutrition Sciences; 4(8): 1-8.

Hunt, R.W.; Chinnasamy, S.; Bhatnagar, A.; Das, K.C.; (2010). Effect of biochemical stimulants on biomass productivity and metabolite content of the microalga, *Chlorella sorokiniana*. Applied Biochemistry and Biotechnology; 162 (8): 2400-2414

Khatun, B.; Rahman, R.; Rahman, M. S.; (2014). Evaluation of Yeast*Saccharomyces cerevisiae* and Algae, *Chlorella vulgaris* as Diet for Rotifer Brachionus calyciflorus. The Agriculturists; 12(1): 1-9.

Kobayashi, N.; Noel, E.; Barnes, A.; Watson, A.; Rosenberg, J.; Erickson, G.; Oyler, G.; (2013). Characterization on three *Chlorella sorokiniana* strains in anaerobic digested effluent from cattle manure. Bioresource Technology; 150: 377-386.

Kong, W.B.; Yang, H.; Cao, Y.T.; Song, H.; Hua, S.F.; Xia, C.G.; (2013) Effect of Glycerol and Glucose on the Enhancement of biomass, lipid and soluble carbohydrate production by *Chlorella vulgaris* in mixotrophic culture, Food Technology and Biotechnology; 51(1): 62-69.

Krzemińska, I.; Pawlik-Skowrońska, B.; Trzciñska, M.; Tys, J.; (2014). Influence of photoperiods on the growth rate and biomass productivity of green microalgae. Bioprocess and Biosystems Engineering; 37(4), 735-741.

Lin, P.Y.; Tsai, Ch.T.; Chuang, W.L.; Chao, Y.H.; Pan, I.H.; Chen, Y.K.; Lin, Ch.Ch.; Wang, B.Y.; (2017). *Chlorella sorokiniana* induces mitochondrial mediated apoptosis in human non-small cell lung cancer cells and inhibits xenograft tumor growth invivo. BMC Complementary and Alternative Medicine**;** 17: 88-108.

Mccaffrey, W.; Burrell, R.; Burrell, M.; Kotelko, B.; (2011). Use of plant growth regulators to enhance algae growth. EP2387304A1.

Mizuno, Y.; Sato, A.; Watanabe, K.; Hirata, A.; Takeshita, T.; Ota, S.; Sato, N.; Zachleder, V.; Tsuzuki, M.; Kawano, S.; (2013). Sequential accumulation of starch and lipid induced by sulfur deficiency in chlorella and parachlorella species. Bioresource Technology; 129: 150-155.

Morales-Sánchez; D., Tinoco-Valencia, R.; Kyndt, J.; Martinez, A.; (2013). Heterotrophic growth of *Neochloris oleoabundans* using glucose as a carbon source, Biotechnology for Biofuels; 6: 100-112.

Nigam, S.; Prakash Rai, M.; Sharma, R.; (2011). Effect of Nitrogen on Growth and Lipid Content of *Chlorella pyrenoidosa*, American Journal of Biochemistry and Biotechnology; 7(3): 124-129.

Pagnanelli, F.; Altimari, P.; Franco, T.; Toro, L.; (2011). Mixotrophic growth of *Chlorella vulgaris* and *Nannochloropsi s oculata*: Interaction between glucose and nitrate. Journal of Chemical Technology & Biotechnology; 89(5): 652-661.

Presta, A.; Stillman, M.J.; (1997). Incorporation of copper into the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Identification of Cu (I)-metallothionein in intact yeast cells. Journal of inorganic biochemistry; 66(4): 231-240.

Rachlin, J.W.L.; Grosso, A.; (1991). The effects of pH on the growth of *Chlorella vulgaris* and its interactions with cadmium toxicity. Archives of Enviromental Contamination Toxicology; 20 (4): 505-8.

Ramanna, L.; Guldhe, A.; Rawat, I.; Bux F.; (2014). The optimization of biomass and lipid yields of *Chlorella sorokiniana* when using wastewater supplemented with different nitrogen sources, Bioresource Technology; 168: 127-135.

Renaud, S.M.; Parry, D.L.; Luong-Van, T.; Kuo, C.; Padovan, A.; Sammy, N.; (1991). Effect of light intensity on the proximate biochemical and fatty acid composition of *Isochrysis sp.* and *Nannochloropsis oculata* for use in tropical aquaculture. Journal of Applied Phycology; 3(1): 43-53.

Ribeiro, A.; Tesima, K.; Souza, J.; Yokoya, N.; (2013). Effects of nitrogen and phosphorus availabilities on growth, pigment, and protein contents in *Hypnea cervicornis* J. Agardh (Gigartinales, Rhodophyta). Journal of Applied Phycology; 25(4): 1151-1157.

Rosenberg, J.N.; Kobayashi, N.; Barnes, A.; Noel, E.A.; Betenbaugh, M.J.; Oyler, G.A.; (2014). Comparative Analyses of three *Chlorella* species in response to light and sugar. Plos One; 9(4): 1-13.

Ruiz, J.; Alvarez, P.; Arbib, Z.; Garrido, C.; Barrag´an, J.; Perales, J.A.; (2011). Effect nitrogen and phosphorus concentration on their removal kinetic treated urban wastewater by *chlorella vulgaris*, International Journal of Phytoremediation; 13(9): 884-96.

Sayegh, F.A.Q.; Montagenes, D.J.S.; (2011). Temperature shifts induse intraspecific variation in microalgae production and biochemical composition. Bioresource Technology; 102(3): 3007-3013.

Sharma, R.; Singh, G.P.; Sharma, V.K.; (2012). Effects of Culture Conditions on Growth and Biochemical Profile of *Chlorella Vulgaris*. Journal of Plant Pathology and Microbiology; 3(5) 1000131-5.

Shu, Ch.H.; (2012). Light quality on the accumulation of oil in a mixed culture of *Chlorella* sp. and *Saccharomyces cerevisiae.* Journal of Chemical Technology& Biotechnology; 87(5): 601-607.

Shugarman, P.M.; Appleman, D.; (1996). .Chlorophyll Synthesis in *Chlorella* II. Effect of Glucose and Light Intensity on the Lag Phase, Plant Physiology; 41(10): 1701-1708.

Singh, S.K.; Bansal, A.; Jha, M.K.; Jain, R.; (2013)., Production of biodiesel from wastewater grown *Chlorella minutissima*. Indian Journal of Chemical Technology; 20: 341-345.

Stirk, W.A.; Bálint, P.; Tarkowská, D.; Novák, O.; Maróti, G.; Ljung, K.; Turečková, V.; Strand, M.; Ordög, V.; Staden, J.; (2014). Effect of light on growth and endogenous hormones in *Chlorella minutissima* (Trebouxiophyceae). Plant Physiology and Biochemistry; 79: 66-76.

Watanabe, T.; Ozaki, N.; Iwashita, K.; Fujii, T.; Iefuji, H.; (2008). Breeding of wastewater treatment yeasts that accumulate high concentrations of phosphorus**,** Applied Microbiology and Biotechnology; 80(2): 331-338.

Wang, C.; Li, H.; Wang, Q.; Wei, P.; (2010). Effect of pH on growth and lipid content of *Chlorella vulgaris* cultured in biogas slurry. Sheng Wu Gong Cheng Xu. Bao; 26 (8): 1074-9

Wellburn, A.R.; (1994). The spectral determination chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. Journal of Plant Physiology; 144: 307-313.

Zachariadis, G.A.; Raidou, E.S.; Themelis, D.G.; Stratis, J.A.; (2002). Determination of mineral content of active dry yeast used in pharmaceutical formulations; Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis; 28(3-4): 463-473.

Zhu, L.; (2015). Biorefinery as a promisin g approach to promote microalgae industry: An innovative framework. Renewable and Sustainable Energy Reviews; 41: 1376-1384.