✓ پژوهش و سازندگی، شماره ۴۳، تابستان ۱۳۷۸

جداسازی و شناسایی

Spirulina maxima

از دریای خزر وارزیابی میزان پروتئین آن

● **فرزانه فراهانی**، دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی - دانشگاه تربیت مدرس ● **مهناز مظاهری اسدی**، پژوهشکده بیوتکنولوژی، سازمان پژوهشهای علمی و صنعتی ایران
● **مهران کیانی‌راد**، پژوهشکده بیوتکنولوژی، سازمان پژوهشهای علمی و صنعتی ایران ● **ندا سلطانی**، جهاد دانشگاهی - دانشگاه شهید بهشتی

تاریخ دریافت: اردیبهشت ماه ۱۳۷۸

چکیده

اسپیرولینا یک سیانوباکتر چند سلولی و رشته‌ای سبز - آبی است که به عنوان منبع غنی پروتئین در کشورهای آمریکایی و آفریقایی مورد استفاده قرار می‌گیرد. رشته‌های سبز - آبی متشکل از سلولهای استوانه‌ای غیر منشعب و به شکل مارپیچ می‌باشد. این رشته‌ها دارای حرکت لغزشی در راستای محور طولی خود بوده و فاقد هتروسیست هستند و ساکن نواحی کم عمق و قلیایی دریاچه‌ها می‌باشد. دریای خزر از نظر شوری جزء دریاچه‌های لب شور می‌باشد و در حال حاضر بیش از ۵۰۰ گونه Sea weed و گیاه در آن دیده شده است ولی در مورد سیانوباکترهای آن اطلاعات چندانی در دسترس نیست. جهت نمونه‌برداری از این دریاچه از ظروف شیشه‌ای مخصوص نمونه‌برداری (دو درب‌دار) و ظروف پلاستیکی استفاده شده است. نمونه‌برداری از این دریاچه در مناطقی که آب ساکن و خزه‌ها رشد زیادی نموده‌اند و ضمناً رنگ سبز - آبی یا لجنی است صورت پذیرفت. بین سیانوباکتریهای جداسازی شده *Spirulina maxima* گونهٔ غالب بوده است. این سیانوباکتر دارای قطر مارپیچی به اندازهٔ ۶۰-۵۰ میکرون و قطر پیچی حدود ۸۰ میکرون و ابعاد سلولهایش ۴ تا ۶ میکرون است. این سیانوباکتر اولین بار در سواحل دریای خزر در استان مازندران شناسایی شد، ضمناً کشت و سنجش پروتئین آن نیز مورد بررسی قرار گرفت.

✓ **Pajouhesh & Sazandegi, No 43 PP: 66-69**

Isolation and identification of *Spirulina maxima* from Caspian Sea and evaluation of its protein content.

By: Farahani F., Faculty of Natural Resources & Marine Science University of Tarbiat Modarres Tehran-Iran; Mazaheri-Asadi M. and Kiani-Rad M.; Biotechnology Center, Iranian Research Organisation for Science & Technology Tehran-Iran; Soltani N.; Jahade Daneshgahi University of Shahid Beheshti. Tehran-Iran

Spirulina, an unicellular filamentous blue - green algae has been consumed by man since ancient times in Mexico and central Africa. Different Species of spirulina have a world wide distribution. In low depth and alkaline waters of Caspian Sea (brackish waters). These organisms isolated of Caspian sea for first time. We used glass or plastic dishes for Sampling (A ccording to standard method). These acid washed dishes were used at the muscoid and mud regions of water. Many species of filamentous form morphology with organized of cylindrical, un branched and helical form cells were isolated. This trichome has gliding motatity along the outer surface of the helix. It has'nt got heterocyst. Out of the isolated species, *Spirulina maxima* Showed better activity. It has 50-60 micron of diameter, 80 micron of Helical diameter and 4-6 micron the dimension of cells. The protein content of *S. maxima* was estimated tobe %53-60 (dry weight) at the end of five days of growth.

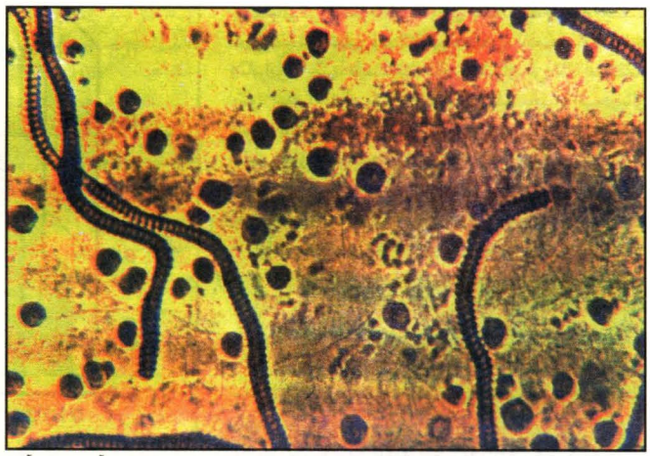
جدول شماره ۱ ـ محیط کشت اختصاصی *S. maxima* جداسازی شده از دریای خزر را نشان می‌دهد

1 - Sea water		100 ml
2 - $NaNO_3$		0.01 gr/100
3 - K_2HPO_4		0.05 gr/100
4 - Trace elemet A ($1 ml L^{-1}$)	H_3BO_3	$2.86 gl^{-1}$
	$Mncl_2.4H_2O$	$1.8 gl^{-1}$
	$ZnSO_4.7H_2O$	$0.22 gl^{-1}$
	MOO_3	$0.01 gl^{-1}$
	$CuSO_4.5H_2O$	0.08
5 - Trace element B ($1 mL L^{-1}$)	NH_4VO_3	$22.96 (mgL^{-1})$
	$NiSO_4.7H_2O$	$47.85 (mgL^{-1})$
	Na_2WO_4	$18 (mgL^{-1})$
	$Te_2 (SO_4)_3$	$40 (mgL^{-1})$

جدول شماره ۲ ـ مشخصات فیزیکی و شیمیایی مناطق نمونه‌برداری شده در سواحل دریای خزر

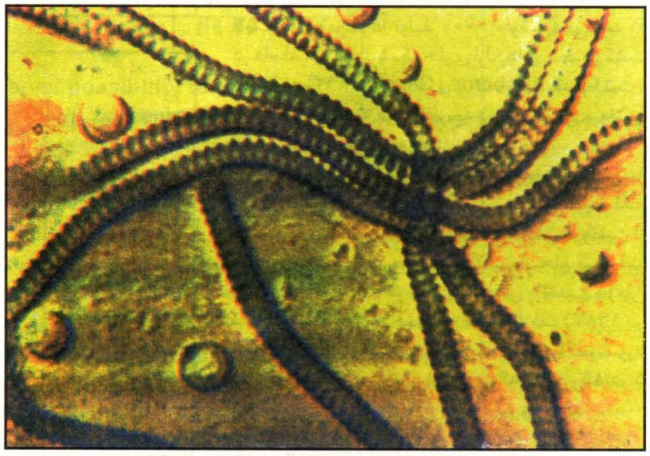
دفعات نمونه‌برداری	زمان نمونه‌برداری	دمای آب	pH
اولین نمونه‌برداری	۷۶/۸/۳۰	۲۲ c°	۷/۳
دومین نمونه‌برداری	۷۷/۵/۱۵	۲۷ c°	۸
سومین نمونه‌برداری	۷۷/۵/۶	۲۶ c°	۷/۷

مراحل مختلف خالص سازی *Spirulina maxima*

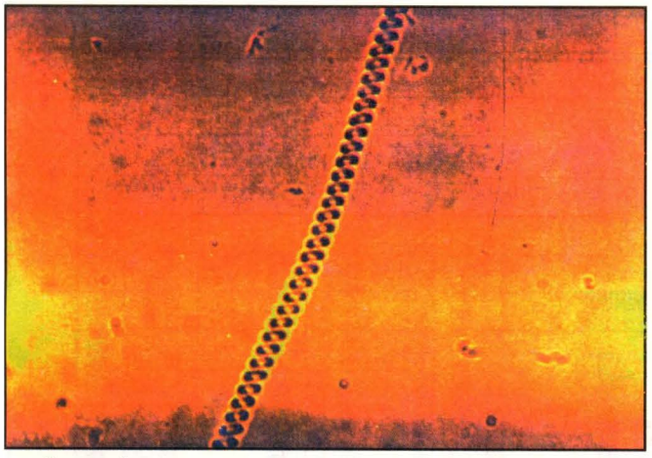


شکل ۱- رشد *S. maxima* همراه با سیانوباکترهای کروکوکال در محیط کشت آب دریا + آگار

شکل ۳- رشد اسپیرولینا تقریباً خالص بر روی آب دریا + آگار



شکل ۲- رشد اسپیرولینای نیمه خالص بر روی آب دریا + آگار



شکل ۴- رشداسپیرولینای خالص پس‌ازمراحل فیلتراسیون وشستشوبرروی آب دریا + آگار

مقدمه

دریاچهٔ خزر از بزرگترین دریاچه‌های دنیا و از بقایای دریای Tes Tis می‌باشد. وسعت این گسترهٔ عظیم آبی ۳۷۸۴۰۰ کیلومتر مربع و ژرفای آن در حوضهٔ شمالی بسیار کم حداکثر تا ۲۵ متر ولی در حوضهٔ جنوبی ۱۰۰۰-۹۶۰ متر می‌رسد که متوسط آن ۳۲۵ متر می‌باشد (پرویز کردوانی، ۱۳۷۴).

این دریاچه توسط رودخانه‌های متعدد تغذیه می‌شود از این رو آب این دریاچه حاوی ترکیبات شیمیایی مخصوص به خود و متفاوت با ترکیبات آب دیگر دریاها و دریاچه‌ها می‌باشد و به دلیل دارا بودن نمک سولفات سدیم جزء آبهای تلخ به شمار می‌رود.

با توجه به خصوصیات ویژه این سیانوباکترها می‌توان از آنها فرآورده‌های مختلفی از جمله پروتئین تک یاخته، رنگها، افزودنیها، داروهای ضد سرطانی، ضد ویروس و... تهیه کرد هم اکنون در آمریکا، از اسپیرولینا جهت تغذیه انسان و آبزیان استفاده می‌شود (Tiboni, ۱۹۸۵ و Orio).

در گذشته روی فلور جلبکی این دریاچه کار چندانی انجام نشده است. در بررسیهایی که اخیراً توسط گروهی از پژوهشگران سازمان پژوهشهای علمی - صنعتی ایران انجام گرفت (مظاهری و همکاران، ۱۳۷۷ -گزارش انتشار نیافته -) برای اولین بار این گونهٔ خاص از سیانوباکتر[1] از دریاچهٔ خزر استخراج، خالص‌سازی و کشت داده شد. لازم به یادآوری است که گونه‌های دیگر از اسپیرولینا نیز شناسایی شده‌اند ولی گونهٔ غالب این گونهٔ خاص بوده است و ما مطالعات را روی آن معطوف نمودیم. قابل ذکر است که ۱۲ نوع محیط کشت مختلف برای جداسازی این گونه از سیانوباکتر مورد استفاده قرار گرفت.

روش کار

سواحل دریاچه خزر در استان مازندران به عنوان جمع‌آوری نمونه‌ها، انتخاب گردید، نمونه برداریها در ماههای مرداد، شهریور و آبان (۷۷-۷۶) انجام گرفت (در ماههای مذکور احتمال حضور این گونه جلبک بیش از ماههای دیگر سال است). عمل نمونه‌برداری در ده نقطه از سواحل مازندران توسط شیشه‌های نمونه‌برداری (دو درب‌دار) و ظروف پلاستیکی طبق روش استاندارد انجام (American standard of water and wastewater treatment. 1975) پذیرفت.

نمونه‌ها پس از جمع‌آوری (در ظروفی که درب‌های آن نیمه‌باز است) به تهران منتقل و محتویات هر شیشه به داخل ارلن خاصی (از لحاظ حجمی) ریخته و در اتاق کشت بر روی شیکر با دور خاص قرار گرفت. سپس حجم مشخصی از نمونه‌ها راگرفته و در دور خاص و مدت زمان معینی سانتریفوژ نموده و قطره‌ای از نمونه را بر روی لام در زیر میکروسکوپ قرار داده و مورد شناسایی قرار گرفت. نمونه بعد از شناسایی، جهت جداسازی از سایر ارگانیسمها و خالص‌سازی از روشهای مختلفی استفاده گردید که عبارتند از: رقیق کردن، پلیت آگار، پی‌پت ساستور دارای لوله موئین. در این تحقیق از روش پلیت آگار و کشت خطی آن را بر روی محیط کشت آگاردار استفاده گردید (Tiboni, ۱۹۸۵ و Orio). البته باید یادآوری نمود که مهمترین قسمت در این تحقیق، پیدا کردن محیط کشت مناسب برای این گونه می‌باشد لذا زمان طولانی از تحقیق صرف پیدا کردن محیط کشت مناسب و کشت دادن و به دنبال آن خالص کردن نمونه از سایر سیانوباکترها صرف شده است بیش از ۱۲ نوع محیط کشت در شرایط مختلف استفاده و بالاخره بهترین محیط کشت جهت تکثیر آن انتخاب شده است. (جدول شماره ۱) (Terai, ۱۹۷۰ و OGawa)بعد از

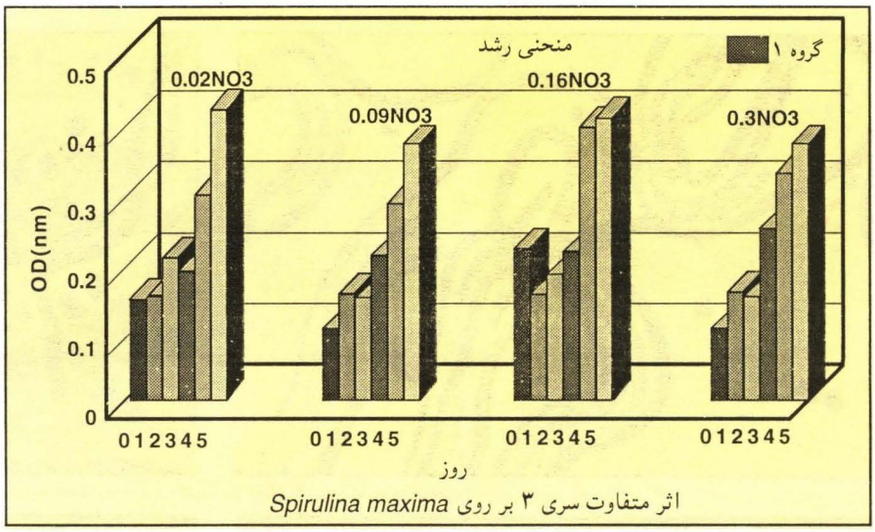
کشت دادن نمونه به طور خطی بر روی محیط آگاردار و به دنبال آن پاساژ دادن از روی یک پلیت بر روی پلیت دیگر تا دستیابی به کلونی خالص، ادامه یافته است بنابراین نه تنها باید برای خالص سازی آن UV استفاده شود بلکه فیلتراسیون و چندین بار نیز باید با آب دریای استریل در محیط کشت مناسب شستشو داده شود. دمای مورد استفاده معمولاً ۳۰ درجه است و برای رشد معمولا از ۱۴ ساعت نور و ۱۰ ساعت تاریکی به مدت ۳ تا ۴ هفته استفاده شد تا رشد آنها کامل گردد (Suresh و Ramamurthy, ۱۹۹۲).

البته لازم به ذکر است که کشت‌ها معمولاً همزیست با باکتریها می‌باشند، بنابراین بیش از ۹ ماه وقت صرف خالص‌سازی این گونه دریاچه خزر گردید. استفاده از کاغذهای فیلتراسیون واتمن ۴۱ و چندین بار شستشو با محیط کشت مناسب و همچنین استفاده از UV عمل خالص‌سازی صورت پذیرفت. سپس کلنی‌های خالص به محیط کشت مایع تلقیح شد و به اتاقک جلبک منتقل گردید. این اتاقک شامل ۳ لامپ فلورسنت باضافه ۲ لامپ گازی (مجموعاً تولید ۱۰۰۰۰ لوکس) می‌باشد که در فاصلهٔ معینی از شیکر حاوی ارلن‌های محیط کشت قرار دارند (Geider, ۱۹۹۲ و Osborne). بعد از کشت و خالص کردن نمونه مورد نظر، به بررسی میزان پروتئین این سیانوباکتر پرداخته شد.

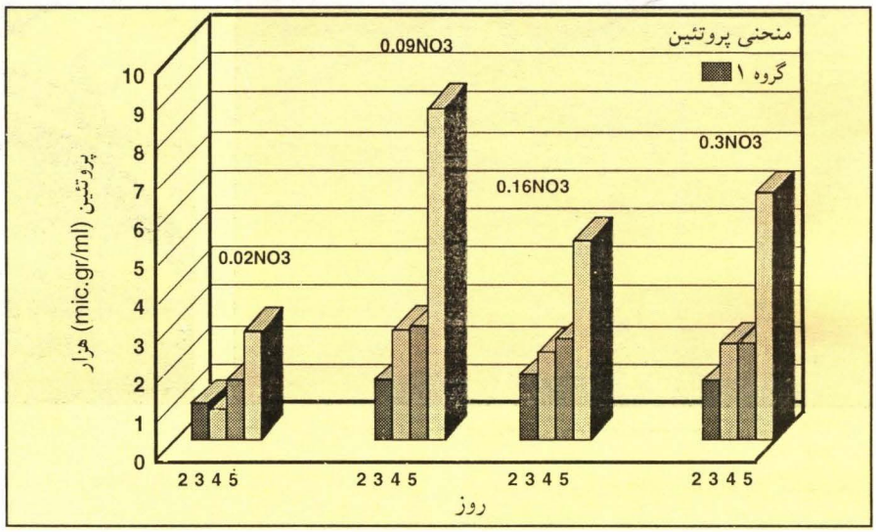
البته سنجش میزان پروتئین سیانوباکتر با تغییر یکی از فاکتورهای محیط کشت (نیترات) و ثابت نگه داشتن بقیه فاکتورها بررسی شد و سنجش پروتئین از روز دوم بعد از تلقیح محیط کشت انجام پذیرفت (Fritsch, ۱۹۴۵) و در ضمن، سنجش پروتئین و زمان مضاعف شدن به طور همزمان صورت گرفت (۱۹۸۷ بر Kaushik,) و نیز اثر pH روی رشد سیانوباکتر مورد بررسی قرار گرفت. لازم به ذکر است که میزان رشد در ۵ روز متوالی کشت سیانوباکتر، اندازه‌گیری گردید.

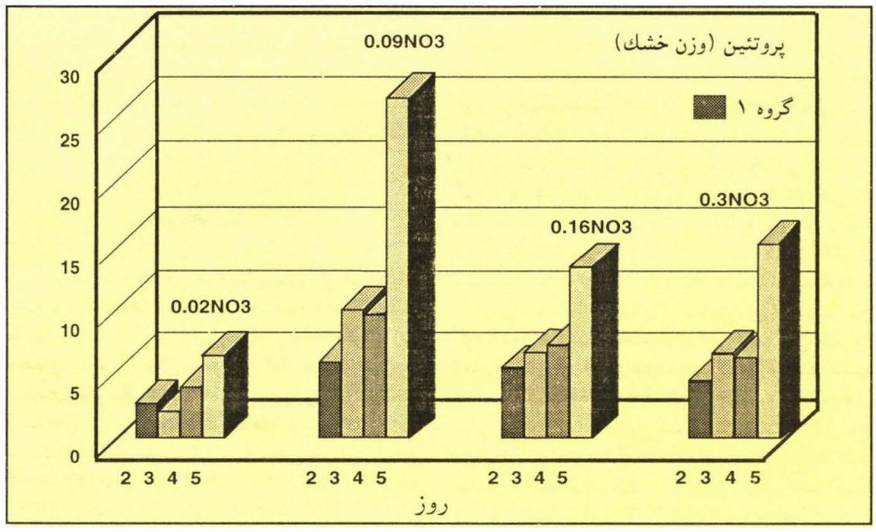
نتیجه‌گیری

مجموعاً سه بار نمونه‌برداری از ده ایستگاه از سواحل دریای خزر در استان مازندران انجام گرفت که در



اثر متفاوت سری ۳ بر روی *Spirulina maxima*





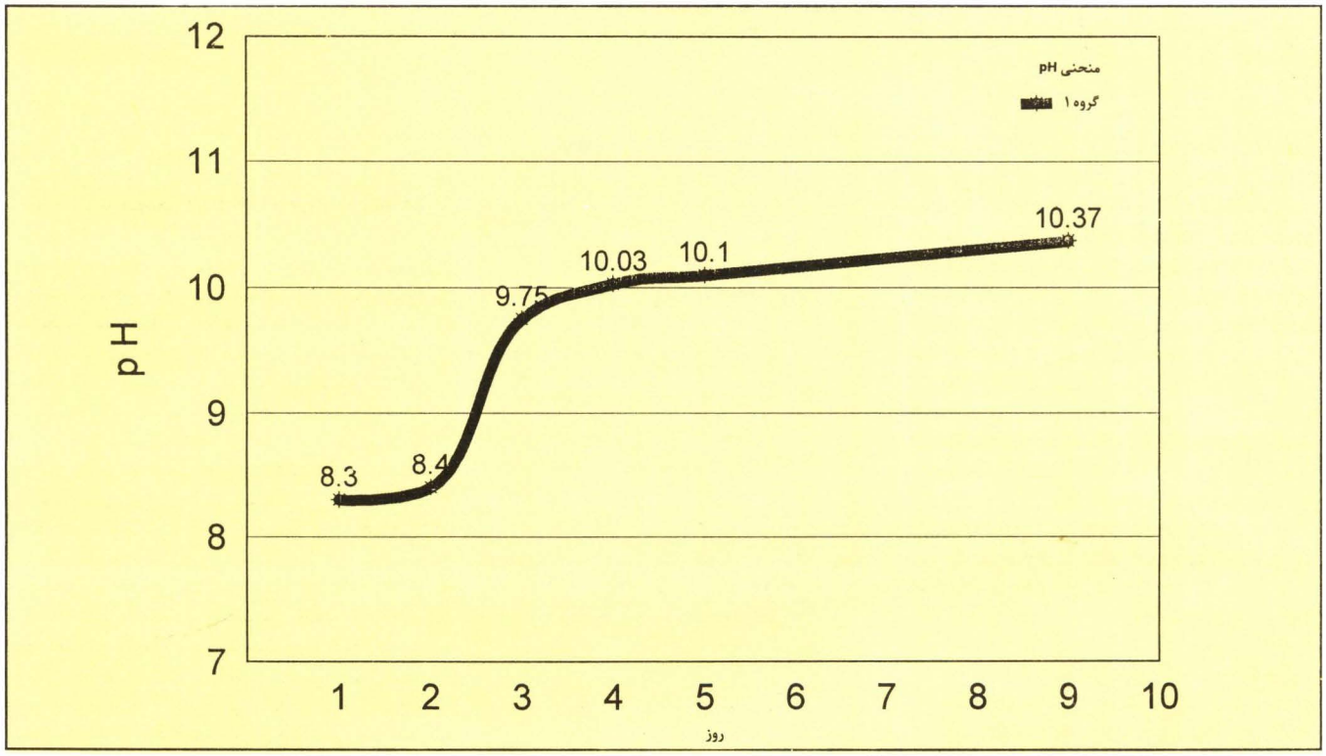
نمودار شماره ۱
اثر غلظت نیترات بر روی رشد
S. maxima

نمودار شماره ۲
اثر غلظت نیترات بر تولید پروتئین در
S. maxima (وزن مرطوب)

نمودار شماره ۳
اثر غلظت نیترات بر تولید پروتئین در
S. maxima (وزن خشک)

نمودار شماره ۴
اثر pH بر روی رشد *S. maxima*

هر سه بار بیشترین گونهٔ غالب از جلبکهای سبز آبی بود متعلق به *Spirulina maxima* (جدول شماره ۲). کشتهای اسپیرولینا معمولاً همزیست با باکتریها می‌باشد البته جداسازی و (Terai, ۱۹۷۰ و Ogawa) خالص‌سازی اسپیرولینا را با استفاده از اشعه UV و فیلتراسیون بر روی پارچه ابریشمی و توالی رقت انجام دادند. اثر موتانزایی UV مقاومت خاصی را در باکتریها و سیانوباکترها ایجاد نمی‌کند البته قرار گرفتن اسپیرولینا در لایهٔ لزج به عنوان لایهٔ محافظی برای سیانوباکتر محسوب می‌شود و باکتریها و سیانوباکتری‌هایی که حاوی این لایه نیستند از بین می‌روند، شکل‌های ۱ تا ۴ مراحل مختلف خالص‌سازی اسپیرولینا ماکزیما



Spirulina maxima جداسازی شده از دریای خزر را نشان می‌دهد.

با دقت در منحنی شماره ۴ مشخص شد که بیشترین رشد این گونه از سیانوباکتر مربوط به محیط کشتی با غلظت ۰/۰۲٪ نیترات و کمترین میزان رشد سیانوباکتر مربوط به محیط کشتی با غلظت ۰/۰۹٪ نیترات است. افزایش غلظت منبع نیتروژنی (NO_3) کاهش رشد را به دنبال دارد پس می‌توان نتیجه‌گیری نمود که بیشترین میزان رشد این میکروارگانیسم در غلظت ۰/۰۲٪ نیترات می‌باشد. نتایج به دست آمده با در نتایج حاصله از تحقیقات Terai و Ogawa در سال ۱۹۷۰ مطابقت دارد هر چند که سیانوباکتر مورد استفاده آنها *Spirulina platensis* است. سنجش پروتئین این غلظت‌ها این واقعیت را بارز ساخت که بیشترین میزان پروتئین مربوط به محیط کشتی با غلظت ۰/۰۹٪ نیترات است شاید بتوان نتیجه‌گیری کرد که ۰/۰۹٪ نیترات می‌تواند به عنوان پیش برنده[۲] در به فعالیت

انداختن ژنهای پروتئین‌ساز عمل کند در حالیکه غلظت بیشتر نیترات چنین روندی را در پروتئین‌سازی در سلول ایجاد نمی‌کند. مشاهدات به دست آمده بر خلاف مشاهدات Terai و Ogawa (۱۹۷۰) می‌باشد.

شاید عدم تطابق مشاهدات متفاوت بودن گونه‌های سیانوباکتر است و شرایط پروتئین‌سازی دوگونه با یکدیگر متفاوت می‌باشد (منحنی‌های شماره ۵ و ۶ میزان پروتئین در سلولهای تر و خشک را نشان می‌دهد). البته باید توجه کرد که سیانوباکتر در این غلظت از کمترین رشد برخوردار بوده است و کمترین میزان پروتئین مربوط به محیط کشتی با غلظت ۰/۰۲٪ نیترات است (در این غلظت سلول بیشترین رشد را داشته است).

بررسیها بیانگر آن بودند که رشد سیانوباکتر در بین محیطی بهتر صورت می‌پذیرد که pH ۹/۷۵ تا ۱۰/۳ باشد. به طور کلی گونه‌های مختلف اسپیرولینا بر روی این pH قابل رشد و تکثیر می‌باشند (منحنی شماره ۷). این مشاهدات با نتایج Ramamurthy و Suresh در سال ۱۹۹۲ مطابقت دارد. آنها pH=۹/۵ برای رشد *S. maxima* گزارش کردند، pH=۸ برای رشد گونه‌های مختلف اسپیرولینا مناسب نیست. در بررسیهای انجام شده بر روی *S. maxima* دریای خزر نیز کمترین میزان رشد در pH= ۸/۳ صورت پذیرفت و تقریباً از pH=۹/۷۵ به بعد در روند تکثیر تأثیر بسیار جزئی را ایجاد نمود. لازم به ذکر است که در ۱۲ و ۱۱ = pH کاهش رشد فاحشی در این سیانوباکتر ایجاد می‌گردد.

پاورقی‌ها

1- *Spirulina maxima* 2- Inducer

منابع مورد استفاده

1- A. PH. A., 1989. Standard methods for the examination of water a wastewater (Edited by Franson M.H.), 17th edition. American public health association, Washington, D.C.

2- Fritsch F.E., 1945. The structure and reproduction of algae, Cambridge university press.

3- Geider R.J. and Bia. Osborne., 1992. Algal photosyntesis, Chapman and Hall.

4- Kaushik B.D., 1987. Laboratory methods for blue - green algae. Associated publishing company, New Delhi, pp 155-220.

5- Ogawa T. and G. Terai, 1970. Studies on the growth of *Spirulina platensis*. (I) on the pure culture of *Spirulina platensis* J. Ferement. Technol 48: 361-367.

6- Orio Ciferri and or Sola. Tiboni, 1985. The biochemistry and industrial potential of spirulina. Microbiol. No (39): 503-526.

7- Suresh P.T., Raman M., Kothari and Ramamutrthy, 1992. Obtaining axenic cultures of filamentous *Cyanobacterium spirulina*. Benchmarks. No (149): 66-67.