

تأثیر منابع مختلف نیتروژن و کربن بر روند رشد، تولید رنگدانه و محتوی پلی ساکارید سیانوباکتری نمک دوست *Cyanothece sp.*

زهرا امینی خوئی^۱، رقیه حیدری^۱، المیرا عرفانی فر^۱ و بیژن آژنگ^۱

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

چکیده

در این تحقیق تأثیر منابع مختلف نیتروژن و کربن به ترتیب شامل (نیتрат سدیم، اوره، کلرید آمونیوم و نیترات آمونیوم) و (بی کربنات سدیم، کربنات سدیم و گلوکز) بر روند رشد، زیتوده، رنگدانه ها و محتوی پلی ساکارید سیانوباکتری نمک دوست *Cyanothece sp.* بررسی شد. روند رشد با شمارش تراکم سلولی و سنجش زیتوده با اندازه گیری وزن خشک به دست آمد. استخراج و سنجش رنگدانه ها با استفاده از دستگاه اسپکتوفتومتری صورت گرفت. استحصال پلی ساکارید با روش حمام آب داغ ۸۰ درجه سانتی گراد انجام شد. بر اساس نتایج این مطالعه منابع مختلف نیتروژن و کربن تأثیر معنی داری بر روند رشد و تولید زیتوده سیانوباکتری *Cyanothece sp.* نداشته است. با این حال، پروفایل رنگدانه های زیتوده *Cyanothece sp.* به طور معنی داری تحت تأثیر منابع مختلف نیتروژن و کربن محیط کشت قرار داشت. در بین تیمارهای مختلف نیتروژن، بالاترین محتوی کلروفیل a و فیکوسیاینین در حضور نیترات سدیم و بی کربنات پتاسیم به دست آمد. بالاترین میزان تولید کارتنوئید و بتاکاروتن در محیط کشت حاوی اوره، نیترات آمونیوم و کربنات پتاسیم مشاهده شد. مقایسه محتوی پلی ساکارید زیتوده *Cyanothece sp.* در بین تیمارهای مختلف نشان داد که محیط کشت حاوی نیترات سدیم و بی کربنات پتاسیم سبب افزایش سنتز پلی ساکارید زیتوده شده است. بر اساس نتایج این تحقیق، به منظور تولید زیتوده از رنگدانه فیکوسیاینین با محتوی پلی ساکارید بالا بهتر است از نیترات سدیم و بی کربنات پتاسیم به عنوان منابع نیتروژن و کربن استفاده گردد.

کلید واژه ها: سیانوباکتری، *Cyanothece sp.*، محیط کشت، رنگدانه و پلی ساکارید

مقدمه

یکی از چالش های جدی در دوران کنونی، رشد سریع جمعیت جهان است که با کمبود منابع غذایی و دارویی مناسب همراه بوده است. در عین حال، نگرانی های زیست محیطی ناشی از آلودگی های صنعتی تا حدود زیادی جوامع مختلف را درگیر خود کرده است. این چالش ها، سبب افزایش تقاضا برای محصولات طبیعی و سازگار با محیط زیست شده است. در حال حاضر جوامع مختلف آگاهی زیادی در مورد اثرات مضر مواد شیمیایی سنتزی، پیدا کرده اند و یافتن منابع جایگزین طبیعی و پایدار به یک اولویتی جهانی تبدیل شده است. بنابراین، با توجه به نگرانی های مرتبط با سلامت در استفاده از محصولات شیمیایی، توجه محققان در سال های اخیر به میکروارگانیسم های مفید جلب شده است. این میکروارگانیسم ها در قالب های مختلف شامل پروبیوتیک، رنگدانه های طبیعی و سایر محصولات تجاری به بازار عرضه شده اند (۱).

یکی از این میکروارگانیسم های مفید، سیانوباکتری ها هستند که توانایی تولید ترکیبات ارزشمند مانند رنگدانه های ریستی ارزشمند، اسیدهای چرب غیراشباع، اسیدهای آمینه ضروری و پلی ساکاریدها را دارند. در سال های اخیر، علی رغم هزینه های بالاتر تولید رنگدانه های طبیعی، گرایش جهانی به استفاده از این ترکیبات افزایش یافته است. این تغییر رویکرد عمدتاً به دلیل افزایش آگاهی مصرف کنندگان در مورد اثرات منفی

نوع مقاله

مقاله پژوهشی اصیل

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۱۰/۰۵

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۱۲/۱۵

تاریخ چاپ الکترونیکی:

۱۴۰۳/۱۲/۲۵

*نویسنده مسئول:

zamini.41@gmail.com

رنگدانه های سنتزی و اجرای قوانین سختگیرانه در صنایع غذایی و دارویی می باشد. اگرچه هزینه تولید رنگدانه های طبیعی بیشتر است، اما ارزش افزوده بالا و قیمت فروش بالاتر در بازار، تولید آن ها را از نظر اقتصادی توجیه پذیر می سازد (۲). سیانوباکتری های نمک دوست، گروهی از میکروارگانیسم های ساکن تالاب های نمکی و مناطق ساحلی دریایی هستند که قابلیت مناسبی در تولید رنگدانه های ارزشمند و پلی ساکاریدهای تجاری دارند. مطالعات اخیر بر روی سویه های مختلف سیانوباکتری های نمک دوست نشان داده است که این میکروارگانیسم ها می توانند به عنوان کاندیدای مناسبی برای تولید رنگدانه ها و پلی ساکاریدهای تجاری مطرح باشند. در همین راستا در برخی مطالعات غربالگری سویه ها بر اساس نرخ رشد و میزان تولید رنگدانه ها و محتوی پلی ساکارید آنها صورت گرفته است. از بین سویه های مختلف بیشتر سویه های *Nostocales* و *Oscillatoriales* شناسایی و مطالعه شده اند و سویه های نمک دوست کمتر مورد مطالعه قرار گرفته اند. در مطالعات غربالگری روی ۱۶۶ سویه جلبک دریایی *Synechococcus sp.* به عنوان یک سویه تولیدکننده پلی ساکارید به میزان ۰/۱۲ گرم در لیتر شناسایی شد (۳).

در مطالعات پیشین، سویه *Cyanotheca sp.* به عنوان یک جدایه بومی از تالاب های نمکی لیپار سواحل چابهار شناسایی شد. گزارشات مختلفی از پراکنش آن در زیستگاه های متنوع از زیستگاه های آب شیرین مزارع برنج تا نمک زارهای ساحلی ثبت شده است (۴). بر اساس گزارشات قبلی این سیانوباکتری توانایی مناسبی در سازگاری با غلظت های بالای نمک را داشته و نوسانات دما نیز سبب کاهش رشد آن نشد. با توجه به این مزیت های زیستی، بررسی سایر ویژگی های آن از جمله راندمان رشد، تولید رنگدانه و سنتز ترکیبات پلی ساکارید این سویه، می تواند گام مؤثری در راستای شناخت بیشتر آن و امکان سنجی بهره برداری از آن در صنایع مختلف باشد.

مواد و روش ها

کشت ریز جلبک و آماده سازی تیمارهای آزمایشی

در این مطالعه از استوک خالص سیانوباکتری *Cyanotheca sp.* که در مطالعات پیشین از سواحل دریای عمان (چابهار) جداسازی و خالص سازی شده و در در آزمایشگاه جلبک شناسی مرکز تحقیقات شیلاتی آب های دور چابهار نگهداری شده بود استفاده شد. در این آزمایش نمونه سیانوباکتری *Cyanotheca sp.* در ارلن مایرهای استریل ۲۵۰ میلی لیتری در آزمایشگاه مرکز تحقیقات شیلاتی آب های دور چابهار در شدت نور ۱۰۰ میکرومول بر متر مربع در ثانیه و دوره روشنایی و تاریکی ۱۲:۱۲ و در دمای $1 \pm 26^{\circ}\text{C}$ کشت داده شده و نمونه های با استفاده از دستگاه پمپ هوا به منظور ایجاد تلاطم و جلوگیری از ایجاد رسوب انجام گرفت. به منظور تعیین مناسب ترین منبع نیترات و کربن تیمارهای آزمایشی مختلف شامل (نیترات سدیم، اوره، کلرید آمونیوم و نیترات آمونیوم) و (بی کربنات سدیم، کربنات سدیم و گلوکز) تهیه و استفاده شد.

اندازه گیری روند رشد سیانوباکتری *Cyanotheca sp.*

برای بررسی روند رشد نمونه برداری از تیمارهای مختلف محیط کشت به صورت روزانه انجام شد. مشاهدات میکروسکوپی و شمارش سلولی با استفاده از لام هموسایتومتر صورت گرفت. تعداد سلول ها در هر میلی لیتر از سوسپانسیون نمونه با استفاده از رابطه زیر محاسبه گردید (۵)

$$10^4 \times \text{میانگین تعداد سلول ها در مربع های لام هماسیتومتر} = \text{تعداد سلول ها}$$

اندازه گیری غلظت زی توده

به منظور اندازه گیری زی توده به دست آمده در پایان دوره رشد، حجم ۱۰ میلی لیتر از سوسپانسیون جلبک را از کاغذ صافی واتمن GF/C، ۰/۴۵ میکرون تحت شرایط خلاء عبور داده شد و در دمای ۱۰۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱ ساعت قرار داده شد تا کاملاً خشک گردد. فیلتر حاوی زی توده خشک شده پس از خروج از آون در دسیکاتور قرار داده شده و در نهایت با ترازوی دیجیتالی (مدل، HR-200) وزن شد (۶).

استخراج و اندازه گیری محتوای کلروفیل a، کارتنوئید کل و بتاکاروتن و فیکوسیانیین ریز جلبک

۱۰ میلی از سوسپانسیون سیانوباکتری به مدت ۵ دقیقه در ۵۰۰۰ دور سانتریفیوژ شد تا زیتوده آن جدا گردد، سپس ۱۰ میلی لیتر استون ۹۰٪ به زیتوده آن اضافه شده و به مدت ۵ دقیقه ورتکس شد. پس از اطمینان از استخراج رنگدانه به مدت ۱۰ دقیقه در ۵۰۰۰ دور سانتریفیوژ شد. محتویات کلروفیل a، کارتنوئید کل، بتاکاروتن در مایع رویی با اندازه گیری میزان جذب در طول موج ۶۳۰، ۶۴۷، ۶۶۴ و ۶۹۱ نانومتر در دستگاه اسپکتروفوتومتر (Evolution™ 300 UV-Vis Spectrophotometer) تعیین شد. غلظت های کلروفیل a، کارتنوئید کل و بتاکاروتن (۷) با توجه به رابطه های زیر محاسبه شد (۸).

$$\text{Chlorophyll a } (\mu\text{g/ mL}) = 0.0604 A_{630} - 4.5224 A_{647} + 13.2969 A_{664} - 1.7453 A_{691}$$

$$\text{Total Carotenoids } (\mu\text{g/ mL}) = 4.69(A_{440}) - 0.267 \text{ Chl (a + b)}$$

$$\beta\text{-carotene } (\mu\text{g/ mL}) = 0.216 (A_{663}) - 1.22 (A_{645}) - 0.304 (A_{505}) + 0.452 (A_{453})$$

برای فیکوسیانیین، ابتدا ۰/۲ گرم از زی توده خشک ریز جلبک به ۲۰ میلی لیتر بافر فسفات سدی ۰/۱ مولار اضافه کرده و به مدت ۱ ساعت معرض گرما و همزن قرار داده شد تا سوسپانسیون یکنواختی به دست آید. سپس با روش انجماد سوسپانسیون به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد قرار داده شد و پس از آن در دمای ۴ درجه سانتی گراد، انجمادزایی صورت گرفت. این فرآیند سه بار تکرار شد. پس از انجام فرآیند، نمونه ها روی هم زن در دمای ۳۷ درجه به مدت ۳ ساعت همگن شدند. پس از انجام مراحل فوق، نمونه ها در دور ۵۰۰۰ به مدت ۲۵ دقیقه سانتریفیوژ شده و مایع رویی برای اندازه گیری رنگدانه های فیکوسیانیین جمع آوری شدند. برای محاسبه غلظت فیکوسیانیین جذب نوری محلول در طول موج های ۶۱۵ و ۶۵۲ نانومتر خوانش و غلظت آن ها برحسب میکروگرم بر میلی لیتر طبق رابطه زیر محاسبه شد (۹).

$$\text{Phycocyanin } (\mu\text{g/ mL}) = A_{615} - 0.474 A_{652} / 5.34$$

استخراج و سنجش پلی ساکارید خام زی توده سیانوباکتری *Cyanothece sp.*

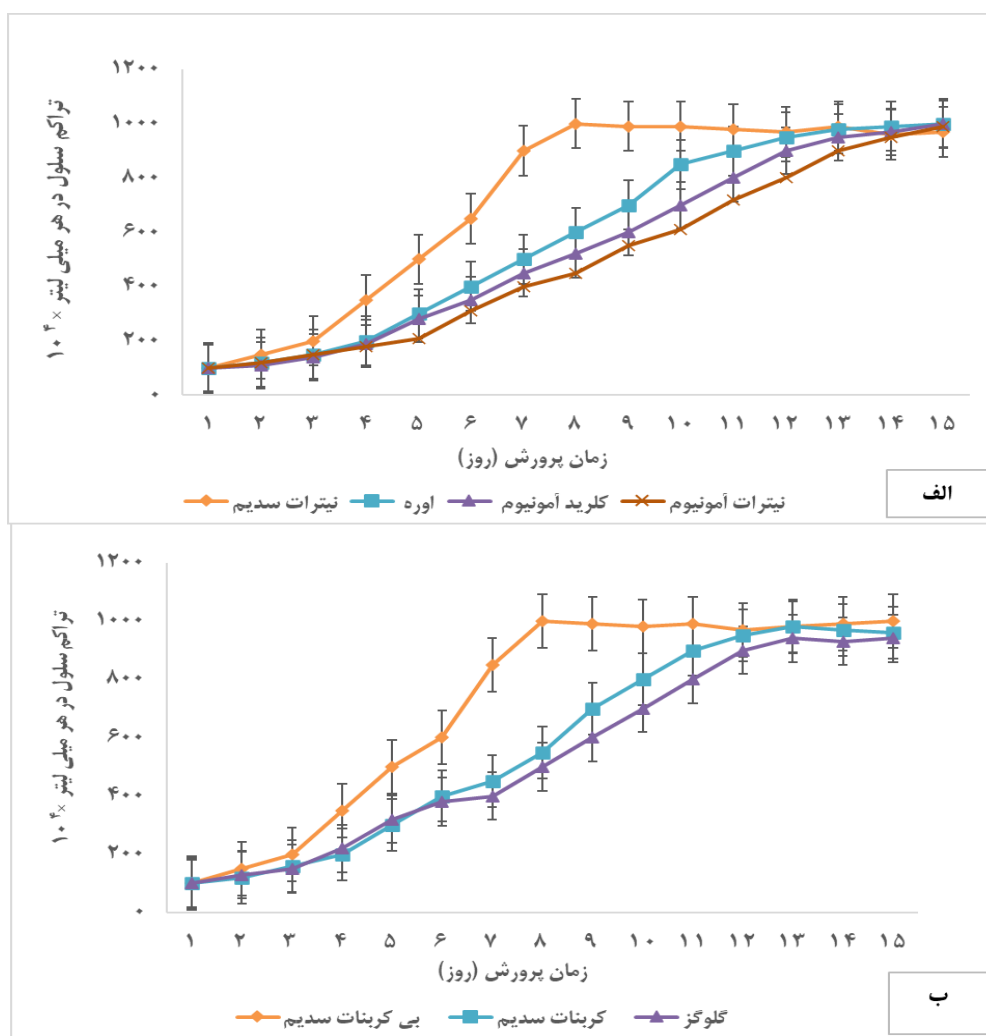
به منظور حذف چربی و رنگدانه های پودر خشک سیانوباکتری *Cyanothece sp* با نسبت ۱ به ۱۰ با اتانول ۸۵٪ مخلوط شده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق قرار گرفت تا ترکیبات چربی دوست مانند کارتنوئیدها و رنگدانه های مرتبط با کلروفیل و پروتئین های با وزن مولکولی پایین حذف شوند. سپس محلول در به مدت ۱۰ دقیقه و با دور ۵۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شد. رسوب جمع آوری، با استون شسته و در دمای اتاق خشک شد. پودر خشک نمونه به نسبت ۱ به ۴۰ آب مقطر در دمای ۸۰ درجه سانتی گراد به مدت ۲ ساعت تحت همزدن مکانیکی قرار گرفت. سپس محلول حاصل به مدت ۲۰ دقیقه و با دور ۵۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شد. مایع رویی جمع آوری و تحت خلاء تغلیظ شد. به محلول حاصل اتانول ۹۹٪ سرد اضافه شده تا پلی ساکارید آن ترسیب گردد. با عبور از فیلتر غشایی (اندازه منافذ ۰،۴۵ میکرومتر) خشک شده و در آون در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد خشک شد (۱۰).

تجزیه و تحلیل آماری داده ها

تجزیه و تحلیل داده های حاصل از این مطالعه با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۱۹ و رسم شکلها با استفاده از Excel نسخه ۲۰۱۶ انجام شد. داده های به دست آمده در قالب آزمایش فاکتوریل ۲ عاملی با طرح پایه کاملاً تصادفی با ۳ تکرار تجزیه واریانس شدند. از آزمون دانکن جهت مقایسه میانگین ها استفاده شد. سطح معنی داری با اطمینان ۹۵ درصد در نظر گرفته شد.

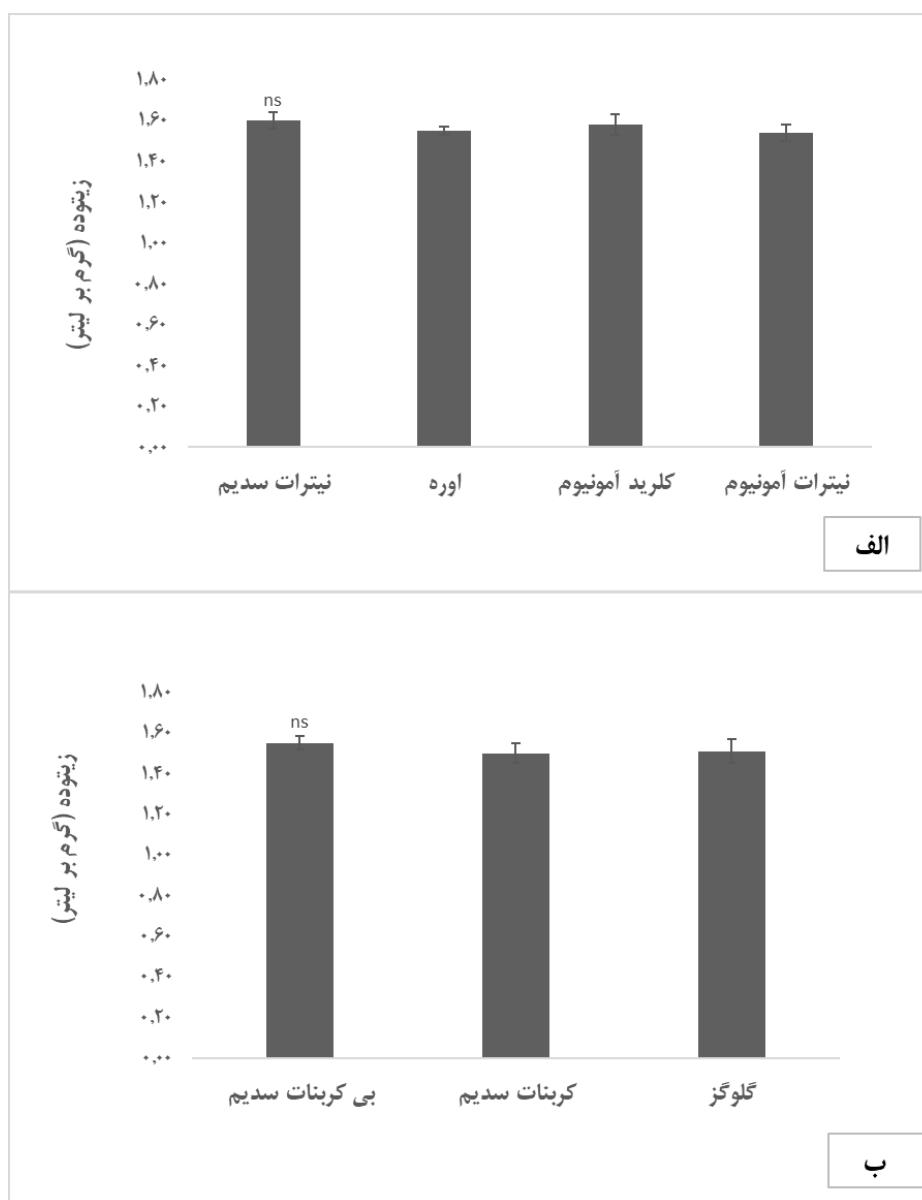
نتایج**تاثیر منابع مختلف نیتروژن و کربن بر روند رشد و تولید زیتوده در تیمارهای آزمایشی**

در شکل شماره ۱ (الف)، تأثیر منابع مختلف نیتروژن شامل (نیترات سدیم، اوره، کلرید آمونیوم و نیترات آمونیوم) را بر روند رشد و ازدیاد سلولی در سیانوباکتری *Cyanothece sp.* در یک دوره ۱۵ روزه نشان داده شده است. مقایسه میانگین تراکم سلولی در تیمارهای مختلف نشان داد که روند ازدیاد سلولی از ($10^4 \times 100$ سلول در میلی لیتر) در ابتدای دوره آغاز شده و روند افزایشی خود را تا حداکثر ($10^4 \times 1000$ سلول در میلی لیتر) در پایان فاز نمایی رشد به پایان رسانده است. مقایسه نرخ رشد در روزهای مختلف کشت نشان داد که در هفته اول نرخ رشد در تیمار نیترات سدیم با سرعت بیشتری مشهود بود، در سایر تیمارها روند ازدیاد سلولی با سرعت تکثیر کند تر تا پایان روز ۱۵ کشت ادامه یافت. در پایان همه تیمارها در روز ۱۵ پس از تلقیح به تعداد تراکم سلولی مشابه ($10^4 \times 1000$ سلول در میلی لیتر) رسیدند. بدین معنی که در پایان دوره پرورش دو هفته ای اختلاف معنی داری در میزان رشد و ازدیاد سلولی در سیانوباکتری مورد مطالعه نداشته است ($p > 0.05$). در شکل شماره ۱ (ب)، تأثیر منابع مختلف کربن از جمله (بی کربنات سدیم، کربنات سدیم، و گلوکز) بر منحنی رشد و تراکم سلولی در سیانوباکتری *Cyanothece sp.* آورده شده است. نتایج شمارش سلولی و مشاهدات میکروسکوپی در این آزمایش نیز نشان داد که با وجود سرعت تکثیر متفاوت در تیمارهای مختلف بی کربنات سدیم، کربنات سدیم، و گلوکز، اما در پایان ۱۵ روز از زمان تلقیح اولیه تراکم سلولی به میزان مشابه در تیمارهای مختلف رسید ($p > 0.05$).



شکل ۱(الف و ب) - تأثیر منابع مختلف نیتروژن و کربن بر روند رشد سیانوباکتری *Cyanothece sp.*

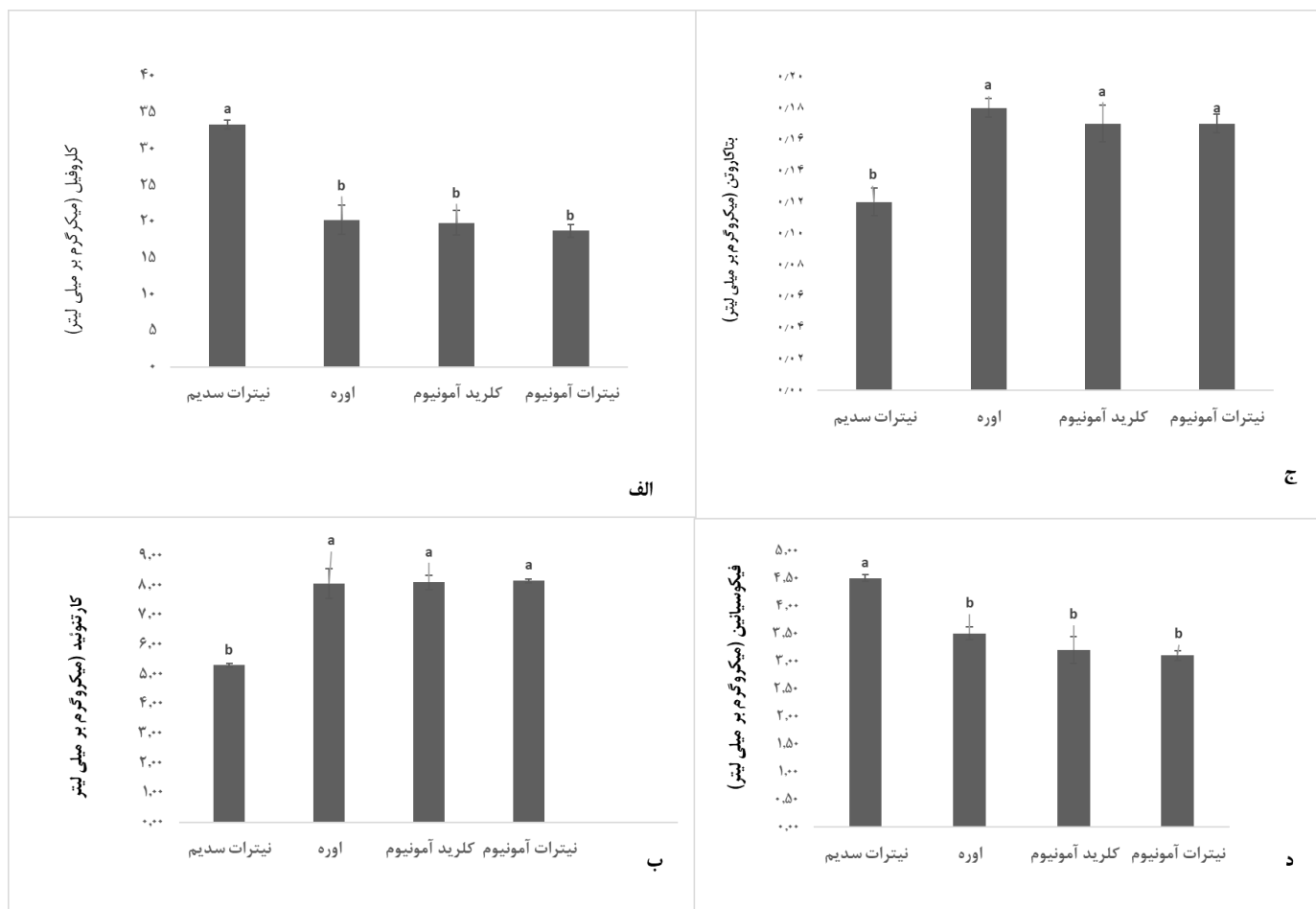
شکل ۲ (الف)، تاثیر منابع مختلف نیتروژن شامل (نیترات سدیم، اوره، کلرید آمونیوم و نیترات آمونیوم) را بر تولید زیئوده در سیانوباکتری *Cyanothece sp.* در طول دوره ۱۵ روزه نشان داده شده است. مقایسه میانگین زیئوده در تیمارهای مختلف نشان داد که استفاده از نیترات سدیم، اوره، کلرید آمونیوم و نیترات آمونیوم اختلاف معنی داری در تولید زیئوده سیانوباکتری مورد مطالعه نداشته است ($p > 0.05$). حداکثر میزان تولید زیئوده در دامنه ۱/۵۴ تا ۱/۶ گرم بر لیتر) به دست آمد. در شکل شماره ۲ (ب)، نیز تاثیر منابع مختلف کربن از جمله (بی کربنات سدیم، کربنات سدیم، و گلوکز) بر تولید زیئوده در سیانوباکتری *Cyanothece sp.* آورده شده است. نتایج این آزمون نیز نشان داد که محیط کشت حاوی منابع مختلف کربن اختلاف معنی داری در تولید زیئوده در سیانوباکتری ایجاد نکرده است ($p > 0.05$). حداکثر میزان تولید زیئوده در دامنه ۱/۲۳ تا ۱/۲۶ گرم بر لیتر) مشاهده شد.



شکل شماره ۲ (الف و ب) - تاثیر منابع مختلف نیتروژن و کربن بر تولید زیئوده سیانوباکتری *Cyanothece sp.*

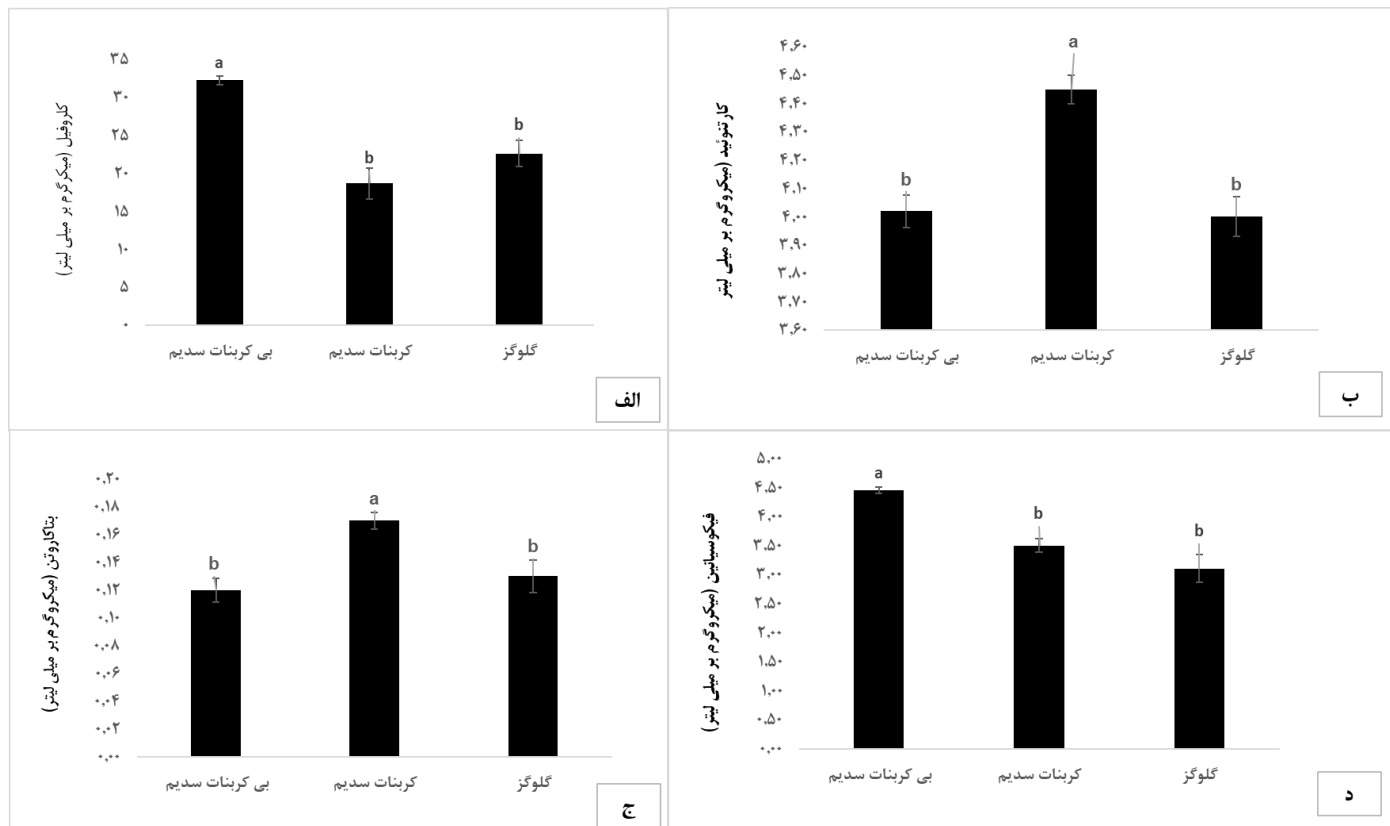
تأثیر منابع مختلف نیتروژن و کربن بر محتوی رنگدانه های زیتوده در تیمارهای آزمایشی

تأثیر منابع مختلف نیتروژن شامل (نیتрат سدیم، اوره، کلرید آمونیوم و نیترات آمونیوم) را بر محتوی رنگدانه کلروفیل a، کارتنوئیدکل، بتاکاروتن و فیکوسیانین زیتوده سیانوباکتری *Cyanothece sp.* در پایان فاز نمایی رشد پس از دو هفته در شکل شماره ۳ (الف، ب، ج و د) ترسیم شد. مقایسه محتوی رنگدانه کلروفیل a، کارتنوئیدکل، بتاکاروتن و فیکوسیانین زیتوده در تیمارهای مختلف نشان داد که استفاده از منابع مختلف نیتروژن تأثیر معنی داری بر سنتز رنگدانه کلروفیل a، کارتنوئیدکل، بتاکاروتن و فیکوسیانین زیتوده سیانوباکتری *Cyanothece sp.* داشته است ($P < 0.05$). به طوری که بالاترین سنتز کلروفیل a و فیکوسیانین به ترتیب به میزان (۳۳/۳ و ۴/۵ میکروگرم بر میلی لیتر) در محیط کشت حاوی نیترات سدیم به دست آمد. محتوی کلروفیل a در تیمارهای اوره، کلرید آمونیوم و نیترات آمونیوم به ترتیب به میزان (۲۰/۲، ۱۹/۸ و ۱۸/۷ میکروگرم بر میلی لیتر) به دست آمد که اختلاف معنی داری با یکدیگر نشان ندادند ($p > 0.05$). میزان تولید کارتنوئید کل به ترتیب به مقدار (۸/۰۵، ۸/۱ و ۸/۱۵ میکروگرم بر میلی لیتر) در تیمارهای اوره، کلرید آمونیوم و نیترات آمونیوم به طور معنی داری بیشتر از نیترات سدیم به میزان (۵/۳ میکروگرم بر میلی لیتر) مشاهده شد. سنتز بتاکاروتن نیز در محیط کشت حاوی اوره، کلرید آمونیوم و نیترات آمونیوم به ترتیب به میزان (۰/۱۸، ۰/۱۷ و ۰/۱۷ میکروگرم بر میلی لیتر) به دست آمد که به طور معنی داری بیشتر از نیترات سدیم به میزان (۰/۱۲ میکروگرم بر میلی لیتر) مشاهده شد ($p < 0.05$).



شکل شماره ۳ (الف، تا د) - تأثیر منابع مختلف نیتروژن بر محتوی رنگدانه کلروفیل a، کارتنوئیدکل، بتاکاروتن و فیکوسیانین سیانوباکتری *Cyanothece sp.*

تأثیر بی کربنات سدیم، کربنات سدیم، و گلوکز بر محتوی رنگدانه کلروفیل a، کارتنوئیدکل، بتاکاروتن و فیکوسیانیین زیتوده سیانوباکتری *Cyanothece sp.* در شکل شماره ۴ (الف، ب، ج و د) قابل مشاهده است. آنالیز داده ها نشان داد که محتوی کلروفیل a در محیط کشت حاوی بی کربنات سدیم به طور معنی داری بالاتر از منبع کربنات سدیم، و گلوکز بوده است ($P < 0.05$). میزان تولید کارتنوئید کل به مقدار (۴/۰۲ میکروگرم بر میلی لیتر) و بتاکاروتن به مقدار (۰/۱۷ میکروگرم بر میلی لیتر) در تیمارهای کربنات سدیم به طور معنی داری بالاتر از بی کربنات سدیم و گلوکز مشاهده شد ($P < 0.05$). مقایسه میزان فیکوسیانیین در تیمارهای مختلف محیط کشت منبع کربن نشان داد که محتوی فیکوسیانیین در سلول های رشد یافته در محیط بی کربنات پتاسیم به میزان (۴/۴۵ میکروگرم بر میلی لیتر) بالاتر از کربنات سدیم و گلوکز به ترتیب (۳/۵ و ۳/۱ میکروگرم بر میلی لیتر) به دست آمد.

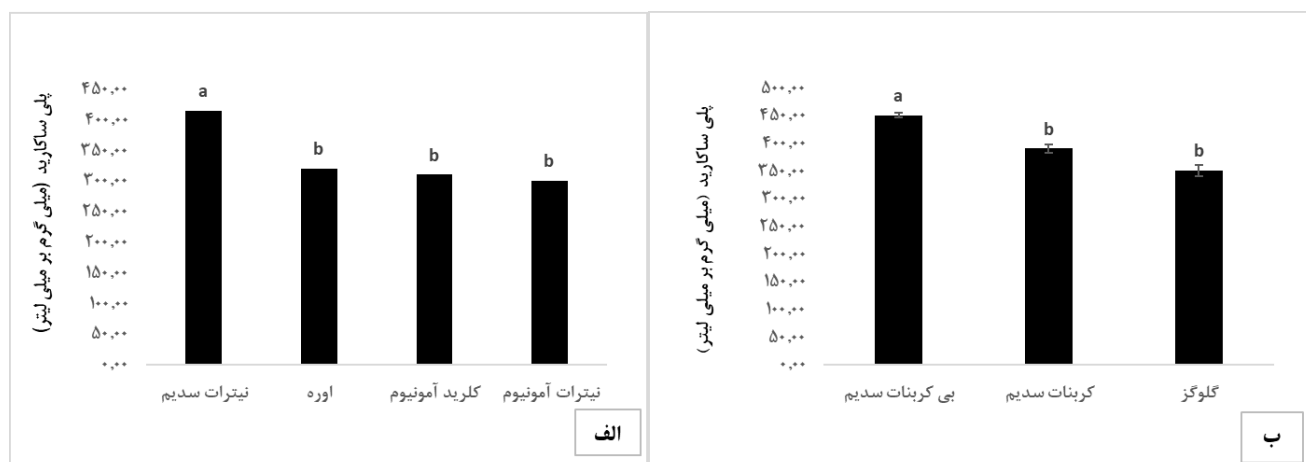


شکل شماره ۴ (الف تا د) - تأثیر منابع مختلف کربن بر محتوی رنگدانه کلروفیل a، کارتنوئیدکل، بتاکاروتن و فیکوسیانیین سیانوباکتری *Cyanothece sp.*

تأثیر منابع مختلف نیتروژن و کربن بر محتوی پلی ساکارید زیتوده در تیمارهای آزمایشی

در شکل شماره ۵ (الف)، تأثیر استفاده از نیترات سدیم، اوره، کلرید آمونیوم و نیترات آمونیوم به عنوان منابع نیتروژن بر میزان سنتز پلی ساکارید در زیتوده سیانوباکتری *Cyanothece sp.* در پایان دوره پرورش و فاز نمایی رشد نشان داده شده است. آنالیز داده های مربوط به پلی ساکارید نشان داد که اختلاف معنی داری در بین منابع مختلف نیتروژن وجود داشت ($P < 0.05$). حداکثر محتوی پلی ساکارید در تیمار نیترات سدیم به میزان (۴۱۵ میکروگرم بر میلی لیتر) به طور معنی داری بیشتر از تیمارهای اوره، کلرید آمونیوم و نیترات آمونیوم (۳۲۰، ۳۱۰ و ۳۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر) مشاهده شد. در شکل شماره ۵ (ب)، میزان سنتز پلی ساکارید در زیتوده سیانوباکتری *Cyanothece sp.* در تیمارهای مختلف کربن قابل مشاهده است. بر اساس داده های به دست آمده از این تحقیق تولید پلی ساکارید در بین تیمارهای مختلف با یکدیگر تفاوت معنی دار داشته

است ($p < 0.05$). به طوری که سنتز پلی ساکارید در سلول های رشد یافته در محیط کشت بی کربنات سدیم (۴۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر) بالاتر از کربنات سدیم (۳۹۰ میکروگرم بر میلی لیتر) گلوکز (۳۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر) مشاهده شد.



شکل شماره ۵ (الف و ب) - تأثیر منابع مختلف کربن بر محتوی پلی ساکارید سیانوباکتری *Cyanobacteria sp.*

بحث و نتیجه گیری

به طور کلی، درک تأثیر منابع مختلف مواد مغذی بر سویه های مختلف سیانوباکتری ها برای بهینه سازی فرآیندهای کشت و تولید محصولات با ارزش حائز اهمیت است. نتایج این تحقیق نشان داد که منابع مختلف نیتروژن شامل نیترات سدیم، نیتريت سدیم، کلرید آمونیوم و اوره تأثیر معنی داری بر روند رشد و تولید زیستوده سیانوباکتری *Cyanobacteria sp.* نداشته اند. این نشان می دهد که این سویه توان مناسبی برای جذب منابع مختلف نیتروژن داشته و امکان بهره برداری و متابولیسم اشکال مختلف نیتروژن را دارد. نتایج این تحقیق با یافته های مطالعه Inabe و همکاران (۲۰۲۱) همسو بود. نتایج این محققین نیز نشان داد که سیانوباکتری *Synechocystis sp. PCC 6803* می تواند از منابع نیترات سدیم و کلرید آمونیوم برای رشد خود استفاده کند و رشد بالاتر در محیط آمونیوم مشاهده شد (۱۱). همچنین، Veaudor و همکاران (۲۰۱۹) بیان کردند که بسیاری از سیانوباکتری ها دارای ژن هایی برای حمل و نقل و کاتابولیسم اوره (urtABCDE) می باشند که به آن ها این امکان را می دهد که از اوره به عنوان منبع نیتروژن استفاده کنند (۱۲). در یک مطالعه دیگر مشخص شد که *Anabaena sp.* نیز توانایی جذب آمونیوم، نیترات و اوره داشته است (۱۳). مقایسه بر روی *Microcystis* و *Dolichospermum Synechococcus* نشان داد که میزان رشد در اوره با نیترات تفاوت معنی داری نداشته است (۱۴). همچنین نتایج آنالیز داده های تحقیق حاضر نشان داد که میزان رشد و تولید زیستوده در سیانوباکتری *Cyanobacteria sp.* نیز تحت تأثیر منابع مختلف کربن مورد استفاده از جمله کربنات سدیم، بی کربنات سدیم و گلوکز نبوده است و اختلاف معنی داری بین تیمارهای مختلف مشاهده نشد. در همین راستا نتایج مطالعه Kurkela و Tyystjärvi (۲۰۲۴)، نیز نشان داد که سیانوباکتری ها می توانند از منابع مختلف کربن، از جمله CO_2 و HCO_3^- برای رشد استفاده کنند (۱۵). گلوکز به عنوان منبع کربن منجر به تولید بالاترین بیومس (۳٫۷ گرم در لیتر) در *Scenedesmus sp.* شد (۱۶). افزایش بیان ناقل های بی کربنات، مانند Bica و SbtA، در سیانوباکتری هایی مانند *Synechocystis sp. PCC 6803* و *Synechococcus sp. PCC 7002* مشاهده شده است که نشان می دهد افزایش بیان ژن های خاص سبب افزایش تولید زیستوده، نرخ رشد در سویه های مورد آزمایش بوده است. این یافته ها قابلیت سازگاری سیانوباکتری ها را با منابع مختلف نیتروژن و علت پایداری حضور آنها را در اکوسیستم های آبی را بیشتر توجیه می کند.

بر اساس نتایج به دست آمده از تحقیق حاضر، مقایسه محتوی رنگدانه کلروفیل a، کارتنوئیدکل، بتاکاروتن و فیکوسیانین زیستوده در تیمارهای مختلف نشان داد که استفاده از منابع مختلف نیتروژن تأثیر معنی داری بر سنتز رنگدانه کلروفیل a، کارتنوئیدکل، بتاکاروتن و فیکوسیانین زیستوده

سیانوباکتری *Cyanothece sp.* داشته است. به طوری که بالاترین سنتز کلروفیل a و فیکوسیانیین در محیط کشت حاوی نیتрат سدیم به دست آمد. میزان تولید کارتنوئید کل در تیمارهای اوره، کلرید آمونیوم و نیترات آمونیوم به طور معنی داری بیشتر از نیترات سدیم به میزان مشاهده شد. سنتز بتاکاروتن نیز در محیط کشت حاوی اوره، کلرید آمونیوم و نیترات آمونیوم به ترتیب به میزان به دست آمد که به طور معنی داری بیشتر از نیترات سدیم به میزان مشاهده شد. به طور مشابه، در مطالعه Tan و همکاران (۲۰۱۹)، بر روی *Microcystis aeruginosa*، نیز مشخص شد که میزان رنگدانه های این سیانوباکتری تحت تاثیر منبع نیترات و آمونیاک محیط کشت بوده است (۱۷). این در حالی است که یافته های Norena-Caro و همکاران (۲۰۲۱)، نیز نشان داد که استفاده از نیترات سدیم باعث افزایش معنی دار در سنتز بتاکاروتن در سیانوباکتری *Anabaena sp.* شد (۱۸). علاوه بر این، Prabakaran و Ravindran (۲۰۱۲)، دریافتند که اوره و نیترات آمونیوم به طور معنی داری محتوای کلروفیل در ریزجلبک های *Scenedesmus* و *Chlorococcum* افزایش داده است (۱۹). بر اساس نتایج مطالعه Erratt و همکاران (۲۰۱۸)، نیز استفاده از اوره سبب افزایش تولید رنگدانه های سیانوباکتری شده است. واکنش های متفاوت در تولید رنگدانه ها در میان گونه های مختلف ریزجلبک را می توان به نوع سازگاری های تکاملی و انعطاف پذیری به زیستگاه های اکولوژیکی این موجودات مرتبط دانست. همچنین گونه های مختلف پروفایل های رنگدانه ای متفاوت و مکانیزم های تنظیمی منحصر به فردی تکامل خود را دارند که می تواند علت اختلاف در نتایج مطالعات متنوع است.

نتایج مطالعه حاضر در تیمارهای مختلف کربن همچنین نشان داد که محتوی کلروفیل a در محیط کشت حاوی بی کربنات سدیم به طور معنی داری بالاتر از منبع کربنات سدیم، و گلوکز بود. میزان تولید کارتنوئید کل و بتاکاروتن در تیمارهای کربنات سدیم به طور معنی داری بالاتر از بی کربنات سدیم و گلوکز مشاهده شد. مقایسه میزان فیکوسیانیین در تیمارهای مختلف محیط کشت منبع کربن نشان داد که محتوی فیکوسیانیین در سلول های رشد یافته در محیط بی کربنات پتاسیم بالاتر از کربنات سدیم و گلوکز به دست آمد. نتایج سایر محققین نیز نشان داد که سنتز رنگدانه ها در منابع مختلف کربن در سویه های مختلف متفاوت بوده است. برای مثال، مطالعه Xing و Lusan (۲۰۱۳)، نشان داد که منابع غذایی مناسب (نیتروژن، فسفر و کربن) نقش مهمی در تولید رنگدانه ها در سیانوباکتری ها داشته اند. کلروفیل a و محتوی فیکوسیانیین در دو گونه سیانوباکتری *Synechocystis sp.* و *Anabaena sp.* در محیط کشت حاوی نیترات سدیم بالاتر از آمونیوم کلرید و اوره بوده است. با این حال، در مطالعه Harutyunyan و همکاران (۲۰۲۳)، بر روی سیانوباکتری *Spirulina platensis* مشخص شد که استفاده از منابع کربن آلی نظیر گلوکز، فروکتوز منجر به افزایش تولید رنگدانه های فتوسنتزی در اسپیرولینا شده است (۲۰). نکته قابل توجه آن است که منابع کربن از طریق مسیرهای مختلف جذب می شوند. کربن غیرآلی از طریق مکانیزم های غلظت CO₂ و کربن آلی از طریق مسیرهای فسفات پنتوز جذب می گردد (۲۱).

بر اساس یافته های مختلف می توان نتیجه گیری کرد که رابطه پیچیده ای بین منابع نیتروژن و کربن و نسبت های آن بر تولید رنگدانه در ریزجلبک ها وجود دارد. تغییر در روند تولید رنگدانه ها در پاسخ به تغییرات محیط کشت یک نوع مکانیسم سازگاری به منظور بهینه سازی کارایی فتوسنتزی و محافظت از در برابر استرس های محیطی است. این انعطاف پذیری در تولید رنگدانه ها کمک کرده است تا این موجودات در طیف وسیعی از زیستگاه ها زنده مانده و به رشد و بقاء خود ادامه داده اند. از طرفی، تفاوت در جذب مواد مغذی و کارایی جذب می تواند منجر به واکنش های مختلف رنگدانه ها در شرایط استرس مواد مغذی گردد. علاوه بر این، مکانیزم های مختلف تثبیت کربن (مانند مسیرهای C3 و C4 مشابه) ممکن است بر واکنش تولید رنگدانه های متفاوت اثر گذار باشد. در نتیجه، واکنش های متنوع در تولید رنگدانه ها در میان گونه های مختلف می تواند با تاریخچه های تکاملی منحصر به فرد، سازگاری های بوم شناختی و قابلیت های متابولیکی آن ها توجیه شود. بنابراین، بهینه سازی مواد مغذی در گونه های مختلف یک استراتژی مهم در موفقیت کشت بوده و بر آن تاکید شده است.

در مطالعه حاضر، آنالیز داده های مربوط به تأثیر استفاده از نیترات سدیم، اوره، کلرید آمونیوم و نیترات آمونیوم به عنوان منابع نیتروژن بر میزان سنتز پلی ساکارید در زیتوده سیانوباکتری *Cyanothece sp.* در پایان دوره پرورش و فاز نمایی رشد بررسی شد که اختلاف معنی داری در بین منابع مختلف نیتروژن وجود داشت. حداکثر محتوی پلی ساکارید در تیمار نیترات سدیم به طور معنی داری بیشتر از تیمارهای اوره، کلرید آمونیوم و نیترات آمونیوم مشاهده شد. مرور منابع مختلف نشان داد که منابع نیتروژن مختلف اثرات متفاوتی بر تولید پلی ساکارید در سیانوباکتری ها داشته است. در برخی گونه ها حضور نیتروژن ترکیبی تولید را افزایش داد، در حالی که در برخی دیگر غیاب آن مؤثرتر بود. برای مثال، مطالعه بر روی تولید پلی ساکارید در سویه های مختلف سیانوباکتری *Cyanothece sp.* صورت گرفته است که نشان داد میزان تولید قند و پلی ساکاریدها در سویه های مختلف متفاوت از یکدیگر است. برای مثال، در سال ۲۰۰۷ مطالعه چاندونگ سو و همکاران شرایط بهینه کشت سویه *Cyanothece sp.* 113 برای تولید اگزوپلی ساکارید مطالعه کردند. براساس نتایج این تحقیق بالاترین میزان تولید اگزوپلی ساکارید به میزان ۱۸/۴ گرم در لیتر در محیط کشت اصلاح شده F/2 در مدت ۱۲ روز به دست آمد (۲۲). در مطالعه Anan Otero و همکاران (۲۰۰۳)، تأثیر دسترسی به نیتروژن بر سنتز اگزوپلی ساکارید محلول در سه سویه از جنس *Nostoc* با مورفولوژی های مختلف بررسی کردند. سنتز پلی ساکاریدهای خارج سلولی در هر سویه متفاوت مشاهده شد که نشان می دهد مکانیسم تولید پلی ساکارید در هر سویه اختصاصی بوده است.

نتایج مطالعه حاضر همچنین نشان داد که میزان تولید پلی ساکارید در تیمار بی کربنات پتاسیم و گلوکز بالاتر کربنات پتاسیم بوده است. به طور مشابه در مطالعه Ghosh و همکاران (۲۰۲۳)، استفاده از ۵ گرم در لیتر گلوکز باعث افزایش تولید کربوهیدرات شده است. این در حالی است که در مطالعه ای روی *Nostoc flagelliforme*، استفاده از گلوکز منجر به افزایش تولید پلی ساکارید خارج سلولی نشد (۲۳). اما در یک تحقیق بر روی *A. platensis* مشخص شد که استفاده از گلوکز در حالت میکسوتروفیک (ترکیب گلوکز و نور) منجر به تولید ۲۹۰ میلی گرم بر لیتر پلی ساکارید خارج سلولی شد (۲۴). این یافته ها نشان می دهد که پاسخ سیانوباکتری ها به منابع کربن مختلف می تواند متفاوت باشد. برخی گونه ها ممکن است از منابع کربن آلی مانند گلوکز برای افزایش تولید پلی ساکارید بهره ببرند، در حالی که برخی دیگر ممکن است به منابع کربن غیر آلی پاسخ بهتری دهند. بنابراین، بهینه سازی منبع کربن برای هر گونه خاص می تواند نقش مهمی در بهبود تولید پلی ساکارید داشته باشد.

نتیجه گیری نهایی

بر اساس نتایج به دست آمده از این تحقیق، اگرچه منابع مختلف نیتروژن و کربن مورد بررسی تأثیر معنی داری بر رشد و تولید زیتوده کلی سیانوباکتری *Cyanothece sp.* نشان ندادند، اما تأثیر معنی داری بر پروفایل رنگدانه ها و محتوی پلی ساکارید زیتوده داشتند. به طور مشخص، محیط کشت حاوی نیترات سدیم و بی کربنات پتاسیم تولید فیکوسیانین و پلی ساکارید را در زیتوده این سیانوباکتری به طور معنی داری افزایش داد. بنابراین، جهت تولید زیتوده غنی از فیکوسیانین و پلی ساکارید با ارزش از *Cyanothece sp.* استفاده از این منابع توصیه می گردد.

تشکر و قدردانی:

از همکاری های ارزشمند کارشناس فنی مرکز تحقیقات شیلات چابهار آقای خالد دشتی و آقای غفور چاکری که با دانش تخصصی خود به سرانجام رسیدن این تحقیق کمک شایانی کردند، تشکر و قدر دانی می کنم.

تعارض منافع:

در این مقاله موردی از تعارض منافع توسط نویسندگان گزارش نشده است.

تأییدیه اخلاقی: هیچ موردی توسط نویسندگان گزارش نشده است.

سهم نویسندگان: زهرا امینی خوئی: طراحی روش شناسی، فرضیات تحقیق، تحلیل داده ها، اندازه گیری داده ها و ارائه نسخه نهایی مقاله. المیرا عرفانی فر، بیژن آژنگ: جمع آوری نمونه ها و تحلیل های آزمایشگاهی و رقیه حیدری: آزمون های آزمایشگاهی تمامی نویسندگان موافق ارائه این مقاله به مجله علوم شیلاتی هستند.

منابع مالی/حمایت:

پژوهش حاضر حاصل پروژه تحقیقاتی با کد مصوب ۱۱۰۳۹-۱۱-۰۳۱-۱۲-۷۸-۴ موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور است.

منابع

1. Sharma Y, Singh GP, Singh CP. Biorefinery potential of *Dunaliella* (Chlorophyta) for production of value-added compounds. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*. 2024;18(5):1755–81.
2. Funari E, Testai E. Human health risk assessment related to cyanotoxins exposure. *Critical reviews in toxicology*. 2008;38(2):97–125.
3. Otero A, Vincenzini M. Extracellular polysaccharide synthesis by *Nostoc* strains as affected by N source and light intensity. *Journal of Biotechnology*. 2003;102(2):143–52.
4. Bandyopadhyay A, Elvitigala T, Welsh E, Stöckel J, Liberton M, Min H, Sherman LA, Pakrasi HB. Novel metabolic attributes of the genus *Cyanothece*, comprising a group of unicellular nitrogen-fixing cyanobacteria. *MBio*. 2011 Nov 1;2(5):10-128.5.
5. Guillard RR, Sieracki MS. Counting cells in cultures with the light microscope. *Algal culturing techniques*. 2005;239–52.
6. Zhu C, Lee Y. Determination of biomass dry weight of marine microalgae. *Journal of applied phycology*. 1997;9:189–94.
7. Karnjanawipagul P, Nittayanuntawech W, Rojsanga P, Suntornsuk L. Analysis of β -carotene in carrot by spectrophotometry. *Mahidol University Journal of Pharmaceutical Science*. 2010;37(8).
8. Karnjanawipagul P, Nittayanuntawech W, Rojsanga P, Suntornsuk L. Analysis of β -carotene in carrot by spectrophotometry. *Mahidol University Journal of Pharmaceutical Science*. 2010;37(8).
9. Karnjanawipagul P, Nittayanuntawech W, Rojsanga P, Suntornsuk L. Analysis of β -carotene in carrot by spectrophotometry. *Mahidol University Journal of Pharmaceutical Science*. 2010;37(8).
10. Tabarsa M, You S, Dabaghian EH, Surayot U. Water-soluble polysaccharides from *Ulva intestinalis*: Molecular properties, structural elucidation and immunomodulatory activities. *Journal of food and drug analysis*. 2018;26(2):599–608.
11. Inabe K, Miichi A, Matsuda M, Yoshida T, Kato Y, Hidese R, Kondo A, Hasunuma T. Nitrogen availability affects the metabolic profile in cyanobacteria. *Metabolites*. 2021 14;11(12):867.12.
12. Veaudor T, Cassier-Chauvat C, Chauvat F. Genomics of urea transport and catabolism in cyanobacteria: biotechnological implications. *Frontiers in microbiology*. 2019;10:2052.
13. Herrero A, Flores E. Genetic responses to carbon and nitrogen availability in *Anabaena*. *Environmental microbiology*. 2019;21(1):1–17.

14. Erratt KJ, Creed IF, Trick CG. Comparative effects of ammonium, nitrate and urea on growth and photosynthetic efficiency of three bloom-forming cyanobacteria. *Freshwater Biology*. 2018;63(7):626–38.
15. Kurkela J, Tyystjärvi T. Inorganic carbon sensing and signalling in cyanobacteria. *Physiologia Plantarum*. 2024;176(1):e14140.
16. Bajwa K, Bishnoi N, Kirrollia A, Selvan. ST (2018). A New Lipid Rich Microalgal SP *Scenedesmus Dimorphus* Isolated: Nile Red Staining and Effect of Carbon, Nitrogen Sources on its Physio-Biochemical Components. *European Journal of Sustainable Development Research*. 2018;2(4):43.
17. Tan X, Gu H, Ruan Y, Zhong J, Parajuli K, Hu J. Effects of nitrogen on interspecific competition between two cell-size cyanobacteria: *Microcystis aeruginosa* and *Synechococcus* sp. *Harmful Algae*. 2019;89:101661.
18. Norena-Caro DA, Malone TM, Benton MG. Nitrogen sources and iron availability affect pigment biosynthesis and nutrient consumption in *Anabaena* sp. UTEX 2576. *Microorganisms*. 2021;9(2):431.
19. Prabakaran P, Ravindran AD. Influence of different carbon and nitrogen sources on growth and CO₂ fixation of microalgae. *Adv Appl Sci Res*. 2012;3(3):1714–7.
20. Harutyunyan AA, Manoyan JG, Hambaryan LR, Gabrielyan LS. effect of various carbon sources on the growth properties and morphology of *spirulina platensis* proceedings of the Chemical and Biological Sciences. 2023;57(2 (261)):164–71.
21. Ma X, Mi Y, Zhao C, Wei Q. A comprehensive review on carbon source effect of microalgae lipid accumulation for biofuel production. *Science of the Total Environment*. 2022;806:151387.
22. Su C, Chi Z, Lu W. Optimization of medium and cultivation conditions for enhanced exopolysaccharide yield by marine *Cyanothece* sp. 113. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*. 2007;25:411–7.
23. Inabe K, Miichi A, Matsuda M, Yoshida T, Kato Y, Hidese R, Kondo A, Hasunuma T. Nitrogen availability affects the metabolic profile in cyanobacteria. *Metabolites*. 2021 Dec 14;11(12):867.
24. Trabelsi L, Ben Ouada H, Zili F, Mazhoud N, Ammar J. Evaluation of *Arthrospira platensis* extracellular polymeric substances production in photoautotrophic, heterotrophic and mixotrophic conditions. *Folia microbiologica*. 2013 Jan;58(1):39-45.

Effects of Different Nitrogen and Carbon Sources on Growth, Pigment Production, and Polysaccharide Content in the Halophilic Cyanobacterium *Cyanothece* sp.

Zahra Aminikhoei¹, Roghayeh Heidari¹, Elmira Erfanifir¹ and Bijan Ajang¹

1-Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Iranian Fisheries Science Research Institute (IFSRI), offshore fisheries Research Center, Chabahar, Iran.

ABSTRACT

This study investigated the impact of different nitrogen (sodium nitrate, urea, ammonium chloride, and ammonium nitrate) and carbon (sodium bicarbonate, sodium carbonate, and glucose) sources on the growth characteristics, biomass production, pigments, and polysaccharide content of the halophilic cyanobacterium *Cyanothece* sp. Growth trends were determined by cell density counting, and biomass was assessed by dry weight measurement. Pigment extraction and quantification were performed using spectrophotometry. Polysaccharide extraction was conducted using a hot water bath method at 80 °C. Based on the results, different nitrogen and carbon sources had no significant effect on the growth trend and biomass production of *Cyanothece* sp. However, the pigment profile and polysaccharide content of *Cyanothece* sp. biomass were significantly influenced by the different nitrogen and carbon sources in the culture medium. Among the tested treatments, the highest content of chlorophyll *a* and phycocyanin was obtained in the presence of sodium nitrate and potassium bicarbonate. The highest production of carotenoids and beta-carotene was observed in culture media containing urea or ammonium nitrate along with potassium carbonate. Comparison of the polysaccharide content in *Cyanothece* sp. biomass among different treatments showed that the culture medium containing sodium nitrate and potassium bicarbonate significantly increased biomass polysaccharide synthesis. Based on the results of this study, for producing *Cyanothece* sp. biomass rich in phycocyanin pigment with high polysaccharide content, it is recommended to use sodium nitrate and potassium bicarbonate as nitrogen and carbon sources, respectively.

KEYWORDS: Cyanobacteria, *Cyanothece* sp., Culture medium, Pigments, Polysaccharide

ARTICLE TYPE

Original Research

ARTICLE HISTORY

Received: 24 Dec. 2024

Accepted: 05 Mar. 2025

ePublished: 15 Mar. 2025

* Corresponding Author:

Email address:

Tel:

© Published by Tarbiat Modares University

ISSN: 2322-5513