

## Comparative study of growth, physiological and biochemical indices of blue-green alga *Spirulina platensis* in two Zarrouk and Johnson nutrient media under vanillin treatment

Nahid Pourbozorgi Rudsari<sup>1</sup>, Maryam Madadkar Haghjou<sup>1\*</sup>, Alireza Ghiasvand<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Lorestan University, Khorramabad, Iran

<sup>2</sup> Department of Chemistry, Faculty of Basic Sciences, Lorestan University, Khorramabad, Iran

### Abstract

The widespread use of vanillin in food and pharmaceutical industries increases the probability of entering to the waters and its positive or negative effects on growth and life of aquatic algae. Due to the nutritional and medical importance of *Spirulina platensis*, a blue-green micro-alga, the effect of vanillin on its growth and physiological characteristics was considered in two Zarrouk and Johnson media, on 0, 21, 27 and 33 days of a 42 days period. The highest dry weight was obtained in Zarrouk and then Zarrouk containing vanillin media, whilst the highest growth was observed in Zarrouk and then Johnson media. A positive and strong correlation ( $R^2=0.94$ ,  $p<0.01$ ) was observed between the turbidity of suspension at 560 nm with its dry weight. Vanillin reduced growth and dry biomass in all days of sampling, but in contrast increased the amount of lipid and protein in both media. The amounts of chlorophyll a, carotenoids, phycocyanin, allophycocyanin, phycoerythrin, astaxanthin, phenol, carbohydrate and lipid peroxidation were often higher in Johnson medium (without vanillin). Although, the recent medium in most cases induced the maximum cell productions, but Zarrouk medium, compared to the Zarrouk containing vanillin medium, showed some inverse results. In general, although vanillin led to a reduction in algal growth and biomass, but in cases where valuable products such as antioxidants, pigments, lipid compounds, protein, carbohydrates and phenols are considered, it can be used as an inducing factor of production.

**Keywords:** Johnson medium, Lipid, Phenol, *Spirulina platensis*, Vanillin, Zarrouk medium

---

\* Corresponding Author: madadkar.m@lu.ac.ir

## بررسی مقایسه‌ای شاخص‌های رشد، فیزیولوژیک و بیوشیمیایی جلبک سبز - آبی *Spirulina platensis* در دو محیط کشت غذایی Johnson و Zarrouk بر اثر تیمار وانیلین

ناهید پوربزرگی رودسری<sup>۱</sup>، مریم مددکار حق جو<sup>۱\*</sup>، علیرضا غیاثوند<sup>۲</sup>

<sup>۱</sup> گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران

<sup>۲</sup> گروه شیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران

### چکیده

استفاده گسترده از ترکیب فنلی وانیلین در صنایع غذایی و دارویی، احتمال راه‌یابی آن به آب‌ها و تأثیر گذاری آن را بر فیزیولوژی و زیست جلبک‌های آبزی افزایش می‌دهد. به دلیل اهمیت غذایی و دارویی ریزجلبک سبز - آبی *Spirulina platensis* تأثیر وانیلین در دوره ۴۲ روزه در دو محیط کشت Johnson و Zarrouk در روزهای صفر، ۲۱، ۲۷ و ۳۳ رشد بر شاخص‌های فیزیولوژیک و رشد این جلبک بررسی شد. بیشترین مقدار وزن خشک در محیط کشت Zarrouk و سپس Zarrouk حاوی وانیلین به دست آمد؛ در حالی که بیشترین میزان رشد (برحسب کدورت (Turbidity)) در محیط کشت Zarrouk و سپس Johnson مشاهده شد. همبستگی مثبت و قوی ( $R^2=0/94$  و  $P \leq 0/01$ ) میان میزان کدورت سوسپانسیون در طول موج ۵۶۰ نانومتر و مقدار وزن خشک جلبک مشاهده شد. وانیلین کاهش مقدار رشد و زیتوده خشک را در همه روزهای نمونه‌برداری و برعکس، افزایش مقدار لیپید و پروتئین سلولی را در هر دو محیط کشت سبب شد. مقادیر رنگدانه‌های کلروفیل a، کاروتنوئید، فیکوسیانین، آلفوئیکوسیانین، فیکواریترین و آستاگزانتین، میزان فنل، کربوهیدرات و پراکسیداسیون لیپیدی در محیط کشت Johnson بدون وانیلین، غالباً بیشتر بودند و این محیط در بیشتر موارد، بیشینه ترکیبات تولیدشده سلولی را داشت؛ اما محیط کشت Zarrouk (در مقایسه با Zarrouk حاوی وانیلین)، در برخی موارد حالت عکس نشان داد. در مجموع، اگرچه وانیلین ممکن است کاهش رشد و زیتوده جلبکی را سبب شود، وقتی که افزایش برخی تولیدات ارزشمند سلول‌های جلبک مانند آنتی‌اکسیدان‌ها، رنگدانه‌ها، ترکیبات لیپیدی، پروتئین، کربوهیدرات و فنل در سلول‌های جلبکی مد نظر باشد، می‌توان از تأثیر القاکنندگی آن بهره برد.

**واژه‌های کلیدی:** فنل، لیپید، محیط کشت جانسون، محیط کشت زاروک، وانیلین، اسپیرولینا پلاتنسیس

## مقدمه

اما آثار ضدتوموری، ضدمتاستازی، آنتی‌اکسیدانی و ضدجوش‌زایی وانیلین نیز در مدل‌های جانوری به اثبات رسیده است که برای آن نقشی در کنترل تعداد و فعالیت سلول پیشنهاد می‌کند (Bezerra *et al.*, 2016). مواردی از تأثیر این ماده بر پیکر موجودات زنده بر اثر راه‌یافتن به محیط‌های آبی بررسی شده است. برخی فعالیت‌های زیستی وانیلین در ماهی (Brooke and Anderson, 1984)، بی‌مهرگان آبی (Källqvist, 1996)، کرم‌های خاکی (Hartenstein, 1982)، مخمر (Fitzgerald *et al.*, 2004) و جلبک‌ها (Miazek, 2012) به صورت ممانعت از رشد سلول‌ها شناخته شده است. پژوهش‌ها نشان داده‌اند وانیلین و برخی ترکیبات فنلی بر رشد تعداد زیادی از جلبک‌های سبز مانند *Chlorella vulgaris*، *Dunaliella* (Scragg, *Platymonas subcordiformis* *salina* و *Phaeodactylum tricornutum*، 2006) و *Skeletonema costatum* (Duan *et al.*, 2017) اثر مهاری دارند؛ درحالی‌که در برخی غلظت‌ها رشد جلبک‌های قرمز را تحریک نیز می‌کنند (Fries, 1974). یکی از دلایل احتمالی برای تحریک رشد سلول بر اثر تیمار با وانیلین، استفاده جلبک از فنل به صورت منبع غذایی و نیز تجزیه زیستی فنل‌ها و در نتیجه، کاهش مقدار آنها بیان شده است (Al-fawwaz *et al.*, 2016; Samanthakamani and Thangaraju, 2015; El-Sheekh *et al.*, 2012; Klekner and Kosaric, 2008; Semple and Cain, 1996).

*Spirulina* جلبک چندسلولی و رشته‌ای - مارپیچی از گروه سیانوباکتری‌ها یا جلبک‌های سبز - آبی فتوسنتزکننده است. بین گونه‌های مختلف

ترکیبات فنلی، گروه بزرگی از ترکیبات آلی با فرمول پایه  $C_6H_5OH$  و محلول در آب‌اند. این ترکیبات در انواع مصنوعی که بشر تولید کرده است و انواع طبیعی (در سلول‌های گیاهی) هستند. انواع صنعتی آنها به دلیل داشتن قابلیت‌های فراوان در بسیاری از صنایع مانند تولید نایلون، شوینده‌ها، گندزداها، قارچ‌کش‌ها و صنایع غذایی اهمیت زیادی دارند و به دلیل گستردگی استفاده، آلاینده‌گی محیط‌های آبی را موجب شده‌اند (Gimeno *et al.*, 2005; Singh and Singh, 2002; Babich and Davis, 1981). از گروه ترکیبات فنلی، به وانیلین در صنایع غذایی توجه فراوان شده است. وانیلین یا ۴-هیدروکسی ۳-متوکسی بنزالدهید ( $C_8H_8O_3$ )، به‌طور طبیعی در دانه گیاه *Vanilla planifolia* یافت می‌شود. وانیلین یکی از محبوب‌ترین ادویه‌های موجود در جهان پس از هل و زعفران است (Gallage *et al.*, 2018; Baqueiro-Peña and Guerrero-Beltrán, 2017; Walton *et al.*, 2000). تقاضای جهانی برای مصرف وانیلین با روند افزایشی سالیانه بیش از ۱۶۰۰۰ تن در سال معادل ۱۱ تا ۱۲ درصد برآورد شده است (Xu *et al.*, 2007). در حال حاضر از وانیلین در مقیاس وسیع برای بهبود طعم غذاها و نیز در عطرسازی، پزشکی و صنایع دارویی استفاده می‌شود (Baqueiro-Peña and Guerrero-Beltrán, 2017). زیرا ترکیب فنلی وانیلین خواص ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدانی قوی دارد (Walton *et al.*, 2003). سازمان غذا و داروی آمریکا (USFDA) وانیلین را برای مصارف آرایشی، عطر و استفاده در طعم‌دهنده‌ها ایمن دانسته است (Jenkins and Erraguntla, 2014)؛

ضد توموری استفاده می‌شود (Ambati et al., 2014). *Spirulina* همچنین حاوی فنل است و پژوهش‌هایی در زمینه افزایش محتوای فنلی این جلبک با تغییر شرایط محیطی مانند شدت نور انجام شده‌اند (Kepekçi and Saygideger, 2012).

برخی آزمایش‌های انجام‌شده نشان داده‌اند مقدار و نوع ترکیبات ارزشمند درون جلبک با تغییر شرایط محیطی و نوع مواد در دسترس جلبک، مانند نیتروژن، فسفر، شوری، اسیدیته و غیره تغییر می‌کنند (Sharma et al., 2012; Battah et al., 2013; Ghobadian et al., 2015; Mazang-Ghasemi et al., 2016). بر همین اساس، تجمع و تغییر در مقدار لیپیدها، پروتئین‌ها، فنل‌ها و ترکیبات آنتی‌اکسیدانی جلبک‌ها بر اثر برخی محرک‌ها و عوامل محیطی مشاهده شده‌اند (Colla et al., 2007b; Narayan et al., 2005; Soni et al., 2012). به‌طور کلی، در پژوهش حاضر علاوه بر بررسی تأثیر وانیلین به‌عنوان ترکیب فنلی آلاینده بر میزان رشد و زیتوده جلبک، احتمال افزایش تولیدات ارزشمند و متفاوت جلبک *Spirulina platensis* مانند پروتئین، کربوهیدرات، چربی، فنل و رنگدانه‌ها نیز بر اثر تیمارهای نوع محیط کشت (Johnson و Zarrouk) و وانیلین با غلظت ۳۰ میلی‌گرم در لیتر بررسی و مقایسه شد.

### مواد و روش‌ها

**آماده‌کردن محیط‌کشت‌های جلبکی و طراحی تیمارها:** جلبک *Spirulina platensis* از کلکسیون جلبکی دانشگاه لرستان تهیه شد و همه مواد لازم برای تهیه محیط‌کشت‌ها از شرکت‌های سیگما یا مرک تهیه شدند. محیط‌کشت Zarrouk

*Spirulina* گونه *Spirulina platensis* پراکنش وسیع‌تری دارد و از نظر غذایی بسیار حائز اهمیت است؛ از این رو پژوهش‌های بسیاری در زمینه صنایع غذایی و دارویی بر آن انجام شده است (Deng and Chow, 2010; Hoseini and Mozafari, 2013). نتایج آنالیز شیمیایی ریزجلبک *Spirulina* نشان می‌دهند این جلبک سرشار از ریزمغذی‌ها و عناصر لازم برای سلامت انسان مانند پروتئین‌ها، ویتامین‌ها، آمینواسیدهای ضروری، مواد معدنی تغذیه‌ای و اسیدهای چرب ضروری است. گونه‌های جنس *Spirulina* به دلیل داشتن منبع پروتئینی و غذایی و فواید درمانی گسترده مانند بهبود سیستم ایمنی، ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی، ضدسرطانی، ضدویروسی و ضدباکتریایی اهمیت دارد آثار مثبت بر سوء تغذیه، دیابت، سمی‌بودن فلزهای سنگین، مواد شیمیایی، واکنش‌های آلرژیک ضدالتهابی، آسیب‌های رادیکال‌های آزاد و کم‌خونی هستند (Setyaningsih et al., 2015; Benemann 2013; Hoseini and Mozafari, 2013; Colla et al., 2007a). جلبک *Spirulina* منبع رنگدانه‌های زیستی فیکوبیلی‌پروتئین، مانند فیکوسیانین و آلفوفیکوسیانین است که ارزش غذایی و دارویی دارند (Yaakob et al., 2014). این جلبک همچنین حاوی آستاگزانتین (۳، ۳'-دی هیدروکسی-β، β'-کاروتن - ۴، ۴' دایون) است که کاروتنوئیدی از نوع گرانتوفیل است و به‌صورت مکمل غذایی مفید حاوی عوامل آنتی‌اکسیدان و

آثار شدید و کشنده بر سوسپانسیون سلولی نداشته باشد؛ اما آثار تحریک‌کنندگی محتمل آن بر رشد و تغییر مقدار برخی ترکیبات درون‌سلولی جلبک میسر شوند. pH همه محیط‌کشت‌ها روی  $9/5 \pm 0$  تنظیم شد. توده زیستی جلبکی به مقدار ۲ گرم بر لیتر وزن تر (۵۰ میلی‌گرم بر لیتر وزن خشک) و با کدورت (Turbidity)  $0/02$  (در طول موج ۵۶۰ نانومتر) در شرایط استریل به محیط‌کشت‌ها اضافه شد (روز صفر). نمونه‌ها برای رشد، به مدت ۴۲ روز در دمای  $28 \pm 2$  درجه سانتی‌گراد، شرایط نوری ۱۰۰ میکرومول فوتون بر متر مربع بر ثانیه، دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی - ۸ ساعت تاریکی و هوادهی قرار گرفتند. ارزیابی کدورت نوری، زیتوده تر (وزن تر) و بیوماس خشک (وزن خشک) جلبک هر ۳ روز یک‌بار انجام شدند و برای اندازه‌گیری و ارزیابی شاخص‌های فیزیولوژیک و بیوشیمیایی، نمونه برداری‌ها در روزهای ۲۱ (مرحله صعودی یا لگاریتمی رشد)، روز ۲۷ (ابتدای مرحله سکون)، و روز ۳۳ (تقریباً انتهای مرحله سکون) انجام شدند. برای استخراج کامل ترکیبات درون‌سلولی جلبک از روش فریزکردن در دمای  $20-$  درجه سانتی‌گراد و آب‌کردن بافت تر و نیز روش سونیکیشن (مدل SONIC 4D، شرکت James، انگلستان) (سه مرتبه، هر بار ۵ دقیقه در ۸۰ هرتز) استفاده شد (Morales *et al.*, 2011).

#### شاخص‌های رشد و زیتوده جلبک: در

پژوهش حاضر، ارزیابی میزان رشد و تکثیر سلولی با روش سنجش کدورت سوسپانسیون جلبکی در طول موج ۵۶۰ نانومتر انجام شد و سنجش وزن تر و وزن خشک جلبک نیز هر سه روز یک‌بار انجام

(Raouf *et al.*, 2006) و محیط‌کشت Johnson (Johnson *et al.*, 1968) تغییر یافته Shariati و Lilley (۱۹۹۴) به این ترتیب آماده شدند. محیط‌کشت Zarrouk حاوی  $K_2HPO_4$  (۰/۵ گرم در لیتر)،  $NaNO_3$  (۲/۵ گرم در لیتر)،  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  (۰/۲ گرم در لیتر)،  $K_2SO_4$  (۱ گرم در لیتر)،  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  (۰/۰۴ گرم در لیتر)،  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  (۰/۰۱ گرم در لیتر)، EDTA (۰/۰۸ گرم در لیتر)،  $H_3BO_3$  (۲/۸۶ گرم در لیتر)،  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$  (۱/۸۱ گرم در لیتر)،  $ZnSO_4 \cdot 4H_2O$  (۰/۲۲ گرم در لیتر)،  $Na_2MoO_4$  (۰/۰۱۸ گرم در لیتر)،  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  (۰/۰۷۹ گرم در لیتر)،  $NaCl$  (۱ گرم در لیتر) و  $NaHCO_3$  (۱۶/۵ گرم در لیتر) و محیط‌کشت Johnson حاوی  $KH_2PO_4$  (۵ میلی‌مولار)،  $KNO_3$  (۵ میلی‌مولار)،  $MgSO_4$  (۵ میلی‌مولار)،  $CaCl_2$  (۵ میلی‌مولار)،  $FeCl_3$  (۵ میلی‌مولار)،  $Na_2-EDTA$  (۵ میلی‌مولار)،  $CoCl_2$  (۱ میلی‌مولار)،  $MnCl_2$  (۱ میلی‌مولار)،  $ZnCl_2$  (۱ میلی‌مولار)،  $(NH_4)_6MoO_7 \cdot 4H_2O$  (۱ میلی‌مولار)،  $NaCl$  (۱ گرم در لیتر)،  $NaHCO_3$  (۱۳/۶ گرم در لیتر) تهیه شدند.

برای اعمال تیمار وانیلین، به هریک از محیط‌کشت‌های Johnson و Zarrouk مقدار ۳۰ میلی‌گرم بر لیتر وانیلین اضافه شد تا به ترتیب محیط‌کشت Johnson دارای وانیلین و محیط‌کشت Zarrouk دارای وانیلین به دست آیند. میزان وانیلین براساس منابع (Miazek, 2012; Akbari and Madadkar Haghjou, 2018a) و نیز برخی آزمایش‌های مقدماتی به گونه‌ای انتخاب شد که

در رابطه ۲،  $\mu_m$ ، بیشترین سرعت رشد ویژه (maximum specific growth rate)؛  $X_1$ ، وزن خشک توده سلولی در زمان  $t_1$  و  $X_2$ ، وزن خشک توده سلولی در زمان  $t_2$  را نشان می‌دهد. زمان‌های  $t_1$  و  $t_2$  به ترتیب، زمان‌های ابتدا و انتهای دوره در فواصل زمانی روز صفر تا روز ۲۱، روز ۲۱ تا روز ۲۷ و روز ۲۷ تا روز ۳۳ هستند (Madkour *et al.*, 2012).

$$\text{رابطه ۳: } t_d (\text{day}) = \ln 2 / \mu = 0.693 / \mu$$

در رابطه ۳،  $t_d$ ، زمان دو برابر شدن توده سلولی و  $\mu$ ، بیشترین سرعت رشد ویژه به دست آمده از رابطه ۲ را نشان می‌دهد.

#### سنجش شاخص‌های فیزیولوژیک و بیوشیمیایی

**سنجش کلروفیل a:** از حلال متانول ۹۵ درصد برای استخراج کلروفیل استفاده شد. بدین منظور رسوب جلبکی از سانتریفیوژ سلول‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در ۶۰۰۰ g به دست آمد؛ سپس لوله حاوی نمونه، در حمام آب گرم ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه نگهداری و دهانه لوله برای کاهش تبخیر متانول با پارافیلیم بسته شد. لوله مزبور در دمای آزمایشگاه، سرد و به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۱۰۰۰۰ g سانتریفیوژ شد؛ سپس محتوای کلروفیل a براساس جذب نوری عصاره متانولی با دستگاه اسپکتروفوتومتر (مدل 6405، شرکت JEN WAY، آمریکا) در طول موج ۶۶۵ نانومتر مطابق با روش Bennett و Bogorad (۱۹۷۳) محاسبه و برحسب میلی‌گرم رنگدانه در گرم وزن خشک جلبک گزارش شد.

#### سنجش کاروتنوئید: برای اندازه‌گیری

کاروتنوئید کل، رسوب جلبکی حاصل از سانتریفیوژ سوسپانسیون سلولی به مدت ۱۵ دقیقه در

شد. همچنین برخی دیگر از شاخص‌های رشد جلبک برحسب وزن خشک و رابطه‌های مربوطه محاسبه شدند.

#### ارزیابی تکثیر توده سلولی جلبک با روش

**کدورت‌سنجی:** میزان رشد با سنجش کدورت سوسپانسیون سلولی *S. platensis* در طول موج ۵۶۰ نانومتر (Choudhary *et al.*, 2007) هر ۳ روز یک بار با دستگاه اسپکتروفوتومتر ۹۶ چاهکی (مدل Eposh، شرکت BioTek، انگلستان) ارزیابی شد.

#### اندازه‌گیری وزن تر و وزن خشک جلبک:

برای اندازه‌گیری وزن تر جلبک، مقادیر همگنی از سوسپانسیون سلولی به مدت ۱۵ دقیقه در ۶۰۰۰ g سانتریفیوژ شد و برای حذف هرگونه نمک، سطح زیتوده تر جلبک، ۲ تا ۳ بار با آب دو بار تقطیر شستشو داده شد و پس از خارج کردن کامل محلول رویی، توزین شد. برای اندازه‌گیری وزن خشک، زیتوده تر به دست آمده به مدت ۸ ساعت در دمای ۷۵ درجه سانتی‌گراد داخل آون، خشک و سپس توزین شد. وزن تر و وزن خشک براساس گرم در لیتر گزارش شدند.

#### محاسبه برخی دیگر از شاخص‌های رشد

**جلبک:** از رابطه‌های ۱، ۲ و ۳ برای محاسبه شاخص‌های مد نظر استفاده شد.

$$\text{رابطه ۱: } P_x (\text{mg/L/day}) = (X_m - X_i) / t_m$$

در رابطه ۱،  $P_x$ ، تولیدات سلولی (Cell productivity) برحسب وزن خشک؛  $X_m$ ، مقدار بیشینه توده سلولی برحسب میلی‌گرم وزن خشک در لیتر؛  $X_i$ ، مقدار اولیه توده سلولی برحسب میلی‌گرم وزن خشک در لیتر و  $t_m$ ، سن کشت (روز) را نشان می‌دهد (Madkour *et al.*, 2012).

$$\text{رابطه ۲: } \mu_m (\text{division/day}) = \ln(x_2 - x_1) / (t_2 - t_1)$$

جلبک (Pan-Utai *et al.*, 2017) گزارش شدند  
(Bennett and Bogorad, 1973).

$$\text{PC } (\mu\text{g/ml}) = (\text{OD615} - 0.474 \times \text{OD652}) / 5.34$$

$$\text{APC } (\mu\text{g/ml}) = (\text{OD652} - 0.208 \times \text{OD615}) / 5.09$$

$$\text{PE } (\mu\text{g/ml}) = ((\text{OD562} - (2.41 \times \text{PC}) - (0.849 \times \text{APC})) / 9.62$$

رابطه ۸:

$$\text{Total phycobiliprotein } (\mu\text{g/ml}) = \text{PC} + \text{APC} + \text{PE}$$

$$\text{Pigment } (\text{mg/g}) = \frac{\text{حجم} \times \text{غلظت رنگدانه}}{\text{وزن خشک}} \quad \text{رابطه ۹:}$$

در رابطه‌های ۵ تا ۸، OD، جذب در طول موج خاص؛ PC، فیکوسیانین؛ APC، آلفوکوسیانین و PE، فیکواریترین را نشان می‌دهد.

#### سنجش آستاگزانتین: برای اندازه‌گیری

آستاگزانتین، پس از افزودن محلول دی‌متیل سولفوکسید (DMSO) به ۵۰ میلی‌گرم رسوب خشک جلبک، نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در حمام آب گرم ۶۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند و چندین بار به شدت ورتکس (مدل 2 Vortex، شرکت IKA، انگلستان) و سپس ۵ دقیقه با سرعت ۴۶۰۰ دور بر دقیقه سانتریفیوژ شدند. مایع رویی برداشت شد و پس از افزودن استون به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۳۵۰۰ دور بر دقیقه دوباره سانتریفیوژ شد؛ سپس محلول در ۶۰۰۰ g به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ و میزان جذب محلول مد نظر با دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل 6405، شرکت JEN WAY، آمریکا) در طول موج ۴۸۲ نانومتر خوانده شد. مقدار آستاگزانتین براساس روش Régnier و همکاران (۲۰۱۵) و با احتساب ضریب خاموشی  $10^5 \times 1/25$  لیتر بر مول بر سانتی‌متر، محاسبه و برحسب

دور ۶۰۰۰ g، دو تا سه بار با آب مقطر شستشو داده شد و سپس با ۲ تا ۳ میلی‌لیتر استون ۸۵ درصد مخلوط شد. سوسپانسیون دوباره به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۱۰۰۰۰ سانتریفیوژ شد و محلول رویی حاوی رنگدانه برداشت شد. مقدار جذب در طول موج ۴۵۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل 6405، شرکت JEN WAY، آمریکا) خوانده شد و مقدار کاروتنوئید براساس رابطه ۴ محاسبه و برحسب میلی‌گرم رنگدانه در گرم وزن خشک جلبک گزارش شد (Devanathan and Ramanathan, 2013).

$$\text{Car} = (\text{D} \times \text{V} \times \text{F}) / (2500 \times 100) \quad \text{رابطه ۴:}$$

در رابطه ۴، D، جذب نوری در طول موج ۴۵۰ نانومتر؛ V، حجم عصاره استخراج شده و F، ضریب رقت را نشان می‌دهد.

#### سنجش فیکوبیلی پروتئین‌ها:

فیکوبیلی پروتئین‌ها از رسوب جلبکی به دست آمده از سانتریفیوژ سوسپانسیون سلولی در ۶۰۰۰ g به مدت ۱۵ دقیقه، با افزودن بافر نمکی فسفات (M) ۰/۰۵ با pH=۷ استخراج شدند (Morales *et al.*, 2011). پس از سانتریفیوژ، جذب محلول رویی در طول موج‌های مندرج در رابطه‌های ۵ تا ۸ با دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل Epoch، شرکت BioTek، انگلستان) خوانده شد و مقدار رنگدانه‌های فیکوبیلین شامل فیکوسیانین (Phycocyanin)، آلفوکوسیانین (Allophycocyanin)، فیکواریترین (Phycoerythrin) و فیکوبیلی پروتئین کل (Total phycobiliprotein) با رابطه‌های ۵ تا ۸ برحسب میکروگرم بر میلی‌لیتر محاسبه شدند؛ سپس با رابطه ۹ برحسب میلی‌گرم رنگدانه در گرم وزن خشک

میکرو گرم رنگدانه بر گرم وزن خشک جلبک گزارش شد.

**سنجش کربوهیدرات کل:** اندازه‌گیری کربوهیدرات کل بر مبنای روش Albalasmeh و همکاران (۲۰۱۳) انجام شد و پس از افزودن اسید سولفوریک به سوسپانسیون همگن جلبکی، محلول بدست آمده به سرعت مخلوط و ورتکس شد و پس از افزایش دمای آن، سپس محلول به سرعت روی یخ سرد شد و تغییرات جذب نوری محلول با دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل Epoch، شرکت BioTek، انگلستان) در ۳۱۵ نانومتر خوانده شد. از D-گلوکز برای رسم نمودار استاندارد استفاده شد و نتایج بر حسب درصد در وزن خشک جلبک ارائه شدند.

**سنجش پروتئین محلول:** پروتئین محلول بر مبنای روش Bradford (۱۹۷۶) با کوماسی برلیانت بلو و خواندن جذب نمونه در طول موج ۵۹۵ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل Epoch، شرکت BioTek، انگلستان) اندازه‌گیری شد. برای ترسیم نمودار استاندارد از سرم آلبومین گاوی (BSA) استفاده شد و نتایج بر حسب درصد در وزن خشک گزارش شدند.

**سنجش لیپید کل:** برای استخراج محتوای لیپیدی، از محلول ۲:۱ (حجمی - حجمی) کلروفرم:متانول استفاده شد. پس از انجام ورتکس و عمل سونیکیشن زیتوده جلبکی (۳ بار، هر بار به مدت ۵ دقیقه و در ۸۰ هرتز)، مقدار ۲/۵ میلی لیتر کلروفرم دوباره به محلول اضافه و ورتکس انجام شد. پس از صاف کردن محلول، مقدار ۲/۵ میلی لیتر آب مقطر، اضافه و در g ۱۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد؛ سپس مایع رویی آن جدا و در آون، خشک و توزین شد. مقدار لیپید، پس از

کاستن مقدار وزن رنگدانه‌های محلول در فاز آلی، مانند کلروفیل و کاروتنوئید، بر حسب میکروگرم در گرم وزن خشک جلبک محاسبه و گزارش شد (Bligh and Dyer, 1959).

**سنجش محتوای فنل کل:** استخراج و اندازه‌گیری فنل کل بر اساس روش Lee و همکاران (۲۰۱۲) انجام شدند. پس از مخلوط کردن نمونه جلبکی با معرف فولین - سیو کالتیو، محلول سدیم کربنات ۲۰ درصد به نمونه اضافه و به خوبی ورتکس شد؛ سپس نمونه‌ها در تاریکی و دمای آزمایشگاه به مدت ۲ ساعت نگهداری شدند. میزان جذب آنها در طول موج ۷۶۵ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل Epoch، شرکت BioTek، انگلستان) خوانده شد. برای رسم نمودار استاندارد از گالیک اسید استفاده شد و نتایج بر حسب درصد فنل در ماده خشک گزارش شدند.

**سنجش میزان پراکسیداسیون لیپیدی:** میزان پراکسیداسیون لیپیدی با ارزیابی مقدار مالون دی آلدئید سنجیده شد. پس از سانتریفیوژ سوسپانسیون همگن جلبکی در g ۶۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه و خارج کردن مایع رویی، افزودن محلول آب:اتانول با نسبت ۸۰:۲۰ حجمی - حجمی به رسوب جلبکی انجام شد. نمونه در g ۶۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ و سپس تیوباریتوریک اسید ۰/۶ درصد به مایع رویی اضافه شد. نمونه به شدت ورتکس شد و در حمام آب گرم در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۲۵ دقیقه قرار گرفت. پس از سرد کردن نمونه روی یخ، دوباره سانتریفیوژ انجام شد. میزان جذب در طول موج‌های ۴۴۰، ۵۳۲ و ۶۰۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل

ترسیم نمودارها با نرم‌افزار Excel نسخه ۲۰۱۶ انجام شد. تحلیل آماری داده‌ها به صورت آنالیز واریانس یک طرفه و با نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۰ انجام شد. میزان همبستگی با آزمون همبستگی (Correlation) و ضریب پیرسون محاسبه شد و مقایسه میانگین‌ها براساس آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح احتمال  $P \leq 0.05$  انجام شد.

### نتایج

**تغییرات رشد سوسپانسیون سلولی جلبک S. platensis براساس میزان کدورت و تغییرات مقدار وزن خشک در دوره ۴۲ روزه:** شکل ۱- A تغییرات میزان کدورت سوسپانسیون سلولی جلبک *S. platensis* را براساس جذب در طول موج ۵۶۰ نانومتر در دو محیط کشت Johnson و Zarrouk بدون تیمار وانیلین (شاهد) و نیز دارای وانیلین با غلظت ۳۰ میلی‌گرم در لیتر نشان می‌دهد. در دوره ۴۲ روزه، میزان کدورت سوسپانسیون سلولی از مقدار حداقل در آغاز دوره در هر چهار محیط کشت به تدریج افزایش یافت و پس از تقریباً ۲۷ روز به بیشترین مقدار خود رسید. پس از این زمان، مرحله ایستایی رشد آغاز شد و سپس از حدود روز ۳۳ کاهش تدریجی مقدار کدورت سلولی مشاهده شد. براساس نتایج آنالیز واریانس (جدول ۱)، تفاوت آثار اصلی و متقابل نوع محیط کشت و نیز تیمار وانیلین بر شاخص کدورت نوری معنی‌دار بود ( $P \leq 0.01$ ) و محیط کشت Zarrouk و پس از آن محیط کشت Johnson در مدت بیشتری از دوره، بیشترین رشد را موجب شدند. محیط کشت‌های حاوی وانیلین، رشد کم را نسبت به محیط کشت‌های بدون وانیلین نشان دادند و کمترین میزان رشد در محیط کشت Johnson حاوی وانیلین به دست آمد.

Epoch، شرکت BioTek، انگلستان) خوانده شد و مقدار مالون‌دی‌آلدهید براساس روش Hodges و همکاران (۱۹۹۹) محاسبه و برحسب درصد مالون‌دی‌آلدهید در توده خشک گزارش شد.

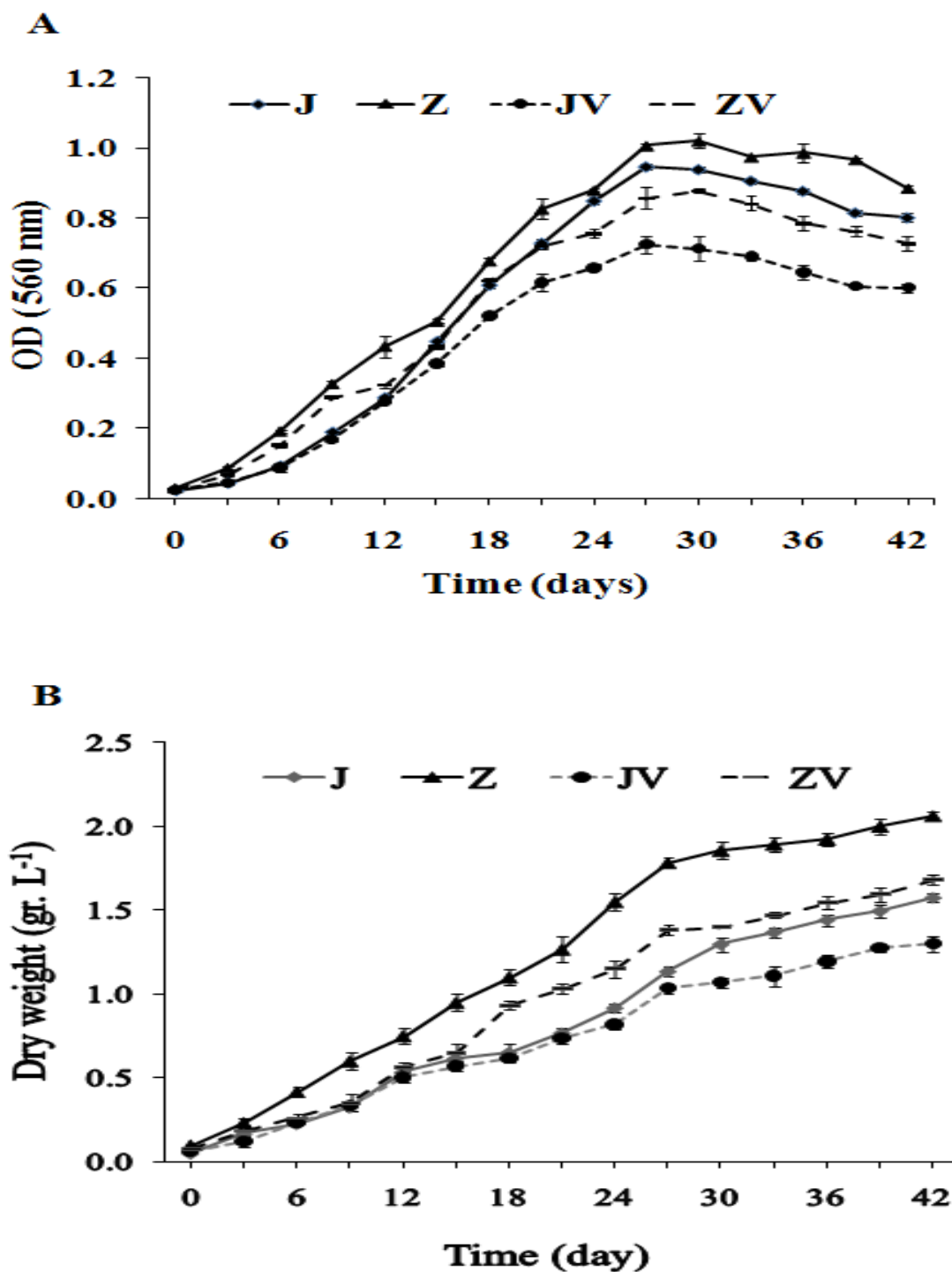
**سنجش فعالیت آنتی‌اکسیدانی سلول (درصد مهار ۱ و ۱- دی فنیل -۲- پیکریل هیدرازیل):** فعالیت آنتی‌اکسیدانی سلول بر مبنای روش Shanab و Shalaby (۲۰۱۳) سنجش شد. برای استخراج، رسوب جلبکی پس از سانتریفیوژ با حلال متانول:اتانول با نسبت ۱:۱۰ (حجمی - حجمی) مخلوط شد؛ سپس به ۱/۵ میلی‌لیتر محلول جلبکی، ۲۵۰ میکرولیتر محلول ۱ و ۱- دی فنیل -۲- پیکریل هیدرازیل (DPPH) در متانول اضافه شد. پس از انکوباسیون در دمای اتاق به مدت ۳۰ دقیقه، جذب در طول موج ۵۲۰ نانومتر با اسپکتروفوتومتر (مدل Epoch، شرکت BioTek، انگلستان) اندازه‌گیری و فعالیت آنتی‌اکسیدانی با رابطه ۹ برحسب درصد محاسبه شد.

$$\text{رابطه ۹} \quad \text{Activity (\%)} = \frac{Ac - At}{Ac} \times 100$$

در رابطه ۹، Activity، فعالیت برحسب درصد مهارکنندگی ۱ و ۱- دی فنیل -۲- پیکریل هیدرازیل؛ At، جذب نمونه عصاره و Ac، جذب محلول ۱ و ۱- دی فنیل -۲- پیکریل هیدرازیل متانولی بدون عصاره (نمونه بلانک) را نشان می‌دهد.

در ارزیابی شاخص‌ها برای اطمینان از تخلیه مواد و ترکیبات درون سلولی از چندین بار فریز کردن نمونه در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد و گرم کردن دوباره آن و نیز سونیکیشن با سه بار تکرار و هر بار ۵ دقیقه در ۸۰ هرتز استفاده شد.

**تحلیل آماری:** آزمون‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی در دو نوع محیط کشت و چهار زمان به صورت فاکتوریل در ۳ تکرار انجام شدند. محاسبات داده‌ها و



شکل ۱- روند تغییرات کدورت (Turbidity) سوسپانسیون سلولی جلبک *Spirulina platensis* براساس جذب در طول موج ۵۶۰ نانومتر (A) و روند تغییرات وزن خشک جلبک (B) در محیط کشت‌های Johnson (J)، Zarrouk (Z)، Johnson دارای وانیلین (JV)، و Zarrouk وانیلین (ZV) در یک دوره رشد ۴۲ روزه- مقادیر، میانگین سه تکرار  $\pm$  SD هستند. حروف متفاوت، بیان‌کننده تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال  $P \leq 0/05$  براساس آزمون دانکن هستند.

جدول ۱- میانگین مربعات جدول تجزیه واریانس شاخص‌های ارزیابی شده جلبک *S. platensis* بر اثر نوع محیط کشت استفاده شده (Johnson یا Zarrouk)، تیمار وانیلین و زمان یا روز نمونه‌برداری در مدت دوره رشد (روزهای صفر، ۲۱، ۲۷، ۳۳): PC (فیکوسیائین)، APC (آلوفیکوسیائین)، PE (فیکواریترین)، PBP (فیکوبیلین کل) و MDA (مالون‌دی‌آلدهید)

منبع تغییرات	درجه آزادی	وزن خشک	کدورت	کلروفیل a	کاروتنوئید	آستاگزاتین	PC	APC
محیط کشت	۱	۰/۹۸۸**	۰/۰۵۸**	۴/۸۸۷**	۵/۷۹۹**	۰/۰۰۱**	۱۴۵/۳**	۴۷۴/۷**
وانیلین	۱	۰/۲۷**	۰/۱۲۵**	۲/۹۲۴**	۶/۹۸۸**	۷/۹E-۰۹ <sup>ns</sup>	۲۵/۱**	۹۶/۹**
روز	۳	۴/۹۴۳**	۱/۶۹۴**	۶/۳۶۶**	۱۵/۳۹**	۰/۰۰۳**	۳۱۴/۷**	۶۴۰/۴**
محیط کشت × روز	۳	۰/۱۳۱**	۰/۰۰۶**	۱/۰۳۳**	۳/۸۵**	۰/۰۰۱**	۲۸/۰**	۵۷/۲**
وانیلین × روز	۳	۰/۰۶۵**	۰/۰۱۸*	۰/۶۴۸**	۲/۹۰۶**	۰/۰۰۱**	۲۴/۱**	۱۲۷/۷**
محیط کشت × وانیلین	۱	۰/۰۶۰*	۰/۰۰۴**	۱/۷۰۶**	۱/۷۱۷**	۰/۰۰۱**	۱۶/۳*	۱۵۲/۴**
محیط کشت × وانیلین × روز	۳	۰/۰۰۹ <sup>ns</sup>	۰/۰۰۱**	۰/۲۸۱**	۰/۹۶۹**	۰/۰۰۱**	۱۸/۹**	۴۷/۴**
خطا	۲۵	۰/۰۱۴	۵/۳E-۰۵	۰/۰۴۷	۰/۰۴۵	۱/۳۱E-۰۶	۲/۵۲۲	۴/۵۰۸
جمع کل	۴۱							

منبع تغییرات	PE	PBP	لیپید	کروئیدرات	پروتئین	فنل	MDA	درصد مهار DPPH
محیط کشت	۷۱/۰**	۱۷۸۷/۵**	۰/۰۲۲**	۱۱۰۵۴۷/۴**	۰/۰۵۱**	۲۷۸۸/۸**	۰/۰۰۶**	۳۶۸۸/۴**
وانیلین	۷/۱*	۳۰۷/۶**	۰/۰۴۹**	۶۰۷۵/۷**	۰/۰۳۱*	۳۳۹۴/۳**	۰/۰۰۳**	۷۶/۷۴*
روز	۶۳۵/۵**	۴۵۳۹/۸**	۰/۱۱۴**	۲۶۷۱۸/۸**	۰/۴۰۲**	۳۳۷۸/۴**	۰/۰۰۹**	۱۹۸۰/۷**
محیط کشت - روز	۸/۶**	۲۳۹/۰**	۰/۰۰۹**	۱۷۴۴۰/۱**	۰/۰۷۳**	۵۳۸۵/۷**	۰/۰۰۱**	۸۵۷/۷**
وانیلین - روز	۲/۱**	۲۹۵/۰**	۰/۰۱**	۶۷۷۹/۷**	۰/۰۴۴*	۴۱۵۸/۹**	۰/۰۰۲**	۱۰۱۲/۵**
محیط کشت - وانیلین	۴۳/۵**	۵۲۸/۸**	۰/۰۰۱**	۹۵۳۹/۳**	۰/۰۰۳**	۶۲۹۴/۲**	۰/۰۰۲**	۵۰/۱**
محیط کشت - وانیلین - روز	۱۶/۷**	۲۱۱/۳**	۰/۰۰۷**	۶۲۶۱/۶**	۰/۰۶۴**	۱۲۱۱/۷**	۰/۰۰۱**	۳۵۵/۲**
خطا	۱/۵۲۴	۱۳/۳	۵/۹۳E-۰۵	۲۸۵/۲	۰/۰۰۲	۱۰۹/۳۵۴	۴/۸E-۰۵	۱۸/۲
جمع کل								

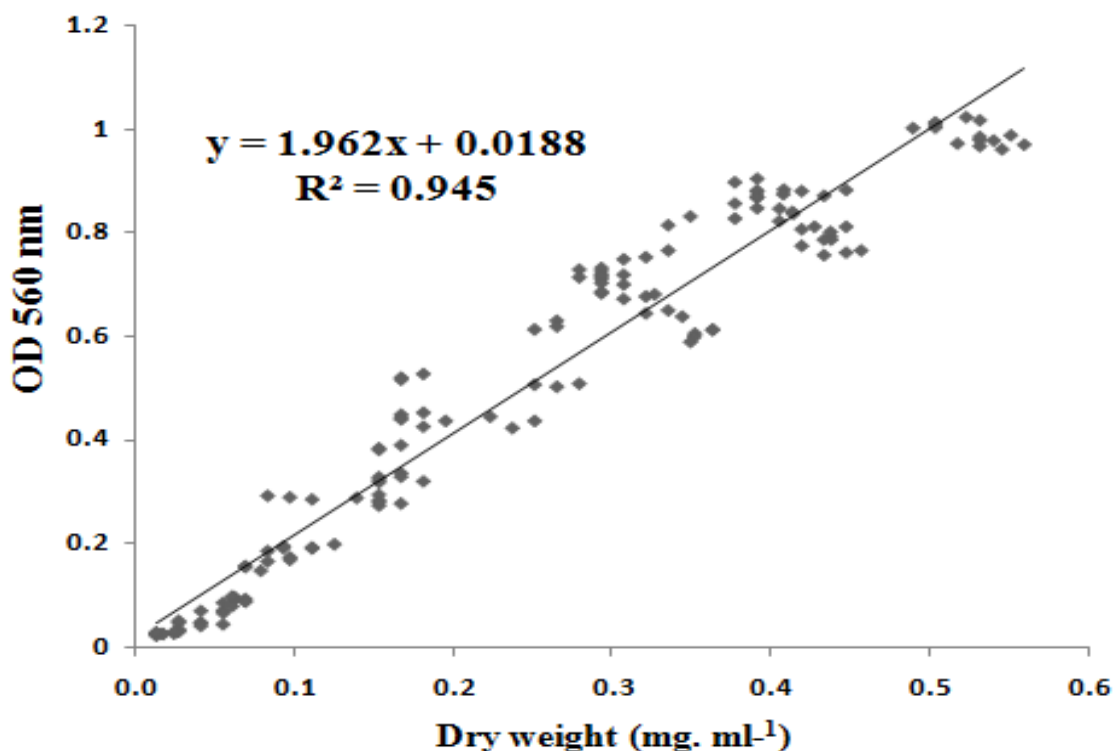
\*, \*\* و ns به ترتیب بیان‌کننده معنی‌داری در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد و معنی‌دار نبودن هستند.

خشک مقدار می‌کند؛ اما برخلاف روندی که در کدورت مشاهده شد، کاهش تا انتهای دوره در مقدار وزن خشک ملاحظه نشد؛ حتی مقدار آن به آرامی افزایش یافت. وزن خشک سلول‌ها در

بر اساس شکل ۱-B و مشابه با تغییرات شاخص کدورت، در هر چهار محیط کشت، روند افزایشی وزن خشک از روز آغاز آزمون تا تقریباً روز ۲۷ دوره مشاهده شد و پس از آن، روند افزایش وزن

وزن خشک سلول‌ها قرار داشت. رابطه همبستگی معنی‌دار ( $P \leq 0/01$  و  $R^2 = 0/94$ ) و مثبت میان کدورت سوسپانسیون سلولی با مقدار وزن خشک جلبک در مدت ۴۲ روز به دست آمد (شکل ۲).

محیط کشت Zarrouk با اختلاف چشمگیری در کل دوره ۴۲ روزه، بیشتر از وزن خشک سلول‌ها در سایر محیط‌ها بود و محیط کشت Zarrouk دارای وانیلین در رتبه بعدی از نظر تأثیر القایی بر افزایش



شکل ۲- رابطه همبستگی (با ضریب پیرسون) بین میزان کدورت سوسپانسیون سلولی جلبک *Spirulina platensis* در ۵۶۰ نانومتر و زیتوده خشک (میلی گرم بر میلی لیتر) در محیط کشت‌های Johnson (J)، Johnson (Z)، Johnson (JV) دارای وانیلین و Zarrouk دارای وانیلین (ZV) در مدت دوره رشد ۴۲ روزه

شد و ۳- محیط کشت‌های Zarrouk دارای وانیلین، Johnson و در نهایت، Johnson دارای وانیلین به ترتیب در رتبه‌های بعدی قرار دارند.

مقایسه سایر شاخص‌های رشد جلبک، از جمله تولیدات سلولی ( $P_x$ )، بیشترین سرعت رشد ویژه ( $\mu_m$ ) و زمان دو برابر شدن توده سلولی جلبک ( $t_d$ ) بین تیمارهای مختلف (جدول ۲) نشان دادند شاخص تولیدات سلولی، در محیط کشت Zarrouk

بیشترین مقدار وزن خشک بر حسب گرم بر لیتر سوسپانسیون سلولی در سه دوره صفر تا ۲۱، ۲۱ تا ۲۷ و ۲۷ تا ۳۳ روز در جدول ۲ آمده است. نتایج مقایسه تیمارها بر اساس آزمون دانکن عبارتند از: ۱- بیشترین میزان وزن خشک در همه تیمارها در دوره آخر نمونه برداری (۲۷ تا ۳۳ روز) به دست آمد؛ ۲- بین تیمارها محیط کشت Zarrouk بیشترین مقدار وزن خشک ( $0/01 \pm 1/89$  گرم بر لیتر) را موجب

زیاد بود. زمان دو برابر شدن تعداد سلول‌ها در هر چهار تیمار در بیشتر مواقع در فاصله‌های زمانی روزهای ۲۱ تا ۲۷ و ۲۷ تا ۳۳ کمترین بود؛ اما رشد در مدت دوره آخر یا سوم در محیط‌کشت Johnson دارای وانیلین نسبت به سایر تیمارها کند شد.

و پس از آن در محیط‌کشت Zarrouk دارای وانیلین بیشتر از دو تیمار دیگر بودند. شاخص بیشترین سرعت رشد ویژه همواره بین روزهای ۲۱ تا ۲۷ رشد که مرحله لگاریتمی رشد است، در هر چهار محیط‌کشت، مساوی و بیشتر از دو فاصله زمانی دیگر بود؛ اگرچه این شاخص در دوره سوم نمونه‌برداری در محیط‌کشت Johnson همچنان

جدول ۲- بیشترین مقدار وزن خشک ( $X_m$ )، تولیدات سلولی ( $P_x$ )، بیشترین سرعت رشد ویژه ( $\mu_m$ )، مدت دو برابر شدن توده سلول‌های جلبک *Spirulina platensis* ( $t_d$ )، در دوره‌های رشد صفر تا ۲۱ روز (A)، ۲۱ تا ۲۷ روز (B) و ۲۷ تا ۳۳ روز (C) در محیط‌کشت‌های Johnson (J)، Zarrouk (Z)، Johnson دارای وانیلین (JV) و Zarrouk دارای وانیلین (ZV) - مقادیر، میانگین سه تکرار  $\pm$  SD هستند. حروف متفاوت، بیان‌کننده تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال  $P \leq 0.05$  براساس آزمون دانکن هستند.

تیمار - محیط‌کشت	$X_m$ (gr.l <sup>-1</sup> )	$P_x$ (mg.l <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )	$\mu_m$ (div day <sup>-1</sup> )	$t_d$ (Day <sup>-1</sup> )
J-A	0.77 ± 0.03 <sup>h</sup>		0.31 ± 0.002 <sup>c</sup>	2/20 ± 0.013 <sup>a</sup>
J-B	1/13 ± 0.03 <sup>f</sup>	40/62 ± 0.93 <sup>c</sup>	0.98 ± 0.013 <sup>a</sup>	0.70 ± 0.009 <sup>c</sup>
J-C	1/37 ± 0.04 <sup>d</sup>		0.91 ± 0.039 <sup>a</sup>	0.77 ± 0.032 <sup>c</sup>
Z-A	1/27 ± 0.08 <sup>e</sup>		0.34 ± 0.003 <sup>c</sup>	2/04 ± 0.018 <sup>a</sup>
Z-B	1/78 ± 0.03 <sup>b</sup>	56/59 ± 1/27 <sup>a</sup>	1/04 ± 0.036 <sup>a</sup>	0.67 ± 0.023 <sup>c</sup>
Z-C	1/89 ± 0.01 <sup>a</sup>		0.77 ± 0.010 <sup>b</sup>	0.92 ± 0.028 <sup>c</sup>
JV-A	0.73 ± 0.03 <sup>b</sup>		0.31 ± 0.002 <sup>c</sup>	2/22 ± 0.013 <sup>a</sup>
JV-B	1/03 ± 0.03 <sup>g</sup>	32/74 ± 1/83 <sup>d</sup>	0.95 ± 0.028 <sup>a</sup>	0.73 ± 0.022 <sup>c</sup>
JV-C	1/17 ± 0.06 <sup>e</sup>		0.63 ± 0.236 <sup>b</sup>	1/23 ± 0.517 <sup>b</sup>
ZV-A	1/03 ± 0.03 <sup>g</sup>		0.33 ± 0.001 <sup>c</sup>	2/10 ± 0.009 <sup>a</sup>
ZV-B	1/38 ± 0.03 <sup>d</sup>	43/75 ± 0.46 <sup>b</sup>	0.98 ± 0.004 <sup>a</sup>	0.71 ± 0.0001 <sup>c</sup>
ZV-C	1/47 ± 0.02 <sup>c</sup>		0.73 ± 0.079 <sup>b</sup>	0.96 ± 0.014 <sup>c</sup>

تأثیر متقابل وانیلین و زمان (روز نمونه‌برداری) بر رنگدانه فیکواریترین، سایر آثار اصلی و متقابل تیمارهای محیط‌کشت، وانیلین و زمان بر شاخص‌های رنگدانه معنی‌دار بوده‌اند (0.05 و 0.01).  $P \leq$  با توجه به شکل ۳-A، مقدار کلروفیل a در

### تغییرات رنگی‌های فتوسنتزی: شکل‌های ۳

و ۴ تغییرات مقدار رنگدانه‌ها را در سلول‌های جلبک *Spirulina* در تیمارها نشان می‌دهند. براساس جدول آنالیز واریانس (جدول ۱)، بجز تأثیر اصلی تیمار وانیلین بر رنگدانه آستاگزانتین و نیز

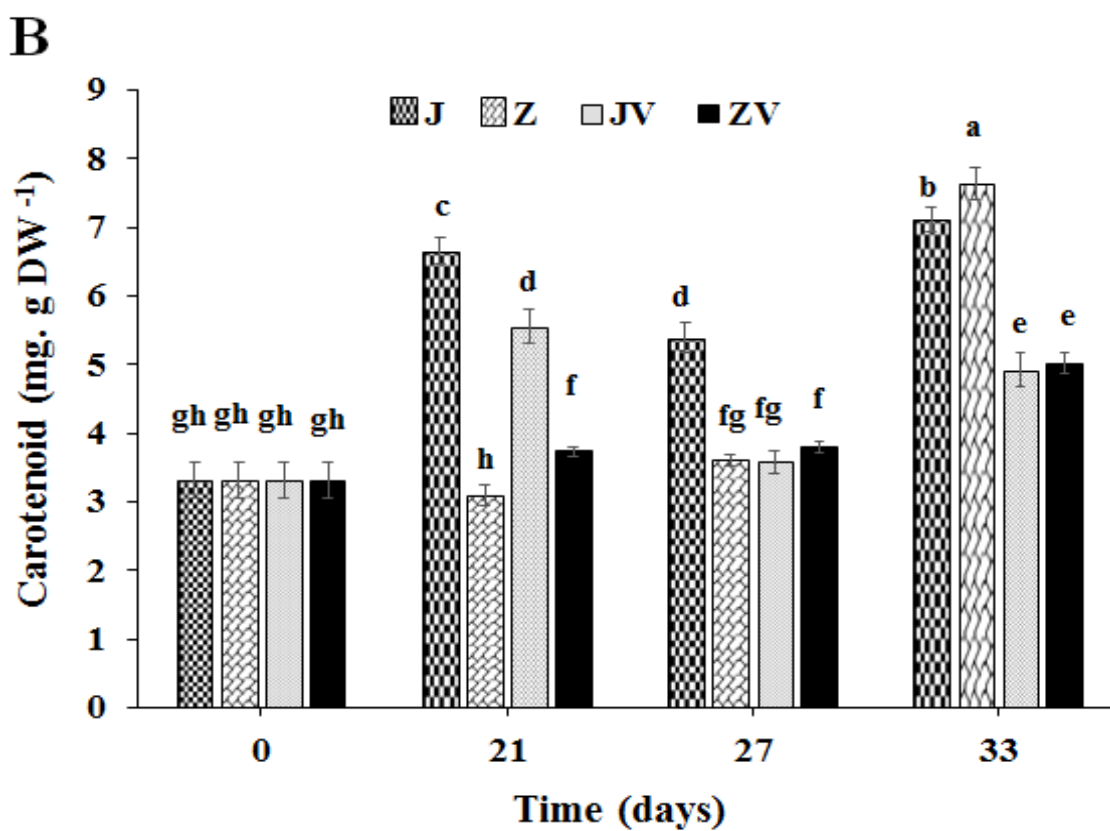
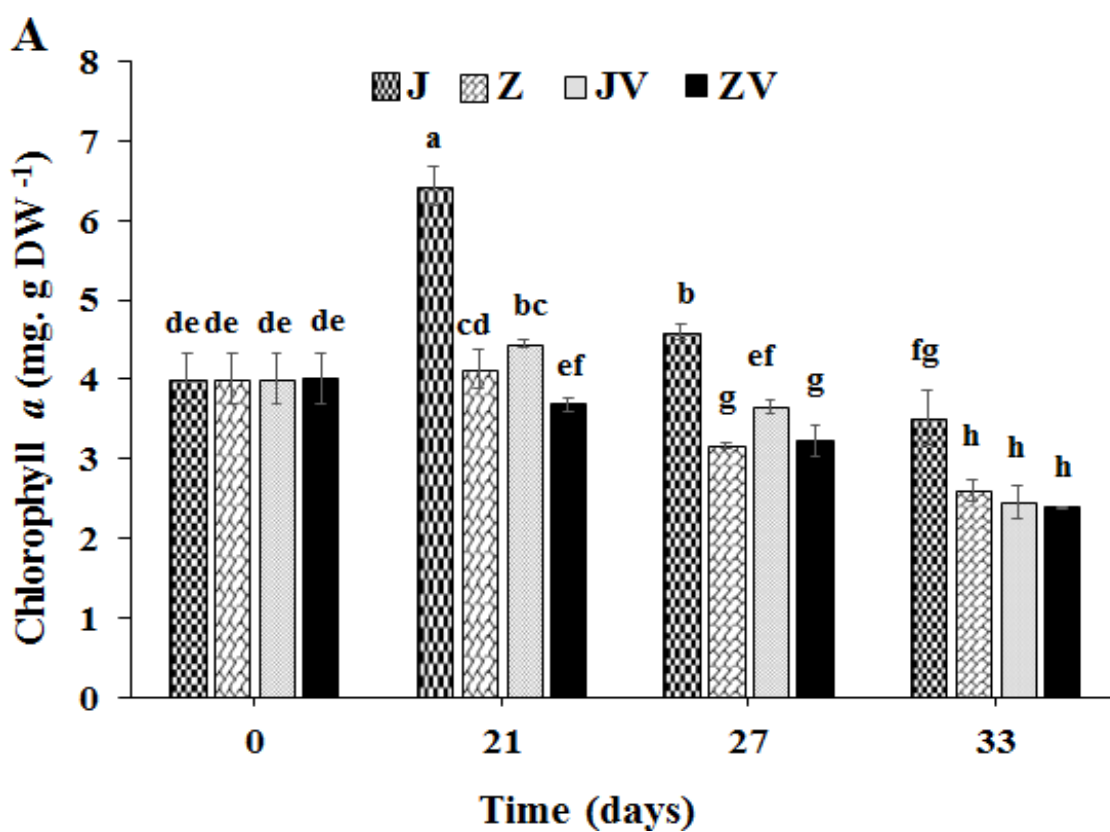
و متقابل تیمارهای محیط‌کشت، وانیلین و زمان بر مقدار کربوهیدرات، لیپید، فنل، پروتئین، مالون‌دی‌آلدهید و فعالیت آنتی‌اکسیدانی خاموش کردن ۱ و ۱-دی فنیل - ۲- پیکریل هیدرازیل معنی‌دار (۰/۰۵ و ۰/۰۱)  $P \leq$  بودند.

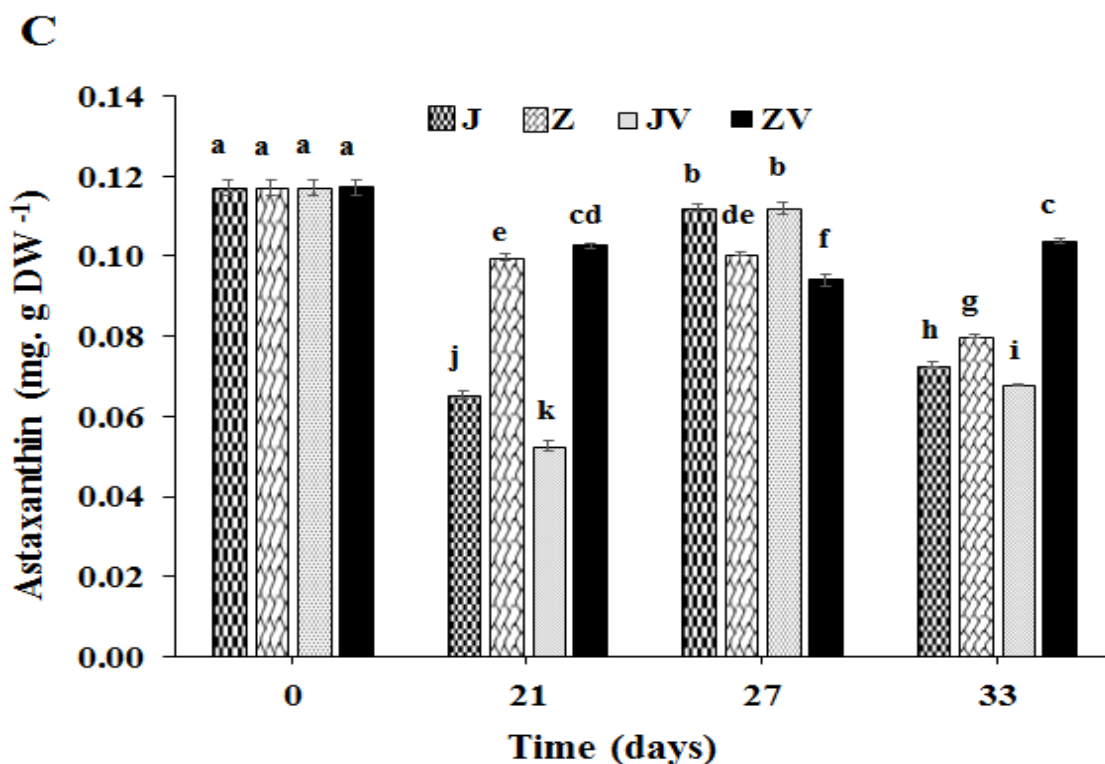
براساس شکل ۵-A تأثیر تیمارها بر میزان کربوهیدرات جلبک در روزهای ۲۱ و ۲۷ کشت، تا اندازه‌ی زیادی به نوع محیط‌کشت بستگی داشت؛ به طوری که محیط‌کشت Johnson در حضور و نبود وانیلین افزایش چشمگیر مقدار کربوهیدرات را سبب شد؛ درحالی‌که افزایش کمتری در مقدار کربوهیدرات‌ها در محیط‌کشت Zarrouk (در حضور یا نبود وانیلین) مشاهده شد. تیمار محیط‌کشت Johnson بدون وانیلین، بیشترین اثر القایی افزایشی را در روزهای ۲۱ و ۲۷ رشد موجب شد و در روز ۳۳ بیشترین مقدار کربوهیدرات، تنها در محیط‌کشت Johnson حاوی وانیلین مشاهده شد.

تأثیر القایی محیط‌کشت Johnson بدون وانیلین بر افزایش میزان لیپید (شکل ۵-B)، فنل (شکل ۵-۵-C)، مالون‌دی‌آلدهید (شکل ۶-A) و فعالیت آنتی‌اکسیدانی سلول‌ها (شکل ۶-B) تا اندازه‌ای مشابه با تأثیر آن بر مقدار کربوهیدرات بود؛ یعنی پس از افزایش چشمگیر نسبت به روز صفر با روندی کاهشی تا انتهای دوره ادامه یافت؛ برعکس، تأثیر آن بر میزان پروتئین (شکل ۶-C) روند افزایشی تا انتهای دوره (روز ۳۳) داشت.

اواخر دوره‌ی رشد (روز ۳۳) نسبت به روزهای ابتدایی در همه‌ی تیمارها کاهش ولی مقدار کاروتنوئیدها (شکل ۳-B) افزایش یافت. محیط‌کشت Johnson در روز ۲۱ رشد، تأثیر القایی چشمگیری در افزایش مقدار کلروفیل داشت که پس از آن در مدت دوره‌ی رشد کاهش یافت. تیمار محیط‌کشت Johnson دارای وانیلین تأثیر مثبت کمتری بر مقدار کلروفیل گذاشت. مقدار کاروتنوئید کل، تفاوت‌های بیشتری بین تیمارها نشان داد و در روزهای پایانی (روز ۳۳) بیشترین مقادیر، تنها مربوط به تیمارهای بدون وانیلین بودند. مقدار آستاگزانتین در مدت دوره‌ی رشد نسبت به روز شروع آزمون کاهش یافت؛ با این حال در بیشتر مواقع به‌ویژه در محیط‌کشت‌های Zarrouk مقدار بیشتری داشت (شکل ۳-C). مجموعه‌ی رنگدانه‌های فیکوبیلینی فیکوسیانین، آلفوفیکوسیانین و فیکواریترین (شکل‌های ۴-A تا C) تغییرات افزایشی از ابتدا تا انتهای دوره با برخی نوسانات نشان دادند و مقدار آنها و در نتیجه فیکوبیلین کل (شکل ۴-D) در انتهای دوره‌ی رشد به بیشینه رسید. بیشترین مقدار هر سه رنگدانه در تیمار با محیط‌کشت Johnson و پس از آن در تیمار محیط‌کشت Johnson دارای وانیلین مشاهده شد.

**تأثیر تیمارها بر مقدار کربوهیدرات، لیپید، فنل، مالون‌دی‌آلدهید، فعالیت آنتی‌اکسیدانی و مقدار پروتئین:** مطابق با جدول آنالیز واریانس (جدول ۱)، بجز تأثیر متقابل محیط‌کشت و وانیلین بر مقدار پروتئین و فعالیت آنتی‌اکسیدانی، همه‌ی آثار اصلی





شکل ۳- مقادیر کلروفیل (A)، کاروتنوئید (B) و آستاگزانتین (C) در سلول‌های *Spirulina platensis* در محیط کشت‌های Johnson (J)، Zarrouk (Z)، Johnson دارای وانیلین (JV) و Zarrouk دارای وانیلین (ZV) در روزهای صفر، ۲۱، ۲۷ و ۳۳- مقادیر، میانگین سه تکرار  $\pm$  SD هستند. حروف متفاوت، بیان‌کننده تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال  $P \leq 0.05$  براساس آزمون دانکن هستند.

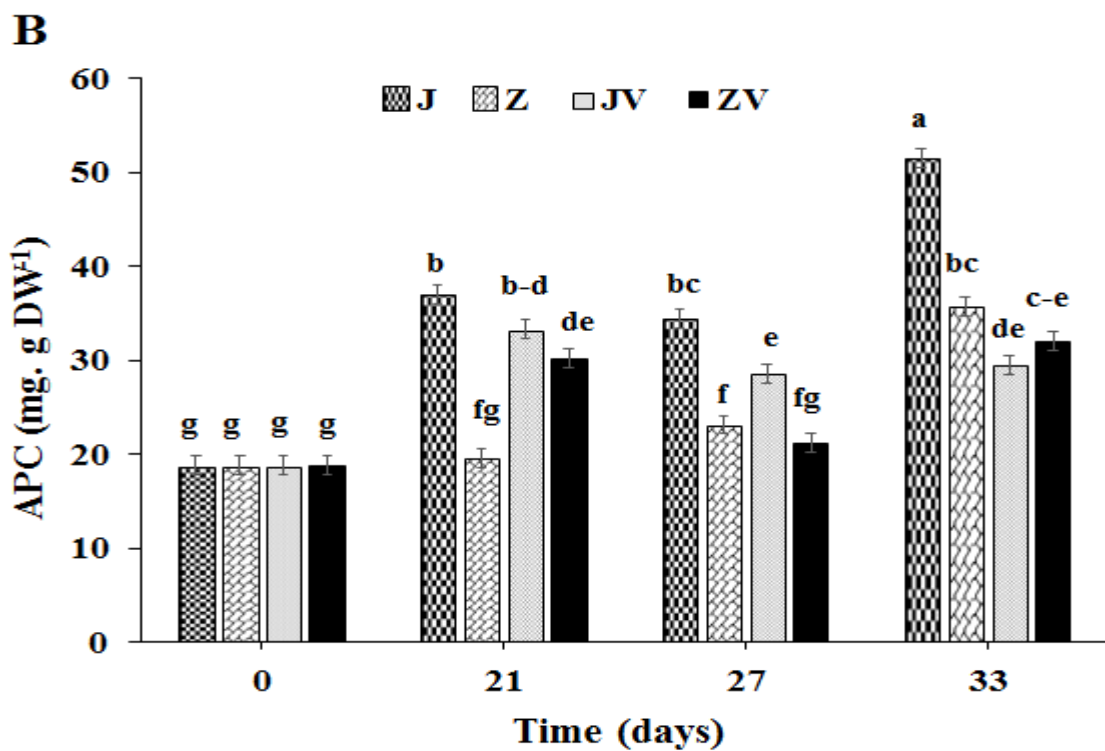
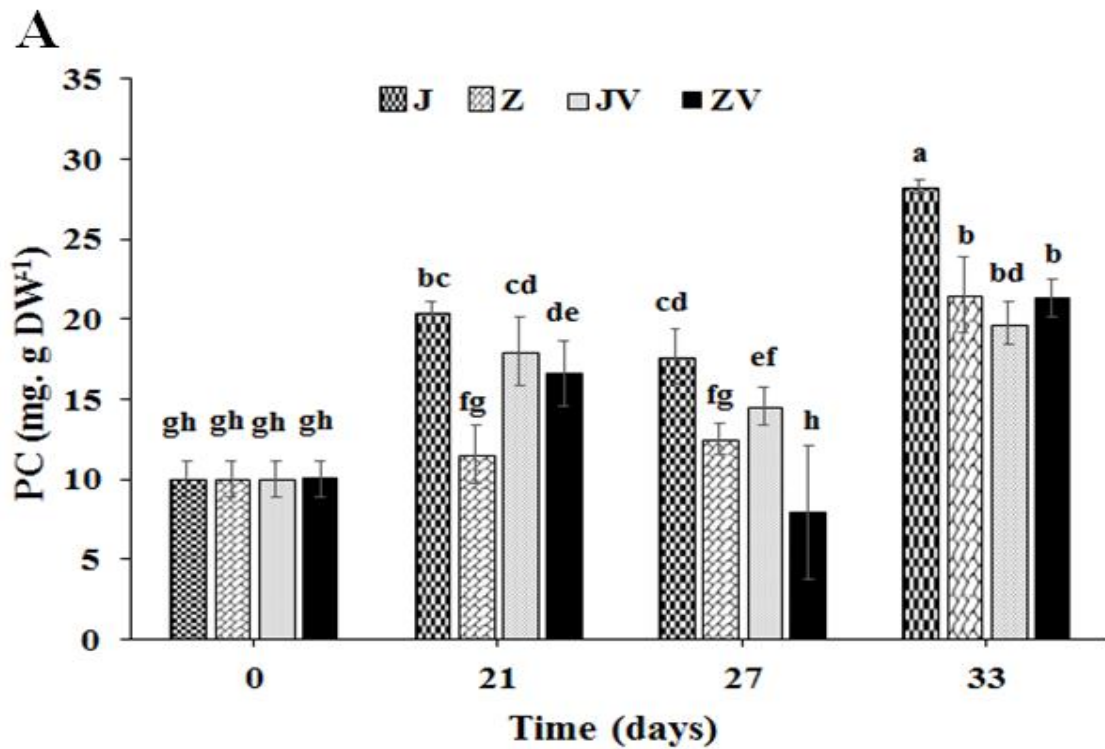
اندک در روز ۲۱، مقدار آن تا انتهای دوره نسبت به روز صفر بی‌تغییر ماند؛ برعکس، مقدار لیپید سلول‌ها، بر اثر محیط کشت Zarrouk افزایش یافت که این افزایش بر اثر محیط کشت Zarrouk دارای وانیلین، بیشتر از سایر تیمارها بود. در نمونه‌های تیمار شده با محیط کشت‌های Zarrouk بدون وانیلین و دارای وانیلین، مقدار مالون‌دی‌آلدهید در روز ۲۱ مقداری افزایش اما پس از آن کاهش یافت. بررسی میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل براساس خاموش کردن ۱ و ۱- دی فنیل -۲- پیکریل هیدرازیل نیز نشان داد مقدار فعالیت آنتی‌اکسیدانی سلول‌ها بر اثر تیمار با محیط کشت Zarrouk نیز مساوی یا کمتر از روز صفر بود؛ ولی مقدار پروتئین، مشابه با تأثیر تیمار محیط کشت Johnson، در نمونه‌های تیمار شده با محیط کشت‌های

محیط کشت Johnson حاوی وانیلین در بیشتر مواقع، افزایش بیشتری در شاخص‌های نام‌برده شده نسبت به محیط کشت Zarrouk حاوی وانیلین یا بدون آن سبب شد و در برخی موارد مانند مقدار کربوهیدرات (شکل ۵-۵) A، لیپید (شکل ۵-۵) B و پروتئین (شکل ۶-۵) C، بیشترین مقدار را بین مجموعه تیمارها به‌ویژه در روزهای ۲۱ و ۲۷ موجب شد. در روز ۳۳ رشد، مقدار لیپید (شکل ۵-۵) B، فنل (شکل ۵-۵) C، مالون‌دی‌آلدهید (شکل ۶-۵) A و فعالیت آنتی‌اکسیدانی سلول‌ها (شکل ۶-۵) B نسبت به روزهای قبلی در همه تیمارها کاهش یافتند.

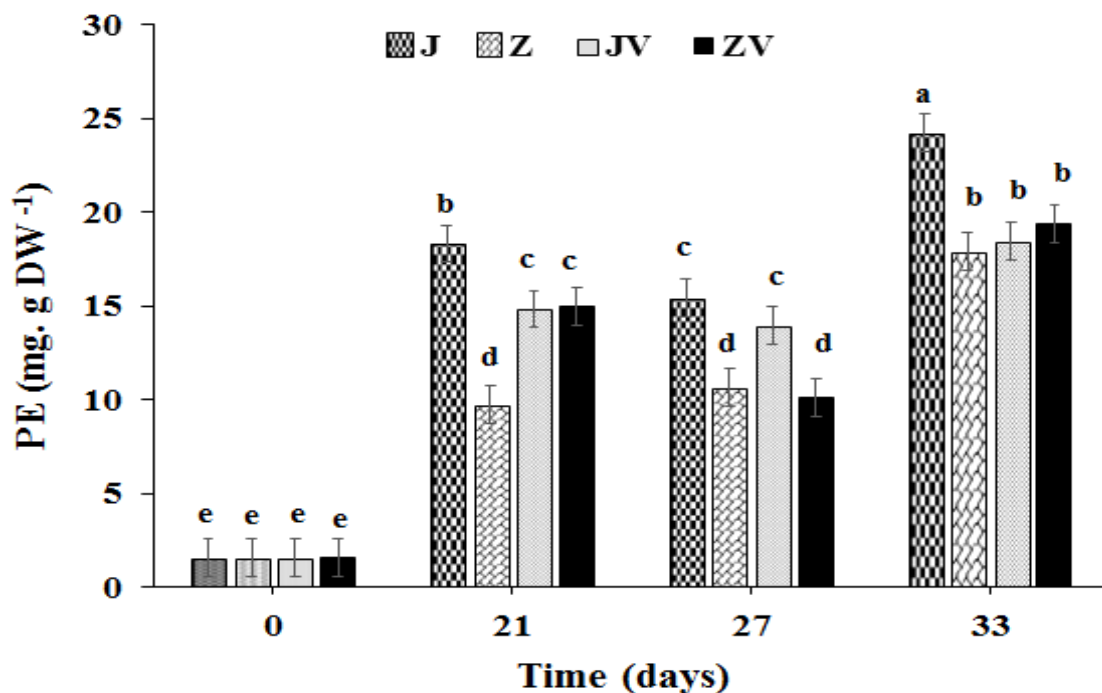
محیط کشت Zarrouk دارای وانیلین و بدون آن، مقدار کربوهیدرات را به میزان مشابه با محیط کشت Johnson افزایش نداد و بجز افزایش

انتهای دوره رشد کاهش یافت؛ درحالی که مقدار پروتئین سلول‌ها افزایش نشان داد.

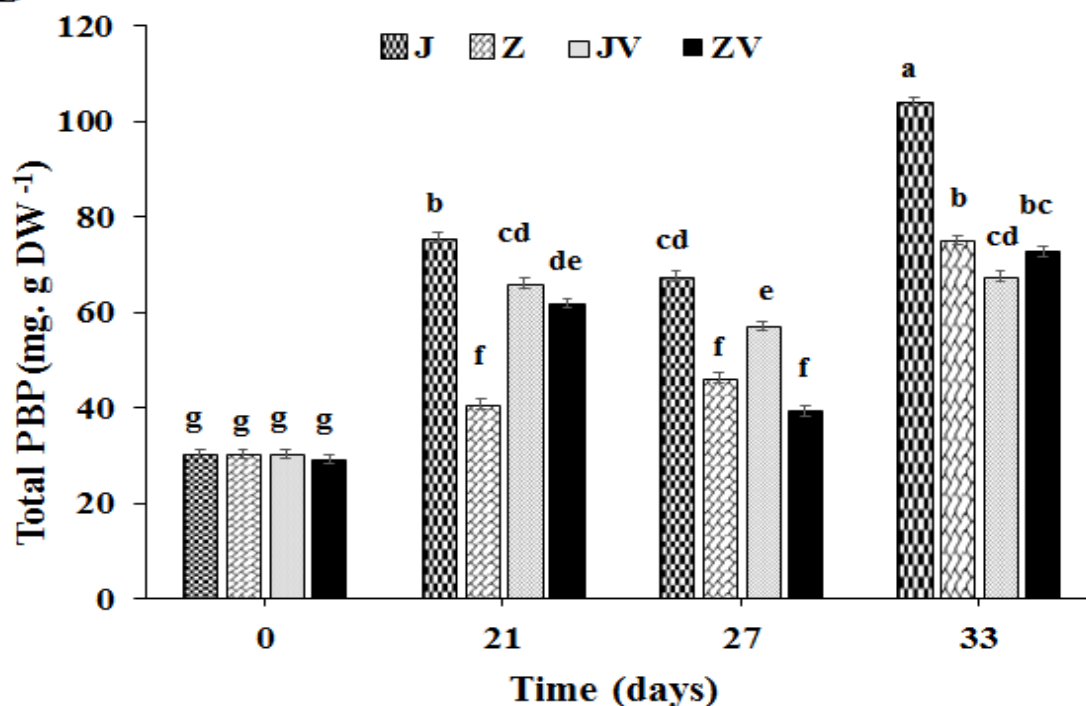
Zarrouk بدون وانیلین و دارای وانیلین افزایش یافت و در انتهای دوره رشد به بیشترین مقدار رسید. به‌طورکلی مقدار بیشتر شاخص‌های گفته‌شده، در



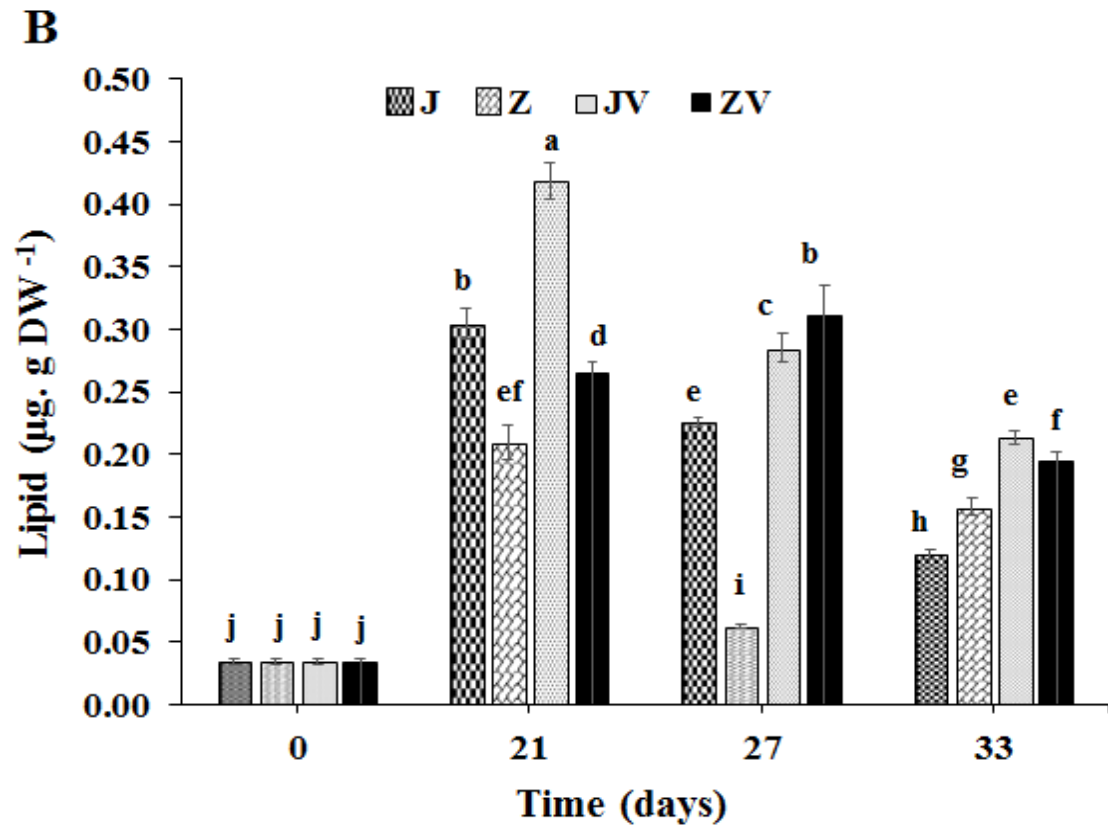
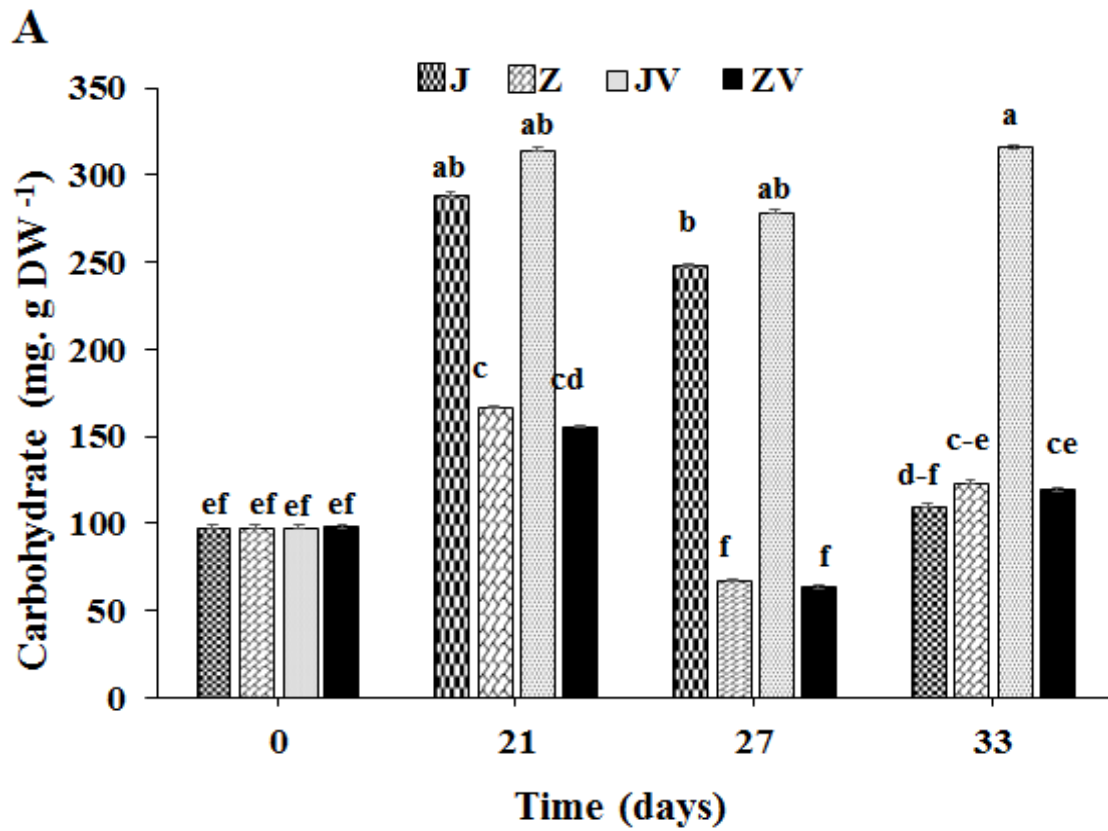
C

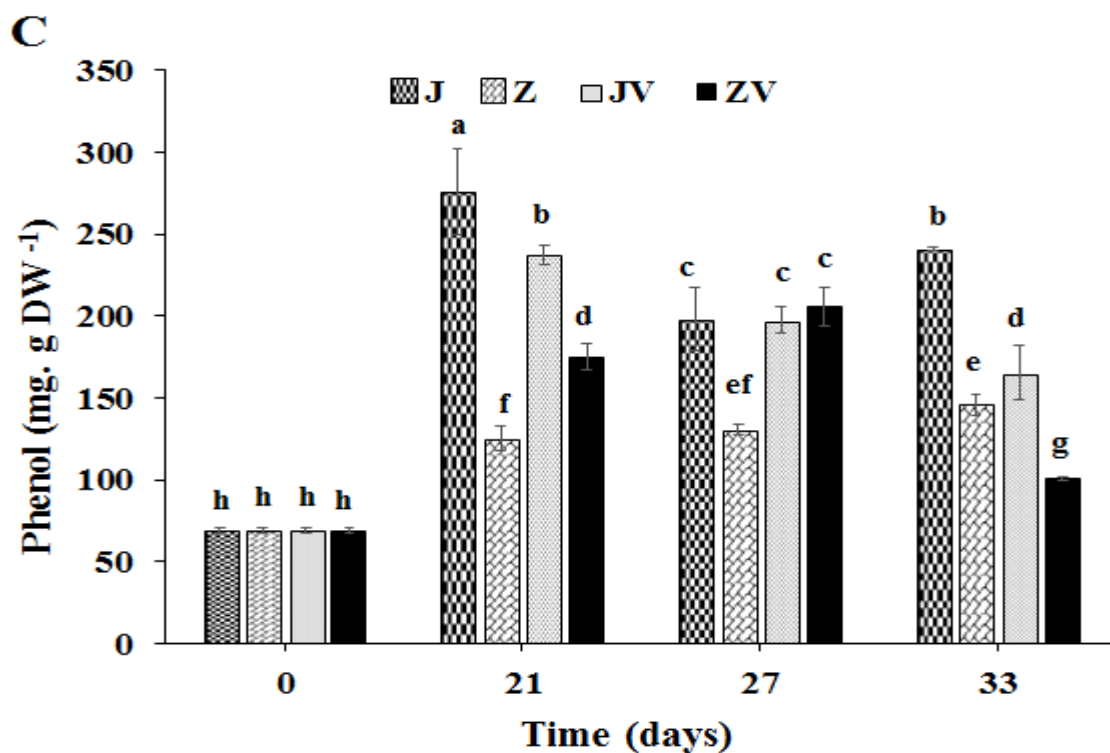


D

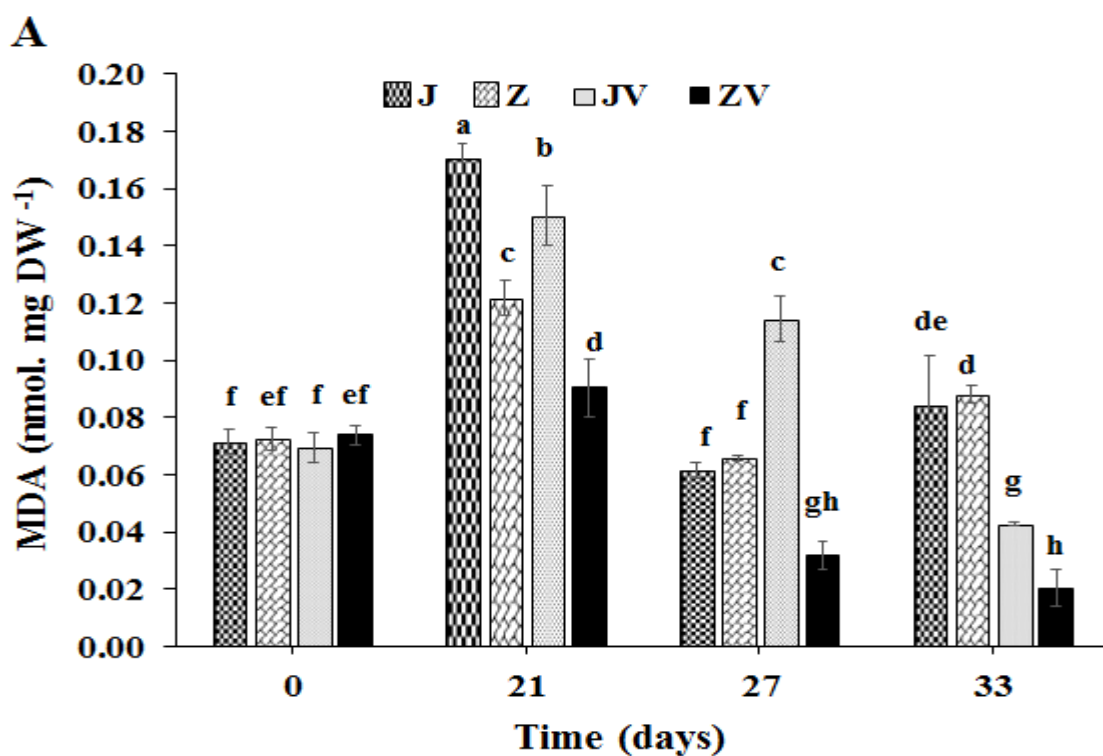


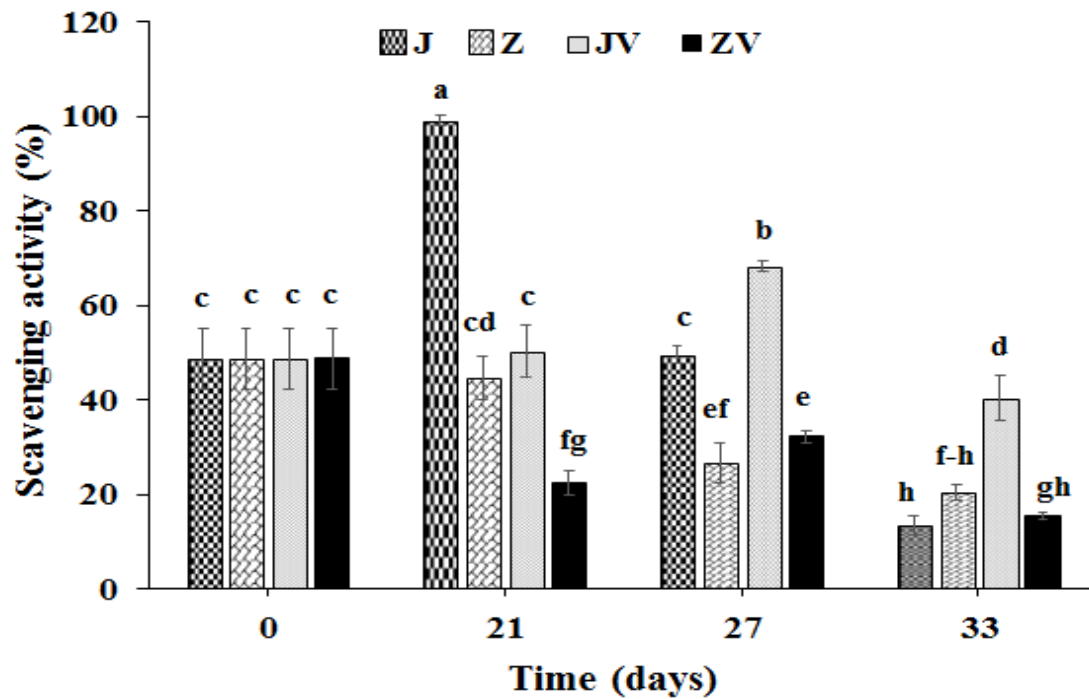
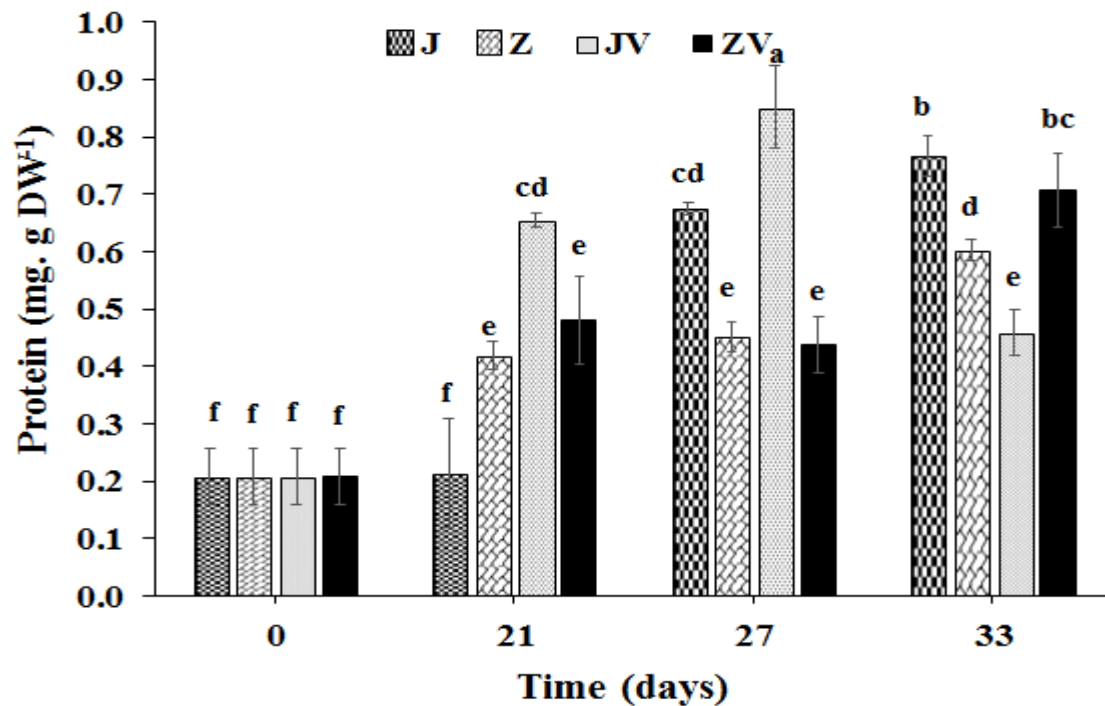
شکل ۴- مقادیر PC (فیکوسیائین) (A)، APC (آلوفیکوسیائین) (B)، PE (فیکواریترین) (C) و Total PBP (فیکوبیلین کل) (D) در سلول‌های *Spirulina platensis* در محیط کشت‌های Johnson (J)، Zarrouk (Z)، وایلین (JV)، و Zarrouk (ZV) در روزهای صفر، ۲۱، ۲۷ و ۳۳- مقادیر، میانگین سه تکرار  $\pm$  SD هستند. حروف متفاوت، بیان‌کننده تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال  $P \leq 0.05$  براساس آزمون دانکن هستند.





شکل ۵- مقادیر کربوهیدرات کل (A)، لیپید (B) و فنل (C) در سلول‌های *Spirulina platensis* در محیط کشت‌های (J) Johnson، (Z) Zarrouk، (JV) Johnson دارای وانیلین، و (ZV) Zarrouk دارای وانیلین در روزهای صفر، ۲۱، ۲۷ و ۳۳-مقادیر، میانگین سه تکرار  $\pm$  SD هستند. حروف متفاوت، بیان‌کننده تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال  $P \leq 0/05$  براساس آزمون دانکن هستند.



**B****C**

شکل ۶- مقادیر MDA (مالون‌دی‌آلدهید) (A)، درصد مهار ۱ و ۱-دی فنیل-۲-پیکریل هیدرازیل (DPPH) (B) و پروتئین کل (C) در سلول‌های *Spirulina platensis* در محیط کشت‌های Johnson دارای وانیلین (JV)، Zarrouk (Z)، Johnson (J) و دارای وانیلین (ZV) در روزهای صفر، ۲۱، ۲۷ و ۳۳-مقادیر، میانگین سه تکرار  $\pm$  SD هستند. حروف متفاوت، بیان‌کننده تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال  $P \leq 0/05$  براساس آزمون دانکن هستند.

## بحث

افزایش تقاضا برای تغذیه و تهیه برخی مکمل‌های غذایی گیاهی، اهمیت دوچندان جنس *Spirulina* را به صورت غذای ایدئال یا غذای آینده سبب شده است و این جلبک به دلیل داشتن ارزش تغذیه‌ای زیاد در صنایع غذایی، دارویی و تشخیصی به کار می‌رود (Raouf *et al.*, 2006). از سوی دیگر برخی ترکیبات آلاینده که در سال‌های اخیر به مقدار زیاد مصرف شده است؛ مانند ترکیب فنلی وانیلین بر رشد و عملکرد جلبک‌ها آثار متفاوتی می‌گذارند (Miazek *et al.*, 2013; Akbari and Madadkar Haghjou, 2018b).

اگرچه در منابع، محیط‌کشت *Zarrouk* محیط‌کشت اولیه و اصلی برای رشد بهینه جلبک *Spirulina* یاد شده است (Dineshkumar *et al.*, 2016; Usharani *et al.*, 2012; Zarrouk, 1966)، پژوهش‌ها نشان داده‌اند مجموعه عناصر در دسترس جلبک مانند ریزمغذی‌ها و درشت‌مغذی‌ها بر نحوه پاسخگویی جلبک به شرایط محیطی از جمله ترکیبات آلاینده موجود در محیط‌های آبی مانند ترکیب فنلی وانیلین تأثیر می‌گذارند (Madkour *et al.*, 2012; Miazek *et al.*, 2013). از آنجاکه محیط‌کشت Johnson در پژوهش‌هایی بر جلبک‌هایی مانند *Dunaliella* و *Tetraflagellochloris* sp. رشد را به خوبی تحریک و تولیدات ارزشمند آنها را القا کرد (Johnson *et al.*, 1968; Barsanti *et al.*, 2013; Akbari and Madadkar Haghjou, 2018a) در پژوهش حاضر نیز استفاده شد.

براساس نتایج به دست آمده از پژوهش حاضر، محیط‌کشت *Zarrouk* بیشترین میزان رشد را بر حسب سنجش میزان کدورت سوسپانسیون

جلبکی در طول موج ۵۶۰ نانومتر موجب شد (شکل ۱)؛ از این رو رشد در محیط‌کشت *Zarrouk* بیشتر از رشد جلبک در محیط‌کشت Johnson بود. افزودن وانیلین (۳۰ میلی‌گرم بر لیتر)، مقدار رشد جلبک را در هر دو محیط‌کشت کاهش داد؛ بنابراین کمترین میزان رشد بر حسب کدورت، در محیط‌کشت‌های *Zarrouk* حاوی وانیلین و Johnson حاوی وانیلین مشاهده شد. این برخلاف نتایج به دست آمده از پژوهش‌های Akbari و Madadkar Haghjou (۲۰۱۸b) بود که وانیلین به مقدار ۲۵ تا ۴۰ میلی‌گرم بر لیتر، افزایش رشد سلول‌های جلبک *Dunaliella salina* را به ویژه پس از مرحله لگاریتمی رشد سبب شد. این آثار متفاوت ممکن است به نوع جلبک بررسی شده نسبت داده شوند؛ چنان‌که تیمار وانیلین در جلبک *Chlorell* sp.، افزایش رشد (Miazek *et al.*, 2013) و تیمار دیاتومه‌ها و *Scenedesmus obliquus* با وانیلین، کاهش رشد را موجب شده است (Vanilin, 1996).

بیشترین وزن خشک و تولیدات سلولی بر حسب وزن خشک جلبک (جدول ۲) نیز با مقادیر به ترتیب ۱/۸۹ گرم بر لیتر و ۵۶/۵۹ میلی‌گرم بر لیتر بر روز دوباره در محیط‌کشت *Zarrouk* به دست آمدند؛ همان‌طور که سلول‌ها در این محیط‌کشت، بیشترین کدورت را نیز داشتند. در پژوهش حاضر، میزان رشد بر حسب کدورت و مقدار وزن خشک سلول‌ها در مجموعه چهار تیمار، رابطه همبستگی معنی‌دار مثبت و نسبتاً قوی ( $P \leq 0/01$  و  $R^2 = 0/94$ ) نشان دادند. در بررسی رابطه همبستگی به طور مجزا،  $R^2$  برای هر یک از تیمارهای محیط‌کشت Johnson، محیط‌کشت *Zarrouk*، محیط‌کشت Johnson

آن معادل ۴۰/۶۲ میلی گرم بر لیتر بر روز بوده است. گفتنی است محیط کشت Zarrouk، سدیم نترات دارد. به نظر می‌رسد وجود برخی تفاوت‌ها در شرایط آزمون Danesi و همکاران (۲۰۱۱) مانند مدت دوره آزمون (۱۴ روز)، مقدار دما (۲۷ تا ۳۳ درجه سانتی‌گراد) و نیز شدت نور (۶۰ میکرومول فوتون بر متر مربع بر ثانیه) با شرایط آزمایش حاضر تفاوت در مقادیر به دست آمده را موجب شده است. بررسی تغییرات مقادیر رنگدانه‌های کلروفیل a و کاروتنوئیدها نشان می‌دهد در روز ۲۱ که در فاز لگاریتمی رشد قرار دارد، مقدار رنگدانه کلروفیل a در سلول‌های جلبکی در محیط کشت Johnson به‌طور چشمگیری افزایش یافت؛ ولی در سایر تیمارها افزایش مشاهده نشد؛ باین حال مقدار کلروفیل a تا انتهای دوره رشد کاهش یافت. کاهش مقدار کلروفیل همگام با افزایش سن سلول‌ها و کشت در برخی پژوهش‌ها بر سایر گیاهان نیز گزارش شده است (Estak, 1963).

در پژوهش‌های Fitzgerald و همکاران (۲۰۰۴) مقادیر ۱۰ تا ۴۰ میلی‌مولار (حدوداً ۱ تا ۶ گرم بر لیتر) وانیلین در باکتری‌های *Lactobacillus plantarum* و *Escherichia coli* که مشابه با جلبک *Spirulina* از نوع سلول‌های پروکاریوتی هستند، توقف کامل تنفس و برهم خوردن هموستازی pH را سبب شد. این پژوهشگران نشان دادند وانیلین به یکپارچگی و سلامت غشای سیتوپلاسمی صدمه می‌زند و بنابراین نشت یونی آرام و برهم خوردن تعادل یون‌ها را در دو سمت غشا سبب می‌شود؛ اما در پژوهش حاضر بر جلبک *Spirulina* افزایش شاخص مالون‌دی‌آلدهید که

دارای وانیلین و محیط کشت Zarrouk دارای وانیلین به ترتیب، ۰/۹۱۵، ۰/۹۷۲، ۰/۹۰۷ و ۰/۹۴۸ به دست آمده است که مؤید افزایش هماهنگ رشد و تکثیر سلولی با مقدار زیتوده خشک سلول‌ها در هر چهار تیمار ولی با بیشترین همبستگی در محیط کشت Zarrouk است.

محیط کشت‌های Zarrouk دارای وانیلین، Johnson و Johnson دارای وانیلین به ترتیب در رتبه‌های بعدی از نظر شاخص‌های بیشترین مقدار وزن خشک و تولیدات سلولی قرار گرفتند که کاهش مقدار وزن خشک بر اثر وانیلین را نشان می‌دهد. زمان دو برابر شدن وزن خشک سلول‌ها که با میزان رشد ویژه رابطه عکس دارد، در نخستین مرحله رشد یعنی از ابتدای آزمون تا روز ۲۱، بیشترین مقدار را یعنی حدود ۲/۱ روز داشت و در هر چهار تیمار از سایر مراحل طولانی‌تر بود. این مسئله ممکن است به دلیل انجام تقسیمات سریع سلولی در مرحله لگاریتمی رشد باشد که فرصت انباشته کردن وزن خشک را نمی‌دهد (Jimenez and Niell, 1991).

براساس آزمایش‌های Goksan و همکاران (۲۰۰۶) بیشترین مقدار وزن خشک به میزان ۰/۹۹ گرم بر لیتر درون محفظه شیشه‌ای بزرگ به دست آمد. Danesi و همکاران (۲۰۱۱) نیز با تغییر مقدار نور و دما در حضور پتاسیم نترات که منبع نترات محیط کشت است، به شاخص تولیدات سلولی به مقدار ۹۶/۵ میلی گرم بر لیتر بر روز دست یافتند. این نتایج با نتایج محیط کشت Johnson در پژوهش حاضر مقایسه می‌شود که منبع نترات از نوع پتاسیم نترات دارد و مقدار تولیدات سلولی در

از آنجا که تعداد بیشتری از ترکیبات محیط‌کشت Johnson به شکل کلراید وجود دارند، ممکن است برای برخی از جلبک‌ها مطلوب نباشند و در القای درجاتی از تنش دخالت داشته باشند و افزایش مقدار مالون‌دی‌آلدئید و القای فعالیت آنتی‌اکسیدانی را سبب شوند؛ زیرا گزارش‌هایی دربارهٔ برخی آثار نامطلوب ترکیبات کلر بر جلبک‌ها وجود دارند (Junli *et al.*, 1997; Heng *et al.*, 2008).

به دلیل افزایش چشمگیر مقدار ظرفیت آنتی‌اکسیدانی سلول‌ها در محیط‌کشت Johnson تا حدود دو برابر سلول‌های تیمار شده در سایر تیمارها، استفاده از این محیط‌کشت برای پرورش سلول‌های جلبک *Spirulina* برای تولید مکمل‌های غذایی حاوی آثار آنتی‌اکسیدانی (Wu *et al.*, 2005) پیشنهاد می‌شود.

با افزایش سن کشت، مقدار مالون‌دی‌آلدئید و نیز ظرفیت اکسیدانی سلول کاهش یافتند؛ ولی در محیط‌کشت Johnson حاوی وانیلین، بیشتر از سایر تیمارها باقی ماندند که بیان‌کنندهٔ تأثیر منفی تیمار وانیلین وابسته به نوع محیط‌کشت بر زیاد باقی ماندن مقدار مالون‌دی‌آلدئید پس از گذشت مرحلهٔ لگاریتمی و فعال رشد است؛ اگرچه کاهش تدریجی مالون‌دی‌آلدئید و به دنبال آن فعالیت آنتی‌اکسیدانی سلول با گذشت زمان ممکن است به دلیل تجزیه شدن احتمالی و تدریجی فنل در جلبک باشد.

رنگدانه‌های فیکوبیلین که رنگدانه‌های کمکی مشارکت‌کننده در فتوسنتز در *Spirulina* هستند، ارزش اقتصادی زیادی دارند. این رنگدانه‌ها

علامت اکسیداسیون غشاء و صدمه به سلامت آن است در مرحلهٔ لگاریتمی و روز ۲۱ رشد در تیمارهای حاوی وانیلین نسبت به محیط‌های بدون وانیلین کمتر مشاهده شد. در ضمن، مقدار مالون‌دی‌آلدئید در محیط‌کشت Johnson و نیز محیط‌کشت Johnson دارای وانیلین از سایرین بیشتر بود. به نظر می‌رسد در این شرایط، بررسی آنتی‌اکسیدانی سلول نیاز است.

بررسی وضعیت پتانسیل آنتی‌اکسیدانی کل در مهار ۱ و ۱- دی فنیل ۲- پیکریل هیدرازیل (شکل B-۶)، افزایش مقدار پتانسیل آنتی‌اکسیدانی را در برخی از تیمارها، نه همهٔ آنها نشان می‌دهد. شاید برخی ترکیبات آنتی‌اکسیدانی که با روش قابلیت احیای آهن (FRAP) یا سایر روش‌های ارزیابی پتانسیل آنتی‌اکسیدانی ارزیابی شدند هستند نیز در خنثی کردن رادیکال‌های آزاد مشارکت داشته‌اند. در برخی پژوهش‌ها تفاوت در روش ارزیابی پتانسیل آنتی‌اکسیدانی سلول (مانند روش‌های ۱ و ۱- دی فنیل ۲- پیکریل هیدرازیل (DPPH)، روش قابلیت احیای آهن (FRAP) و ...) و مقدار آن گزارش شده است (Pisoschi and Negulescu, 2011). به هر حال افزایش مقدار مالون‌دی‌آلدئید و پتانسیل آنتی‌اکسیدانی در تیمارهایی مانند محیط‌کشت Johnson حاوی وانیلین یا بدون آن، نشان‌دهندهٔ وقوع تنش اکسیداتیو و مقابلهٔ سیستم آنتی‌اکسیدانی با آن است. در واقع، منطقی است که دلیل این افزایش به مجموعه‌ای از عناصر موجود در محیط‌کشت Johnson و تفاوت آنها با محیط‌کشت Zarrouk (نه عاملی منفرد) نسبت داده شود؛ با این حال

به صورت رنگ‌های طبیعی و خوراکی با خواص آنتی‌اکسیدانی در صنایع غذایی و دارویی کاربرد دارند (Walter *et al.*, 2011)؛ بنابراین افزایش مقدار این رنگدانه‌ها بر ارزش اقتصادی *Spirulina* به صورت مکمل غذایی می‌افزاید.

برخلاف مقدار کلروفیل a و آستاگزانتین که با پیرشدن کشت کاهش یافتند، فیکوبیلین‌ها مانند کاروتنوئید کل با افزایش سن کشت افزایش پیدا کردند و به بیشترین مقدار در روز ۳۳ و در محیط کشت Johnson رسیدند. براساس نظر قبادیان و همکاران (۱۳۹۴) اگر مواد مغذی لازم برای سنتز هردو کلروفیل و فیکوبیلی پروتئین‌ها تا اندازه‌ای یکسان باشند، دو ماده یادشده در رقابت هستند و با کاهش یکی، دیگری باید افزایش یابد. سلول‌های *Spirulina* در محیط کشت Johnson در همه روزهای نمونه‌برداری، بیشترین مقدار هر سه فیکوبیلین (فیکوسیائین، آلفوفیکوسیائین و فیکواریترین) و بنابراین فیکوبیلین کل را داشتند. از آنجا که رنگدانه‌های فیکوبیلین به دلیل وجود باندهای دوگانه موجود در کروموفور خاصیت آنتی‌اکسیدانی دارند (Walter *et al.*, 2011)، ممکن است افزایش آنها همگام با افزایش سن کشت به پایداری و مقابله با رادیکال‌های آزاد برای جلوگیری از وقوع اکسیداسیون در سوسپانسیون سلولی کمک کند. Seo و همکاران (۲۰۱۳) با اندازه‌گیری میزان فعالیت عصاره فیکوبیلینی در خاموش کردن ۱ و ۱- دی فنیل -۲- پیکریل هیدرازیل، میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن را وابسته به سلامت و یکپارچگی کمپلکس کروموپروتئین و دست‌نخورده‌گی رنگدانه‌ها همگام استخراج دانستند.

در پژوهش حاضر، اندازه‌گیری مهار و خاموش کردن ۱ و ۱- دی فنیل -۲- پیکریل هیدرازیل در روزهای انتهایی آزمون (روز ۳۳) افزایشی همگام با افزایش مقدار فیکوبیلین‌ها نشان داد که احتمالاً به دلیل صدمه به سلامت و یکپارچگی کروموپروتئین (رنگدانه - پروتئین) هنگام استخراج رنگدانه‌ها است که ممکن است بخشی از خواص آنتی‌اکسیدانی کمپلکس سالم را تغییر دهد (Seo *et al.*, 2013).

افزودن وانیلین به هریک از دو محیط کشت، بروز تغییرات متفاوت را در مقدار فیکوبیلین‌ها سبب شد؛ به طوری که در محیط کشت Johnson، کاهش و در محیط Zarrouk، افزایش اندک آنها را سبب شد. این مسئله نیز تأثیر متقابل معنی‌دار نوع محیط کشت و وانیلین را بر مقدار ترکیبات و تولیدات سلولی نشان می‌دهد (Akbari and Madadkar Haghjou, 2018a; Akbari and Madadkar Haghjou, 2018b). مقدار پروتئین‌ها در روزهای ۲۱ و ۲۷ نمونه‌برداری به‌ویژه در محیط کشت Johnson دارای وانیلین نسبت به محیط کشت Johnson بدون وانیلین افزایش نشان داد. این مسئله ممکن است به دلیل تلاش سلول برای مقابله با آثار منفی وانیلین به‌ویژه در مرحله تقسیمات سلولی شدید باشد.

برخی پژوهش‌ها به دلیل امکان استفاده جلبک‌های سبز آب شیرین مانند *Chlorella*، *Chlamydomonas reinhardtii*، *Scenedesmus vulgaris* Beyerinck و *quadricauda* و جلبک‌های سبز - آبی *Nostoc muscorum*، *Anabaena ambigua*، *Oscillatoria sancta*، *Oscillatoria animalis*

محیط کشت Johnson آن را کاهش و افزودن آن به محیط کشت Zarrouk در بیشتر مواقع، آن را افزایش داد. این مسئله تغییرات مقدار فنل وابسته به نوع محیط کشت و نیز زمان را نشان می‌دهد. Colla و همکاران (۲۰۰۷a) نیز تغییر در مقدار فنل وابسته به تغییر در برخی شرایط دیگر مانند مقدار منبع نیتروژن و حرارت محیط را نشان داده‌اند.

### جمع‌بندی

مقادیر متفاوت شاخص‌ها و ترکیبات ارزیابی‌شده جلبک *Spirulina* در پژوهش حاضر به نوع محیط کشت استفاده‌شده، وجود یا نبود تیمار وانیلین و نیز روز نمونه‌برداری یا سن کشت بستگی دارند. دو محیط کشت Zarrouk و Johnson از نظر القای رشد سلول‌ها و نیز القای سوسپانسیون سلولی برای تولید ترکیبات مختلف آثار با شدت‌های متفاوت و گاه آثار متضاد داشتند. با توجه به ارزان‌تر بودن و کمتر بودن هزینه تهیه محیط کشت Johnson نسبت به Zarrouk و نیز اثر القایی مثبت آن در تولید برخی ترکیبات مهم مانند فنل، کربوهیدرات، پروتئین، فیکوبیلی پروتئین‌ها و لیپید، این محیط برای تحریک تولید شاخص‌های مزبور توصیه می‌شود.

پاسخ سلول‌ها به تیمار وانیلین نیز وابسته به نوع محیط کشت بود. اگرچه افزودن وانیلین، مقدار رشد جلبک *Spirulina platensis* و برخی شاخص‌ها را در هر دو محیط کشت کاهش داد، افزایش مقدار برخی شاخص‌های مهم مانند لیپید، پروتئین و کربوهیدرات را سبب شد؛ از این رو با توجه به تأثیر متقابل نوع محیط کشت بر پاسخ سلول‌های

*Spirulina maxima* و *Spirulina platensis* از فنل و تجزیه آن به صورت منبع کربنی، بر محیط کشت آگار انجام شده‌اند. همه جلبک‌ها بجز *S. maxima* و *S. platensis* توانستند تجزیه زیستی فنل را در مدت چند روز انجام دهند (Samanthakamani and Thangaraju, 2015). در سایر پژوهش‌ها جلبک‌های *Ankistrodesmus braunii* و *Scenedesmus quadricauda* توانایی تخریب بیش از ۷۰ درصد فنل‌ها را در مدت ۵ روز (Pinto et al., 2002) و جلبک *Chlorella vulgaris* تجزیه ۹۰ درصدی فنل را پس از ۷ روز (El-Sheekh et al., 2012) موجب شدند؛ اما نتایج حاصل از پژوهش حاضر نشان می‌دهند مقدار کربوهیدرات‌ها و لیپید تولیدشده در سلول‌های کشت‌شده در محیط کشت Johnson دارای وانیلین حتی در روز ۳۳ کشت بیشتر از محیط کشت Johnson بدون وانیلین است؛ بنابراین ممکن است جلبک وانیلین را به صورت منبع کربن ولی در مدت طولانی‌تری استفاده و تجزیه کند. در پژوهشی که در بررسی تأثیر فنل بر چهار ریزجلبک دریایی سبز انجام شد، کاهش رنگدانه کلروفیل و تعداد سلول‌ها با افزایش تعداد قطرات چربی همراه بود که به سم‌زدایی فنل نسبت داده شد (Duan et al., 2017).

مقدار فنل که ترکیب آنتی‌اکسیدانی بسیار مهم است، در جلبک *Spirulina* تقریباً ۵ برابر مقدار آن در جلبک *Chlorella* است (Colla et al., 2007a; Wu et al., 2005). در پژوهش حاضر، بیشترین مقدار فنل در محیط کشت Johnson و روز ۲۱ کشت مشاهده شد؛ اما افزودن وانیلین به

- Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants 6: 1-9.
- Barsanti, L., Frassanito, A. M., Passarelli, V., Evangelista, V., Etebari, M., Paccagnini, E., Lupetti, P., Lenzi, P., Verni, F. and Gualtieri, P. (2013) *Tetraflagellochloris mauritanica* gen. et sp. nov. (Chlorophyceae), a new flagellated alga from the Mauritanian desert: Morphology, ultrastructure, and phylogenetic framing. *Journal of Phycology* 49: 178-193.
- Battah, M., El-Ayoty, Y., Abomohra, A. E., El-Ghany, S. and Esmael, A. (2013) Optimization of growth and lipid production of the Chlorophyte microalga *Chlorella vulgaris* as a feedstock for biodiesel production. *World Applied Sciences Journal* 28: 1536-1543.
- Benemann, J. (2013) Microalgae for biofuels and animal feeds. *Energies* 6: 5869-5886.
- Bennett, A. and Bogorad, L. (1973) Complementary chromatic adaptation in a filamentous blue-green alga. *The Journal of Cell Biology* 58: 419-435.
- Bezerra, D. P., Soares, A. K. N. and de Sousa, D. P. (2016) Overview of the role of vanillin on redox status and cancer development. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2016(Article ID 9734816): 1-9.
- Babich, H. and Davis, D. L. (1981) Phenol: A review of environmental and health risks. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 1(1): 90-109.
- Bligh, E. G. and Dyer, W. J. (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology* 37: 911-917.
- Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-Dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
- Brooke, L. T. and Anderson, C. H. (1984) Acute toxicities of organic chemicals to fathead minnows (*Pimephales promelas*). vol. 1. Center for Lake Superior Environmental Studies, University of Wisconsin-Superior, Washington.
- Spirulina* به ماده وانیلین (ضمن لحاظ کردن آثار منفی وانیلین)، ممکن است در شرایطی که تولید ماده و ترکیب خاصی مد نظر است، از تیمار وانیلین در هریک از این محیط کشت‌ها استفاده شود.
- ### سپاسگزاری
- بدین وسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه لرستان به سبب پشتیبانی مالی از پژوهش حاضر سپاسگزاری می‌شود.
- ### منابع
- Akbari, F. and Madadkar Haghjou, M. (2018a) Improvement of nutritional values of two *Dunaliella* (green microalgae) species, by changing in medium factors. *Journal of Fisheries* 70(3): 243-261.
- Akbari, F. and Madadkar Haghjou, M. (2018b) Increase in biomass and growth of *Dunaliella* microalga under vanillin treatment. *Journal of Plant Process and Function* 7(24): 211-228.
- Al-fawwaz, A. T., Jacob, J. H. and Al-wahishe, T. E. (2016) Bioremoval capacity of phenol by green micro-algal and fungal species isolated from dry environment. *International Journal of Scientific and Technology Research* 5: 155-160.
- Albalasmeh, A. A., Berhe, A. A. and Ghezzehei, T. A. (2013) A new method for rapid determination of carbohydrate and total carbon concentrations using UV spectrophotometry. *Carbohydrate Polymers* 97: 253-261.
- Ambati, R. R., Phang, S. M., Ravi, S. and Aswathanarayana, R. G. (2014) Astaxanthin: sources, extraction, stability, biological activities and its commercial applications-A review. *Marine Drugs* 12: 128-152.
- Baqueiro-Peña, I. and Guerrero-Beltrán, J. Á. (2017) Vanilla (*Vanilla planifolia* Andr.), its residues and other industrial by-products for recovering high value flavor molecules: A review. *Journal of*

- Choudhary, M., Jetley, U. K., Khan, M. A., Zutshi, S. and Fatma, T. (2007) Effect of heavy metal stress on proline, malondialdehyde, and superoxide dismutase activity in the cyanobacterium *Spirulina platensis*-S5. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 66: 204-209.
- Colla, L. M., Furlong, E. B., Costa, J. A. V., Alberto, J. and Costa, V. (2007a) Antioxidant properties of *Spirulina (Arthrospira) platensis* cultivated under different temperatures and nitrogen regimes. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 50: 161-167.
- Colla, L. M., Oliveira Reinehr, C., Reichert, C., Costa, J. A. V., Reinehr, C. O., Reichert, C., Alberto, J. and Costa, V. (2007b) Production of biomass and nutraceutical compounds by *Spirulina platensis* under different temperature and nitrogen regimes. *Bioresource Technology* 98: 1489-1493.
- Danesi, E. D. G., Rangel-Yagui, C. O., Sato, S. and de Carvalho, J. C. M. (2011) Growth and content of *Spirulina platensis* biomass chlorophyll cultivated at different values of light intensity and temperature using different nitrogen sources. *Brazilian Journal of Microbiology* 42: 362-373.
- Deng, R. and Chow, T. J. J. (2010) Hypolipidemic, antioxidant, and antiinflammatory activities of microalgae *Spirulina*. *Cardiovascular Therapeutics* 28: 33-45.
- Devanathan, J. and Ramanathan, N. (2013) Utilization of seawater as a medium for mass production of *Spirulina platensis*-A novel approach. *International Journal of Recent Scientific Research* 4: 597-602.
- Dineshkumar, R., Narendran, R. and Sampathkumar, P. (2016) Cultivation of *Spirulina platensis* in different selective media. *Indian Journal of Geo Marine Sciences* 45(12): 1749-1754.
- Duan, W., Meng, F., Lin, Y. and Wang, G. (2017) Toxicological effects of phenol on four marine microalgae. *Environmental Toxicology and Pharmacology*.
- El-Sheekh, M., Ghareib, M. M. and Abou-el-souod, G. W. (2012) Biodegradation of phenolic and polycyclic aromatic compounds by some algae and cyanobacteria. *Bioremediation and Biodegradation* 3: 1-9.
- Estak, Z. (1963) Changes in the chlorophyll content as related to photosynthetic activity and age of leaves. *Photochemistry and Photobiology* 2: 101-110.
- Fitzgerald, D. J., Stratford, M. and Gasson, M. J. (2004) The potential application of vanillin in preventing yeast spoilage of soft drinks and fruit juices. *Journal of Food Protection* 67: 391-395.
- Fries, L. (1974) Growth stimulation of axenic red algae by simple phenolic compounds. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 15: 1-9.
- Gallage, N. J., Jorgensen, K., Janfelt, C., Nielsen, A. J., Naake, T., Dunski, E., Dalsten, L., Grisoni, M. and Moller, B. L. (2018) The intracellular localization of the vanillin biosynthetic machinery in pods of *Vanilla planifolia*. *Plant and Cell Physiology* 59(2): 304-318.
- Ghobadian, S., Gangidoost, H., Ayatee, B. and Soltani, N. (2015) Investigating the effect of aeration and aqueous factors on quantitative and qualitative indices of *Spirulina* microalgae biomass as a candidate for treatment of sewage. *Journal of Aquatic Ecology* 5(2): 87-99.
- Gimeno, O., Carbajo, M., Beltrán, F. J. and Rivas, F. J. (2005) Phenol and substituted phenols AOPs remediation. *Journal of Hazardous Materials* 119: 99-108.
- Goksan, T., Zekeriyaoğlu, A. and Ülkür, A. K. (2006) The growth of *Spirulina platensis* in different culture systems under greenhouse condition. *Turkish Journal of Biology* 31: 47-52.
- Hartenstein, R. (1982) Effect of aromatic compounds, humic acids and lignins on growth of the earthworm *Eisenia foetida*. *Soil Biology and Biochemistry* 14: 595-599.
- Heng, L., Yanling, Y., Weijia, G., Xing, L. and Guibai, L. (2008) Effect of pretreatment by permanganate/chlorine on algae fouling control for ultrafiltration (UF) membrane system. *Desalination* 222(1-3): 74-80.

- Hodges, D. M., DeLong, J. M., Forney, C. F. and Prange, R. K. (1999) Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. *Plantae* 207: 604-611.
- Hoseini, S. M. and Mozafari, M. R. (2013) Nutritional and medical applications of *Spirulina*. *Microalgae. Mini Review in Medicinal Chemistry* 13(8): 1231-1237.
- Jenkins, A. and Erraguntla, N. K. (2014) Vanillin. In: *Encyclopedia of Toxicology* (Ed. Wexler, P.) 912-914. Academic Press, Oxford.
- Jimenez, C. and Niell, F. X. (1991) Growth of *Dunaliella viridis* Teodoresco: effect of salinity, temperature and nitrogen concentration. *Journal of Applied Phycology* 3: 319-327.
- Johnson, M. K., Johnson, E. J., Macelroy, R. D., Speer, H. L. and Bruff, B. S. (1968) Effects of salts on the halophilic alga *Dunaliella viridis*. *Journal of Bacteriology* 95: 1461-1468.
- Junli, H., Li, W., Nenqi, R., Li, L. X., Fun, S. R. and Guanle, Y. (1997) Disinfection effect of chlorine dioxide on viruses, algae and animal planktons in water. *Water Research* 31(3): 455-460.
- Källqvist, T. 1996. Effect of vanillin on the reproduction of *Daphnia magna*. NIVA (Norwegian Institute for Water Research), Report no. G001/1a, Norway.
- Kepekçi, R. A. and Saygideger, S. D. (2012) Enhancement of phenolic compound production in *Spirulina platensis* by two-step batch mode cultivation. *Journal of Applied Phycology* 24: 897-905.
- Klekner, V. and Kosaric, N. (2008) Degradation of phenols by algae. *Environmental Technology* 13: 493-501.
- Lee, W. C., Mahmud, R., Pillai, S., Perumal, S., Lee, W. C., Mahmud, R., Pillai, S., Perumal, S. and Ismail, S. (2012) Antioxidant activities of essential oil of *Psidium Guajava* L. leaves. *APCBEE Procedia* 2: 86-91.
- Madkour, F. F., Kamil, A. E. W. and Nasr, H. S. (2012) Production and nutritive value of *Spirulina platensis* in reduced cost media. *Egyptian Journal of Aquatic Research* 38: 51-57.
- Mazang-Ghasemi, S., Einali, A., Valizadeh, J. and Noroozifar, M. (2016) Tolerance induction to stress caused by lavender (*Lavandula angustifolia*) extracts in the microalga *Dunaliella salina* through metabolic modifications and  $\beta$ -carotene production. *Iranian Journal of Plant Biology* 8(27): 63-80.
- Miazek, K. (2012) The effect of vanillin on *Chlorella* growth. W: Technical University of Lodz, Department of Bioprocess Engineering, Wolczanska 213, Lodz, Poland.
- Miazek, K., Goffin, D., and Richel, A. (2013) Growth of *Chlorella* in vanillin enriched medium. 6<sup>th</sup> International Conference on Green and Sustainable Chemistry, Nottingham, England.
- Moraes, C. C., Sala, L., Cerveira, G. P. and Kalil, S. J. (2011) C-Phycocyanin extraction from *Spirulina platensis* wet biomass. *Brazilian Journal of Chemical Engineering* 28: 45-49.
- Narayan, M. S., Manoj, G. P., Vatchravelu, K., Bhagyalakshmi, N. and Mahadevaswamy, M. (2005) Utilization of glycerol as carbon source on the growth, pigment and lipid production in *Spirulina platensis*. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 56: 521-528.
- Pan-Utai, W., Kahapana, W. and Iamtham, S. (2017) Extraction of C-phycoyanin from *Arthrospira (Spirulina)* and its thermal stability with citric acid. *Journal of Applied Phycology* 30(1): 231-242.
- Pinto, G., Pollio, A., Previtera, L. and Temussi, F. (2002) Biodegradation of phenols by microalgae. *Biotechnology Letters* 24: 2047-2051.
- Pisoschi, A. M. and Negulescu, G. P. (2011) Methods for total antioxidant activity determination: A review. *Biochemistry and Analytical Biochemistry* 1: 1-10.
- Raof, B., Kaushik, B. D. and Prasanna, R. (2006) Formulation of a low-cost medium for mass production of

- Spirulina*. Biomass and Bioenergy 30: 537-542.
- Régnier, P., Bastias, J., Rodriguez-Ruiz, V., Caballero-Casero, N., Caballo, C., Sicilia, D., Fuentes, A., Maire, M., Crepin, M., Letourneur, D., Gueguen, V., Rubio, S. and Pavon-Djavid, G. (2015) Astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* prevents oxidative stress on human endothelial cells without toxicity. Marine Drugs 13: 2857-2874.
- Samanthakamani, D. and Thangaraju, N. (2015) Potential of freshwater microalgae for degradation of phenol. Indian Journal of Scientific Research and Technology 3: 9-12.
- Seo, Y. C., Choi, W. S., Park, J. H., Park, J. O., Jung, K. H. and Lee, H. Y. (2013) Stable isolation of phycocyanin from *Spirulina platensis* associated with high-pressure extraction process. International Journal of Molecular Science 14(1): 1778-1787.
- Scragg, A. H. (2006) The effect of phenol on the growth of *Chlorella vulgaris* and *Chlorella* VT-1. Enzyme and Microbial Technology 39: 796-799.
- Semple, K. T. and Cain, R. B. (1996) Biodegradation of phenols by the alga *Ochromonas danica*. Applied and Environmental Microbiology 62: 1265-1273.
- Setyaningsih, I., Bintang, M. and Madina, N. (2015) Potentially antihyperglycemic from biomass and phycocyanin of *Spirulina fusiformis* voronikhin by *in vivo* test. Procedia Chemistry 14: 211-215.
- Shalaby, E. A. and Shanab, S. M. M. (2013) Comparison of DPPH and ABTS assays for determining antioxidant potential of water and methanol extracts of *Spirulina platensis*. Indian Journal of Geo-Marine Sciences 42: 556-564.
- Shariati, M. and Lilley, R. M. (1994) Loss of intracellular glycerol from *Dunaliella* by electroporation at constant osmotic pressure: subsequent restoration of glycerol content and associated volume changes. Plant, Cell and Environment 17: 1295-1304.
- Sharma, K. K., Schuhmann, H. and Schenk, P. M. (2012) High lipid induction in microalgae for biodiesel production. Energies 5: 1532-1553.
- Singh, N. and Singh, J. (2002) An enzymatic method for removal of phenol from industrial effluent. Preparative Biochemistry and Biotechnology 32: 127-133.
- Soni, S. K., Agrawal, K., Srivastava, S. K., Gupta, S. and Pankaj, C. K. (2012) Growth performance and biochemical analysis of *Spirulina platensis* under different culture conditions. Journal of Algal Biomass Utilization 3(1): 55-58.
- Usharani, G., Saranraj, P. and Kanchana, D. (2012) *In vitro* cultivation of *Spirulina platensis* using rice mill effluent. International Journal of Pharmaceutical and Biological Archives 3(6): 1518 - 1523.
- Vanilin, O. S. (1996) Forward introduction. UNEP Publications.
- Walter, A., de Carvalho, J. C., Soccol, V. T., de Faria, A. B. B., Ghiggi, V. and Soccol, C. R. (2011) Study of phycocyanin production from *Spirulina platensis* under different light spectra. Brazilian Archives of Biology and Technology 54(4): 675-682.
- Walton, N. J., Mayer, M. J. and Narbad, A. (2003) Vanillin. Phytochemistry 63: 505-515.
- Walton, N. J., Narbad, A., Faulds, C. B. and Williamson, G. (2000) Novel approaches to the biosynthesis of vanillin. Current Opinion in Biotechnology 11: 490-496.
- Wu, L. C., Ho, J. A., Shieh, M. C. and Lu, I. W. (2005) Antioxidant and antiproliferative activities of *Spirulina* and *Chlorella* water extracts. Journal of Agricultural and Food Chemistry 53(10): 4207-4212.
- Xu, P., Hua, D. and Ma, C. (2007) Microbial transformation of propenylbenzenes for natural flavour production. Trends in Biotechnology 25: 571-576.

Yaakob, Z., Ali, E., Zainal, A., Mohamad, M. and Takriff, M. S. (2014) An overview : biomolecules from microalgae for animal feed and aquaculture. *Journal of Biological Research (Thessalon)* 21: 1-10.

Zarrouk, C. (1966) Contribution to the study of cyanobacteria, influence of various physical and chemical factors on growth and photosynthesis in *Spirulina maxima*. PhD thesis, University of Paris, Paris, France.