مجله بوم شناسی آبزیان

Journal homepage: http://jae.hormozgan.ac.ir

مقایسه محتوای پلی‌هیدروکسی بوتیرات تولید شده توسط *Spirulina* sp. در شرایط کشت اتوتروفی، هتروتروفی و میکسوتروفی

طاهره نوبخت پرشکوه[۱]، اکبر نورسته نیا[۱،۲*]، فاطمه مرادی[۱]

[۱] گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان، رشت

[۲] گروه علوم دریایی، پژوهشکده حوزه آبی دریای خزر، دانشگاه گیلان، رشت

نوع مقاله:
پژوهشی

تاریخچه مقاله:
دریافت: ۹۷/۰۷/۲۷
اصلاح: ۹۸/۰۲/۳۰
پذیرش: ۹۸/۰۳/۱۰

کلمات کلیدی:
اتوتروفی
زیست‌تخریب‌پذیر
میکسوتروفی
هتروتروفی
Spirulina sp.

چکیده

پلی‌هیدروکسی بوتیرات یکی از انواع ترکیبات زیست تخریب‌پذیر است که توسط سیانوباکتری *Spirulina* sp. تولید می‌شود. در این مطالعه سیانوباکتری *Spirulina* sp. جداسازی شده از مخازن آبی استان گیلان به مدت ۲۰ روز در محیط کشت Zarruok تحت شرایط اتوتروف، میکسوتروف و هتروتروف کشت داده شد و مورد بررسی قرار گرفت. استخراج پلی‌هیدروکسی بوتیرات با استفاده از حلال کلروفرم متانول صورت پذیرفت. جهت بررسی کیفی از رنگ‌آمیزی با سودان سیاه و روش FTIR استفاده شد و کروماتوگرافی گازی (GC) به منظور بررسی کمی مورد استفاده قرار گرفت. گرانول‌های پلی‌هیدروکسی بوتیرات درون سلول‌های *Spirulina* sp. کشت یافته در هر سه محیط اتوتروف، میکسوتروف و هتروتروف به صورت لکه‌های سیاه مشاهده شد. طیف جذبی FTIR نیز حضور پلی‌هیدروکسی بوتیرات جدا شده ازاسپیرولینا را تائید کرد. غلظت پلی‌هیدروکسی بوتیرات در شرایط اتوتروف، میکسوتروف و هتروتروف با توجه به کروماتوگرام حاصل از GC به ترتیب ۰/۴۱۴، ۰/۷۹۴ و ۰/۸۱۶ میکروگرم بر لیتر به دست آمد. نتایج به دست آمده نشان می‌دهد، محیط کشت هتروتروف نسبت به دو محیط دیگر برای تجمع پلی‌هیدرروکسی بوتیرات مناسب‌تر است.

مقدمــه

استفاده از پلیمرهای صنعتی از جمله پلاستیک‌ها باعث به وجود آمدن مشکلاتی از قبیل دفن پسماندهای جامد و همچنین گرم شدن کره زمین می‌شود (Lee *et al.*, 2008). امروزه پلاستیک‌ها در تولید انواع فرآورده‌های صنعتی، از صنعت خودروسازی گرفته تا دنیای پزشکی، دارای کاربرد هستند، اما این مواد به عنوان زباله‌های مقاوم به تجزیه میکروبی، چالش‌های زیست‌محیطی پیچیده‌ای به وجود آورده‌اند (Mokhtarani *et al.*, 2007).

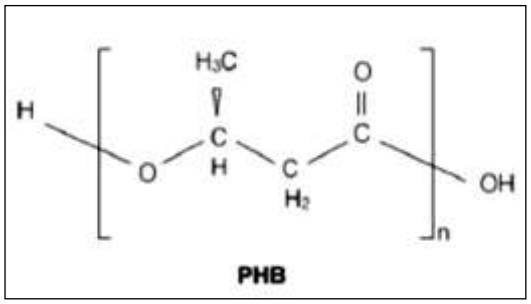
فعالیت‌های پژوهشی گسترده‌ای در زمینه پلیمرهای زیست‌تخریب‌پذیر، با هدف غلبه بر مشکلات زیست‌محیطی ناشی از تجمع پلاستیک‌های مصنوعی در طبیعت و همچنین در زمینه پلیمرهای زیست تخریب‌پذیر در حال انجام است (Shimao, 2001). پلیمرهای متداول امروزی از نفت خام ساخته می‌شوند که با توجه به محدود بودن منابع نفتی، باید به تدریج با پلاستیک‌های زیست تخریب‌پذیر که از منابع تجدید شونده ساخته می‌شوند، جانشین شوند (Vanessa *et al.*, 2015).

* نویسنده مسئول، پست الکترونیک: norasteh@guilan.ac.ir

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2026-11-22]

[DOR: 20.1001.1.23222751.1398.9.1.10.9]

این مواد به وسیله موجودات زنده ساخته می‌شوند و در نتیجه در چرخه ساخت و تجزیه مواد زیستی قرار می‌گیرند. بنابراین بنابراین منبعی تجدید پذیر محسوب می شوند. سه گروه از موجودات زنده می‌توانند پلاستیک‌های زیست‌تخریب‌پذیر را تولید کنند که عبارت‌اند از: گیاهان، جانوران و میکروارگانیسم‌ها. در این میان جلبک‌ها و سیانوباکترها بیشتر مورد توجه قرار گرفته‌اند (Sundaramoorthy *et al.*, 2013; Anupama *et al.*, 2010). یکی از پلیمرهای غیرسمی و تجزیه‌پذیر که تاکنون تهیه شده پلی‌هیدروکسی آلکانوات‌ها (PHA) هستند. PHA ها عموماً از زیرواحد بتاهیدروکسی آلکانوات و به واسطه مسیری ساده با سه آنزیم، از استیل-کوآنزیم A ساخته شده و معروف‌ترین آن‌ها پلی‌هیدروکسی بوتیرات (PHB) است. PHB یک ترکیب شبه لیپیدی است و از واحدهای بتاهیدروکسی بوتیریک اسید تشکیل می‌شود. مونومرهای این ترکیب توسط پیوندهای استری به هم متصل شده و پلیمر طویل PHB را تشکیل می‌دهند. با تجمع این پلیمرها، گرانول‌های PHB شکل می‌گیرند که به عنوان مواد ذخیره‌ای کربن/انرژی عمل می‌کنند (Sundaramoorthy *et al.*, 2013). شکل (۱) ساختار شیمیایی PHB که داری یک گروه متیل (CH_3) در زنجیره جانبی خود است را نشان می‌دهد (Singh and Parmar, 2011; Brandl *et al.*, 1990).



شکل ۱. ساختار شیمیایی پلی‌هیدروکسی بوتیرات (Singh and Parmar, 2011; Brandl *et al.*, 1990).

این مواد اغلب در پاسخ به شرایط تنشی به عنوان یک متابولیت ثانویه‌ی ناشی از استرس انباشته می‌شود. مواد بیوپلیمری که در سلول‌های گیاهی ساخته می‌شود، بیشتر از جنس PHB است. سیانوباکترها قادر به تولید PHB می‌باشند (Anupama *et al.*, 2010; Vanessa *et al.*, 2015). سیانوباکترها گروهی از موجودات زنده هستند که انرژی مورد نیازشان را از طریق فتوسنتز کسب می‌کنند. آن‌ها به اشکال تک‌سلولی، کلونی و رشته‌ای یافت می‌شوند (Pal and Kumar, 2014). سیانوباکترها محدوده وسیعی از زیستگاه‌های طبیعی زمین از جمله آب‌های شیرین، دریاها، چشمه‌های آب گرم، خلیج‌های بسیار شور و بوم سامانه‌های خاکی مرطوب را در کلیه عرض‌های جغرافیایی اشغال نموده‌اند (Drosg *et al.*, 2015). از مزایای استفاده از سیانوباکترها این است که این موجودات فتواتوتروف و فتوسنتز کننده هستند همچنین در مدت زمان کوتاهی رشد کرده و با شرایط مختلف سازگاری دارند. علاوه براین بهره‌وری زیست‌توده بالا، حمل و نقل ساده، کم‌خطر از نظر آلودگی و هزینه‌های عملیاتی پایینی دارند. یکی ازسیانوباکترهای تولید کننده PHB اسپیرولینا (*Spirulina* sp.) است (Anupama *et al.*, 2010; Vanessa *et al.*, 2015). *Spirulina* sp. سازگار با شرایط سخت، محیط‌های بسیار گرم و آب‌های شور است همچنین دارای طیف رشد در محدوده pH=8/5-11/0 است. *Spirulina* sp. می‌تواند با استفاده از برخی قندها به ویژه گلوکز تحت شرایط هتروتروف و میکسوتروف رشد کند (Richmond, 1988; Chen *et al.*, 2006). ریزجلبک‌ها در صورت قرار گرفتن در شرایط هتروتروفی برای دریافت منبع کربن از محیط رشد، ذخیره آن‌ها و یا بهینه‌سازی مصرف منابع سازش می‌یابند. ریزجلبک‌ها در حالت کلی برای رشد و تولید زیست‌توده (شامل۵۰-۴۰ ٪ کربن) به منبع کافی کربن و نور برای انجام فتوسنتز نیاز دارند (Moheimani, 2005). آن‌ها قادرند ساختار درونی‌شان را تغییر دهند و تنظیم کنند. آن‌ها همچنین می‌توانند در پاسخ به شرایط محیطی تغییر متابولیسم دهند (Richmond, 2004). برخی از ریزجلبک‌ها بر حسب نوع تغذیه می‌توانند به صورت اتوتروفی، هتروتروفی یا میکسوتروف رشد نمایند (Chojnacka and Marquez-Rocha, 2004). بهترین راه‌حل برای رفع مشکلات زیست‌محیطی ناشی از پلیمرهای مقاوم به تخریب زیستی، تولید پلیمرهای زیست‌تخریب‌پذیر می‌باشد. به همین دلیل تولید این نوع پلاستیک‌ها حائز اهمیت بوده و مورد نظر پژوهشگران زیادی قرار گرفته است. هدف این پژوهش بررسی

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2026-11-22]

[DOR: 20.1001.1.23222751.1398.9.1.10.9]

مقایسه‌ای تولید پلی‌هیدروکسی بوتیرات تولید شده توسط سیانوباکتری *Spirulina* sp. بومی ذخایر آبی استان گیلان در محیط کشت‌های اتوتروفی، هتروتروفی و میکسوتروفی به صورت کمی و کیفی در شرایط آزمایشگاهی است.

مواد و روش‌ها

تهیه نمونه و کشت ریزجلبک

نمونه‌ی ریزجلبک *Spirulina* sp. جدا شده از مخازن آبی استان گیلان از موسسه تحقیقات ماهیان خاویاری واقع در شهر رشت تهیه شد. جهت رشد ریزجلبک *Spirulina* sp. در شرایط کشت اتوتروفی (autotrophic)، هتروتروفی (heterotrophic) و میکسوتروفی (mixotrophic) ابتدا محیط کشت استاندارد Zarrouk (Zarrouk, 1966)، تهیه و pH آن در محدوده ۹-۸/۵ تنظیم شده و تلقیح ریزجلبک در محیط‌های کشت انجام پذیرفت. برای ایجاد شرایط اتوتروف، یک ارلن به طور مستقیم در شرایط پایه اتاقک کشت با دمای ۲± ۲۵ درجه سانتی‌گراد و شدت نوری ۲۵۰۰ لوکس با دوره نوری ۱۲ ساعت نور و ۱۲ ساعت تاریکی و تحت شرایط هوادهی به مدت ۲۰ روز قرار گرفت. برای ایجاد شرایط هتروتروفی و ایجاد تاریکی، ارلن توسط یک کیسه پلاستیکی مشکی با قابلیت عدم عبور نو پوشانده شد و در شرایط پایه اتاقک کشت به مدت ۲۰ روز قرار گرفت. برای ایجاد شرایط میکسوتروفی ۰/۱ ٪ ساکارز به عنوان منبع کربن به محیط اضافه شد و در شرایط پایه اتاقک کشت به مدت ۲۰ روز قرار گرفت. زیست‌توده ریزجلبک برای استخراج و سنجش پلی‌هیدروکسی بوتیرات و آنالیزهای فیزیولوژی از جمله سنجش پروتئین کل و پراکسیداسیون لیپیدی مورد استفاده قرار گرفت.

سنجش رشد روزانه بر حسب جذب نوری (OD)

با استفاده از روش Ismaiel و همکاران (۲۰۱۶)، رشد ریزجلبک از طریق اندازه‌ی جذب نوری در طول موج ۵۶۰nm طی زمان رشد، هر دو روز یک‌بار با کمک دستگاه اسپکتروفتومتری (CamSpec M501 Single Beam UV/Visible, Chaina) اندازه‌گیری شد.

سنجش میزان پراکسیداسیون لیپیدی و محتوای پروتئین کل

برای سنجش مقدار مالون‌دی‌آلدهید از روش Heath و Packer (۱۹۶۸) استفاده شد. بدین منظور ۰/۱ گرم سوسپانسیون جلبکی به کمک ۱ میلی‌لیتر محلول تری کلرواستیک اسید (۵٪) تحت تأثیر امواج اولتراسوند (Power=70, Duty=50) به مدت ۳۱ ثانیه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و عصاره به دست آمده به مدت ۱۵ دقیقه در ۹۰۰۰ (rpm) سانتریفیوژ شد. برابر با حجم سوپرناتانت، محلول تیوباربیتوریک اسید ۰/۵ درصد (در تری کلرواستیک اسید ۲۰ ٪) به آن اضافه شد. این مخلوط برای ۳۰ دقیقه در بن ماری ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد جوشانده و بلافاصله در ظرف یخ برای چند دقیقه قرار گرفت. سپس به مدت ۵ دقیقه در ۳۰۰۰ دور مجدداً سانتریفیوژ شد تا محلول شفاف به دست آید. جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۳۲ نانومتر خوانده شد. برای محاسبه غلظت MDA از ضریب خاموشی ۱۵۵ $mM^{-1}cm^{-1}$ استفاده شد و در نهایت مقدار مالون‌دی‌آلدهید بر اساس نانومول در گرم وزن‌تر محاسبه شد. محتوای پروتئین کل به روش برادفورد (Bradford, 1976) و با استفاده از سرم آلبومین گاوی BSA به عنوان منحنی استاندارد در طول موج ۵۹۵ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر مدل CamSpec M501 Single Beam UV/Visible اندازه‌گیری شد.

سنجش محتوای کربوهیدرات در محیط میکسوتروف

ابتدا ۱۰۰ میکرولیتر از محیط کشت میکسوتروف در روز اول و روز ۲۰ام برداشت و به آن ۳ میلی‌لیتر محلول آنترون (۱۵۰ میلی‌گرم آنترون حل شده در ۱۰۰ میلی‌لیتر اسید سولفوریک ۷۲ درصد) اضافه شد. آنترون باید به تعداد نمونه‌ها به صورت تازه تهیه شود. پس از خنک شدن در محیط آزمایشگاه میزان جذب نمونه‌ها در طول موج ۶۲۵ نانومتر با اسپکتروفتومتر قرائت شد. منحنی کالیبراسیون با استفاده از استاندارد گلوکز رسم و میزان قندهای محلول نمونه بر حسب میلی‌گرم بر لیتر محاسبه شد (Irigoyen *et al.*, 1992).

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2026-11-22]

[DOR: 20.1001.1.23222751.1398.9.1.10.9]

رنگ‌آمیزی پلی‌هیدروکسی بوتیرات

یک قطره از سوسپانسیون ریزجلبک را بر روی لام قرار داده و پس از خشک شدن به آن محلول سودان سیاه (۰/۳ گرم سودان سیاه + ۱۰۰ میلی‌لیتر اتانول ۷۰ ٪) آغشته، بعد از گذشت ۱۰ دقیقه با آب مقطر شسته شده و پس از خشک شدن با زایلن شستشو داده شد. سپس به مدت ۱۵ ثانیه با محلول ۰/۵٪ سافرانین آغشته و با آب مقطر شسته شد. سپس گرانول‌های پلی هیدروکسی بوتیرات به صورت لکه‌های سیاه رنگ درون ریزجلبک با لنز ۱۰۰ میکروسکوپ نوری مشاهده شد (Anupama *et al.*, 2010).

استخراج پلی‌هیدروکسی بوتیرات

با توجه به روش Sayaka و همکاران (۲۰۱۵) و با استفاده از زیست‌توده خشک، PHB تجمع یافته در ریزجلبک اسپیرولینا استخراج و تخلیص شد. نمونه‌ها ابتدا خشک و سپس وزن شد. ۷ میلی‌لیتر کلروفرم به آن اضافه شده و به کمک دستگاه ورتکس همگن شده و به مدت ۱۱ دقیقه تحت تاثیر امواج اولتراسوند قرار داده شد. محصول در انکوباتور خشک و استفاده از امواج اولتراسوند تکرار شد. با افزودن کلروفرم و صاف کردن با کاغذ صافی و تبخیر حلال، حجم کلروفرم باقی‌مانده به یک میلی‌لیتر رسانده شد. با افزودن هگزان و قرار دادن مخلوط به مدت یک شب در دمای اتاق و سانتریفیوژ نمونه‌ها در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد محلولی به دست آمد که به آن متانول اضافه شده و پس از ۲۴ ساعت دوباره سانتریفیوژ شد. پس از حذف فاز بالایی، محلول پایین که حاوی کلروفرم بود، تبخیر و رسوب باقی مانده به عنوان PHB تخلیص شده، جمع آوری شد.

آنالیز کیفی و کمی پلی‌هیدروکسی بوتیرات از طریق دستگاه FTIR و کروماتوگرافی گازی (GC)

به منظور تائید حضور پلی‌هیدروکسی بوتیرات بعد از استخراج، رسوب به دست آمده جهت بررسی کیفیت نمونه‌ها به وسیله دستگاه FTIR آنالیز شد و طیف‌های مربوطه مورد بررسی قرار گرفت (Anupama *et al.*, 2010). بعد از متیلاسیون نمونه‌ها با روش Brandl و همکاران (۱۹۸۸)، مقدار ۲ میلی‌لیتر کلروفرم و ۱ میلی‌لیتر متانول اسیدی (شامل ۸۵٪ متانول حجمی - حجمی، ۱۵٪ اسید سولفوریک حجمی - حجمی) به نمونه به دست آمده و نمونه استاندارد پلی‌هیدروکسی بوتیرات اضافه شد. نمونه‌ها و استاندارد به مدت ۲ ساعت در دما ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد تا کامل شدن واکنش استری شدن نگه‌داری شدند. در این حالت دو فاز ایجاد می‌شود به طوری که فاز بالایی حاوی اسید سولفوریک و فاز پایینی حاوی متیل استر هیدروکسی بوتیرات است که برای تزریق به دستگاه GC (Perkin Elmer, Clarus 580, England) استفاده شد. برای تائید تولید دانه‌های PHB از ماده استاندارد تری‌هیدروکسی‌بوتیریک اسید (Sigma, USA) استفاده شد. شرایط آزمایش شامل دمای تزریق ۱۵۰ درجه سانتی‌گراد، گاز حامل، نیتروژن با سرعت ۲ میلی‌لیتر بر دقیقه، دمای ستون (از نوع CLP) ۱۲۰ درجه سانتی‌گراد (زمان ماند یک دقیقه) و سپس افزایش دما با شیب ۵ درجه سانتی‌گراد بر دقیقه تا ۲۸۰ درجه و ۵ دقیقه ماندن در ۲۸۰ دقیقه، دتکتور از نوع FID و با دمای ۲۰۰ درجه سانتی‌گراد بود.

محاسبات آماری

انجام کلیه آزمایش‌ها در این پژوهش در سه تکرار انجام شد. جهت بررسی داده‌ها از آنالیز واریانس یک‌طرفه (One-Way ANOVA) و آزمون دانکن در سطح احتمال $P\leq ۰/۰۵$ با نرم‌افزار SPSS (Statistics 17.0) و جهت ترسیم نمودارها از نرم‌افزار Excel استفاده شد.

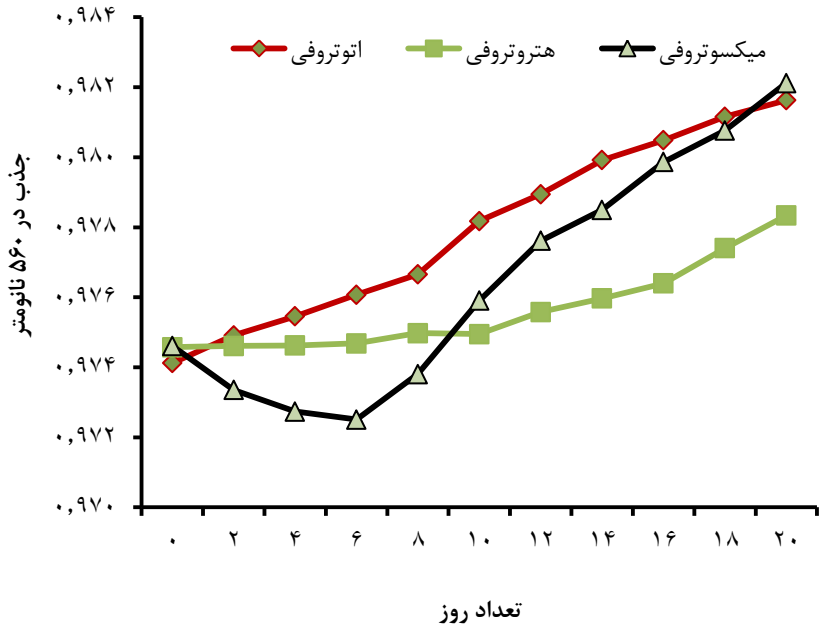
نتایـج

رشد روزانه ریزجلبک *Spirulina* sp.

منحنی رشد رسم شده برای ریزجلبک *Spirulina* sp. نشان می‌دهد که شرایط رشد برای نمونه‌های رشد یافته در تیمارهای اتوتروفی و میکسوتروفی تقریباً مشابه و برای تیمار هتروترفی متفاوت از دو تیمار دیگر است (شکل۲).

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2026-11-22]

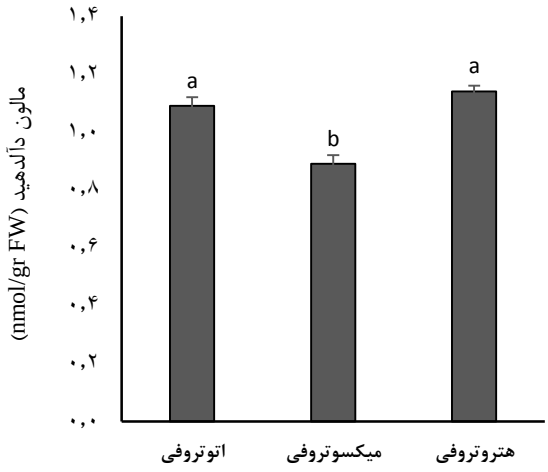
[DOR: 20.1001.1.23222751.1398.9.1.10.9]



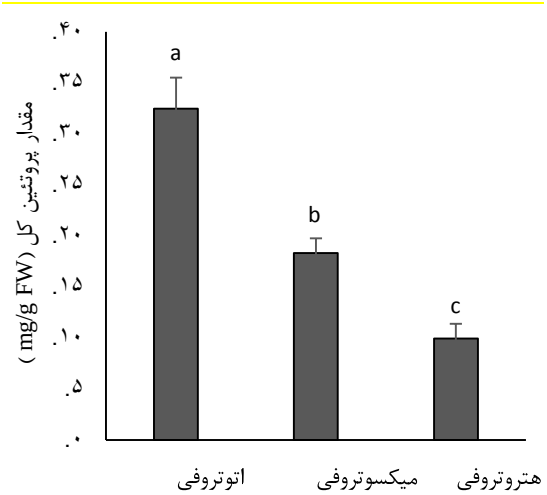
شکل ۲. منحنی‌های رشد *Spirulina* sp. در محیط کشت اتوتروف، میکسوتروف و هتروتروف در شرایط پایه اتاقک کشت با دمای ۲± ۲۵ درجه سانتی‌گراد و شدت نوری ۲۵۰۰ لوکس با دوره نوری ۱۲ ساعت نور و ۱۲ ساعت تاریکی و در شرایط هوادهی.

محتوای پراکسیداسیون لیپیدی و میزان پروتئین کل ریزجلبک *Spirulina* sp.

محتوای مالون‌دی‌آلدهید در نمونه رشد یافته در شرایط اتوتروفی و هتروتروفی در مقایسه با شرایط میکسوتروفی به صورت معنی‌داری بیشتر بود (شکل ۳). با توجه به شکل (۴)، افزایش محتوای پروتئین نیز در نمونه‌های رشد یافته در شرایط اتوتروفی نسبت به تیمارهای میکسوتروفی و هتروتروفی معنی‌دار بود، به‌طوری‌که بیشترین محتوای پروتئین در شرایط اتووتروفی و کمترین مقدار در شرایط هتروتروفی به دست آمد.



شکل ۳. تغییرات محتوای مالون‌دی‌آلدهید در *Spirulina* sp. در شرایط اتوتروف، میکسوتروف و هتروتروف ، داده‌ها میانگین سه تکرار ± خطای معیار (SE) می‌باشد. حروف متفاوت نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین نمونه‌ها براساس مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال P≤۰/۰۵ می‌باشند.



شکل ۴. تغییرات محتوای پروتئین کل *Spirulina* sp.در شرایط اتوتروف، میکسوتروف و هتروتروف، داده‌ها میانگین سه تکرار ± خطای معیار (SE) می‌باشد. حروف متفاوت نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین نمونه‌ها براساس مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال P≤۰/۰۵ می‌باشند.

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2026-11-22]
[DOR: 20.1001.1.23222751.1398.9.1.10.9]



شکل ۵. تصاویر گرانول‌های PHB در ریزجلبک *Spirulina* sp.

گرانول‌های رنگ‌آمیزی شده پلی‌هیدروکسی بوتیرات درون سلول‌های *Spirulina* sp.

پس از انجام رنگ‌آمیزی و مشاهده به وسیله میکروسکوپ نوری با لنز ۱۰۰، گرانول‌های پلی‌هیدروکسی بوتیرات درون سلول‌های اسپیرولینا تصویربرداری شدند که با پیکان در شکل (۵) مشخص شده است.

طیف FTIR و کروماتوگرام پلی‌هیدروکسی بوتیرات تجمع یافته در *Spirulina* sp.

پیک‌های به دست آمده از طیف‌های FTIR برای نمونه استاندارد پلی‌هیدروکسی بوتیرات و نمونه‌های استخراج شده از اسپیرولینا در شرایط کشت مختلف، کیفیت پلی‌هیدروکسی بوتیرات استخراج شده را تائید می‌نماید. نوار پهن در $3439\ cm^{-1}$ مربوط به ارتعاش کششی گروه‌های O-H می‌باشد. ارتعاشات کششی C-H در ناحیه ۲۸۷۷ و $2987\ cm^{-1}$ ظاهر شده‌اند. نوار قوی در $1727\ cm^{-1}$ مربوط به ارتعاش کششی C=O می‌باشد. همچنین ارتعاشات خمشی H-C-H در گروه‌های CH_2 و CH_3 به صورت نوارهایی در ۱۳۸۱ و $1455\ cm^{-1}$ قابل مشاهده است. ارتعاشات کششی C-O نیز در ۱۱۸۴ و $1286\ cm^{-1}$ ظاهر شده‌اند (شکل ۶) .

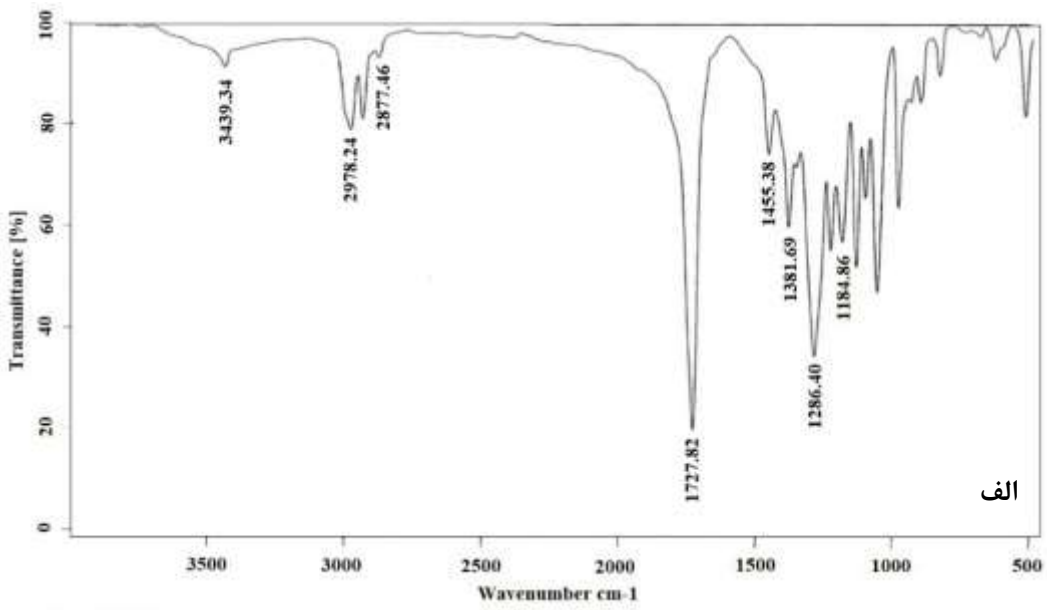
مطابق با کروماتوگرام‌های به دست آمده از کروماتوگرافی گازی، پیک PHB استاندارد در دقیقه ۳۶/۱۷ و پیک PHB تولید شده در شرایط اتوتروف، میکسوتروف و هتروتروف در دقیقه ۳۵/۹۱ ظاهر شدند (شکل ۷). مقادیر کمی پلی‌هیدروکسی بوتیرات با توجه به منحنی استاندارد حاصل از غلظت‌های مختلف پلی‌هیدروکسی بوتیرات استاندارد، محاسبه و ارائه شد (جدول ۱).

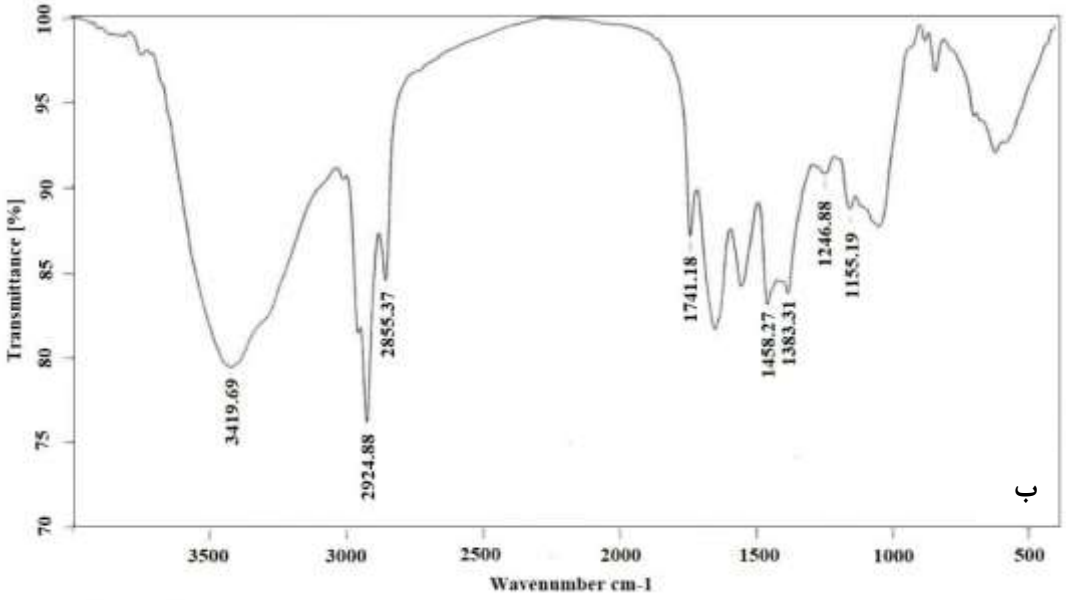
جدول ۱. مقادیر پلی‌هیدروکسی بوتیرات بر حسب میکروگرم بر لیتر

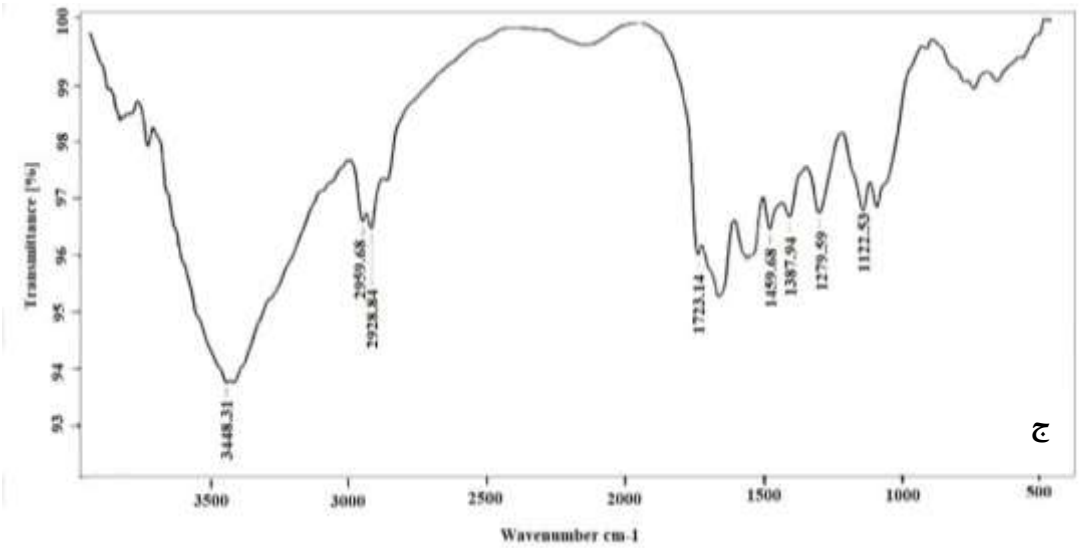
تیمار	PHB (µg/l)
اتوتروف	۰/۴۱۴۴۹۷
هتروتروف	۰/۸۱۵۸۳۹
میکسوتروف	۰/۷۹۴۳۹۴

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2026-11-22]

[DOR: 20.1001.1.23222751.1398.9.1.10.9]

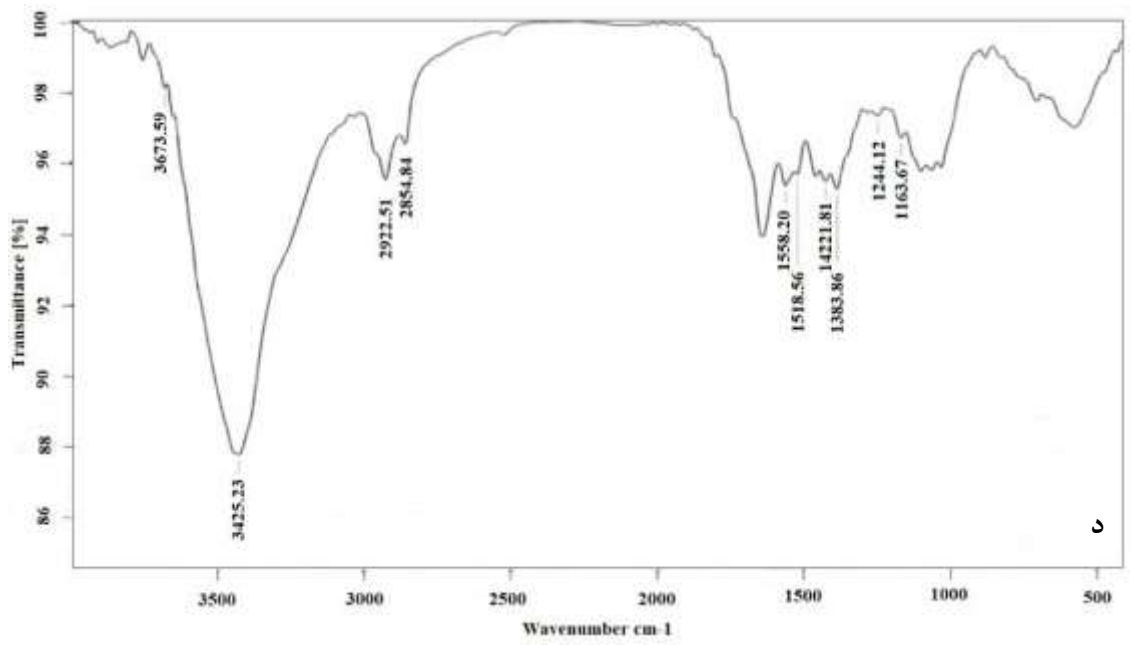




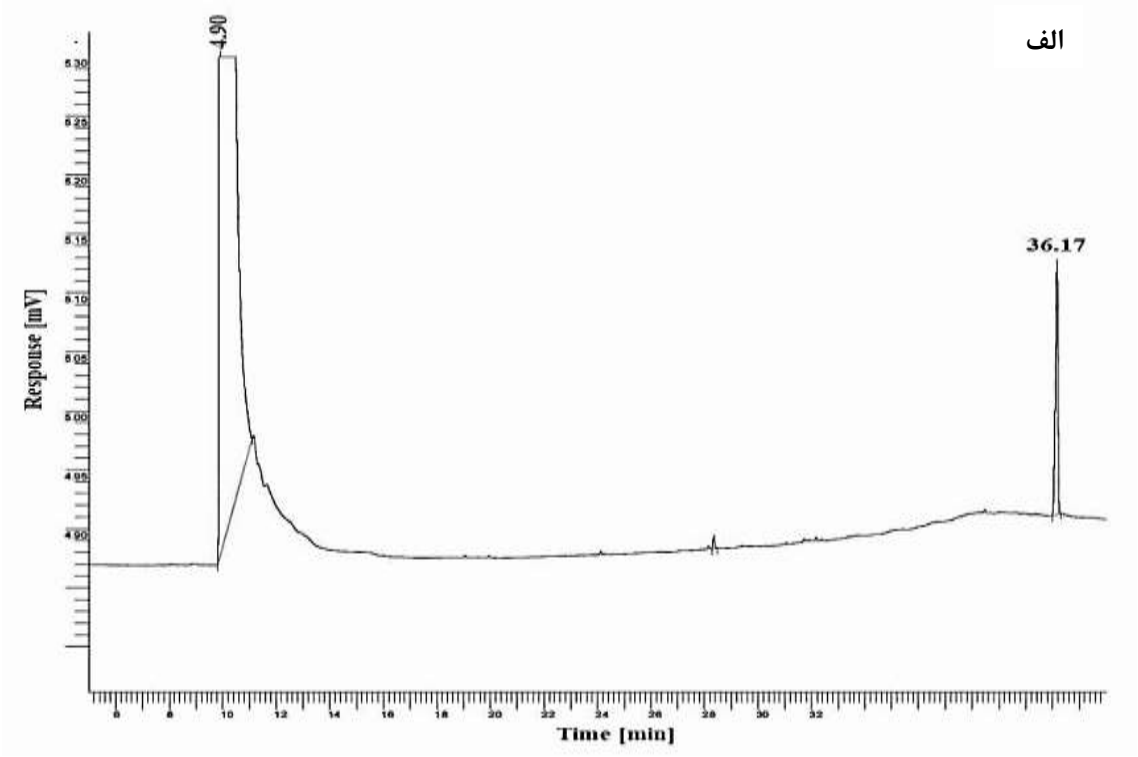


[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2026-11-22]

[DOR: 20.1001.1.23222751.1398.9.1.10.9]

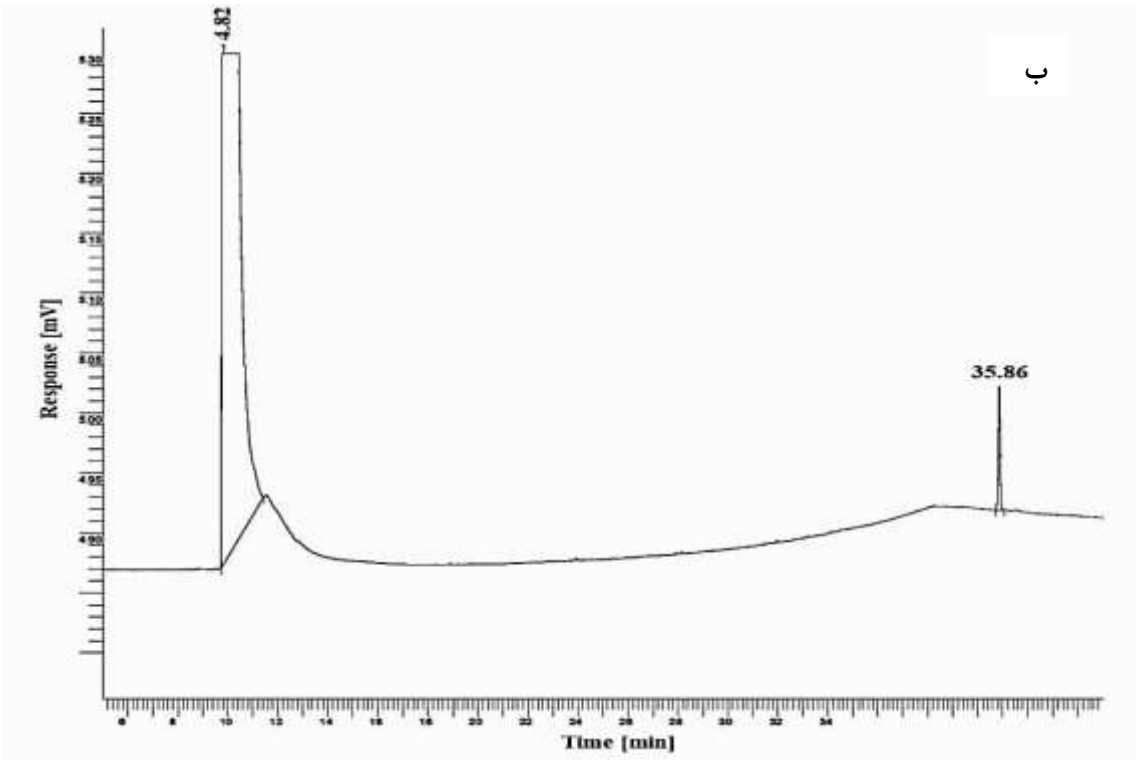


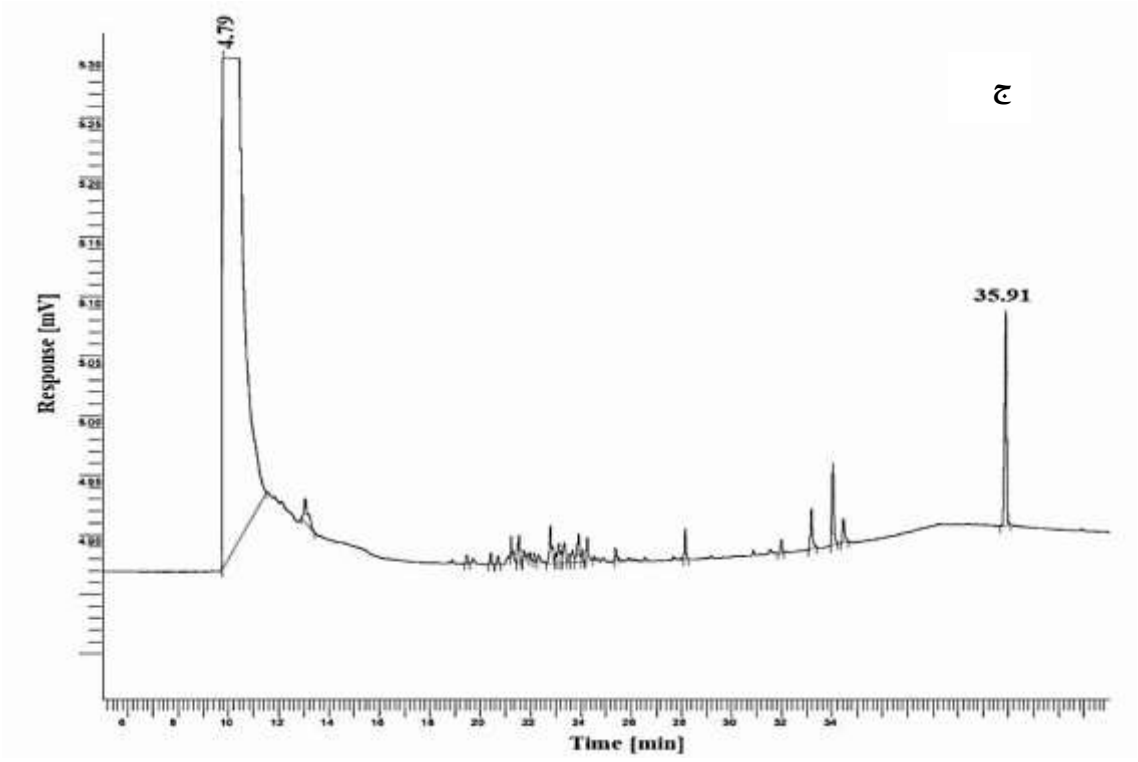
شکل ۶. طیف FTIR پلی‌هیدروکسی بوتیرات در نمونه استاندارد (الف)، نمونه‌های استخراج شده از .*Spirulina* sp در شرایط کشت اتوتروف (ب)، کشت میکسوتروف (ج) و کشت هتروتروف (د).



[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2026-11-22]

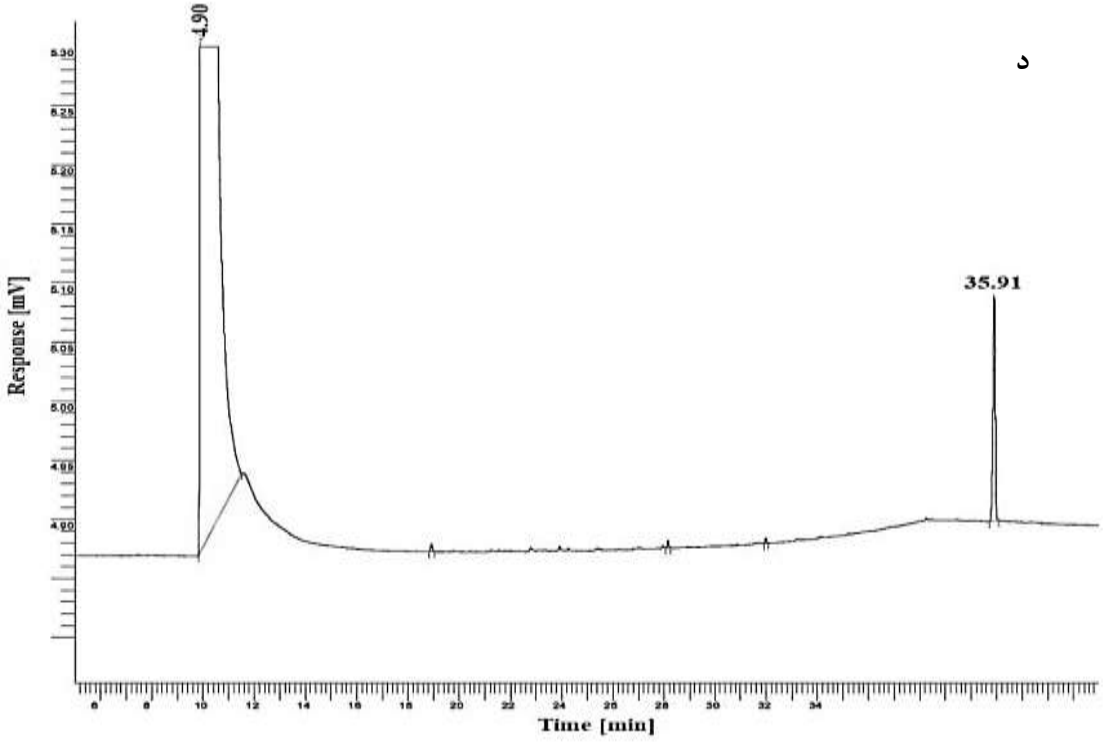
[DOR: 20.1001.1.23222751.1398.9.1.10.9]





[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2026-11-22]

[DOR: 20.1001.1.23222751.1398.9.1.10.9]



شکل ۷. کروماتوگرام PHB استاندارد (الف)، PHB استخراج شده از *Spirulina* sp. در شرایط اتوتروف (ب)، میکسوتروف (ج) و هتروتروف (د).

بحث

بررسی رشد ریزجلبک *Spirulina* sp.

با توجه به شکل ۲، ریزجلبک‌هایی که تحت شرایط اتوتروفی و میکسوتروفی رشد یافته بودند تقریباً الگوی رشدی مشابه‌ای داشتند، اما در شرایط هتروتروفی که فاقد نور و منبع کربن اضافی است و تنها منبع کربن موجود CO_2 می‌باشد ریزجلبک اسپیرولینا با تأخیر بیشتری وارد فاز لگاریتمی رشد شده و سرعت افزایش زیست‌توده آن نیز به طور معنی‌داری کمتر از دو تیمار دیگر بود، چرا که در غیاب نور به عنوان عامل اصلی فتوسنتز، ماده‌سازی با سرعت بسیار کمتری انجام می‌شود. در مجموع نتایج تحقیق حاضر نشان داد که شرایط اتوتروفی و میکسوتروفی باعث افزایش زیست‌توده اسپیرولینا نسبت به شرایط رشد هتروتروفی می‌شود که در بررسی Craig و Carr (۱۹۶۸) نیز مورد تأکید قرار گرفته است.

بررسی پراکسیداسیون لیپیدی و محتوای پروتئین کل در *Spirulina* sp.

پراکسیداسیون لیپیدی، عموماً شاخص‌ترین علائم پذیرفته شده شرایط استرس اکسیداتیو است که با اندازه‌گیری مالون‌دی‌آلدئید در سلول‌ها برآورد شده است. با توجه به شکل (۳)، در شرایط اتوتروفی به علت متابولیسم بیشتر به ویژه در کلروپلاست‌ها (از طریق فرآیند مهلر و زنجیره انتقال الکترون کلروپلاستی)، تشکیل گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) افزایش یافته و تنش بیشتری را در سلول‌های این سیانوباکتری موجب می‌شود که در چنین شرایطی میزان مالون‌دی‌آلدهید (MDA) نیز افزایش می‌یابد. اما در شرایط میکسوتروفی به دلیل اینکه منبع کربن اضافی (ساکارز) وجود دارد، به دنبال متابولیسم کمتر، میزان استرس حاصله و MDA نیز نسبت به شرایط اتوتروف کم‌تر است. در شرایط هتروتروف با وجود مقدار کافی مواد غذایی چون نور به عنوان منبع انرژی، جهت رشد وجود ندارد و فتوسنتزی حاصل نمی‌شود. ازآنجاکه شرایط استفاده از منابع موجود در محیط کشت به سهولت دسترسی به منابع کربنی حاصل از فتوسنتز نیست، در نتیجه رشد به کندی صورت گرفته و اسپیرولینا در معرض تنش بیشتری بوده است. با گذشت زمان، تنش ایجاد شده منجر به تخریب دیواره سیانوباکتری‌ها و از

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2026-11-22]
[DOR: 20.1001.1.23222751.1398.9.1.10.9]

بین بردن آن‌ها می‌شود و سطح MDA نسبت به شرایط میکسوتروف افزایش می‌یابد. طبق نتایج مطالعه حاضر، در محیط اتوتروف به دلیل بیوسنتز فعال به ویژه فعالیت‌های کلروپلاستی و تامین کافی عوامل احیایی برای ورود نیتروژن به ساختار پروتئین‌ها، محتوای پروتئین ساختاری و آنزیمی برای حمایت از رشد سلول بالا بود. اما تحت شرایط هتروتروف، با وجود قابلیت تثبیت نیتروژن برای اسپیرولینا، کارایی استفاده از منابع نیتروژنی و ورود آن به ساختار اسیدهای آمینه و پروتئین‌ها در هیچ‌یک از تیمارهای هتروتروف و میکسوتروف به اندازه تیمار اتوتروف بالا نبود (شکل ۸). به نظر می‌رسد، تخریب پروتئین داخل سلولی به منظور تأمین نیتروژن برای حفظ عملکردهای متابولیکی هم می‌تواند موجب کاهش محتوای پروتئین کل در سلول شود (Gouveia *et al*., 2009; Mata *et al*., 2010; Raja *et al*., 2008).

بررسی کیفی حضور پلی‌هیدروکسی بوتیرات در *Spirulina* sp. با روش رنگ‌آمیزی و FTIR

لکه‌های سیاه نشان داده شده توسط پیکان در شکل (۵) مربوط به گرانول‌های پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات می‌باشد که با نتایج Ansari و Fatma (۲۰۱۶) مطابقت نشان داد. این محققین نیز توانستند حضور گرانول‌های پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات را در *Nostoc muscorum* NCCU-442 با میکروسکپ نوری و رنگ‌آمیزی با سودان سیاه مورد تائید قرار دهند.

با توجه به طیف‌های FTIR پیک‌های جذبی به دست آمده در Cm^{-1} ۱۳۸۱، ۱۴۵۵، ۲۹۷۸-۲۸۷۷ و ۳۴۳۹، به ترتیب نشان‌دهنده $-CH_3$ ،$-CH_2$، -CH و O- H است. با توجه به طیف‌های به دست آمده، PHB جدا شده از *Spirulina sp*. با PHB استاندارد ساختار شیمیایی یکسانی را نشان دادند (شکل ۷). صرف نظر از طبیعت و نوع بیوپلاستیک، گروه کربونیل (C = O) یک ویژگی مشترک در تمام ساختمان‌های PHB استخراج شده در طول مطالعه اخیر است. نتایج ما در این مطالعه برای تائید حضور PHB استخراج شده از اسپیرولینا از طیف FTIR با گزارش‌های حاصل از تحقیقات Ansari و Fatma (۲۰۱۶) ، Hong و همکاران (۱۹۹۹) ، Kansiz و همکاران (۲۰۰۰) و Anupama و همکاران (۲۰۱۰) مطابقت داشت.

بررسی کمی پلی‌هیدروکسی بوتیرات در *Spirulina* sp. با استفاده از کروماتوگرافی گازی (GC)

تحقیقات زیادی برای به دست آوردن مقادیر کمی ترکیب شیمیایی PHB استخراج شده از ریزجلبک و PHB استاندارد با استفاده از کروماتوگرافی گازی انجام شده است (Anupama *et al*., 2010; Jau *et al*., 2005; Fatma and Ansari 2016). مطابق با نتایج این محققین، پیک‌های ظاهر شده در کروماتوگرام نمونه‌های استخراج شده، در شکل ۷ (ب، ج و د) و پیک ظاهر شده در کروماتوگرام نمونه استاندارد در شکل۷ (الف) نشان داده شده است. مساحت زیر پیک با توجه به منحنی رگرسیون حاصل از نمونه‌های استاندارد، نشان‌دهنده غلظت نمونه PHB در تیمارها است (جدول ۱). غلظت PHB استخراج شده از اسپیرولینا در شرایط اتوتروف، میکسوتروف و هتروتروف به ترتیب ۰/۴۱، ۰/۷۹ و ۰/۸۱ بود. درنتیجه میزان پلی‌هیدروکسی بوتیرات تولید شده در محیط هتروتروف به دلیل تنش بیشتر محیط نسبت به دو تیمار دیگر بیشتر بود.

پلاستیک‌زیستی می‌تواند نقشی حیاتی برای محیط زیست ایفا کند و جایگزین پلاستیک‌های معمولی باشد. از این رو تولید PHB به کمک سیانو باکترها راه‌حلی مفید بوده و در حال پیشرفت و توسعه است. بنابراین، برای استفاده از سیانوباکتری‌های تولیدکننده PHB باید پتانسیل واقعی آن‌ها ارزیابی شده و همچنین تحقیقات بیشتری برای دستیابی به اطلاعات در مورد عواملی که می‌تواند باعث بیوسنتز PHB شود، صورت گیرد. می‌توان نتیجه‌گیری کرد که محیط کشت هتروتروفی در مقایسه با دو محیط دیگر از لحاظ تولید میزان PHB بدون در نظر گرفتن میزان زیست‌توده به دست آمده در طی کشت ۲۰ روزه، محیط مناسب‌تری است، اما رشد ریزجلبک و تولید زیست‌توده در این شرایط نسبت به شرایط اتوتروفی و میکسوتروفی کمتر است. برای بهبود رشد و جبران تولید زیست‌توده کاهش یافته در محیط هتروتروفی، بهتر است از طریق بهینه‌سازی دسترسی به منابع کربن و سایر عناصر ضروری، محیطی قابل رقابت با دو محیط رشد دیگر ایجاد کرد.

منابـع

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2026-11-22]

[DOR: 20.1001.1.23222751.1398.9.1.10.9]

Ansari, S., Fatma, T. 2016. Cyanobacterial Polyhydroxybutyrate (PHB): Screening, Optimization and Characterization. PLoS ONE. 11(6): 158-168.

Anupama, Sh., Sanjiv, K.M., Sandhya, M. 2010. Polyhydroxyalkanoate (PHA) synthesis by *Spirulina subsalsa* from Gujarat coast of India. International Journal of Biological Macromolecules. 46(2): 255-260.

Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram of protein utilizing of protein– day binding. Journal of Analytical Biochemistry. 72: 248-254.

Brandl, H., Gross, C.A.N., Lenz, R.W., Fuller, R.C. 1990. Plastics from Bacteria and for Bacteria: Poly (hydroxybutyrate) as Natural Biodegradable Polyesters. Advances in Biochemical Engineering Biotechnology. 41: 77-93.

Brandl, H., Gross, R.A., Lenz, R.W., Fuller, R.C. 1988. Pseudomonas oleovorans as a source of poly (β-hydroxyalkanoates) for potential applications as biodegradable polyesters. Applied and Environmental Microbiology. 54(8): 1977-1982.

Chen, T., Zheng, W., Wong, Y.-S., Yang, F., Bai, Y. 2006. Accumulation of selenium in mixotrophic culture of *Spirulina platensis* on glucose. Bioresource Technology. 97: 2260-2265.

Chojnacka, K., Marquez-Rocha, F.J. 2004. Kinetic stoichiometric relationships of the energy and carbon metabolism in the culture of microalgae. Biotechnology. 3(1): 21-34.

Craig, I.W., Carr, N.G. 1968. C-Phycocyanin and Allophycocyanin in Two Species of Blue-Green Algae. Biochemistry Journal. 106: 361-366.

Drosg, B., Fritz, I., Gattermayr, F., Silvestrini, L. 2015. Photo-autotrophic production of poly(hydroxyalkanoates) in cyanobacteria. Chemical and Biochemical Engineering Quarterly. 29(2): 145-156.

Gouveia, L., Marques, A.E., Da Silva, T.L., Reis, A. 2009. *Neochloris oleabundans* UTEX #1185: a suitable renewable lipid source for biofuel production. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology. 36: 821-826.

Heath, R.L., Packer, L. 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. Archives in Biochemistry and Biophysics. 125(1): 189-198.

Hong, K., Sun, S., Tian, W., Chen, G.Q., Huang, W. 1999. A rapid method for detecting bacterial polyhydroxyalkanoates in intact cells by Fourier transform infrared spectroscopy. Applied Microbiology and Biotechnology. 51(4): 523-526.

Irigoyen, J.J., Emerich, D.W., Sanchez-Diaz, M. 1992. Water stress induced changes in concentrations of proline and total soluble sugars in nodulated alfalfa (*Medicago sativa*) plants. Physiologia Plantarum. 84(1): 55-60.

Ismaiel, M.M., MahmoudEl-Ayouty, Y., Piercey-Normore, M. 2016. Role of pH on antioxidants production by *Spirulina* (*Arthrospira*) *platensis*. Brazilian Journal of Microbiology. 47(2): 298-304.

Jau, M.H., Yew, S.P., Toh, P.S.Y., Chong, A.S.C., Chu, W.L., Phang, S.M. 2005. Biosynthesis and mobilization of poly(3-hydroxybutyrate) [P(3HB)] by *Spirulina platensis*. International Journal of Biological Macromolecules. 36(3): 144-151.

Kansiz, M., Billman-Jacobe, H., McNaughton, D. 2000. Quantitative determination of the biodegradable polymer poly(beta-hydroxybutyrate) in a recombinant Escherichia coli strain by use of mid-infrared spectroscopy and multivariative statistics. Applied and Environmental Microbiology. 66(8): 3415-3420.

Lee, C., Kim, J., Do, H., Hwang, S. 2008. Monitoring thiocyanate-degrading microbial community in relation to changes in process performance in mixed culture systems near washout. Water Research. 42(4-5): 1254-1262.

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2026-11-22]

[DOR: 20.1001.1.23222751.1398.9.1.10.9]

Mata, T.M., Martins, A.A., Caetano, N.S. 2010. Microalgae for biodiesel production and other applications: a review. Renewable and Sustainable Energy Reviews. 14(1): 217-232.

Moheimani, N.R. 2005. The culture of Coccolithophorid algae for carbon dioxide bioremediation. PhD thesis. Murdoch University. 266 p.

Mokhtarani, N., Ganjidust, H., Vashaghani Farahani, E., Khaleghi S.M. 2007. Effect of volatile fatty acid in production of polyhydroxyalkanoate by activated sludge. Journal of Polymer Technology. 21: 80-93. (in Persian)

Pal, R., Kumar, Ch.A. 2014. An Introduction to Phytoplanktons: Diversity and Ecology. 1th edition. Springer. 164 p.

Raja, H.A., Ferrer, A., Shearer, C.A. 2008. Freshwater ascomycetes: A new genus, *Ocala scalariformis* gen. et sp. nov, and two new species, Ayria *nubispora* sp. nov. and Rivulicola *cygnea* sp. nov. Fungal Diversity. 34: 79-86.

Richmond, A. 1988. *Spirulina*. In: Borowitzka, M.A., Borowitzka, L.J. (eds.). Micro-algal Biotechnology. Cambridge University Press. pp: 85-121.

Richmond, A. 2004. Handbook of microalgal culture: Biotechnology and Applied Phycology. Blackwell Science Ltd. 577 p.

Sayaka, H., Masatoshi, T., Takashi O., Mami, M., Tomohisa, H., Akio, T., Yoichi, N., Shigeru, Ch., Morifumi, H., Munehiko, A. 2015. Genetic engineering and metabolite profiling for overproduction of polyhydroxybutyrate in cyanobacteria. Journal of Bioscience and Bioengineering. 120(5): 510-517.

Shimao, M. 2001. Biodegradation of plastics. Environmental Biotechnology. 12(3): 242-247.

Singh, P., Parmar, N. 2011. Isolation and characterization of tow novel polyhydroxybutyrate producing bacteria. African Journal of Biotechnology. 10(24): 4907-4919.

Sundaramoorthy, B., Kadiyala, G., Bhaskaran, M. 2013. A review on production of poly β hydroxybutyrates from cyanobacteria for the production of bio plastics. Algal Research. 2: 278-285.

Vanessa, C.C., Cleber, K.d.S., Terra, A.L., Costa, J.A.V., Morais, M.G.d. 2015. Polyhydroxybutyrate production by *Spirulina* sp. LEB 18 grown under different nutrient concentrations. African Journal of Microbiology Research. 9(24): 1586-1594.

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, Plant Biology Department. Paris University.

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2026-11-22]

[DOR: 20.1001.1.23222751.1398.9.1.10.9]