

تولید پلی هیدروکسی بوتیرات توسط سیانوباکتری *Spirulina sp.* در تنش غلظت نمک‌های معدنی

یونس کردی تمندانی^۱، اکبر نورسته‌نیا^{۲*}، فاطمه مرادی^۴

تاریخ پذیرش: اردیبهشت ۹۸

تاریخ دریافت: بهمن ۹۷

چکیده

امروزه با توجه به مصرف بسیار زیاد پلیمرهای مقاوم به تخریب زیستی، مشکل بزرگ تجمع ضایعات پلیمری در طبیعت به وجود آمده است. پلی‌هیدروکسی آلکانوات‌ها ترکیبات تجزیه‌پذیر زیستی هستند که می‌توانند جایگزین پلاستیک شوند. در این مطالعه، اثر تنش غلظت‌های مختلف نمک‌های معدنی موجود در محیط کشت بر تولید پلی‌هیدروکسی بوتیرات توسط سیانوباکتری *Spirulina sp.* مورد بررسی قرار گرفت. اسپیرولینا در محیط کشت زاروک حاوی نمک‌های معدنی با غلظت‌های نصف ($\frac{1}{2}X$)، برابر (X)، به عنوان شاهد، دو برابر ($2X$) و سه برابر ($3X$) به مدت ۲۰ روز کشت داده شد. بررسی کیفی و کمی پلی‌هیدروکسی بوتیرات و اندازه‌گیری شاخص‌های رشد، محتوای پروتئین و پراکسیداسیون لیپیدی صورت گرفت. میزان رشد *Spirulina sp.* در محیط کشت حاوی غلظت‌های افزایشی و کاهش نمک‌های موجود تغییر معنی‌داری نداشت. اما میزان پراکسیداسیون لیپیدی و میزان پروتئین با بیشتر شدن غلظت نمک تا ۳ برابر در مقایسه با نمونه شاهد به ترتیب افزایش و کاهش یافت. مقدار پلی‌هیدروکسی بوتیرات در شرایط $\frac{1}{2}X$ ، X ، $2X$ و $3X$ به ترتیب ۰/۰۱۱، ۰/۰۱۴، ۰/۰۱۹ و ۰/۰۰۶ گرم بر گرم وزن خشک سلول به دست آمد. در نتیجه تیمار با غلظت نمک $2X$ ، تنش مناسب‌تری برای تولید پلی‌هیدروکسی بوتیرات نسبت به تیمارهای دیگر است.

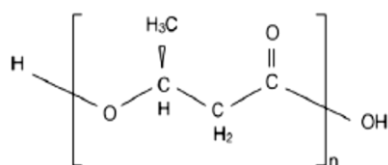
واژگان کلیدی: تنش شوری، پلی‌هیدروکسی بوتیرات، سیانوباکتری، *Spirulina sp.*

- ۱- دانشجوی کارشناسی ارشد فیزیولوژی گیاهی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان، رشت، ایران.
- ۲- دانشیار گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان، رشت، ایران.
- ۳- دانشیار گروه علوم دریایی، پژوهشکده حوزه آبی دریای خزر، دانشگاه گیلان، رشت، ایران.
- ۴- دانشجوی دکتری بیوشیمی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان، رشت، ایران.

* نویسنده مسئول: norasteh@guilan.ac.ir

مقدمه

دیگر پلیمرهای زیست‌تخریب‌پذیر بیشتر مورد توجه قرار گرفته‌اند (Kumagai and Doi, 1992; Chua et al., 1997; Shrivastav et al., 2013). یکی از مهم‌ترین ترکیبات گروه پلی‌هیدروکسی آلکانوات، پلی‌هیدروکسی بوتیرات (PHB) است. پلی‌هیدروکسی بوتیرات یک ترکیب شبه لیپیدی است و از واحدهای بتاهیدروکسی بوتیریک اسید تشکیل می‌شود. مونومرهای این ترکیب توسط پیوندهای استری به هم متصل شده، تشکیل پلیمر طویل پلی‌هیدروکسی بوتیرات می‌دهند و با تجمع این پلیمرها، گرانول‌های پلی‌هیدروکسی بوتیرات شکل می‌گیرند که به عنوان ذخیره کربن/انرژی عمل می‌کنند (Balaji et al., 2013). شکل ۱ ساختار شیمیایی پلی‌هیدروکسی بوتیرات را که خود است نشان می‌دهد (Brandl et al., 1990; Singh and Parmar, 2011).



شکل ۱: ساختار شیمیایی پلی‌هیدروکسی بوتیرات (Singh and Parmar, 2011)

استفاده از پلیمرهای صنعتی از جمله پلاستیک‌ها باعث به وجود آمدن مشکلاتی مانند دفن پسماندهای جامد و همچنین گرم شدن کره زمین می‌شود. با هدف غلبه بر مشکلات زیست‌محیطی ناشی از تجمع پلاستیک‌های مصنوعی در طبیعت، فعالیت‌های پژوهشی گسترده‌ای در زمینه پلیمرهای زیست‌تخریب‌پذیر (Biodegradable) در حال انجام است (Lee et al., 2008). در این بین تولید پلیمرهای زیستی جایگاه خاصی دارد. تولید چنین پلیمرهایی توسط طیف وسیعی از موجودات زنده مثل گیاهان، جانوران و باکتری‌ها صورت می‌گیرد. چون این مواد اساس طبیعی دارند، بنابراین توسط سایر موجودات نیز مورد مصرف قرار می‌گیرند. عمده پلیمرهای زیست‌تخریب‌پذیر پلی‌استرها هستند که تولید آن‌ها با روش‌های زیستی یا شیمیایی صورت می‌پذیرد. از میان پلاستیک‌های قابل تجزیه که تاکنون تهیه شده است، پلی‌هیدروکسی آلکانوات (PHA) و کوپلیمرهای آن که بالغ بر چهل نوع ترکیب هستند، به علت قابلیت تجزیه‌پذیری کامل، انعطاف‌پذیری، مقاومت ۱۰۰ درصد در برابر آب، پایین بودن نسبی هزینه تولید و همچنین سادگی فرآیند نسبت به

مانند ابزار ترمیمی عصب، بخیه‌های ترمیمی، کاربردهای قلبی عروقی، اتصالات ارتوپدی، ابزارهای بازتولید یا ترمیم بافت همبند، ابزارهای ترمیم تاندون، داربست مغز استخوان، تعمیر اعصاب و ابزارهای مهندسی بافت قلبی عروقی استفاده می‌شوند (رستم‌زاد و همکاران، ۱۳۹۶). برخی ریزجلبک‌های پروکاریوتی پلی‌هیدروکسی آلکانوات‌هایی مانند پلی‌هیدروکسی بوتیرات (PHB) را تحت شرایط خاص و تنش‌زا به عنوان انرژی و ذخایر کربن در داخل سلول خود تولید و ذخیره می‌کنند (Drosg et al., 2015). از جمله این سیانوباکترها می‌توان به *Spirulina* اشاره کرد. *Spirulina* یک جلبک ساده تک سلولی است که در آب‌های شیرین قلیایی به خوبی رشد می‌کند و با استفاده از فتوسنتز مواد غذایی ساخته شده را در خود ذخیره می‌کند (Shetty et al., 2013). اولین گزارش در مورد تجمع PHA در سیانوباکتری‌های فتوتوتروف توسط Rippka و همکاران در سال ۱۹۷۱ مطرح شد تا به امروز، حضور PHB برای چند گونه سیانوباکتر مانند *Spirulina spp.*، *Gloeothece spp.*، *Aphanothece spp.* و *Synechococcus spp.* تایید شده است (Campbell et al., 1982; Fernandez et al., 2005). Panda و همکاران (۲۰۰۵)،

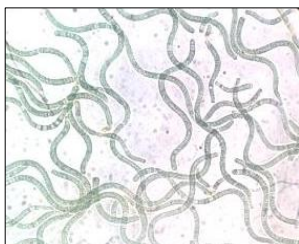
به واسطه ویژگی‌های خاص، پلی‌هیدروکسی آلکانوات‌ها در زمینه‌های مختلف علوم پزشکی، دامپزشکی، صنایع دارویی، بسته‌بندی، کشاورزی، محیط زیست و مهندسی بافت کاربرد دارند. ساده‌ترین کاربرد آن‌ها بسته‌بندی ظروف غذا و بطری‌های نوشابه، کیسه‌ها، پارچه و لوازم آرایشی است (Brandl et al., 1988; Luef et al., 2015). این مواد به دلیل این که پس از تجزیه به طور خالص به هیدروکسی اسیدها تجزیه می‌شوند، همچنین سازگاری آن‌ها با سیستم‌های زیستی سبب استفاده از آن‌ها در رهایش کنترل شده داروها و حشره‌کش‌ها، ساخت انواع صفحات و جایگزین‌های استخوانی (پروتزها)، نخ و دستکش‌های جراحی، جایگزین‌های عروق خون و در نهایت بسته‌بندی شده است (Griffin, 1994; Shi et al., 2010). تخریب پلیمرهای پلی‌هیدروکسی آلکانوات در موجود میزبان امکان همراه شدن پدیده آزادسازی ترکیباتی مانند آنتی‌بیوتیک یا داروهای ضد توموری را فراهم می‌کند. داروها می‌توانند در هوموپلیمر یا کوپلیمرهای پلی‌هیدروکسی آلکانوات به دام افتاده یا به صورت میکروکپسول در آیند (Shrivastav et al., 2013; Luef et al., 2015). همچنین پلی‌هیدروکسی آلکانوات‌ها برای بهبود وسایلی

بیشتر و هزینه کمتر فراهم شود. یکی از روش‌های افزایش تولید چنین ترکیباتی افزایش تنش‌های محیطی از جمله تنش غلظت بالای نمک در محیط کشت است. از این رو در مطالعه حاضر، بهینه‌سازی شرایط کشت این ریزجلبک از طریق افزایش نمک‌های محیطی به منظور تولید پلی‌هیدروکسی بوتیرات بیشتر توسط سیانوباکتری *Spirulina sp.* بومی ذخایر آبی استان گیلان مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

تهیه نمونه و کشت ریزجلبک

ریزجلبک *Spirulina sp.* جدا شده از ذخایر آبی استان گیلان از موسسه تحقیقات ماهیان خاویاری واقع در شهر رشت تهیه شد (شکل ۲). این گونه توسط پژوهشگران این موسسه و به کمک کلیدهای شناسایی و با روش‌های تکرار کشت مایع و جامد، خالص و جداسازی شده است.



شکل ۲: ریزجلبک *Spirulina sp.* (بزرگنمایی ۴۰۰ برابر)

Nishioka و همکاران (۲۰۰۱) و Sharma و Mallick (۲۰۰۵) گزارش کردند که افزایش قابل توجهی در محتوای PHB به ترتیب در گونه‌های *Spirulina platensis*، *Nostoc muscorum* و *Synechococcus sp.* رشد کرده تحت محدودیت فسفات و نیتروژن به دست آمد. با توجه به اهمیت *Spirulina platensis*، بهینه‌سازی فرآیند کشت آن جهت افزایش نرخ رشد، ترکیبات مغذی و اسید آمینه‌های کلیدی از اهمیتی بالایی برخوردار است (Li et al., 2007). معرفی این ریزجلبک و بررسی اثرات مفید آن، همچنین مطالعه شرایط تولید انبوه آن می‌تواند زمینه تولید فرآورده‌های قابل استفاده در بخش‌های مختلف علوم کشاورزی، صنعت و پزشکی را فراهم آورد. اسپیرولینا در بیوتکنولوژی ریزجلبک‌ها با توجه به آسان بودن پرورش آن‌ها، داشتن یک فرآیند برداشت و خشک کردن ساده و رشد در pH قلیایی که به طور موثر مانع از آلودگی ریزجلبک در محیط کشت می‌شود، بسیار مورد توجه است. پلی‌هیدروکسی بوتیرات تولید شده توسط اسپیرولینا در صورتی می‌تواند وارد بازار شود که روش تولید آن اقتصادی باشد. بهینه‌سازی شرایط رشد و تولید زیست‌توده اسپیرولینا سبب می‌شود که فرآورده‌هایی با ارزش اقتصادی

(2X) و سه برابر (3X) محیط زاروک به مدت ۲۰ روز در شرایط پایه اتافک کشت با دمای 25 ± 2 درجه سانتی‌گراد و شدت نوری ۲۵۰۰ لوکس با دوره نوری ۱۲ ساعت نور و ۱۲ ساعت تاریکی، pH ۹ و هوادهی با پمپ هوا کشت داده شد. کلیه آزمایش‌ها در این پژوهش در سه تکرار انجام شد. سپس زیست‌توده به دست آمده برای سنجش میزان رشد و اندازه‌گیری محتوای پروتئین کل، پراکسیداسیون لیپیدی و پلی‌هیدروکسی بوتیرات استفاده شد.

سنجش رشد روزانه بر حسب جذب نوری

رشد ریزجلبک از طریق میزان جذب نوری (OD) در طول موج ۵۶۰ نانومتر طی دوره رشد، هر دو روز یک‌بار با کمک دستگاه اسپکتروفتومتری (M501 Single Beam UV/Visible، CamSpec، انگلستان) اندازه‌گیری شد (Ismail et al., 2016).

سنجش میزان پراکسیداسیون لیپیدی

برای سنجش میزان پراکسیداسیون لیپیدهای غشا، غلظت مالون دی‌آلدهید (MDA) اندازه‌گیری شد. بدین منظور ۰/۱ گرم رسوب جلبکی به کمک ۱ میلی‌لیتر محلول تری‌کلرو استیک اسید (TCA ۵ درصد) و با

برای کشت ریزجلبک *Spirulina sp.* از محیط کشت استاندارد زاروک (جدول ۱ و ۲) استفاده شد (Zarrouk, 1966).

جدول ۱: ترکیب ماکرونوترینت محیط کشت زاروک

غلظت (گرم در لیتر)	ترکیبات
۱۶/۸	NaHCO ₃
۰/۵	K ₂ HPO ₄
۲/۵	NaNO ₃
۱/۰	K ₂ SO ₄
۱/۰	NaCl
۰/۲	MgSO ₄ .7H ₂ O
۰/۰۴	CaCl ₂ .2H ₂ O
۰/۰۱	FeSO ₄ .7H ₂ O
۰/۰۸	EDTA

جدول ۲: ترکیب میکرونوترینت محیط کشت زاروک

غلظت (گرم در لیتر)	ترکیبات
۲/۸۶	H ₃ BO ₃
۱/۸۱	MnCl ₂ .H ₂ O
۰/۲۲۲	ZnSO ₄ .4H ₂ O
۰/۱۷۷	Na ₂ MoO ₄
۰/۰۷	CuSO ₄ .5H ₂ O

این ریزجلبک در محیط کشت‌های حاوی غلظت‌های مختلف نمک‌های معدنی شامل یک برابر (X) به عنوان شاهد، نصف ($\frac{1}{2}X$)، دو برابر

دقیقه در ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ و به رسوب که تقریباً معادل ۰/۱ گرم وزن تر بود، ۱ میلی‌لیتر بافر استخراج اضافه شد. برای پاره کردن کامل غشای سلولی، نمونه‌ها به مدت ۳۰ ثانیه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در دستگاه سونیکاتور (Ultrasonic Homogenizer, FAPAN CO, 400 R, ژاپن) قرار داده شد و سپس به مدت ۲۰ دقیقه در ۹۰۰۰ دور در دقیقه در ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. لازم به ذکر است تمام مراحل استخراج روی یخ انجام گرفت. به مایع رویی آنزیمی استخراج شده، ۲/۵ میلی‌لیتر از محلول برادفورد اضافه شد و پس از مخلوط شدن به مدت ۱۵ دقیقه در تاریکی قرار گرفت. جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۹۵ نانومتر خوانده شد و غلظت پروتئین کل بر اساس مقایسه با منحنی استاندارد تهیه شده، محاسبه شد (Bradford, 1976).

رنگ آمیزی 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 در ۱۰۰ میلی‌لیتر اتانول ۷۰ درصد) اضافه و بعد از گذشت ۱۰ دقیقه با آب مقطر شسته شد. لام پس از خشک شدن با زایلن شستشو داده شد و

سانتریفیوژ (Sigma, 1-14K، آلمان) به مدت ۱۵ دقیقه در ۹۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد تهیه شد. هم حجم مایع رویی، محلول تیوباربیئوریک اسید ۰/۵ درصد (در تری‌کلرواستیک اسید ۲۰ درصد) به آن اضافه شد. مخلوط به دست آمده برای ۳۰ دقیقه در بن‌ماری ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد جوشانده شد و بلافاصله برای چند دقیقه در ظرف یخ قرار داده شد. سپس دوباره به مدت ۵ دقیقه در ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد تا محلول شفاف به دست آید. جذب مایع رویی در ۵۳۲ و ۶۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. برای محاسبه غلظت مالون دی‌آلدئید از ضریب خاموشی معادل ۱۵۵ میلی‌مولار بر سانتی‌متر استفاده و در نهایت مقدار مالون دی‌آلدئید که محصول پراکسیداسیون لیپیدی است برحسب نانومول در گرم وزن تر محاسبه شد (Heath and Packer., 1968).

سنجش محتوای پروتئین کل

به منظور آماده‌سازی نمونه‌ها برای سنجش محتوای پروتئین کل، ابتدا استخراج عصاره سلولی ریزجلبک به کمک بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار با pH ۷ صورت گرفت. برای این کار، ۵۰ میلی‌لیتر سوسپانسیون جلبکی به مدت ۱۰

پلی‌هیدروکسی بوتیرات بود که توسط ترازو وزن و برحسب گرم بر وزن خشک سلول بیان شد (Sayaka et al., 2015).

تایید حضور پلی‌هیدروکسی بوتیرات از طریق دستگاه FTIR

به منظور تایید حضور پلی‌هیدروکسی بوتیرات، بعد از استخراج رسوب، کیفیت نمونه‌ها به وسیله دستگاه FTIR (Bruker, Alpha, آمریکا) بررسی شد و قله‌های جذبی مربوطه مورد مطالعه قرار گرفت. بدین صورت که نمونه جامد پلی‌هیدروکسی بوتیرات به کمک تهیه قرص KBr توسط یک نگهدارنده در دستگاه قرار داده شد. تهیه قرص به این صورت بود که نمونه جامد کاملاً پودری با پودر KBr مخلوط شد و سپس توسط دستگاه قرص‌ساز، تحت فشار قرار گرفت. KBr تحت فشار ذوب شده و قرص شفاف تهیه شد (Shrivastav et al., 2010).

محاسبات آماری

برای بررسی داده‌ها از آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه (One-Way ANOVA) و پس‌آزمون دانکن در سطح اطمینان ۹۵ درصد ($P \leq 0.05$) با نرم‌افزار SPSS (نسخه ۱۷) و برای

به مدت ۱۵ ثانیه به محلول ۰/۵ درصد سافرانین آغشته و سپس با آب مقطر شسته شد. در نهایت گرانول‌های پلی‌هیدروکسی بوتیرات به صورت لکه‌های سیاه رنگ درون ریزجلیک با عدسی ۱۰۰ میکروسکوپ نوری (Olympus، ژاپن) مجهز به دوربین دیجیتال مشاهده شد (Ataei et al., 2008).

استخراج پلی‌هیدروکسی بوتیرات

به زیست توده خشک ریزجلیک ۷ میلی‌لیتر کلروفرم اضافه و پس از همگن کردن به مدت ۱۰ دقیقه سونیک شد. سپس نمونه‌ها به مدت ۳ ساعت در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفته و دوباره به مدت ۱۰ دقیقه سونیک و به مدت ۲ روز در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. سپس ۱۰ میلی‌لیتر کلروفرم به آن اضافه و توسط کاغذ صافی (Whatman، Grade 1، 70 mm) فیلتر شد. محلول باقی مانده تبخیر شد به طوری که ۱ میلی‌لیتر کلروفرم باقی ماند. ۱۰ میلی‌لیتر هگزان به آن اضافه و به مدت ۱ شب در دمای اتاق قرار داده شد. بعد نمونه‌ها سانتریفیوژ شدند. به رسوب باقی مانده ۱ میلی‌لیتر کلروفرم و ۱۰ میلی‌لیتر متانول اضافه شد و ۱ شب در دمای اتاق باقی گذاشته شد تا تبخیر شود. رسوب باقی مانده

پراکسیداسیون لیپیدی و محتوای پروتئین کل ریز جلبک *Spirulina sp.*

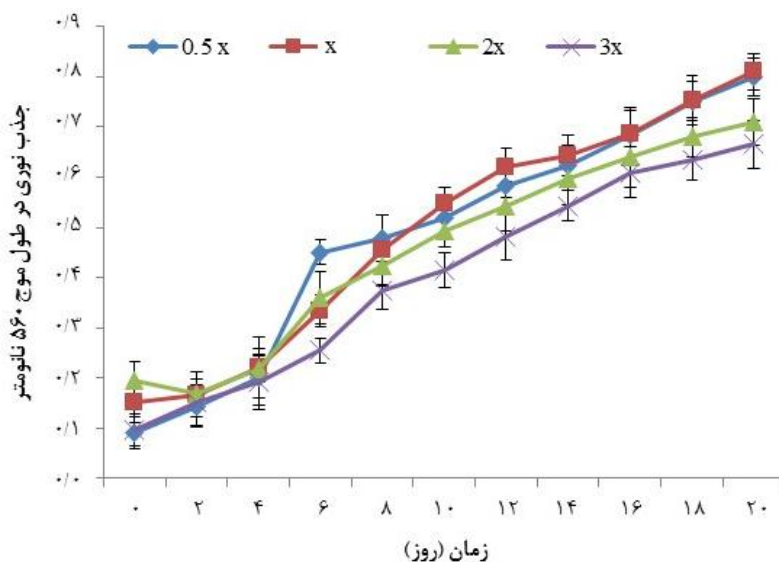
محتوای مالون دی آلدئید در شرایط 3X در مقایسه با شرایط شاهد و تیمارهای دیگر به طور معنی داری بیشتر بود ($P < 0.05$; شکل ۴). با توجه به شکل (۵)، محتوای پروتئین در شرایط تیمار در مقایسه با شاهد کاهش یافت، به طوری که بیشترین محتوای پروتئین در بین تیمارها در شرایط $X_{\frac{1}{2}}$ به دست آمد.

ترسیم نمودارها از نرم افزار Microsoft Excel 2010 استفاده شد.

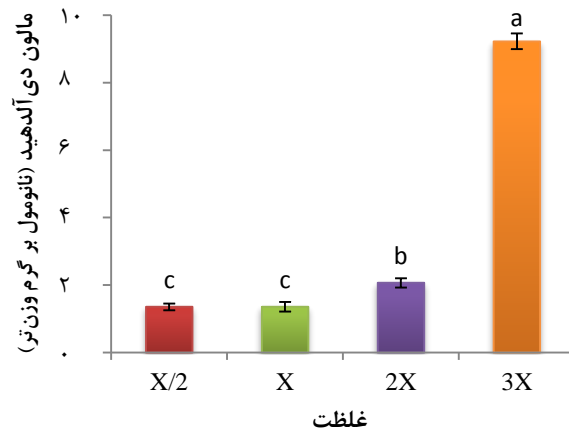
نتایج

منحنی رشد ریز جلبک *Spirulina sp.*

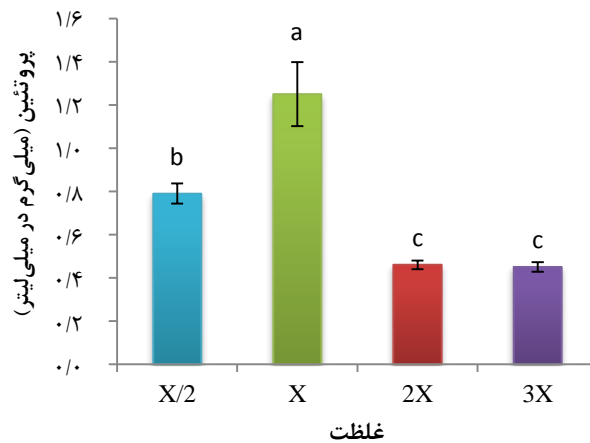
منحنی رشد رسم شده برای ریز جلبک *Spirulina sp.* نشان می دهد که رشد ریز جلبک در همه شرایط تقریباً مشابه و به صورت صعودی بود و بیشترین میزان رشد در شرایط شاهد (X) و نصف غلظت اولیه نمک های معدنی ($X_{\frac{1}{2}}$) در انتهای دوره رشد بود (شکل ۳).



شکل ۳: منحنی رشد روزانه ریز جلبک *Spirulina sp.* در محیط های حاوی مختلف نمک های معدنی شامل نصف ($X_{\frac{1}{2}}$), برابر (X), به عنوان شاهد، دو برابر (2X) و سه برابر (3X) محیط زاروک (میانگین \pm خطای استاندارد). حروف متفاوت نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار بین تیمارها است ($P \leq 0.05$).



شکل ۴: تغییرات محتوای مالون‌دی‌آلدئید در ریزجلبک *Spirulina sp.* در محیط‌های حاوی مختلف نمک‌های معدنی شامل نصف ($X/2$), برابر (X, به عنوان شاهد), دو برابر (2X) و سه برابر (3X) محیط زاروک (میانگین \pm خطای استاندارد). حروف متفاوت نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارها است ($P \leq 0.05$).

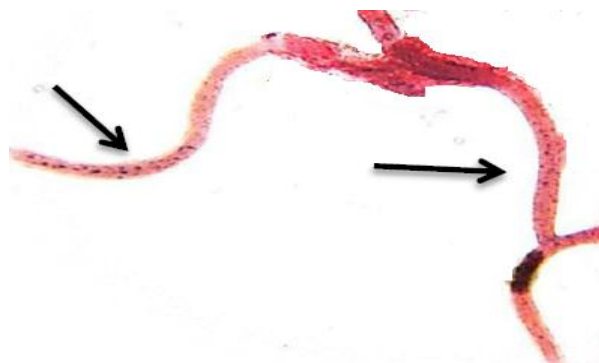


شکل ۵: تغییرات محتوای پروتئین کل ریز جلبک *Spirulina sp.* در محیط‌های حاوی مختلف نمک‌های معدنی شامل نصف ($X/2$), برابر (X, به عنوان شاهد), دو برابر (2X) و سه برابر (3X) محیط زاروک (میانگین \pm خطای استاندارد). حروف متفاوت نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارها است ($P \leq 0.05$).

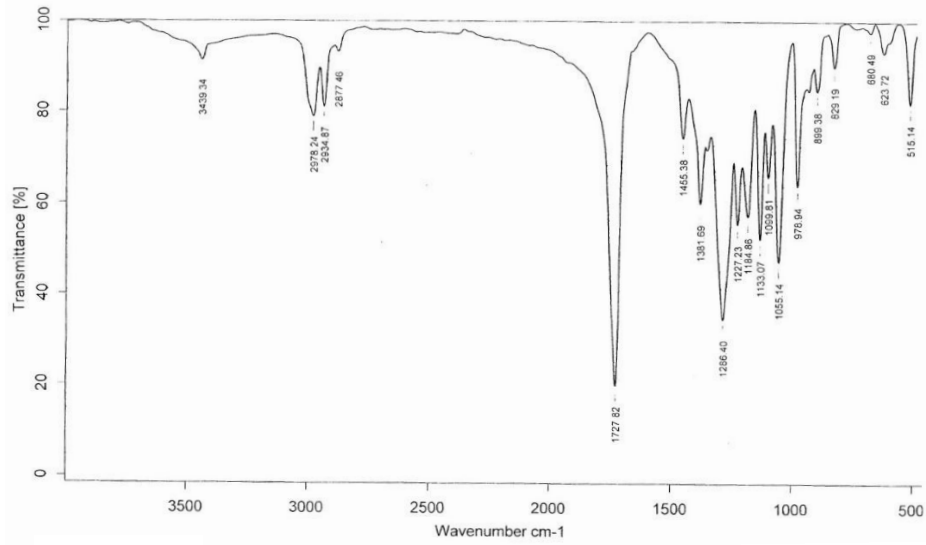
گروه کربونیل (C=O) و قله جذبی در ناحیه ۲۸۷۷ و 2978cm^{-1} مربوط به ارتعاشات کششی C-H است. این دو گروه کربنی منعکس کننده ساختار PHB هستند که این دو قله جذبی در طیف FTIR نمونه‌های PHB استخراج شده در شرایط مختلف کشت و استاندارد مشاهده شده است. قله‌های جذبی در ناحیه 3439cm^{-1} مربوط به ارتعاش کششی گروه‌های O-H، در ناحیه ۱۳۸۱ و 1455cm^{-1} مربوط به ارتعاشات خمشی H-C-H در گروه‌های CH_2 و CH_3 و در ناحیه ۱۱۸۴ و 1286cm^{-1} مربوط به ارتعاشات کششی گروه اتری (C-O) مشاهده شده در طیف FTIR نمونه‌های استخراج شده با طیف FTIR نمونه PHB استاندارد مطابقت دارد.

تایید حضور پلی‌هیدروکسی بوتیرات با روش‌های رنگ‌آمیزی و FTIR

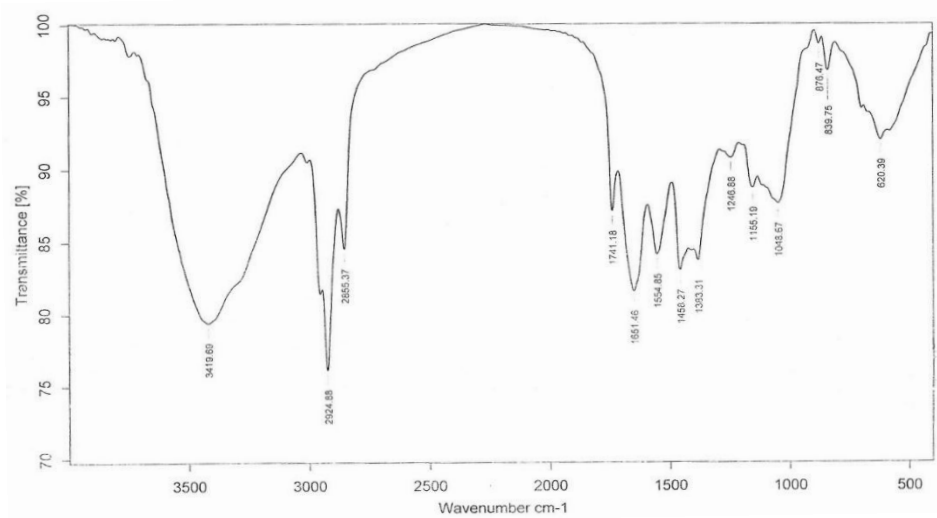
پس از انجام رنگ‌آمیزی و مشاهده به وسیله میکروسکوپ نوری، گرانول‌های پلی‌هیدروکسی بوتیرات درون سلول‌های ریزجلبک تصویربرداری شدند. لکه‌های سیاه نشان داده شده توسط پیکان در شکل ۶ مربوط به گرانول‌های پلی‌هیدروکسی بوتیرات است. با توجه به شکل‌های ۷ تا ۱۱ باندهای به دست آمده از طیف‌های FTIR برای نمونه استاندارد پلی‌هیدروکسی بوتیرات و نمونه‌های استخراج شده از ریزجلبک در شرایط کشت مختلف، کیفیت پلی‌هیدروکسی بوتیرات استخراج شده را تایید می‌کند. قله جذبی در ناحیه 1727cm^{-1} مربوط به ارتعاش کششی



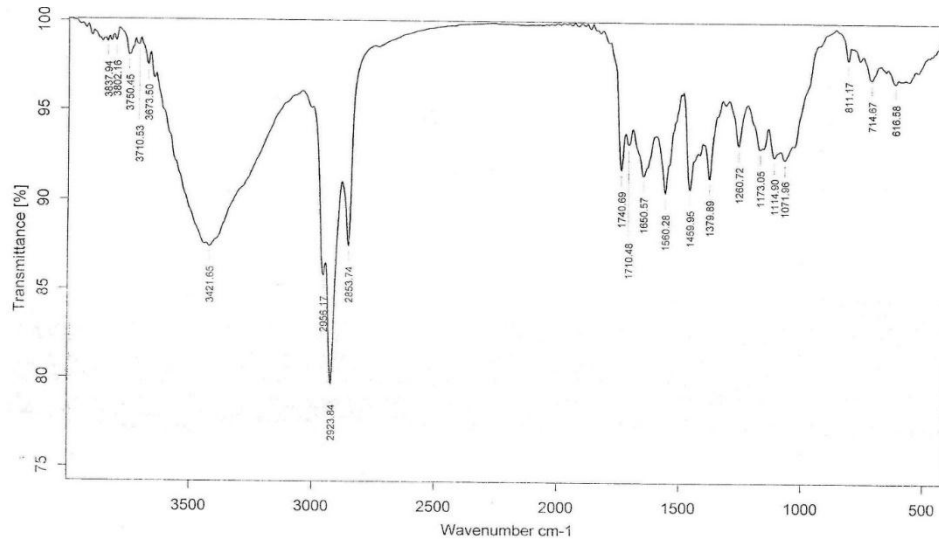
شکل ۶: گرانول‌های پلی‌هیدروکسی بوتیرات در ریزجلبک *Spirulina sp.* (بزرگنمایی ۱۰۰۰ برابر)



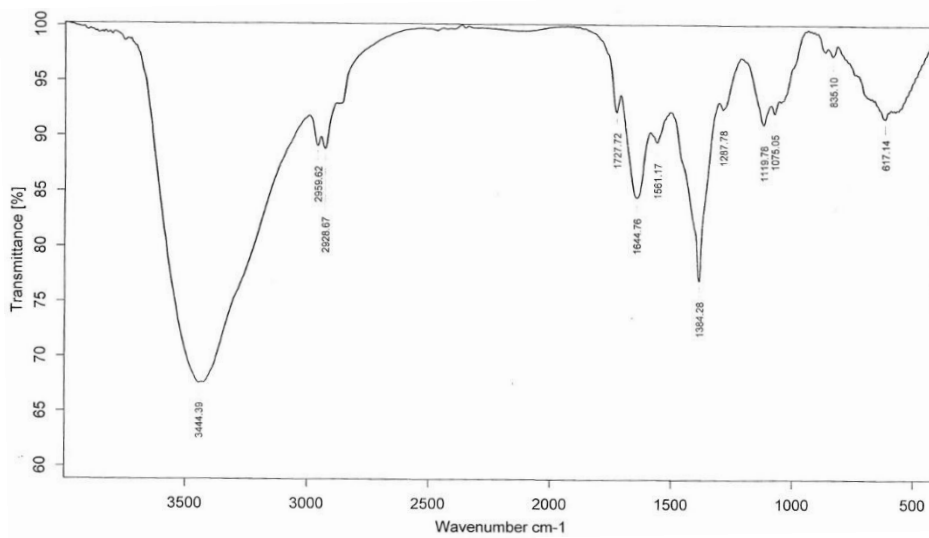
شکل ۷: طیف FTIR پلی هیدروکسی بوتیرات نمونه استاندارد



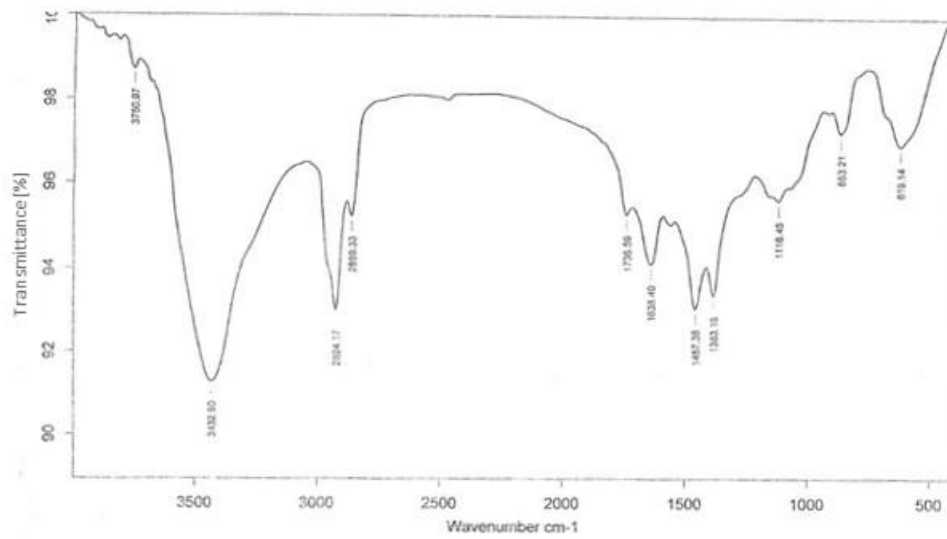
شکل ۸: طیف FTIR پلی هیدروکسی بوتیرات نمونه شاهد (X، حاوی غلظت نمک‌های معدنی برابر با محیط زاروک)



شکل ۹: طیف FTIR پلی هیدروکسی بوتیرات نمونه X/2 (حاوی غلظت نمک‌های معدنی نصف محیط زاروک)



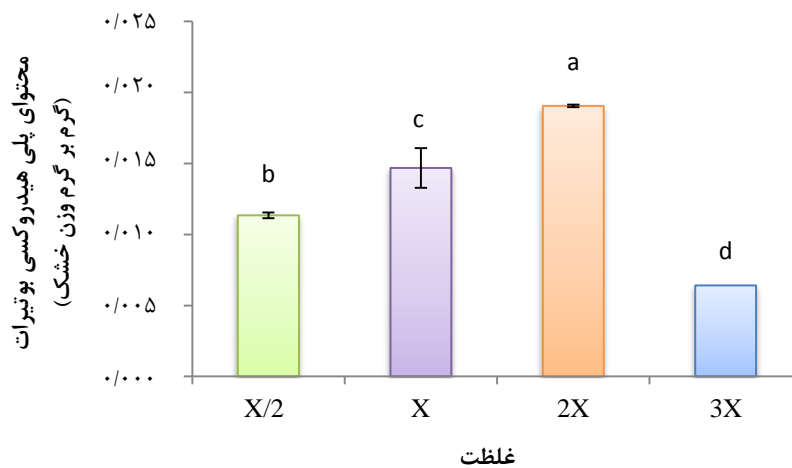
شکل ۱۰: طیف FTIR پلی هیدروکسی بوتیرات نمونه 2X (حاوی غلظت نمک‌های معدنی دو برابر محیط زاروک).



شکل ۱۱: طیف FTIR پلی‌هیدروکسی بوتیرات نمونه 3X (حاوی غلظت نمک‌های معدنی سه برابر محیط زاروک).

۱۲ آورده شده است. با توجه به نتایج به دست آمده، در شرایط 2X، میزان پلی‌هیدروکسی بوتیرات به طور معناداری در سطح احتمال $P \leq 0.05$ بیشتر از تیمارهای دیگر بود.

مقدار کمی پلی‌هیدروکسی بوتیرات ریزجلبک *Spirulina sp.* مقادیر کمی پلی‌هیدروکسی بوتیرات بر حسب گرم بر گرم وزن خشک سلول در شکل



شکل ۱۲: میزان پلی هیدروکسی بوتیرات تولید شده در *Spirulina sp.* در محیط‌های حاوی مختلف نمک‌های معدنی شامل نصف ($X/2$), برابر (X), به عنوان شاهد، دو برابر ($2X$) و سه برابر ($3X$) محیط زاروک (میانگین \pm خطای استاندارد). حروف متفاوت نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارها است ($P \leq 0.05$).

بحث

بررسی رشد ریزجلبک *Spirulina sp.*

and Lee, 2012). نیتروژن برای رشد و فرآیند فتوسنتز مورد نیاز است، کاهش آن منجر به توقف تقسیم سلولی و به دنبال آن کاهش نرخ رشد می‌شود. در ریزجلبک مقادیر بالای نیتروژن در محیط کشت موجب تولید بیشتر نشاسته برای حمایت از رشد می‌شود (Li et al., 2007). همچنین برخی از سیانوباکترها تثبیت کننده نیتروژن هستند و معمولاً بدون منبع نیتروژن و با تثبیت نیتروژن هوا رشد می‌کنند (Capone et al., 2005). رشد سیانوباکترها، با توجه به مطالعات Paerl در سال ۲۰۱۲، وابسته به آهن و بسیاری از ریز مغذی‌های فلزی مانند روی،

فرآیند رشد به عنوان یک شاخص اکولوژیکی مهم است که تحت تاثیر شرایط محیطی قرار دارد (Gao et al., 2009). برای عملکرد فیزیکی طبیعی سلول‌ها، چهار عنصر اساسی یعنی کربن، هیدروژن، اکسیژن و نیتروژن مورد نیاز است. آب متداول‌ترین منبع هیدروژن و اکسیژن است. با این حال، میکروارگانیسم‌ها برای به دست آوردن کربن و نیتروژن از منابع مختلف بسته به نوع تغذیه استفاده می‌کنند (Pinto et al., 2003; Lam

آنتی‌اکسیدانی قادر به جلوگیری از اثرات مخرب ترکیبات ROS است (Zhang et al., 2013). طبق نتایج مطالعه حاضر، محتوای مالون‌دی‌آلدئید در شرایطی که غلظت نمک‌های معدنی سه برابر بود (3X)، در مقایسه با شاهد و تیمارهای دیگر به طور معنی‌داری بیشتر بود (شکل ۴).

میزان پروتئین بستگی به شرایط کشت و پرورش و گونه ریزجلبک دارد (Singh et al., 2002). با توجه به نتایج مطالعه حاضر، محتوای پروتئین در تیمارهای آزمایشی در مقایسه با شاهد کاهش یافت، به طوری که بیشترین محتوای پروتئین بین تیمارها در شرایط $X\frac{1}{2}$ به دست آمد (شکل ۵). در تیمار شاهد 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. با توجه به میزان بالای پراکسیداسیون لیپیدی در شرایط 2X و 3X بخشی از پروتئین موجود در سلول‌های نمونه مورد بررسی توسط گونه‌های فعال اکسیژن تخریب شد و محتوای آن در این دو تیمار کمتر بود.

مس و نیکل است. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که افزایش یا کاهش نمک‌های مغذی موجود در محیط کشت ریزجلبک *Spirulina sp.* تاثیر معنی‌داری بر رشد آن ندارد و ریزجلبک توانسته در شرایط کمبود و افزایش غلظت نمک‌های محیط رشد برابری نسبت به شرایط شاهد داشته باشد. Shrivastav و همکاران در سال ۲۰۱۰ گزارش دادند که با افزایش غلظت نمک NaCl میزان رشد ریزجلبک *Spirulina subsalsa* نسبت به شاهد تغییر معناداری نشان نداد و رشد آن مشابه حالت شاهد بود. بنابراین می‌توان با تغییر تنش‌زایی مواد مغذی محیط کشت و بدون کاهش قابل توجه رشد، تولید ترکیبات ثانویه از جمله پلی‌هیدروکسی بوتیرات را بهبود بخشید.

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

پراکسیداسیون لیپیدی، عموماً شاخص‌ترین علائم پذیرفته شده شرایط استرس اکسیداتیو است که با اندازه‌گیری مالون‌دی‌آلدئید در سلول‌ها برآورد می‌شود. تحت استرس اکسیداتیو مقدار زیادی از گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) در ریزجلبک‌ها تجمع می‌یابد که منجر به تخریب پروتئین‌ها، اسیدهای نوکلئیک و لیپیدها می‌شود. ریزجلبک با داشتن سیستم

دادند (شکل‌های ۷ تا ۱۱). صرف نظر از طبیعت و نوع بیوپلاستیک، گروه کربونیل (C=O) یک ویژگی مشترک در تمام ساختمان‌های پلی‌هیدروکسی بوتیرات استخراج شده در طول مطالعه حاضر است.

بر اساس وزن به دست آمده برای پلی‌هیدروکسی بوتیرات پس از جداسازی و تخلیص، مقادیر این ترکیب در تیمارهای حاوی غلظت‌های X ، $\frac{1}{2}X$ ، $2X$ و $3X$ عناصر معدنی به ترتیب $۰/۰۱۴$ ، $۰/۰۱۱$ ، $۰/۰۱۹$ و $۰/۰۰۶$ گرم بر گرم وزن خشک سلول به دست آمد. از آنجا که میزان پراکسیداسیون لیپیدی در شرایط $3X$ نسبت به تیمارهای دیگر خیلی بیشتر بود، میزان پلی‌هیدروکسی بوتیرات در این شرایط به دلیل حضور گونه‌های فعال اکسیژن و تمایل زیاد این رادیکال‌ها برای ترکیب با لیپیدها و در نتیجه تخریب احتمالی پلی‌هیدروکسی بوتیرات از یک طرف و کند شدن مسیر ساخت آن‌ها در حضور چنین عواملی از طرف دیگر، بسیار کم بود. در مقابل، در شرایط $2X$ مقدار پلی‌هیدروکسی بوتیرات نسبت به تیمارهای دیگر از بالاترین مقدار برخوردار بود. در بررسی‌های به عمل آمده پیشین نیز نشان داده شده است که افزایش غلظت نمک می‌تواند تولید PHB را در اسپیرولینا تا $۱۴/۷$ درصد افزایش دهد

بررسی کیفی و کمی پلی‌هیدروکسی بوتیرات ریزجلبک *Spirulina sp.*

در این مطالعه پس از انجام رنگ‌آمیزی و مشاهده به وسیله میکروسکوپ نوری، گرانول‌های پلی‌هیدروکسی بوتیرات درون سلول‌های ریزجلبک تصویربرداری شدند. لکه‌های سیاه نشان داده شده توسط پیکان در شکل ۶ مربوط به گرانول‌های پلی‌هیدروکسی بوتیرات است که با نتایج رستم‌زاد و همکاران (۱۳۹۶) و Ansari و Fatma (۲۰۱۶) مطابقت نشان داد. این پژوهشگران نیز توانستند حضور گرانول‌های پلی‌هیدروکسی بوتیرات را در *Nostoc muscorum* NCCU-442 با میکروسکوپ نوری و رنگ‌آمیزی با سودان سیاه مورد تایید قرار دهند.

مطابق نظر بسیاری از پژوهشگران از جمله Ansari و Fatma (۲۰۱۶)، Hong و همکاران (۱۹۹۹) و Kansiz و همکاران (۲۰۰۰) و Shrivastav و همکاران (۲۰۱۰) برای تایید ترکیب استخراج شده به عنوان پلی‌هیدروکسی بوتیرات خالص از روش دستگاهی FTIR نیز استفاده شد. با توجه به طیف‌های به دست آمده، پلی‌هیدروکسی بوتیرات جدا شده از *Spirulina sp.* با پلی‌هیدروکسی بوتیرات استاندارد ساختار شیمیایی یکسانی را نشان

(Shrivastav et al., 2010). چنین تغییراتی در تولید PHB از طریق حذف و کاهش نیتروژن و فسفر (Panda et al., 2005;) نیز گزارش شده است. همچنین Ansari و Fatma (۲۰۱۶)، مقدار پلی‌هیدروکسی بوتیرات تولید شده را در *Spirulina platensis* NCCU-S5 کشت شده در محیط کشت IX زاروک در حدود ۰/۵۱ درصد (W/W) گزارش دادند. Shrivastav و همکاران نیز در سال ۲۰۱۰ گزارش دادند که میزان تولید پلی‌هیدروکسی بوتیرات در سیانوباکتر *Spirulina subsalsa* تحت غلظت ۵ درصد سدیم کلرید (NaCl) دو برابر افزایش یافت (Shrivastav et al., 2010). تجزیه و تحلیل دقیقی روی *Spirulina strain* PCC8005 توسط Deschoenmaeker و همکاران (۲۰۱۶) تحت شرایط فقدان نیتروژن انجام شد. در این شرایط گرانول‌های PHB فراوان‌تر و بزرگ‌تر بودند. همچنین آن‌ها با توجه به پژوهش‌های خود و مطالعات دیگر بر روی تولید PHB در *Spirulina* بیان کردند که میزان تولید این ترکیب به نوع سویه وابسته است (Deschoenmaeker et al., 2016). در ریزجلبک *Spirulina platensis* فقدان نیتروژن در محیط میکسوتروفی باعث تجمع PHB تا ۱۰ درصد وزن خشک سلول شد (Jau et al., 2005). Campbell و همکاران (۱۹۸۲) گزارش دادند که بیشترین PHB تجمع یافته ۶ درصد (dcw) در *Arthrospira (Spirulina) platensis* در کشت فتواتوتروفی بود. بر این اساس نه تنها اسپیرولینای بومی منابع آبی استان گیلان به نظر می‌رسد از ظرفیت تولید پلی‌هیدروکسی بوتیرات بالایی برخوردار است بلکه در شرایط تنش حاصل از بالا بودن غلظت نمک نیز این ظرفیت افزایش یافته، درصد پلی‌هیدروکسی بوتیرات تولید شده به طور قابل توجهی ارتقا می‌یابد.

نتایج امیدوار کننده‌ای از مطالعات جدید در مورد استفاده از روش‌های بهینه شده برای تجمع پلی‌هیدروکسی بوتیرات در ریزجلبک‌ها به ویژه *Spirulina sp.* به دست آمده است. بنابراین، برای استفاده از سیانوباکترهای تولید کننده پلی‌هیدروکسی بوتیرات باید پتانسیل واقعی آن‌ها ارزیابی شود و همچنین پژوهش‌های بیشتری برای دستیابی به اطلاعاتی در مورد عواملی که می‌تواند باعث بیوسنتز این ترکیب شوند، صورت گیرد. با توجه به نتایج به دست آمده در این مطالعه، تغییر غلظت نمک‌های معدنی برای بهینه‌سازی محیط کشت ریزجلبک و به منظور تولید بیشتر ترکیب پلی‌هیدروکسی

بوتیرات، تغییر معنی داری ایجاد نکرد، اما میزان پراکسیداسیون لیپیدی با بیشتر شدن غلظت نمک تا سه برابر در مقایسه با نمونه شاهد افزایش یافت، در حالی که میزان پروتئین به طور قابل توجهی کاهش یافت. با این وجود بدون کاهش معنی دار زیست توده، مقدار پلی هیدروکسی بوتیرات تولید شده توسط ریزجلبک *Spirulina sp.* در محیط حاوی غلظت دو برابر نمک محلول به بیشترین مقدار خود در بین همه تیمارها رسید که می تواند محیطی مناسب تر برای تولید این ترکیب زیستی به شمار آید. اما پیشنهاد می شود در ادامه این مسیر جهت صرفه جویی در استفاده از نمک و بهینه تر شدن محیط برای تولید بیشتر پلی هیدروکسی بوتیرات از ریزجلبک مربوطه، اثر دو برابر شدن نمک موجود در محیط را به صورت جدا از هم بر روی میزان تولید این ترکیب بررسی کرد.

منابع

- کارخانه شیر ایلام. مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی ایلام، ۳(۱): ۱۳۷-۱۲۵.
- Ansari S. and Fatma T. 2016.** Cyanobacterial polyhydroxybutyrate (PHB): Screening, optimization and characterization. PLOS ONE, 11(6): 1-20.
- Ataei S.A., Vashghani Farahani E., Tehrani H.A. and Shojaosadati S.A. 2008.** Isolation of PHA producing bacteria from date syrup waste. Macromolecular Symposia, 269(1): 11-16.
- Balaji S., Gopi K. and Muthuvelan B.A. 2013.** Review on production of poly β hydroxybutyrates from cyanobacteria for the production of bio plastics. Algal Research, 2(3): 278-285.
- Bradford M.M. 1976.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram of protein utilizing of protein- day binding. Analytical Biochemistry, 72(1-2): 248-254.
- Brandl H., Gross C.A.N., Lenz R.W. and 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 betahydroxyalkanoates for potential applications as biodegradable polyesters. Applied and Environmental Microbiology, 54(8): 1977-1982.
- Campbell J., Stevens J.S. and Balkwill D.L. 1982.** Accumulation of poly- β hydroxybutyrate in *Spirulina plantensis*. Journal of Bacteriology, 149: 361-363.
- Capone D.G., Burns J.A., Montoya J.P., Subramaniam A., Mahaffey A.C., Gunderson T., Michaels A.F. and Carpenter E.J. 2005.** Nitrogen fixation by *Trichodesmium* spp.: An important source of new nitrogen to the tropical and subtropical North Atlantic Ocean. Global Biogeochemical Cycles, 19(2): 1-17.
- Chua H., Hu W.F. and Ho. L.Y. 1997.** Recovery of biodegradable polymers from food-processing wastewater activated sludge system. Journal-Institution of Engineers Singapore, 37: 9-14.
- Deschoenmaecker F., Facchini R., Carlos J., Pino C., Bayon-Vicente**
- رستمزاد آ. رضایی ح. و هوشمندفر ر. ۱۳۹۶.** جداسازی باکتری‌های تولید کننده پلاستیک زیست‌تخریب‌پذیر از خاک‌های آلوده به پساب

- G., Sachdeva N., Flammang P. and Wattiez R. 2016.** Nitrogen depletion in *Arthrospira* sp. PCC 8005, an ultrastructural point of view. *Journal of Structural Biology*, 196: 385–393.
- Drosg B., Fritz I., Gattermayr F. and Silvestrini L. 2015.** Photoautotrophic production of poly (hydroxyalkanoates) in cyanobacteria. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*, 29(2): 145–156.
- Fernandez D., Rodriguez E., Bassas M., Vinas M., Solanas A.M., Llorens J., Marques A.M. and Manresa A. 2005.** Agro-industrial oily wastes as substrates for PHA production by the new strain *Pseudomonas aeruginosa* NCIB 40045: Effect of culture conditions. *Biochemical Engineering Journal*, 26: 159–167.
- Gao Y., Cui Y., Xiong W., Li X. and Wu Q. 2009.** Effect of UV-C on algal evolution and differences in growth rate, pigmentation and photosynthesis between prokaryotic and eukaryotic algae. *Photochemistry and Photobiology*, 85: 774–782.
- Griffin G. 1994.** *Chemistry and Technology of Biodegradable Polymers*. Springer, Netherlands. 154P.
- Heath R.L. and Packer L. 1968.** Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 125(1): 189–198.
- Hong K., Sun S., Tian W., Chen G. and 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.
- Ismail M.M., MahmoudEl-Ayouty Y. and 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. and 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. and 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 multivariate statistics. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(8): 3415–3420.

- Kumagai Y. and Doi Y. 1992.** Enzymatic degradation of binary blends of microbial poly (3-hydroxy butyrate) with enzymatically active polymers. *Polymer Degradation and Stability*, 37(3): 253–256.
- Lam M.K. and Lee K.T. 2012.** Microalgae biofuels: A critical review of issues, problems and the way forward. *Biotechnology Advances*, 30(3): 673–690.
- Lee C., Kim J., Do H. and 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.
- Li Z.Y., Guo S.Y., Li L. and Cai M.Y. 2007.** Effects of electromagnetic field on the batch cultivation and nutritional composition of *Spirulina platensis* in an air-lift photobioreactor. *Bioresource Technology*, 98(3): 700–705.
- Luef K.P., Stelzer F. and Wiesbrock F. 2015.** Poly(hydroxyalkanoate)s in medical applications. *Chemical and Biochemical Engineering*, 29(2): 287–297.
- Nishioka M., Nakai K., Miyake M., Asada Y. and Taya M. 2001.** Production of poly-b hydroxybutyrate by thermophilic cyanobacterium, *Synechococcus* sp. MA19 under phosphate limitation. *Biotechnology Letters*, 23: 1095–1099.
- Paerl H.W. 2012.** Marine plankton. P: 127–153. In: Whitton B.A. (Ed.). *Ecology of Cyanobacteria II*. Springer, Netherlands.
- Panda B., Sharma L. and Mallick N. 2005.** Poly-b-hydroxybutyrate accumulation in *Nostoc muscorum* and *Spirulina platensis* under phosphate limitation. *Journal Plant Physiology*, 162: 1376–1379.
- Pinto E., Sigaud-Kutner T., Leitao M. and Okamoto O. 2003.** Heavy metal induced oxidative stress in algae. *Journal of Phycology*, 39(6): 1008–1018.
- Rippka R., Neilson A., Kunic W.A.R. and Cohenbazire G. 1971.** Nitrogen fixation by unicellular blue-green algae. *Archiv fur Mikrobiologie*, 76: 341–348.
- Sayaka H., Masatoshi T., Takashi O., Mami M., Tomohisa H., Akio T., Yoichi N., Shigeru C., Morifumi H. and Munehiko A. 2015.** Genetic engineering and metabolite profiling for overproduction of polyhydroxybutyrate in cyanobacteria. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 120(5): 510–517.
- Sharma L. and Mallick N. 2005.** Accumulation of poly- β -hydroxybutyrate in *Nostoc muscorum*: Regulation by pH,

- light-dark cycles, N and P status and carbon sources. *Bioresource Technology*, 96: 1304–1310.
- Shetty P., Shenai P. and Chatra L. 2013.** Efficacy of *Spirulina* as an antioxidant adjuvant to corticosteroid injection in management of oral submucous fibrosis. *Indian Journal of Dental Research*, 24(3): 347–350.
- Shi J., Votruba A.R., Farokhzad O.C. and Langer R. 2010.** Nanotechnology in drug delivery and tissue engineering: From discovery to applications. *Nano Letters*, 10(9): 3223–3230.
- Shrivastav A., Kim H.Y. and Kim Y.R. 2013.** Advances in the applications of polyhydroxyalkanoate nanoparticles for novel drug delivery system. *Nanobiotechnology*, 1: 1–12.
- Shrivastav A., Mishra S.K., Mishra S. 2010.** Polyhydroxyalkanoate (PHA) synthesis by *Spirulina subsalsa* from Gujarat coast of India. *International Journal of Biological Macromolecules*, 46(2): 255–260.
- Singh P. and Parmar N. 2011.** Isolation and characterization of two novel polyhydroxybutyrate producing bacteria. *African Journal of Biotechnology*, 10(24): 4907–4919.
- Singh S.C., Sinha R.P. and Hader D.P. 2002.** Role of light and fatty acids in stress tolerance in cyanobacteria. *Acta Protozoologica*, 41(4): 297–308.
- Zarrouk C. 1966.** Contribution to the Cyanophyceae study: Influence various physical and chemical factors on growth and photosynthesis of *Spirulina maxima* (Setch et Gardner) Geitler extract. Ph.D. Thesis, University of Paris-Saclay, France. 146P.
- Zhang Y.M., Chen H., He C.L. and Wang Q. 2013.** Nitrogen starvation induced oxidative stress in an oil-producing green alga *Chlorella sorokiniana* C3. *PLOS ONE*, 8(7): 1–12.



Research Paper

Production of polyhydroxybutyrate by cyanobacteria *Spirulina* sp. under concentrations of mineral salts stress

Younes Kordi Tamandani¹, Akbar Norastehnia^{2,3*}, Fatemeh Moradi⁴

Received: February 2019

Accepted: May 2019

Abstract

Today, due to the high consumption of biodegradable resistant polymers, there is a huge problem of the accumulation of polymer waste in nature. Polyhydroxyalkanoates are biodegradable compounds that are very much considered for replacement with synthetic plastics. In this study, the effects of salt concentration changes on the production of polyhydroxybutyrate by cyanobacteria *Spirulina* sp. were investigated. *Spirulina* was cultured in Zarrouk medium containing half (1/2X), equal (X, as control), double (2X) and triple (3X) salt concentrations for 20 days. Quality and quantity of polyhydroxybutyrate were analyzed by measuring growth, protein content and lipid peroxidation. The growth rate of *Spirulina* sp. in the medium containing increased and decreased concentrations of salts did not change significantly. However, lipid peroxidation and protein increased and decreased, respectively, by increasing salt concentration to 3 times as compared to control. The amount of polyhydroxybutyrate under salt concentrations of 1/2X, X, 2X and 3X were 0.011, 0.014, 0.019 and 0.006 (g/g dcw) respectively. As a result, treatment with 2X salt concentration is more suitable for polyhydroxybutyrate producing than other treatments.

Key words: *Salinity Stress, Polyhydroxybutyrate, Cyanobacteria, Spirulina sp.*

1- M.Sc. Student in Plant Physiology, Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran.

2- Associate Professor in Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran.

3- Associate Professor in Department of Marine Sciences, Caspian Sea Basin Research Center, University of Guilan, Rasht, Iran.

4- Ph.D. Student in Biochemistry, Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran.

*Corresponding Author: norasteh@guilan.ac.ir