



The Growth and Quality Optimization of Spirulina Biomass by Changing the Dilution of Medium and Using the Aeration Cycle

ARTICLE INFO

Article Type

Original Research

Authors

Ghobadian S.¹ PhD,
Ganjidoust H.*¹ PhD,
Ayati B.¹ PhD,
Soltani N.² PhD

How to cite this article

Ghobadian S, Ganjidoust H, Ayati B, Soltani N. The Growth and Quality Optimization of Spirulina Biomass by Changing the Dilution of Medium and Using the Aeration Cycle. Modares Journal of Biotechnology. 2018;9(3):385-393.

¹Environmental Engineering Department, Civil & Environmental Engineering Faculty, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

²Petroleum Microbiology Department, Research Institute of Applied Science, Academic Center for Education, Culture and Research (ACECR), Tehran, Iran

*Correspondence

Address: Tarbiat Modares University, Nasr Bridge, Jalal-e-Al-e-Ahmad Highway, Tehran, Iran
Phone: +98 (21) 82883332
Fax: -
h-ganji@modares.ac.ir

Article History

Received: September 10, 2016
Accepted: February 1, 2017
ePublished: September 22, 2018

ABSTRACT

Aims The increasing development of microalgae applications has led to the concentration of new multidisciplinary studies to facilitate commercial cultivation of these organisms due to cost reduction and productivity enhancement. The aim of this study was the growth and quality optimization of Spirulina biomass by changing the dilution of medium and using the aeration cycle.

Materials & Methods In this experimental study, the effect of concentration of Zarrouk medium (0 to 100% dilution) and aeration cycle on specific growth rate and dry weight, as well as the content of chlorophyll and carotenoids of Spirulina were investigated, using response surface method, central design. A total duration of 16 hours was aerated in any 24-hour period; the interval time between these aerated periods varied between 1 to 8 hours. The data were analyzed by SPSS 16 software, using multiple regression test.

Findings The highest biomass (0.659mg/ml) was obtained at 80% concentration of culture media and aeration cycle of 2.75 hours and the highest specific growth rate (0.230 daily) was obtained at 60% concentration and aeration cycle of 4.5 hours. The highest aeration cycle (8 hours) resulted in a significant and simultaneous increase in the content of chlorophyll and carotenoids (11.65 and 2.67 mg/g, respectively).

Conclusion The growth and quality optimization of Spirulina biomass can be accomplished by changing the dilution of the medium and using the aeration cycle.

Keywords Spirulina; Zarrouk; Aeration Cycle; Chlorophyll; Carotenoid; RSM-CCD

CITATION LINKS

[1] Biofuels from microalga - a review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels ... [2] Cultivation of Spirulina maxima in medium supplemented with ... [3] Taxonomy and growth conditions concur to determine ... [4] Metrics for sustainability analysis of post-combustion ... [5] Bioeffects of selenite on the growth of Spirulina platensis ... [6] Spirulina, the edible ... [7] Solid-phase/supercritical-fluid extraction for liquid chromatography of phenolic ... [8] The potential application of Spirulina (Arthrospira) as a nutritional and therapeutic ... [9] Biological activities and health benefit effects ... [10] The protective efficacy ... [11] Characteristics of the photosynthesis ... [12] Biomethane and biocrude ... [13] Use of Spirulina biomass ... [14] Microalgal biotechnology for ... [15] Fed-batch cultivation of ... [16] Cultivation of Arthrospira ... [17] Influence of temperature ... [18] Arthrospira (Spirulina): Systematics ... [19] Biofixation of carbon dioxide ... [20] The effects of limiting nighttime ... [21] Anaerobic energy metabolism ... [22] Different nitrogen sources and growth ... [23] Algal culturing ... [24] The use of acetone and methanol in the estimation ... [25] Molecular and biochemical ... [26] The effects of temperature and ... [27] Evaluation of the effects of aeration ... [28] Variation of nitrogenase ... [29] Reflector based chlorophyll production by ... [30] Evaluation of Spirulina sp. growth ... [31] Optimization of the repeated batch ... [32] Photic volume in photobioreactors ... [33] Physiological characteristics of Spirulina platensis ... [34] Renewal rate and nutrient concentration as tools to modify ... [35] Productivity and biochemical composition of cyclostat cultures of the marine ... [36] Molecular and physiological responses of diatoms to variable ... [37] Repeated fed-batch cultivation of Arthrospira (Spirulina) ... [38] Chlorophyll production from Spirulina platensis: Cultivation with ... [39] Effect of irradiance on fatty acid, carotenoid, total protein composition and growth ... [40] Autotrophic growth and carotenoid ... [41] Use of response surface methodology to optimise ... [42] On the factors which ... [43] The effect of temperature ... [44] Effect of various stress-regulatory factors on ... [45] Effect of macro- and micro-nutrient ...

بهینه‌سازی رشد و کیفیت بیومس ریزجلبک اسپیرولینا با تغییر رقت محیط کشت و استفاده از سیکل هوادهی

ساسان قبادیان PhD

گروه مهندسی محیط زیست، دانشکده مهندسی عمران و محیط زیست، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

حسین گنجی‌دوست PhD

گروه مهندسی محیط زیست، دانشکده مهندسی عمران و محیط زیست، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

بیبا آیتی PhD

گروه مهندسی محیط زیست، دانشکده مهندسی عمران و محیط زیست، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

ندا سلطانی PhD

گروه میکروبیولوژی نفت، پژوهشکده علوم پایه کاربردی، جهاد دانشگاهی، تهران، ایران

چکیده

اهداف: توسعه روزافزون کاربری‌های ریزجلبکی در بسیاری از صنایع باعث تمرکز پژوهش‌ها به این حوزه نوین بین رشته‌ای شده است تا با افزایش بهره‌وری و کاهش هزینه‌های کشت، تجاری‌سازی کشت این موجودات تسهیل شود. هدف این پژوهش بهینه‌سازی رشد و کیفیت بیومس ریزجلبک اسپیرولینا با تغییر رقت محیط کشت و استفاده از سیکل هوادهی بود.

مواد و روش‌ها: در پژوهش تجربی حاضر با بهره‌گیری از روش پاسخ سطح-طراحی مرکزی، اثرگذاری دو فاکتور غلظت محیط کشت زاروک (۰ تا ۱۰۰٪ رقت) و سیکل هوادهی بر نرخ رشد مخصوص و وزن خشک و نیز محتوی کلروفیل و کاروتنوئید اسپیرولینا بررسی شد. در هر دوره ۲۴ ساعته مجموعاً ۱۶ ساعت هوادهی شد که فاصله قطع و وصل هوادهی با عنوان سیکل هوادهی بین ۱ ساعت تا ۸ ساعت متغیر بود. تجزیه و تحلیل داده‌ها با نرم‌افزار SPSS 16 از طریق آزمون رگرسیون چندگانه صورت گرفت.

یافته‌ها: بیشترین بیومس (۰/۶۵۹ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) در غلظت ۸۰٪ محیط کشت و سیکل هوادهی ۲/۷۵ ساعته و بیشترین نرخ رشد مخصوص (۰/۲۳۰ روزانه) در غلظت ۶۰٪ و سیکل هوادهی ۴/۵ ساعته حاصل شد. بیشترین سیکل هوادهی (۸ ساعت) موجب افزایش قابل توجه و همزمان محتوای کلروفیل و کاروتنوئید (به ترتیب ۱۱/۶۵ و ۲/۶۷ میلی‌گرم بر گرم) شد.

نتیجه‌گیری: بهینه‌سازی رشد و کیفیت بیومس ریزجلبک اسپیرولینا با تغییر رقت محیط کشت و استفاده از سیکل هوادهی قابل انجام است.

کلیدواژه‌ها: اسپیرولینا، زاروک، سیکل هوادهی، کلروفیل، کاروتنوئید و RSM-CCD

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۰۶/۲۰

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۱۱/۱۳

*نویسنده مسئول: h-ganji@modares.ac.ir

مقدمه

کشت ریزجلبک‌ها به سبب نیاز کمتر به آب، امکان استفاده از زمین‌های غیرمزروعی، عدم مداخله در تولید غذا، عدم نیاز به کاربرد سموم، قابلیت کشت در تمام طول سال و بهره‌وری بالا^[1] مورد توجه بسیاری از پژوهش‌ها قرار گرفته است. داشتن نرخ رشد نمایی بالا و قابلیت کشت در تمام طول سال از دلایل این توجه است. گستره وسیع شرایط محیطی قابل تحمل موجب تنوع گونه‌ها و غیریکنواختی ترکیب شیمیایی آنها می‌شود^[2] که امکان تنظیم این ترکیب بیوشیمیایی زی‌توده جلبکی نیز با تغییر شرایط رشد میسر است^[3]. کشت گونه‌های ریزجلبکی متنوعی نظیر کلرلا (*Chlorella spp.*)، دونالیا (*Dunaliella spp.*)، همتاکوکوس (*Haematococcus spp.*)، سندسموس (*Scenedesmus spp.*) و اسپیرولینا (*Spirulina spp.*) با کاربری‌های مختلف مانند تولید سوخت زیستی، تولید ترکیبات شیمیایی مفید نظیر

رنگدانه‌ها، پروتئین‌ها، چربی‌ها، اسیدهای چرب چندگانه غیراشباع، کاروتنوئیدها، استروئیدها و ویتامین‌ها، توجه روزافزون صنایع دارویی، آرایشی، بهداشتی، غذایی و نظامی را به خود جلب کرده است^[4]. بین انواع گونه‌های ریزجلبکی، اسپیرولینا قرن‌ها به واسطه ارزش غذایی بالا و سطوح بالای پروتئین، ویتامین، مواد معدنی و اسیدهای چرب چندگانه غیراشباع^[5] توسط بومیان از دریاچه‌های چاد آفریقا و تکسکوکوی مکزیک به عنوان منبع غذایی استفاده می‌شد^[6]. امروزه نیز به سبب قابلیت تولید ترکیبات آنتی‌اکسیدان مانند فنولیک‌ها^[7]، نقش اسیدگاما-لینولنیک (GLA) در کاهش کلسترول خون^[8]، خواص آنتی‌اکسیدانی، ضدسرطانی و ضدتوموری فیکوسیانین^[9]، نقش حفاظتی در مقاومت علیه اندوتوکسین (ماده‌ای که توسط باکتری‌های روده، تولید و با مصرف الکل و بالا رفتن سطح آن، تصلب بافت‌ها و بیماری‌های کبدی ایجاد می‌شود)^[10]، استفاده در پیل سوختی میکروبی فتوسنتزی^[11] و تولید بیومتان^[12]، کاربری‌های موفق در تصفیه پساب^[13] و تثبیت کربن‌دی‌اکسید (CO₂)^[14] توجه ویژه‌ای به گونه‌های این ریزجلبک شده و تبدیل به گزینه مناسبی برای انجام فیکورمیداسیون شده است.

از بین فاکتورهای اثرگذار در فرآیند کشت اسپیرولینا می‌توان به نوع و میزان مواد مغذی یا محیط کشت^[15]، شدت تابش^[16]، pH^[17]، دما^[18]، میزان CO₂^[19] و هوادهی اشاره کرد. فاکتور هوادهی در کشت علاوه بر تامین اختلاط، همگنی محیط و کمک به انتقال CO₂ برای تسریع رشد، تامین اکسیژن (O₂) و جلوگیری از شرایط بی‌هوایی در فاز تنفس سلول‌ها را نیز بر عهده دارد^[20]. وقتی تنفس هوایی سلول‌ها وارد شرایط بی‌هوایی و تخمیر اسیدی شود، تامین آندوزین‌تری فسفات (ATP) برابر با ۳۰ به ازای گلوکز، به ATP برابر با ۵ کاهش می‌یابد^[21] و افزایش مصرف ناشسته برای جبران کاهش ATP روی می‌دهد. علی‌رغم نقش اساسی فاکتور هوادهی بر کمیت و کیفیت زی‌توده تولیدی، پژوهش‌های بسیار معدودی روی آن و به ویژه بررسی اثرات تناوب و سیکل آن انجام شده است. محیط کشت‌های مختلفی برای کشت اسپیرولینا به کار گرفته شده که زاروک مرسوم‌ترین آنهاست و تلاش‌های زیادی نیز برای جایگزینی منبع نیتروژن در آن انجام شده است^[22] تا هزینه‌های کشت کاهش یابد. در این پژوهش بدون تغییر سایر شرایط موثر بر رشد، با بهره‌گیری از روش پاسخ سطح-طرح مرکب مرکزی (RSM-CCD) به بررسی اثر دو فاکتور رقت محیط کشت زاروک و سیکل هوادهی روی کمیت و کیفیت بیومس تولیدی ریزجلبک اسپیرولینا پرداخته شد و با به‌کارگیری اندرکنش فاکتور سیکل هوادهی (که پیش از این مورد توجه قرار نگرفته است) سعی در رقیق‌سازی محیط کشت، ارتقای بهره‌وری و کاهش هزینه‌های کلی فرآیند شد. بنابراین هدف پژوهش حاضر، بهینه‌سازی رشد و کیفیت بیومس ریزجلبک اسپیرولینا با تغییر رقت محیط کشت و استفاده از سیکل هوادهی بود.

مواد و روش‌ها

در پژوهش تجربی حاضر، نمونه ریزجلبک اسپیرولینا از سواحل خلیج فارس جمع‌آوری و پس از جداسازی کلنی‌های تخلیص‌شده روی پلیت‌های آگار، به منظور ازدیاد بیومس، انتقال به محیط کشت مایع زاروک صورت گرفت^[23]. از ذخیره جلبکی، تلقیح اولیه ۲۰۰ میلی‌لیتر با شرایط سنی یکسان در تمام ۱۳ تیمار انجام شد. تیمارها به صورت کشت ناپیوسته در ارلن‌های ۲ لیتری و در دمای

$$\mu = \frac{\ln(DW_7 - DW_5)}{t_7 - t_5} = \frac{\ln\left(\frac{DW_7}{DW_5}\right)}{2}$$

μ : نشان دهنده نرخ رشد مخصوص (روزانه)

DW_7 : نشان دهنده وزن خشک روز هفتم (گرم بر لیتر)

DW_5 : نشان دهنده وزن خشک روز پنجم (گرم بر لیتر)

t : زمان (روز)

تجزیه و تحلیل داده‌ها با نرم‌افزار SPSS 16 از طریق آزمون رگرسیون چندگانه برای بررسی تاثیر سیکل هوادهی و رقت محیط کشت بر پاسخ‌های نرخ رشد مخصوص (SGR)، میزان وزن خشک (DW_7 و DW_5) در روزهای پنجم و هفتم، میزان کلروفیل (Chl) و میزان کاروتنوئید (Car) صورت گرفت.

یافته‌ها

تاثیر فاکتور رقت محیط کشت برای پاسخ‌های بیومس و نرخ رشد مثبت بود، اما اثرگذاری آن بر میزان کلروفیل و کاروتنوئید منفی بود و بر کلروفیل تاثیر بیشتری داشت. سیکل هوادهی دارای تاثیر منفی بر بیومس بود و روی کلروفیل و کاروتنوئید اثر مثبت داشت که میزان اثرگذاری بر کلروفیل بسیار بیشتر بود. بیشترین بیومس (0.1659 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) در غلظت 80% محیط کشت و سیکل هوادهی $2/75$ ساعته و بیشترین نرخ رشد مخصوص (0.230 روزانه) در غلظت 60% و سیکل هوادهی $4/5$ ساعته حاصل شد. بیشترین سیکل هوادهی (8 ساعت) موجب افزایش قابل توجه و همزمان محتوای کلروفیل و کاروتنوئید (به ترتیب $11/65$ و $2/67$ میلی‌گرم بر گرم) شد (جدول ۱ و ۲).

با افزایش غلظت محیط کشت، میزان وزن خشک در هر دو روز پنجم و هفتم افزایش یافت (شکل ۱- الف و ب). در مقایسه چگونگی تغییرات نرخ رشد مخصوص با وزن خشک روز هفتم نشان داده شد که با کاهش مواد مغذی در غلظت‌های پایین محیط کشت، بیومس روز هفتم کاهش یافت و نرخ رشد مخصوص در غلظت‌های کم و سیکل‌های کوچک هوادهی کاهش زیادی داشت. همچنین در سیکل‌های بزرگ و غلظت‌های پایین محیط کشت که اُفت بیومس وجود داشت، نرخ رشد مخصوص افزایش زیادی داشت (شکل ۱- ب؛ شکل ۲- الف).

با افزایش سیکل، کاهش بیومس دیده شد. این کاهش برای بیومس ۷ روزه ناشی از افزایش سیکل در غلظت 80% به مراتب بیش از کاهش در غلظت 40% بود (نمودار ۱- ب). میزان بیومس ۵ روزه در سیکل $2/75$ ساعته بیش از بیومس ۷ روزه در سیکل هوادهی $6/25$ ساعته بود و این امر اهمیت تاثیر فاکتور سیکل را نشان داد. همچنین افزایش بیومس ناشی از افزایش رقت محیط کشت دیده شد (نمودار ۱- الف). اما تاثیر اندرکنش فاکتورهای غلظت و سیکل هوادهی بر نرخ رشد مخصوص روند دیگری داشت و با تغییر سیکل روند تاثیر آن معکوس شد. مثلاً با افزایش غلظت در سیکل‌های کوچک نرخ رشد مخصوص زیاد شد، اما در سیکل‌های بزرگ نرخ رشد مخصوص کاهش یافت (نمودار ۲).

روند تغییرات برای غلظت‌ها و سیکل‌های مختلف و همچنین برای کلروفیل و کاروتنوئید ثابت بود (نمودار ۳). در سیکل‌های مختلف، افزایش غلظت محیط کشت تاثیر محدودی بر کاهش جزئی مقادیر کلروفیل و کاروتنوئید داشت (نمودار ۳- الف). مقدار کلروفیل نیز در سیکل‌های بزرگ به مراتب بیشتر از سیکل‌های کوچک بود. با افزایش سیکل هوادهی، در هر غلظتی میزان کلروفیل زیاد شد، اما با توجه به شیب خطوط، تاثیر بر کاروتنوئید جزئی بود (نمودار ۳- ب).

$26 \pm 2^{\circ}C$ تحت تابش 4250 لوکس (معادل 60 میکرومول بر متر مربع بر ثانیه توسط LED سفید متصل به منبع تغذیه با جریان کنترل شده) و تناوب روشنایی/تاریکی به صورت $12/12$ ساعت قرار گرفتند. با اتصال پمپ هواده 9620 (هایلا؛ چین) با توان $2/3$ لیتر بر دقیقه به تایمر دیجیتال PTS-DWM (فانوس سیستم؛ ایران)، برنامه‌ریزی سیکل تابش بر حسب طراحی آزمایش انجام شد.

طراحی آزمایش و آنالیز آماری: با طراحی آزمایش RSM-CCD و منظورکردن آلفای برابر با ۲ در نرم‌افزار Design Expert 7.0.0، مقادیر دو فاکتور سیکل هوادهی (T) و رقت محیط کشت زاروک (D) در تیمارهای مختلف منظور شد (جدول ۱). در این طراحی نقطه مرکزی با ۵ بار تکرار (آزمایشات ۱، ۲، ۳، ۴، ۵ و ۶)، نقاط فاکتوریال (آزمایشات ۷، ۸، ۹ و ۱۰) و نقاط محوری (آزمایشات ۱۱، ۱۲ و ۱۳) مورد بررسی قرار گرفتند. مثلاً در آزمایش شماره ۸، مقادیر $4/5$ ساعت $X_1=60\%$ و $X_2=60\%$ به معنی رقت 60% محیط زاروک (720 میلی‌لیتر زاروک و 1080 میلی‌لیتر آب) و سیکل هوادهی $4/5$ ساعته بود. در واقع این تیمار در طول مدت کشت متناوباً تحت ۹ ساعت هوادهی و $4/5$ ساعت عدم هوادهی قرار داشت (اما با توجه به آنکه مدت هوادهی دوبرابر مدت قطع آن است، در مجموع مدت ۷ روزه کشت مانند همه تیمارها معادل ۱۶ ساعت از ۲۴ ساعت هوادهی شد). با استفاده از رگرسیون خطی به صورت رابطه زیر و با تلاش برای برازش کمترین درجه چندجمله‌ای، پاسخ‌های مختلف مورد بررسی، مدل شدند:

$$Y = A_0 + A_1 D_C + A_2 T_C + A_{12} D_C T_C + A_{11} D_C^2 + A_{22} T_C^2$$

Y : نشان دهنده پاسخ مورد بررسی (نرخ رشد مخصوص، وزن خشک، میزان کلروفیل یا محتوای کاروتنوئید)
 A_0 : جمله مستقل بیانگر میانگین نتایج آزمایشات
 A_1 و A_2 : نماینده ضریب خطی و بیانگر تاثیرگذاری هر یک از پارامترها

A_{12} : ضریب رگرسیون و بیانگر اندرکنش بین متغیرها
 A_{11} و A_{22} : نشان دهنده ضرایب رگرسیون درجه دوم
 D_C و T_C : به ترتیب نماینده فاکتورهای کد شده درصد رقت و سیکل هوادهی هستند که براساس روابط زیر از روی مقادیر واقعی حاصل می‌شوند:

$$D_C = \frac{D_{Actual} - \bar{D}}{(D_{Hi} - D_{Low})/2}$$

$$T_C = \frac{T_{Actual} - \bar{T}}{(T_{Hi} - T_{Low})/2}$$

روش‌های تحلیل و سنجش: سنجش شدت تابش به وسیله لوکس متر LX-103 (Lutron؛ تایوان) صورت گرفت و با کالیبراسیون جریان- شدت تابش، با کنترل میزان جریان شدت تابش تنظیم شد. سنجش وزن خشک براساس قرائت یک روز در میان چگالی نوری در طول موج 750 نانومتر دستگاه اسپکتروفوتومتر WPA-S2000 (Scintec، ایالات متحده) و به کمک کالیبراسیون وزن خشک- جذب انجام شد. با توجه به پیش‌آزمایشات و آغاز فاز لگاریتمی رشد از روز پنجم کشت، نرخ رشد مخصوص، از روی اختلاف وزن خشک روزهای پنجم و هفتم مطابق رابطه زیر اندازه‌گیری شد. سنجش مقدار کلروفیل و محتوای کاروتنوئید به ترتیب با روش‌های مارکر و چاموویز [24، 25] و به کمک قرائت جذب عصاره آماده شده توسط اسپکتروفوتومتر انجام شد:

ب). روند تاثیرگذاری فاکتورهای سیکل هوادهی و غلظت محیط کشت بر میزان کلروفیل و کاروتنوئید تقریباً مشابه بود (شکل ۳ و ۴).

جدول ۱) طراحی آزمایش، مقادیر فاکتورها در هر تیمار، پاسخ‌های استحصالی برای هر تیمار و مقایسه مقادیر پیش‌بینی و واقعیت برای هر پاسخ در جلبک اسپیرولینا

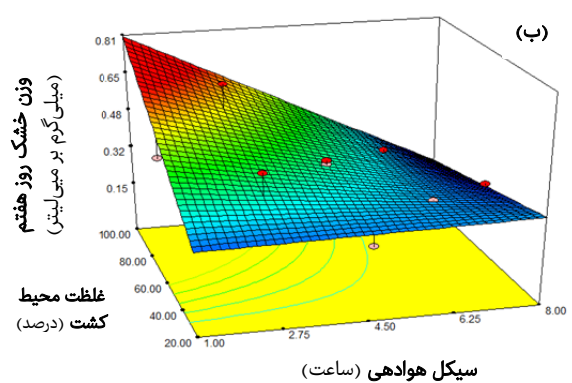
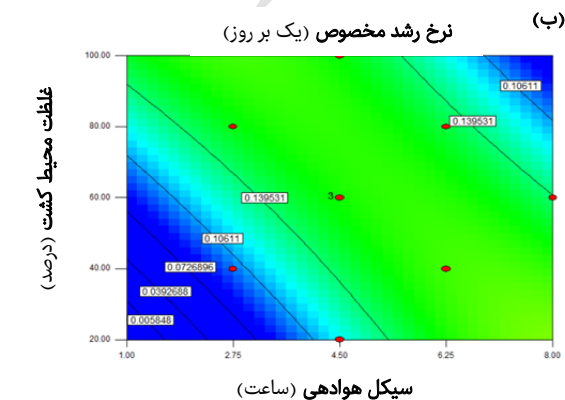
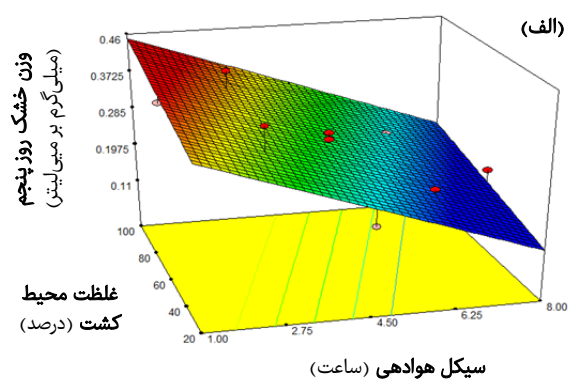
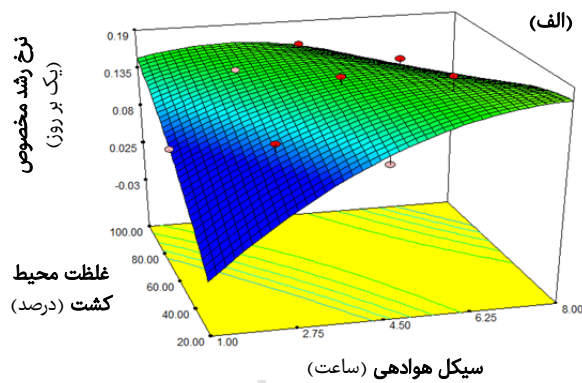
آزمایش	سیکل هوادهی (ساعت)	رقت محیط کشت (درصد)	وزن خشک روز پنجم (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)			وزن خشک روز هفتم (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)			نرخ رشد مخصوص (روزانه)			محتوای کلروفیل در وزن خشک (میلی‌گرم بر گرم)			محتوای کاروتنوئید در وزن خشک (میلی‌گرم بر گرم)		
			R	P	A	R	P	A	R	P	A	R	P	A	R	P	A
۱	۴/۵	۶۰	۰/۲۵۹	۰/۲۸۱	۰/۲۲	۰/۳۹۶	۰/۳۸۷	۰/۳۰۹	۰/۲۱۲	۰/۱۵۷	۰/۰۵۵	۹/۷۱۶	۸/۵۲۳	۱/۱۹۳	۲/۱۹	۱/۹۵۳	۰/۲۳۸
۲	۴/۵	۶۰	۰/۲۵۵	۰/۲۸۱	۰/۲۷	۰/۳۹۴	۰/۳۸۷	۰/۳۰۶	۰/۲۳۰	۰/۱۵۷	۰/۰۷۳	۷/۱۰۱	۸/۵۲۳	۱/۴۲۲	۲/۲۶۷	۱/۹۵۳	۰/۳۴۴
۳	۸	۶۰	۰/۱۸۵	۰/۱۵۷	۰/۲۸	۰/۲۴۱	۰/۲۳۱	۰/۲۰	۰/۱۳۲	۰/۱۴۱	۰/۰۰۹	۱۱/۶۵۱	۱۳/۰۵۵	۱/۴۰۴	۲/۶۶۹	۲/۷۸۲	۰/۱۱۳
۴	۴/۵	۶۰	۰/۲۵۸	۰/۲۸۱	۰/۲۳	۰/۳۵۸	۰/۳۸۷	۰/۳۰۳	۰/۱۶۳	۰/۱۵۳	۰/۰۰۵	۷/۹۱۲	۸/۵۲۳	۰/۶۱۲	۲/۳۲۱	۱/۹۵۳	۰/۳۶۹
۵	۲/۷۵	۸۰	۰/۴۰۵	۰/۳۶۶	۰/۰۴	۰/۶۵۹	۰/۵۵۳	۰/۱۰۵	۰/۱۵۳	۰/۱۰۰۱	۴/۳۰۵	۵/۹۵۶	۱/۶۵۲	۱/۳۸	۱/۵۵۷	۰/۱۷۷	۰/۲۷۸
۶	۴/۵	۶۰	۰/۲۸۴	۰/۲۸۱	۰/۰۰۲	۰/۳۸۰	۰/۳۸۷	۰/۳۰۷	۰/۱۴۶	۰/۱۵۷	۰/۰۱۱	۹/۱۶۷	۸/۵۲۳	۰/۶۴۳	۱/۶۷۴	۱/۹۵۳	۰/۲۷۸
۷	۶/۲۵	۸۰	۰/۲۳۶	۰/۲۴۱	۰/۰۰۵	۰/۳۲۲	۰/۳۱۳	۰/۳۰۹	۰/۱۵۵	۰/۱۴۷	۰/۰۰۸	۱۱/۹۸۶	۱۰/۴۸۸	۰/۱۴۹۸	۲/۲۰۷	۲/۳۸۷	۰/۱۸
۸	۴/۵	۱۰۰	۰/۳۰۳	۰/۳۲۶	۰/۰۲۳	۰/۴۱۴	۰/۴۷۸	۰/۰۶۴	۰/۱۵۷	۰/۱۵۵	۰/۰۰۱	۷/۷۵۴	۷/۹۲۱	۰/۱۶۷	۲/۳۶۳	۲/۴۲۲	۰/۱۲
۹	۱	۶۰	۰/۳۹۱	۰/۴۰۶	۰/۰۱۵	۰/۴۵۸	۰/۵۴۴	۰/۰۸۶	۰/۰۸	۰/۰۸۱	۰/۰۰۱	۵/۵۸۹	۳/۹۹۲	۰/۱۵۹۷	۱/۰۶۴	۱/۱۲۳	۰/۰۵۹
۱۰	۴/۵	۶۰	۰/۲۹۹	۰/۲۸۱	۰/۰۱۷	۰/۳۹۸	۰/۳۸۷	۰/۳۰۱	۰/۱۴۳	۰/۱۵۷	۰/۰۱۴	۹/۸۱۱	۸/۵۲۳	۰/۱۲۸۸	۱/۸۰۳	۱/۹۵۳	۰/۱۵
۱۱	۶/۲۵	۴۰	۰/۲۰۸	۰/۱۹۷	۰/۰۱۱	۰/۳۰۱	۰/۳۰۶	۰/۰۰۵	۰/۱۸۴	۰/۱۶۴	۰/۰۰۲	۱۱/۷۹۷	۱۱/۰۹	۰/۷۰۷	۱/۶۸۶	۲/۵۹۹	۰/۹۱۳
۱۲	۲/۷۵	۴۰	۰/۳۷۶	۰/۳۲۱	۰/۰۵۴	۰/۴۷۰	۰/۳۷۸	۰/۳۰۷	۰/۰۹۱	۰/۱۱۱	۰/۰۱۲	۴/۴۱۳	۶/۵۵۹	۲/۱۴۶	۱/۶۵۹	۱/۷۷	۰/۱۱
۱۳	۴/۵	۲۰	۰/۱۹۹	۰/۲۳۷	۰/۰۳۸	۰/۲۴۷	۰/۲۶۷	۰/۰۵	۰/۱۰۸	۰/۱۰۸	۰/۰۱۱	۹/۶۰۱	۹/۱۲۶	۰/۴۷۵	۲/۶۶۴	۲/۶۶۷	۰/۰۰۳

A: نشان‌دهنده مقدار واقعی؛ P: نشان‌دهنده مقدار پیش‌بینی مدل؛ R: میزان باقیمانده (تفاوت پیش‌بینی و واقعی)

جدول ۲) ضرایب رگرسیون پاسخ‌های مختلف بر حسب مقادیر گذشته دو متغیر سیکل هوادهی (ساعت) و رقت (درصد) در جلبک اسپیرولینا

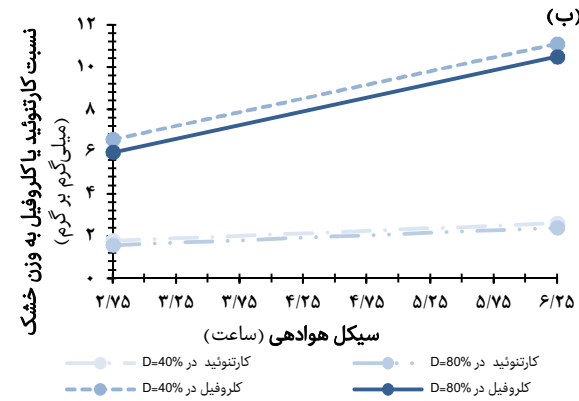
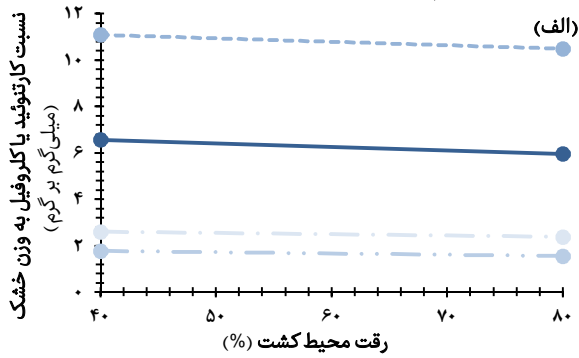
متغیرها	A ₀	A ₁	A ₂	A ₁₁	A ₁₂	A ₂₂	ضریب تعیین	سطح معنیداری میزان F	عدم انطباق
روز پنجم	۰/۲۸۱۳۹	۰/۰۲۲۱۲	-۰/۰۶۲۲۲				۰/۸۴	۰/۰۰۰۱	۰/۱۱
روز هفتم	۰/۳۸۷۵	۰/۰۴۵۳۷	-۰/۰۷۸۳		-۰/۰۴۱۹۷		۰/۷۵	۰/۰۰۴۴	۰/۰۰۴۴
نرخ رشد مخصوص	۰/۱۵۷۳۵	۰/۰۰۹۰۶	۰/۰۱۴۷۹	-۰/۰۱۷۶۷	۰/۰۰۵۰۳	-۰/۰۱۱۶۱	۰/۸۷	۰/۰۳۱۰	۰/۲۷
کلروفیل	۸/۵۲۳۳	-۰/۳۰۱۲۶	۲/۲۶۵۷۴				۰/۷۵	۰/۰۰۰۹	۰/۳۰
کاروتنوئید	۱/۹۵۲۵۹	-۰/۱۰۶۱۶	۰/۴۱۴۸	۰/۱۲۵۵۶			۰/۸۲	۰/۰۰۲۶	۰/۷۷

A₀: جمله مستقل بیانگر میانگین نتایج آزمایشات؛ A₁ و A₂: نماینده ضریب خطی و بیانگر تاثیرگذاری هر یک از پارامترها؛ A₁₁: ضریب رگرسیون و بیانگر اندرکنش بین متغیرها؛ A₁₂ و A₂₂: نشان‌دهنده ضرایب رگرسیون درجه دوم

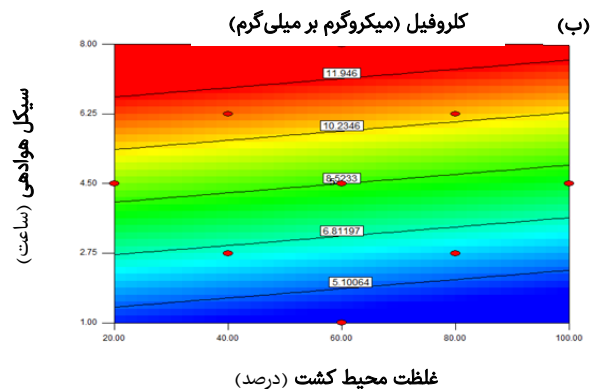
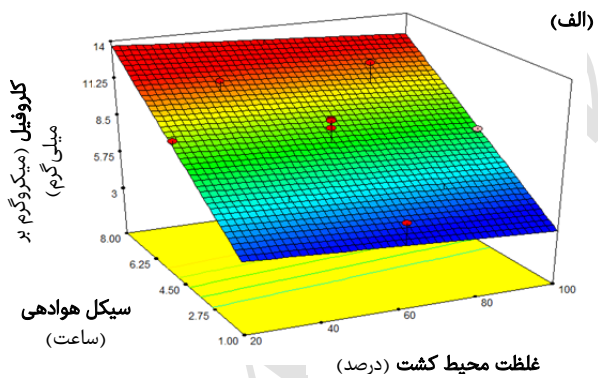


شکل ۲) تاثیر فاکتورهای سیکل و شدت تابش بر نرخ رشد مخصوص در جلبک اسپیرولینا: الف) در نمای سه‌بعدی؛ ب) در نمای کانتور

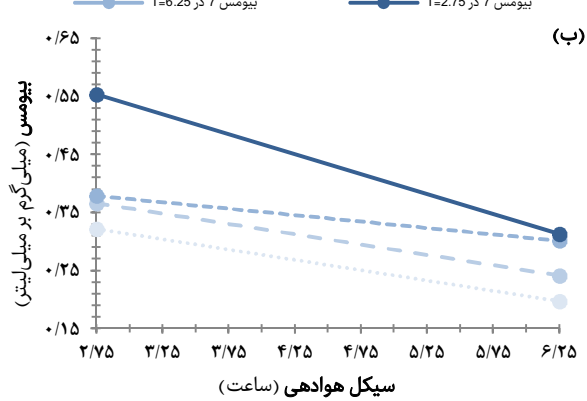
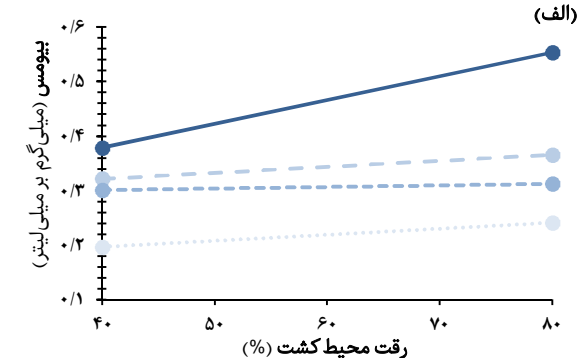
شکل ۱) تاثیر فاکتورهای سیکل هوادهی و رقت زاروک بر میزان وزن خشک روز در جلبک اسپیرولینا: الف) در روز پنجم، ب) در روز هفتم



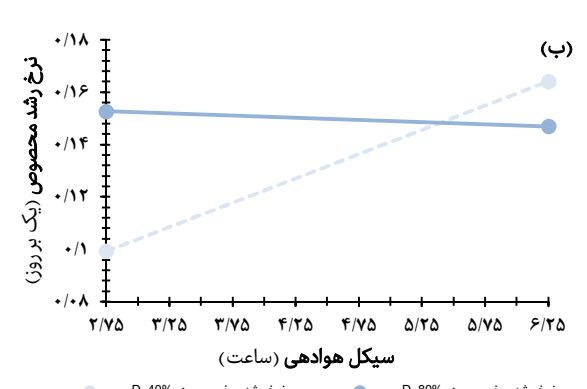
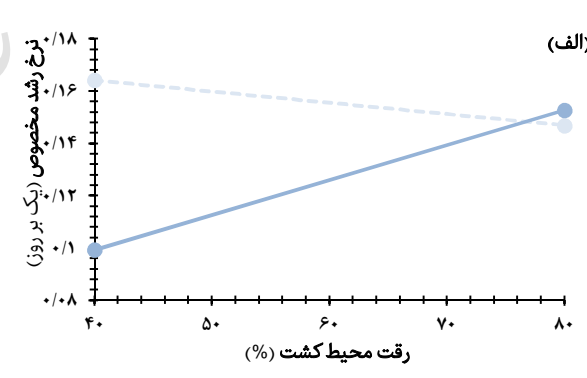
نمودار ۳ تاثیر اندرکنش فاکتورهای رقت محیط کشت و سیکل هوادهی بر محتوای کلروفیل و کاروتنوئید در جلبک اسپیرولینا: الف) تاثیر اندرکنش رقت محیط کشت بر محتوای کلروفیل و کاروتنوئید، ب) تاثیر اندرکنش سیکل هوادهی بر محتوای کلروفیل یا کاروتنوئید



شکل ۳ تاثیر فاکتورهای سیکل هوادهی و غلظت محیط کشت بر محتوای کلروفیل (میکروگرم بر میلی‌گرم) در جلبک اسپیرولینا: الف) در نمای سه‌بعدی، ب) در نمای کانتور



نمودار ۱ تاثیر اندرکنش رقت و سیکل هوادهی بر مقدار بیومس روزهای پنجم و هفتم در جلبک اسپیرولینا: الف) تاثیر اندرکنش رقت محیط کشت (درصد)

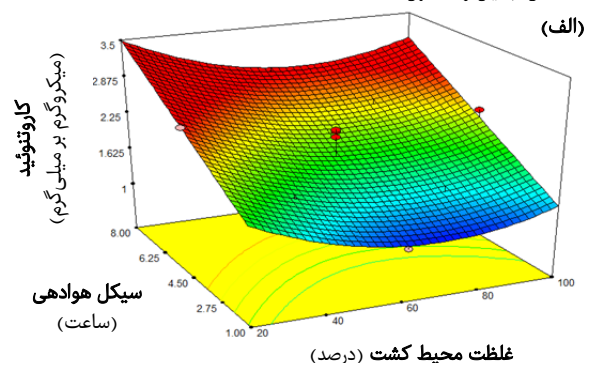


نمودار ۲ تاثیر اندرکنش رقت محیط کشت و سیکل هوادهی بر نرخ رشد مخصوص در جلبک اسپیرولینا: الف) تاثیر اندرکنش رقت محیط کشت (درصد)، ب) تاثیر اندرکنش سیکل هوادهی (ساعت)

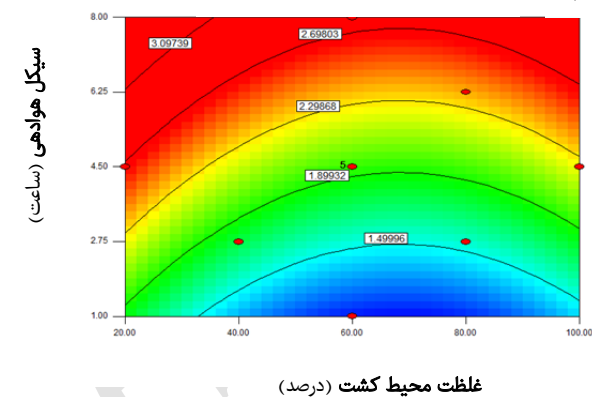
می‌دهد که در کنار ماهیت سایه‌پسند جلبک‌های سبز آبی [28] می‌تواند به اثر بازدارندگی نوری منتج شود که در مطالعات مشابه نیز گزارش شده است [29]. این تاثیر به صورت افت فعالیت فتوسنتزی است که به وسیله چگالی شار الکترونی اضافی در سلول (که نمی‌تواند در سیکل کلوبین مصرف شود) تحریک و منجر به تشکیل پراکسید هیدروژن می‌شود که برای سلول بسیار مضر است [30]. هر چند به دلیل تغییر شرایط نوری و تلقیح، امکان مقایسه عددی دو پژوهش وجود نداشت، اما با توجه به عدم تاثیر سیکل هوادهی در غلظت‌های پایین و تاثیرگذاری بیشتر آن در روزهای نخست کشت (بیومس روز پنجم و عدم محدودیت غذایی) یا غلظت‌های بالای محیط کشت می‌توان گفت در اینجا میزان هوادهی (و نورسانی ناشی از آن) بیش از حد لازم بود و به همین دلیل سیکل‌های کوچک‌تر که به معنی قطع متناوب هوادهی است، فرصت تغذیه بیشتری برای سلول‌ها فراهم آورد و در شرایطی که محدودیت غذایی وجود نداشت، منجر به افزایش بیومس شد. هر چند پژوهش‌های انجام‌شده روی این فاکتور محدود است و لازم است محدوده تغییرات و به‌ویژه اندرکنش آن با شدت و سیکل تابش مورد بررسی بیشتری قرار گیرد.

با مقایسه چگونگی تغییرات نرخ رشد مخصوص با وزن خشک روز هفتم نکات مهمی قابل تفسیر است. نخست آن که به واسطه کاهش مواد مغذی در غلظت‌های پایین محیط کشت، بیومس روز هفتم کاهش یافت و لذا نرخ رشد مخصوص در غلظت‌های کم و سیکل‌های کوچک هوادهی افت چشمگیری داشت که با میزان در دسترس بودن مواد مغذی قابل تفسیر است. دوم آنکه در سیکل‌های بزرگ و غلظت‌های پایین محیط کشت که افت بیومس وجود داشت، نرخ رشد مخصوص افزایش زیادی نشان داد. این مطلب در مطالعات *رادمان* و همکاران [31] نیز در کشت ناپیوسته تکرار شونده اسپیرولینا ذکر شده و بیشترین نرخ رشد مخصوص در غلظت‌های کمتر بیومس و نیز در غلظت ۲۰٪ محیط کشت زاروک گزارش شده است. همچنین محققان دیگری نیز به ایجاد اثر سایه در غلظت‌های بالای بیومس، محدودیت نوری و کاهش نرخ رشد مخصوص اشاره کرده‌اند [32]، به نحوی که *کیانگ* و همکاران [33] معتقد بوده‌اند در صورتی که سایر شرایط کشت، ایده‌آل باشد، مقادیر بالای نرخ رشد مخصوص در سیستم‌هایی با غلظت‌های پایین بیومس مورد انتظار بوده است. اما آنچه در این پژوهش حاصل شد، افزایش نسبی نرخ رشد در سیکل‌های کوچک هوادهی و غلظت‌های بالای محیط کشت بود. به نظر می‌رسد با کاهش سیکل هوادهی و انجام متناوب آن می‌توان بر مشکل اثر سایه و کاهش نرخ رشد ناشی از آن غلبه کرد و به‌طور همزمان به بیومس و نرخ رشد مخصوص بالا دست یافت.

در پژوهش حاضر روند کاهش بیومس در اثر افزایش سیکل از نمودار ۱- الف مشهود بود. این مطلب را می‌توان ناشی از احتمال وقوع شرایط بی‌هوازی در زمان تنفس سلول‌ها دانست که به دلیل قطع طولانی‌مدت هوادهی و کمبود اکسیژن در سیکل‌های بزرگ محتمل است و در مطالعه *یوستانس* و همکاران [20] نیز اشاره شده است. براساس نمودار ۱- ب میزان افزایش در سیکل‌های کوچک به مراتب بیشتر بود و در سیکل‌های بزرگ، افزایش غلظت محیط کشت تاثیر چندانی بر بیومس نداشت. وجود مواد مغذی بیش از حد مورد نیاز در محیط‌های کشت و وابستگی آن به نحوه کشت در برخی پژوهش‌ها گزارش شده است. مثلاً در پژوهشی میزان غلظت ۲۵ گرم بر لیتر نیترا را برای کشت دونالیلا مناسب دانسته‌اند که کمتر از ۱۵٪ مقدار موجود در محیط کشت زاروک بوده است [34] و



(ب) کاروتنوئید (میکروگرم بر میلی‌گرم)



شکل ۴ تاثیر فاکتورهای سیکل هوادهی و غلظت محیط کشت بر محتوای کاروتنوئید (میکروگرم بر میلی‌گرم) در جلبک اسپیرولینا؛ (الف) در نمای سه‌بعدی، (ب) در نمای کنتور

بحث

پژوهش حاضر با هدف بهینه‌سازی رشد و کیفیت بیومس ریزجلبک اسپیرولینا با تغییر رقت محیط کشت و استفاده از سیکل هوادهی انجام شد. با افزایش غلظت محیط کشت، میزان وزن خشک در روز پنجم و هفتم افزایش داشت و این مطلب به سبب عدم محدودیت مواد مغذی در دسترس ریزجلبک و در راستای پژوهش‌های مرتبط بود [26, 27]. تاثیر سیکل هوادهی بر میزان وزن خشک منفی بود و به‌طور کلی کاهش سیکل موجب افزایش بیومس شد، اما میزان این تاثیر در روز پنجم به مراتب بیشتر بود، به نحوی که در غلظت‌های پایین، کاهش سیکل تاثیری بر بیومس روز هفتم نداشت. در نگاه اول به نظر می‌رسد اثرگذاری سیکل هوادهی در مقایسه با پژوهش *قبادیان* و همکاران [27] روندی معکوس داشت، زیرا در آنجا با افزایش سیکل هوادهی ابتدا کاهش بیومس و سپس افزایش زیاد آن مشاهده شد. اما یادآوری این نکته ضروری است که در پژوهش حاضر ضمن افزایش شدت نور نسبت به پژوهش قبلی [27] (شدت تابش ثابت ۶۰ میکرومولار بر متر مربع بر ثانیه در مقابل ۲۸ میکرومولار بر متر مربع بر ثانیه)، کل تیمارها تحت تناوب ۱۶ ساعت هوادهی و ۸ ساعت خاموشی قرار داشتند که نسبت به پژوهش مذکور، میزان هوادهی ۸ ساعت بیشتر شده بود. در واقع در این آزمایشات حداکثر زمان سکون ممتد برابر ۸ ساعت بود و در ازای آن ۱۶ ساعت هم هوادهی ممتد انجام شد (آزمایش شماره ۴). یعنی در بزرگ‌ترین سیکل هوادهی، دو اثر متضاد وجود دارد: نخست آنکه به‌واسطه ۸ ساعت سکون امکان تغذیه بیشتر فراهم است، اما در مقابل به سبب ۱۶ ساعت هوادهی مداوم اختلاط کارآ مانع وقوع اثر سایه می‌شود و دسترسی بیشتری به نور روی

(*Dunaliella Salina*) [43] و هماتوکوکوس پلوویالیس [44] نیز اشاره شده است. در شکل ۴، به نظر می‌رسد در سیکل‌های بزرگ‌تر که ۸ ساعت عدم هوادهی روی می‌داد، ۱۶ ساعت هوادهی ممتد ادامه آن باعث افزایش بهره‌وری دریافت نور توسط سلول‌ها و افزایش تولید کاروتنوئید شد و در واقع این تداوم در دریافت نور باعث ازدیاد بهره‌وری و افزایش محتوای کاروتنوئید شد.

روند تغییرات برای غلظت‌ها و سیکل‌های مختلف و همچنین برای کلروفیل و کاروتنوئید ثابت بود. بررسی سه رژیم نوری ضعیف، متوسط و زیاد روی کشت سیانوباکتری میکروسیستیس آئروژینوزا (*Microcystis aeruginosa*) نیز بیانگر برتری همزمان محتوای کلروفیل و کاروتنوئید در شدت نور متوسط (۴۰ میکرومول بر متر مربع ثانیه) بوده است [39] که پژوهش حاضر از نظر مشابهت شرایط بهینه برای کلروفیل و کاروتنوئید با آن همخوانی داشت. در مطالعه انجام شده توسط ساه و همکاران [45] روی گونه *دونالیلا سالینا* با اعمال استرس‌های حذف عناصر مختلف مغذی در کنار افزایش شدت تابش و حذف نیتروژن، محتوای کلروفیل و کاروتنوئید بررسی شده است. میزان کلروفیل از همان روز اول اعمال استرس در تمامی سناریوها به‌طور تقریبی ۶۰٪ کاهش یافته و فقط در تیماری که شدت تابش نیز کم بوده، کلروفیل، کاهش کمتری داشته است (۲۰٪ کاهش). اما میزان کاروتنوئید مستقل از استرس‌ها تا روز دهم افزایش داشته و پس از آن تا روز ۱۷ام کاهش یافته است که نتایج این پژوهش به لحاظ اثر شدت تابش بر محتوای کلروفیل و کاروتنوئید با این یافته‌ها همخوانی داشت، اما آنچه در اینجا اهمیت می‌یابد، نقش کلیدی فاکتور سیکل هوادهی است. در اینجا در بزرگ‌ترین سیکل هوادهی طی ۸ ساعت قطع هوادهی، فرصت نشست و ایجاد اثر سایه بر سلول‌ها داده شد و محتوای کلروفیل افزایش یافت و در ادامه با ۱۶ ساعت هوادهی ممتد، افزایش بهره‌وری نوری موجب افزایش محتوای کاروتنوئید شد. به نظر می‌رسد تداوم نوردهی فاکتور مهمی است و نوردهی ممتد و در مقابل قطع ممتد آن (که هر دو از طریق قطع و وصل هوادهی انجام می‌شود) می‌تواند به افزایش همزمان هر دو مقدار محتوای کلروفیل و کاروتنوئید کمک کند.

اهمیت انواع ریزجلبک‌ها برای تولید رنگدانه‌های مهم کلروفیل و کاروتنوئید در کنار سایر کاربری‌های اسپیرولینا نظیر تولید سوخت زیستی، صنایع آرایشی و بهداشتی، تصفیه پساب و تثبیت CO₂ بر ضرورت افزایش بهره‌وری و کشت اقتصادی دلالت دارد.

نتایج این پژوهش حاکی از آن بود که بین فاکتورهای موثر بر رشد، تاثیر فاکتور در نظر گرفته نشده سیکل هوادهی در کنار غلظت محیط کشت بر خواص کمی و کیفی دارای اهمیت زیادی بوده و امکان بهره‌گیری از آن برای ارتقای کمی و کیفی بیومس تولیدی فراهم است. به‌عنوان نمونه می‌توان با کشت تغذیه منقطع (Fed batch)، در یک فاز با بهره‌گیری از سیکل‌های بزرگ هوادهی در کنار غلظت‌های پایین، ضمن صرفه‌جویی در مصرف مواد به نرخ رشد مخصوص بالایی دست یافت و در عین حال محتوای کلروفیل و کاروتنوئید را به‌طور همزمان افزایش داد و سپس در فاز دوم با بهره‌مندی از غلظت‌های بالای محیط کشت همراه سیکل‌های کوچک هوادهی موجب افزایش فزاینده بیومس شد. براساس این پژوهش فاکتور سیکل هوادهی که پیش از این کمتر مورد توجه پژوهشگران قرار گرفته بود، دارای اثرات مثبت و قابل به‌کارگیری در طراحی روش‌های کشت کم‌هزینه ریزجلبکی است، هر چند لازم است به اندرکنش آن با سایر فاکتورها و به‌ویژه شدت و سیکل تابش بیشتر پرداخته شود. براساس امکان بهره‌گیری از فاکتور

در پژوهشی دیگر اعلام کرده‌اند که میزان مواد مغذی زاروک برای کشت ناپیوسته تکرارشونده گونه تتراسلوس (*Tetraselus*) زیاد و نامناسب بوده است و باعث کاهش بهره‌وری و بازدارندگی فعالیت آنزیم‌های مرتبط با فتوسنتز می‌شود [35]. همین اثر وفور نیتروژن (N) در مصرف انرژی بیشتر برای جذب و کاهش نیترات و کاهش بهره‌وری فتوسنتزی ناشی از آن در مطالعه اسمیت و همکاران [36] روی گونه *اسکلتنوما کاستانوم* (*Skeletonema costanum*) نیز اشاره شده است. براساس نمودار ۲-ب افزایش سیکل در رقت‌های پایین منجر به افزایش نرخ رشد مخصوص شد که با احتمال تنفس بی‌هوازی در کنار کاهش مواد مغذی سازگار بود [20]، اما در رقت‌های بالا روند برعکس شد و کمی کاهش نرخ رشد مخصوص در اثر افزایش سیکل حاصل شد. لذا به نظر می‌رسد اندرکنش این دو فاکتور باید به دقت بررسی و به‌طور مناسب برای هر الگوریتم کشت استفاده شود. مثلاً با استفاده از یافته‌های این پژوهش می‌توان سیکل دومرحله‌ای برای کشت توصیه کرد که در یک فاز با بهره‌گیری از سیکل‌های بزرگ هوادهی در کنار غلظت‌های پایین، ضمن صرفه‌جویی در مصرف مواد به نرخ رشد مخصوص بالایی دست یافت و سپس در فاز بعدی با بهره‌مندی از غلظت‌های بالای محیط کشت همراه سیکل‌های کوچک هوادهی موجب افزایش فزاینده بیومس شد. مشابه این پیشنهاد (بدون منظورکردن سیکل هوادهی) برای کشت ناپیوسته تکرارشونده اسپیرولینا در مطالعه رادمان و همکاران [31] و با جایگزینی حجم معلومی از کشت در زمان مشخص و توسط غلظت معینی از زاروک انجام شده است.

براساس یافته‌ها میزان کلروفیل با افزایش سیکل و کاهش غلظت محیط کشت زیاد شد، اما میزان تاثیر غلظت محیط کشت روی آن بسیار محدودتر بود. در پژوهش قبادیان و همکاران [27] بیشینه کلروفیل در مقادیر میانی رقت و در سیکل هوادهی ۷ ساعته مشاهده شده است که با نتایج این پژوهش سازگار بود. هر چند اثر محیط کشت و به‌ویژه نوع و میزان نیتروژن بر محتوای کلروفیل گزارش شده است [15] اما در همان مطالعات نیز بیشینه کلروفیل در مقادیر میانی دو فاکتور غلظت آمونیوم کلراید (NH₄Cl) و پتاسیم نیترات (KNO₃) ایجاد شده و نویسنده به لزوم بررسی سایر فاکتورها نظیر شدت تابش و غلظت سلولی اشاره داشته است. لذا به نظر می‌رسد در شرایط نوری این پژوهش، میزان مواد مغذی و به‌ویژه نیتروژن در محیط کشت برای تشکیل کلروفیل در غلظت ۲۰٪ کافی بود و افزایش غلظت محیط کشت تاثیری بر افزایش محتوای کلروفیل نداشت. اما افزایش سیکل و ایجاد اثر سایه به‌واسطه نشست جلبک‌ها موجب افزایش محتوای کلروفیل شد و در سیکل‌های کوچک‌تر به‌واسطه دریافت نور دائمی‌تر، فرصت افزایش محتوای کلروفیل پیدا نشد. اثر سایه در افزایش بیوسنتز کلروفیل برای افزایش بهره‌وری، جذب فوتون و جبران کاهش نور در بسیاری از مطالعات اشاره شده است [37]. روند عکس محتوای کلروفیل با شدت تابش [38] و ایجاد بیشترین بهره‌وری کلروفیل در مقادیر میانی [39] نیز پیش از این گزارش شده است.

مطالعات انجام شده در مورد کاروتنوئید محدودتر بوده است. هارکر و همکاران [40] به تحریک تولید آن در گونه هماتوکوکوس پلوویالیس (*Haematococcus pluvialis*) با استفاده از سدیم کلراید (NaCl) پرداخته‌اند و علی‌رغم تاثیر مثبت، معتقد بوده‌اند که میزان نیاز بالای تابش برای فرآیند بیوسنتز کاروتنوئید مانع بهره‌وری مناسب است. این نیاز به تابش بالا که در یک مطالعه [41] و همچنین در بسیاری از مطالعات دیگر روی گونه‌های *دونالیلا باردویل* (*Dunaliella Bardawil*) [42]، *دونالیلا سالینا*

- Bioresour Technol. 2003;89(2):171-6.
- 6- Ciferri O. Spirulina, the edible microorganism. Microbiol Rev. 1983;47(4):551-78
- 7- Klejduš B, Kopecký J, Benesová L, Vacek J. Solid-phase/supercritical-fluid extraction for liquid chromatography of phenolic compounds in freshwater microalgae and selected cyanobacterial species. J Chromatogr A. 2009;1216(5):763-71.
- 8- Belay A. The potential application of Spirulina (Arthrospira) as a nutritional and therapeutic supplement in health management. J Am Nutraceutical Assoc. 2002;5(2):27-48.
- 9- Pangestuti R, Kim SK. Biological activities and health benefit effects of natural pigments derived from marine algae. J Funct Foods. 2011;3(4):255-66.
- 10- Sarumathi A, Sethupathy S, Saravanan N. The protective efficacy of Spirulina against bacterial endotoxin potentiated alcoholic liver disease. J Funct Foods. 2014;9:254-63.
- 11- Lin CC, Wei CH, Chen CI, Shieh CJ, Liu YC. Characteristics of the photosynthesis microbial fuel cell with a Spirulina platensis biofilm. Bioresour Technol. 2013;135:640-3.
- 12- Sirisha Parimi N, Singh M, Kastner JR, Das KC. Biomethane and biocrude oil production from protein extracted residual Spirulina platensis. Energy. 2015;93(Part 1):697-704.
- 13- Wuang SC, Khin MC, Chua PQD, Luo YD. Use of Spirulina biomass produced from treatment of aquaculture wastewater as agricultural fertilizers. Algal Res. 2016;15:59-64.
- 14- Moraes L, Da Rosa GM, Cardias BB, Dos Santos LO, Costa JAV. Microalgal biotechnology for greenhouse gas control: Carbon dioxide fixation by Spirulina sp. at different diffusers. Ecol Eng. 2016;91:426-31.
- 15- Rodrigues MS, Ferreira LS, Converti A, Sato S, Carvalho JCM. Fed-batch cultivation of Arthrospira (Spirulina) platensis: Potassium nitrate and ammonium chloride as simultaneous nitrogen sources. Bioresour Technol. 2010;101(12):4491-8.
- 16- Carvalho JCM, Francisco FR, Almeida KA, Sato S, Converti A. Cultivation of Arthrospira (Spirulina) platensis (Cyanophyceae) by fed-batch addition of ammonium chloride at exponentially increasing feeding rates. J Phycol. 2004;40(3):589-97.
- 17- Ogbonda KH, Aminigo RE, Abu GO. Influence of temperature and pH on biomass production and protein biosynthesis in a putative Spirulina sp. Bioresour Technol. 2007;98(11):2207-11.
- 18- Vonshak A, Tomaselli L. Arthrospira (Spirulina): Systematics and ecophysiology biochemistry. In: Vonshak A, editor. Spirulina platensis (Arthrospira): Physiology, cell-biology and biotechnology. Abingdon: Taylor & Francis; 2004.
- 19- De Moraes MG, Costa JA. Biofixation of carbon dioxide by Spirulina sp. and Scenedesmus obliquus cultivated in a three-stage serial tubular photobioreactor. J Biotechnol. 2007;129(3):439-45.
- 20- Eustance E, Wray JT, Badvipour Sh, Sommerfeld MR. The effects of limiting nighttime aeration on productivity and lipid accumulation in Scenedesmus dimorphous. Algal Res. 2015;10:33-40.
- 21- Atteia A, Van Lis R, Tielens AG, Martin WF. Anaerobic energy metabolism in unicellular photosynthetic eukaryotes. Biochim Biophys Acta. 2013;1827(2):210-23.
- 22- Costa JAV, Cozza KL, Oliveira L, Magagnin G. Different

سیکل هوادهی برای افزایش همزمان محتوای کلروفیل و کاروتنوئید و نیز برای طراحی کشت‌های دومرحله‌ای به‌منظور افزایش بهره‌وری، کاهش غلظت محیط و هزینه‌های کشت میسر است.

از محدودیت‌های پژوهش حاضر می‌توان به عدم امکان ثبت آن‌لاین داده‌ها اشاره کرد تا از این طریق با ارزیابی پارامتر زمان، بهینه‌سازی این فاکتور صورت گیرد. همچنین با توجه به کاربری‌های متعدد ریزجلبک اسپیرولینا، در صورت امکان اندازه‌گیری (مالی و تجهیزاتی) سایر پاسخ‌ها مانند میزان انواع پروتئین‌ها، فرآیند بهینه‌سازی معطوف به کاربری خاص قابل انجام بود. همچنین به‌دلیل یکتا بودن شرایط کشت و نیز اندرکنش موثر فاکتورها، لازم است پیش از تعمیم نتایج به سایر شرایط محیطی و کشت‌های مشابه بررسی‌های لازم صورت پذیرد.

نتیجه‌گیری

بهینه‌سازی رشد و کیفیت بیومس ریزجلبک اسپیرولینا با تغییر رقت محیط کشت و استفاده از سیکل هوادهی قابل انجام است.

تشکر و قدردانی: این پژوهش با حمایت مالی صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور وابسته به معاونت علمی و فناوری ریاست جمهوری انجام شده است که بدین وسیله مراتب سپاس از این حمایت اعلام می‌شود.

تابیدیه اخلاقی: موردی بیان نشده است.

تعارض منافع: تعارض منافی وجود ندارد.

سهم نویسندگان: ساسان قبادیان (نویسنده اول)، نگارنده مقدمه/روش‌شناسی/پژوهشگر اصلی/تحلیلگر آماری/نگارنده بحث (۲۵٪): حسین گنجی‌دوست (نویسنده دوم)، روش‌شناسی/پژوهشگر اصلی/نگارنده بحث (۲۵٪): بیتا آیتی (نویسنده سوم)، نگارنده مقدمه/روش‌شناسی/پژوهشگر اصلی/نگارنده بحث (۲۵٪): ندا سلطانی (نویسنده چهارم)، نگارنده مقدمه/پژوهشگر اصلی/نگارنده بحث (۲۵٪)

منابع مالی: این پژوهش با حمایت مالی صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور وابسته به معاونت علمی و فناوری ریاست جمهوری انجام شده است.

منابع

- 1- Brennan L, Owende P. Biofuels from microalga - a review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. Renew Sustain Energy Rev. 2010;14(2):557-77.
- 2- Dos Santos RR, Araújo OQF, De Medeiros JL, Chaloub RM. Cultivation of Spirulina maxima in medium supplemented with sugarcane vinasse. Bioresour Technol. 2016;204:38-48.
- 3- Giordano M, Palmucci M, Norici A. Taxonomy and growth conditions concur to determine the energetic suitability of algal fatty acid complements. J Appl Phycol. 2015;27(4):1401-13.
- 4- De Queiroz Fernandes Araújo O, De Medeiros JL, Yokoyama L, Do Rosário Vaz Morgado C. Metrics for sustainability analysis of post-combustion abatement of CO₂ emissions: Microalgae mediated routes and CCS (carbon capture and storage). Energy. 2015;92(Part 3):556-68.
- 5- Li ZY, Guo SY, Li L. Bioeffects of selenite on the growth of Spirulina platensis and its biotransformation.

- tools to modify productivity and biochemical composition of cyclostat cultures of the marine microalga *Dunaliella tertiolecta*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 1995;44(3-4):287-92.
- 35- Fábregas J, Patiño M, Vecino E, Cházaro F, Otero A. Productivity and biochemical composition of cyclostat cultures of the marine microalga *Tetraselmis suecica*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 1995;43(4):617-21.
- 36- Jason Smith G, Zimmerman RC, Alberte RS. Molecular and physiological responses of diatoms to variable levels of irradiance and nitrogen availability: Growth of *Skeletonema costatum* in simulated upwelling conditions. *Limnol Oceanogr*. 1992;37(5):989-1007.
- 37- Matsudo MC, Bezerra RP, Sato S, Perego P, Converti A, Carvalho JCM. Repeated fed-batch cultivation of *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis* using urea as nitrogen source. *Biochem Eng J*. 2009;43(1):52-7.
- 38- Rangel-Yagui Cde O, Danesi ED, De Carvalho JC, Sato S. Chlorophyll production from *Spirulina platensis*: Cultivation with urea addition by fed-batch process. *Bioresour Technol*. 2004;92(2):133-41.
- 39- Walsh K, Jones GJ, Hugh Dunstan R. Effect of irradiance on fatty acid, carotenoid, total protein composition and growth of *Microcystis aeruginosa*. *Phytochemistry*. 1997;44(5):817-24.
- 40- Harker M, Tsavalos AJ, Young AJ. Autotrophic growth and carotenoid production of *Haematococcus pluvialis* in a 30 liter air-lift photobioreactor. *J Ferment Bioeng*. 1996;82(2):113-8.
- 41- Harker M, Tsavalos AJ, Young AJ. Use of response surface methodology to optimise carotenogenesis in the microalga, *Haematococcus pluvialis*. *J Appl Phycol*. 1995;7(4):399-406.
- 42- Ben-Amotz A, Avron M. On the factors which determine massive beta-carotene accumulation in the halotolerant alga *Dunaliella bardawil*. *Plant Physiol*. 1983;72(3):593-7.
- 43- Gómez PI, González MA. The effect of temperature and irradiance on the growth and carotenogenic capacity of seven strains of *Dunaliella salina* (Chlorophyta) cultivated under laboratory conditions. *Biol Res*. 2005;38(2-3):151-62.
- 44- Saha SK, McHugh E, Hayes J, Moane S, Walsh D, Murray P. Effect of various stress-regulatory factors on biomass and lipid production in microalga *Haematococcus pluvialis*. *Bioresour Technol*. 2013;128:118-24.
- 45- Saha SK, Moane S, Murray P. Effect of macro- and micro-nutrient limitation on superoxide dismutase activities and carotenoid levels in microalga *Dunaliella salina* CCAP 19/18. *Bioresour Technol*. 2013;147:23-8.
- nitrogen sources and growth responses of *Spirulina platensis* in microenvironments. *World J Microbiol Biotechnol*. 2001;17(5):439-42.
- 23- Andersen RA, Phycological Society of America, editors. *Algal culturing techniques*. Cambridge: Academic press; 2005.
- 24- Marker AFH. The use of acetone and methanol in the estimation of chlorophyll in the presence of phaeophytin. *Freshw Biolo*. 1972;2(4):361-85.
- 25- Chamovitz D, Sandmann G, Hirschberg J. Molecular and biochemical characterization of herbicide-resistant mutants of cyanobacteria reveals that phytoene desaturation is a rate-limiting step in carotenoid biosynthesis. *J Biol Chem*. 1993;268(23):17348-53.
- 26- Davis TW, Berry DL, Boyer GL, Gobler CJ. The effects of temperature and nutrient on the growth and dynamics of toxic and non-toxic strains of *Microcystis* during cyanobacteria bloom. *Harmful Algae*. 2009;8(5):715-25.
- 27- Ghobadian S, Ganjidoost H, Ayati B, Soltani N. Evaluation of the effects of aeration cycle and culture medium concentration on biomass qualitative and quantitative indices in microalga *Spirulina* as candidate for wastewater treatment. *J Aquat Ecol*. 2015;5(2):87-99. [Persian]
- 28- Soltani N, Khavari Nejad RA, Tabatabaei Yazdi M, Shokravi Sh, Fernández-Valiente E. Variation of nitrogenase activity photosynthesis and pigmentation of the cyanobacterium *Fischerella ambigua* strain FS18 under different irradiance and pH values. *World J Microbiol Biotechnol*. 2006;22:571.
- 29- Ajayan KV, Selvaraju M. Reflector based chlorophyll production by *Spirulina platensis* through energy save mode. *Bioresour Technol*. 2011;102(16):7591-4.
- 30- Chojnacka K, Noworyta A. Evaluation of *Spirulina* sp. growth in photoautotrophic, heterotrophic and mixotrophic culture. *Enzyme Microb Technol*. 2004;34(5):461-5.
- 31- Radmann EM, Reinehr CO, Costa JAV. Optimization of the repeated batch cultivation of microalga *Spirulina platensis* in open raceway ponds. *Aquaculture*. 2007;265(1-4):118-26.
- 32- Gitelson A, Qiuang H, Richmond A. Photic volume in photobioreactors supporting ultrahigh population densities of the photoautotroph *Spirulina platensis*. *Appl Environ Microbiol*. 1996;62(5):1570-3.
- 33- Qiang H, Guterman H, Richmond A. Physiological characteristics of *Spirulina platensis* (cyanobacteria) cultured at ultrahigh cell densities. *J Phycol*. 1996;32(6):1066-73.
- 34- Fábregas J, Patiño M, Arredondo-Vega BO, Tobar JL, Otero A. Renewal rate and nutrient concentration as