تحقیقات سامانه‌ها و مکانیزاسیون کشاورزی/جلد ۲۱/ شماره ۷۶/زمستان ۱۳۹۹/ص ۱۱۶-۹۹
https://www.amsr.areeo.ac.ir

مقاله پژوهشی

تاثیر محیط کشت، دما و pH بر عملکرد ریزجلبک اسپیرولینا پلاتنسیس در فتوبیوراکتور عمودی

محمدحسین افشاربخش[۱]، احمد محمدی[۲*]، حمید مشهدی[۳] و فهیمه محمودنیا[۴]

۱، ۲ و ۳- به ترتیب: دانشجوی دکتری؛ استادیار گروه مکانیزاسیون کشاورزی؛ و استادیار گروه مکانیک بیوسیستم، دانشکده کشاورزی واحد اراک، دانشگاه آزاد اسلامی، اراک، ایران

۴- استادیار گروه میکروبیولوژی، دانشگاه فرهنگیان (شهید بهشتی) قم، قم، ایران

تاریخ دریافت: ۹۹/۳/۲۹؛ تاریخ پذیرش: ۹۹/۸/۵

چکیده

این تحقیق به بررسی تاثیر دما، pH و نوع محیط کشت بر فاکتورهای موثر در تولید ریزجلبک اسپیرولینا پلاتنسیس پرداخته است. آزمایشی با استفاده از طرح فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در فتوبیوراکتور عمودی به اجرا درآمد. عامل اول یعنی محیط کشت ریزجلبک در سه سطح: محیط کشت والن، جردن و BBM، عامل دوم دما در دو سطح: ۲۵ و ۳۰ درجه سلسیوس و عامل سوم میزان اسیدیته در دو سطح: ۸±۰/۵ و ۱۰±۰/۵ بود. میزان شدت نور ۵۰۰۰ لوکس، مدت نوردهی ۱۴ ساعت و هوادهی از طریق پمپ هوا با اختلاط میزان دی‌اکسید کربن ۱۵ درصد برای هر ۳۶ نمونه به صورت یکسان اعمال گردید. پارامترهای اندازه‌گیری شامل: میزان تراکم سلولی، زیست‌توده، درصد چربی، میزان کلروفیل *a* و کارتنوئید است. نتایج بررسی‌ها نشان داد که فاکتورهای تراکم سلولی، میزان زیست‌توده، درصد لیپید، میزان کلروفیل *a* و کارتنوئید در بین محیط‌های کشت والن، جردن و BBM در سطح ۱ درصد و بین pH و دماهای انتخابی نیز تفاوت معنی-داری وجود دارد. نتایج مقایسهٔ میانگین داده‌ها نشان داد بیشترین میزان تراکم سلولی، میزان کلروفیل *a*، میزان کارتنوئید مربوط به تیمار M1T1P1 (محیط کشت والن با دمای ۵ و pH=۸±۰/۵) و کمترین میزان مربوط به تیمار M2T2P2 (محیط کشت BBM با دمای ۳۰ و pH= ۱۰±۰/۵) است. در خصوص زیست‌توده، بیشترین میزان در تیمار M3T1P1 (محیط کشت جردن با دمای ۲۵ و pH=۸±۰/۵) به دست آمد. تحقیق حاضر نشان داد از بین شرایط مختلف تولید، مناسب‌ترین آن برای تولید اسپیرولینا پلاتنسیس محیط کشت والن با دمای ۲۵ درجه سلسیوس با pH= ۸±۰/۵ است.

واژه‌های کلیدی

زیست توده، کلروفیل، کارتنوئید، لیپید، میکروجلبک

مقدمه

افزایش جهانی جمعیت از یک‌سو موجب افزایش نیاز به منابع انرژی و غذای جایگزین شده و از سوی دیگر مخاطرات زیست‌محیطی جدیدی مانند افزایش انتشار گازهای گلخانه‌ای و تولید آلودگی‌ها و فاضلاب‌های مختلف صنعتی را به همراه داشته است. در این راستا، کشت گونه‌های مختلف ریزجلبک یکی از روش‌های اکولوژیکی جدیدی است که برای تولید ترکیبات شیمیایی سودمند مانند رنگدانه‌ها، پروتئین‌ها، چربی‌ها، اسیدهای چرب چندگانه غیراشباع، کاروتنوئیدها، استروئیدها و ویتامین‌ها

* نگارنده مسئول: Email: a-mohamady@iau-arak.ac.ir
http://doi: 10.22092/erams.2020.343130.1358

استفاده شده است. تحقیقاتی نیز برای به‌کارگیری جلبک‌ها در تصفیه فاضلاب‌ها گزارش شده است (Pulz & Gross, 2004; Sajilata *et al*., 2008). ریزجلبک‌ها به علت دارا بودن ترکیبات زیست‌فعال منحصر به فرد، جزو غذاهای فراسودمند به شمار می‌آیند (Lubzens *et al*., 2003).

امروزه استفاده از ریزجلبک‌ها به عنوان منبع غذایی، دارویی، استفاده در مواد آرایشی و بهداشتی، تولید سوخت دیزل و سوخت جت نیز روز به روز در حال گسترش است (Assaf Sukenik, 1989). ریزجلبک‌ها به دلیل داشتن کلروفیل که آنها را قادر به فتوسنتز می‌کند مهم‌ترین تولیدکنندگان مواد آلی در محیط‌های آبی به شمار می‌آیند و به عنوان اولین حلقهٔ زنجیرهٔ غذایی در اکوسیستم‌های آبی محسوب می‌شوند (Barbosa, 2003). اسپیرولینا[1] یکی از نویدبخش‌ترین ریزجلبک‌هاست که از سوی سازمان بهداشت جهانی به عنوان برترین غذای روی زمین و همچنین بهترین راه‌حل برای فردا اعلام گردیده است (Gouveia *et al*., 2006). ترکیب پودرهای تجاری زیست‌توده اسپیرولینا عمدتا متشکل از ۶۰-۷۰ درصد پروتئین، ۲۰ درصد کربوهیدرات، ۵ درصد چربی، ۷ درصد مواد معدنی و ۳- ۶ درصد رطوبت است که باعث می‌شود به عنوان ماده غذایی کم‌کالری با میزان چربی کم و منبع خوب پروتئینی محسوب گردد (Anon, 2013)

از نظر میزان مواد معدنی اسپیرولینا، سطح آهن آن ۱۲ برابر بیشتر از هر ماده غذایی دیگر و همچنین غنی از منیزیم، پتاسیم و دیگر عناصر است (Puyfoulhoux *et al*., 2001). اسپیرولینا غنی‌ترین منبع ویتامین B12 (۱۱ میلی‌گرم در کیلوگرم) است و علاوه بر ویتامین B12 مخلوطی عالی از دیگر ویتامین‌ها مانند A،B1، B2، B6 و E است (Belay, 1997).

اسپیرولینا حاوی ۵-۷ درصد لیپید است که عمدتا از اسیدهای چرب ضروری مانند اسید لینولئیک (LA) و اسیدهای گاما لینولئیک (GLA) تشکیل شده است (Ötles & Pire, 2001). اسپیرولینا بتاکاروتن بالایی دارد، در حدود ۰/۱ درصد وزن خشک آن را بتاکاروتن تشکیل می‌دهد که ۲۰ برابر بیشتر از مقدار این ماده در هویج است (Belay, 1997).

کارتنوئیدها گروهی از رنگدانه‌ها هستند که علاوه بر نقشی که در تشکیل رنگدانه‌ها برعهده دارند خاصیت آنتی‌اکسیدانی نیز برای آنها گزارش شده است (Lee, 2008). کارتنوئیدها از رنگدانه‌های بسیار مهم طبیعی هستند که در گیاهان و جلبک‌ها تولید می‌شوند، در چربی انحلال‌پذیرند و نقش مهمی در فتوسنتز دارند (Del Campo *et al*., 2007). کارتنوئیدها در صنایع پزشکی و داروسازی کاربرد دارند و از رنگ زرد تا قرمز متغیر هستند (Saleh *et al*., 2011). این مواد علاوه بر فواید غذایی، به عنوان مکمل برای میگوی پرورشی استفادهٔ فراوانی دارد و مهم‌ترین اثر آن رنگدانه‌سازی است (Todd, 2000). به طور کلی، در پرورش ریزجلبک‌ها پنج مرحلهٔ رشد قابل تشخیص است (جدول ۱).

1- Spirulina Platensis

جدول ۱- مراحل مختلف رشد ریزجلبک

Table 1- Different stages of microalgae growth

مرحلهٔ رشد growing steps	زمان تقریبی* (روز) Time(day)	توضیحات Explain
سازگاری Adaptation	3	برای سازگارشدن با شرایط جدید، افزایش سلول‌ها کند پیش می‌رود Due to adaptation to new conditions, cell proliferation occurs slowly
رشد لگاریتمی Logarithmic growth	7	بعد از سازگاری با محیط جدید، جهشی قابل‌توجه در تکثیر به وجود می‌آید. After adapting to the new environment, there is a significant mutation in reproduction
شیب رشد کاهشی Decreasing growth slope	2	با محدود شدن شرایط محیطی مواد مغذی، تقسیم سلولی کاهش می‌یابد و سرعت افزایش تراکم نسبت به مرحلهٔ‌پیشین کمتر است. As environmental conditions and nutrients are restricted, cell division decreases and density increases at a slower rate than in the previous stage.
رشد ثابت Fix growing	5	در این مرحله، تقریباً تعداد سلول‌ها ثابت می‌ماند. میزان مرگ و زایش سلول‌ها مساوی است. At this stage, the number of cells is almost constant. The rate of cell death is equal to the rate of cell proliferation.
مرگ Death	10	به علت کاهش کیفیت آب و مواد مغذی، سلول‌ها به سرعت می‌میرند و تراکم سلول‌ها به‌شدت کاهش می‌یابد. Due to the decrease in water and nutrient quality, cells begin to die rapidly and cell density is greatly reduced.

*مدت‌زمان هر یک از فازها تابع شرایط محیطی، نوع مواد مغذی و مقدار مواد مغذی است و پارامترهایی مانند میزان غلظت نیترات، دما، شدت نور و اسیدیته می‌تواند مدت‌زمان فازهای مختلف را تغییر دهد.

The duration of each phase depends on the environmental conditions and the type and amount of nutrients. Parameters such as nitrate concentration, temperature and light intensity and acidity can change the duration of different phases.

بهترین زمان برای برداشت، مرحلهٔ سوم یعنی همان مرحلهٔ رشد با نسبت کاهنده[1] است زیرا در این مرحله هم ریزجلبک به اندازهٔ کافی زمان برای افزایش تراکم داشته و هم کیفیت ریزجلبک کاهش نیافته است. ذکر این نکته لازم است که نمودار رشد ریزجلبک شدیداً به نوع ریزجلبک، شرایط محیطی (شدت و دورهٔ نور، میزان مواد مغذی و به ویژه دما) و همچنین نوع ظرف کشت بستگی دارد. این شرایط مهم‌ترین پارامترها برای رشد جلبک‌ها هستند (Lavens & Sorgeloos, 1996). روش‌های مختلفی برای پرورش ریزجلبک وجود دارد که از مهم‌ترین آن می‌توان به استفاده از فتوبیوراکتورها[2] اشاره کرد. عوامل مختلفی در بهینه‌سازی عملکرد فتوبیوراکتور مؤثر هستند که رعایت کردن آنها می‌تواند بر میزان تولید تأثیر زیادی داشته باشد. این عوامل شامل نور، دما، محیط کشت، گردش آب، pH و دی‌اکسید کربن محلول هستند (Masoumi & Yavari, 2007).

مواد و روش‌ها

کشت اولیه

ابتدا ریزجلبک اسپیرولینا تهیه شده از مرکز تحقیقات شیلات شمال، در محیط کشت عمومی BBM[3] و در ظرف‌های شیشه‌ای یک لیتری از پیش استریل شده کشت داده شد. کلیهٔ مواد لازم برای

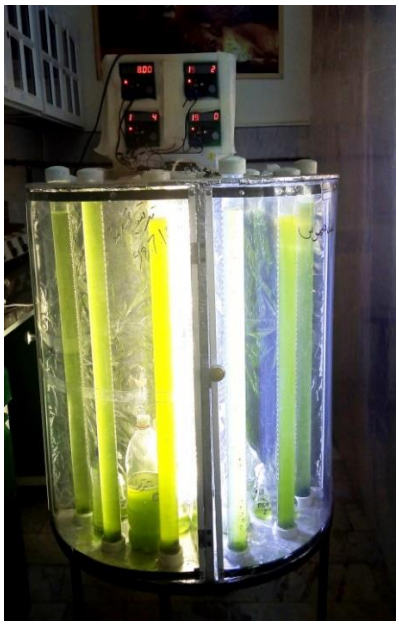
1- Phase of Declining Growth Rate

2- Photobioreactor

3- Bold's Busal Medium

تهیهٔ محیط کشت از محصولات شرکت مرک[1] استفاده گردید. ریزجلبک اسپیرولینا در دمای آب بین ۲۲ تا ۲۵ درجه سلسیوس در برابر تابش لامپ‌های فلورسنت با شدت ۳۰۰۰ لوکس قرار داده شد (Peck *et al.*, 2008). برای هوادهی از پمپ اکواریوم مدل آکوا[2] ۹۸۰۵ استفاده شد. پس از ۵ روز، ۱۰۰ سی‌سی از ریزجلبک با تراکم ۲×۱۰۴ در میلی‌لیتر به هر یک از محیط‌های آماده در فتوبیوراکتور منتقل گردید. حجم هر یک از محیط‌های فتوبیوراکتور ۸۰۰ سی‌سی است و برای هر دوره آزمایش با محیط مختلف از ریزجلبک کشت شده در آزمایشگاه به فتوبیوراکتور عمودی اضافه شد؛ این نوع فتوبیوراکتور تحقیقاتی با توجه به نوع تحقیق طراحی و ساخته شد. فتوبیوراکتور تحقیقاتی نیمه اتوماتیک است و اغلب شرایط محیطی به صورت اتوماتیک کنترل می‌گردد.

این فتوبیوراکتور از ۴ محیط جداگانه تشکیل شده است که تمام پارامترها از جمله میزان دما، شدت نور، مدت نوردهی و میزان هوادهی در هر یک از محیط‌ها قابل کنترل خواهد بود. با توجه به تحقیقاتی بودن فتوبیوراکتور، در هر یک از محیط‌ها از سه استوانهٔ شیشه‌ای استفاده شده که به عنوان تکرار هر یک از نمونه‌ها از آنها استفاده می‌شود. هوادهی از طریق سنگ‌های انتهایی استوانه‌هاست با استفاده از پمپ هوادهی با ترکیب مشخصی از دی‌اکسید کربن. آزمایش‌ها در آزمایشگاه تخصصی ریزجلبک دانشگاه آزاد اسلامی اراک اجرا شد.



شکل ۱- فتوبیوراکتور عمودی ساخته شده برای استفاده در آزمایش‌ها

Fig. 1- Vertical photobioreactor made to be used in the experiments

با توجه به محدودیت تعداد محیط‌های کشت (۱۲ عدد)، تحقیق در سه مرحلهٔ جداگانه دنبال شد. طرح آماری انتخابی با توجه به تعداد تیمارها و سطوح، فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی بود. فاکتورها و سطوح مربوط در جدول ۲ به صورت کامل آورده شده است.

1- Merck

2- AQUA

جدول ۲- مشخصات عوامل محیطی و متغیر های تحقیق

Table 2- Specifications of environmental factors and research variables

شمارهٔ دوره p. Num	محیط کشت Medium	ترکیب نیتراتی Nitratecomposition	طول دوره(روز) period(Day)	دما (سلسیوس) Tempareture		اسیدیته pH		مدت روشنایی ساعت time light	شدت نور LUX	CO_2 (%)	تکرار repetition
1	M_1	Walne	$NaNo_3$	15	T_1	25	P_1	8±0.5	14	5000	15	3
					T_2	30	P_2	10±0.5				
2	M_2	BBM	$NaNo_3$	15	T_1	25	P_1	8±0.5	14	5000	15	3
					T_2	30	P_2	10±0.5				
3	M_2	Jourdan	KNo_3	15	T_1	25	P_1	8±0.5	14	5000	15	3
					T_2	30	P_2	10±0.5				

با توجه به اینکه میزان pH با افزایش رشد ریزجلبک و مواد غذایی داخل محیط کشت و دی‌اکسید کربن وارد شده به محیط دچار تغییر می‌شود، سعی گردید که دامنهٔ این تغییر یک واحد بیشتر نباشد. با توجه به تأثیر میزان نیترات در رشد ریزجلبک‌ها، نوع ترکیبات نیترات در محیط کشت‌های انتخابی مشخص گردید.

نوع محیط کشت بر اساس عملکرد و میزان هزینه‌های ساخت آن انتخاب شد. با توجه به نوع ترکیبات و مواد به کار رفته در محیط کشت‌های انتخابی، میزان هزینهٔ ساخت محیط کشت‌ها متفاوت بود. بیشترین و کمترین هزینه به‌ترتیب مربوط به محیط کشت والن و BBM است.

نمونه‌برداری و بررسی نحوهٔ رشد

بعد از انتقال ریزجلبک به فتوبیوراکتور، نمونه‌برداری به صورت روزانه ادامه داشت و پارامترهای زیر در یک دوره ۱۵ روزه محاسبه، ثبت و بررسی شد.

شمارش سلولی

برای شمارش سلولی از لام نئوبار و روش پیشنهادی لاونس به طور روزانه استفاده شد (Lavens & Sorgeloos, 1996).

برای محاسبهٔ سرعت رشد[1] و تکثیر سلولی از رابطهٔ ۱ استفاده شد (Choonawala, 2007).

$$SGR= Ln (mt_2/mt_1)/t_2-t_1; \quad t_2>t_1 \qquad (1)$$

که در آن،

mt_1 = تعداد سلول در زمان صفر؛ mt_2 = تعداد سلول در زمان t؛ و t= زمان بر حسب روز.

اندازه‌گیری کارتنوئید و کلروفیل *a*

به منظور تعیین کارتنوئید و کلروفیل *a*، از هر نمونه به میزان مساوی ۵ سی‌سی نمونه برداشته و برای کاهش شوری به نمونه ما ۵ سی‌سی آب مقطر اضافه شد. پس از آن با دستگاه وکیوم و کاغذ صافی ۰/۴۵ میکرون نمونه ما فیلتر شد. کاغذ صافی‌های حاوی نمونه در لوله آزمایش قرار داده شد و ۱۰ سی‌سی استون ۰/۹ به هر یک از لوله ما اضافه گردید. لوله ما پس از پوشانیده شدن با پارا فیلم در محیطی کاملا تاریک و خنک به مدت ۲۴ ساعت نگهداری شد. نمونه ما با استفاده از دستگاه سانتریفیوژ با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانترفیوژ گردید. پس از آن با استفاده از دستگاه اسپکتوفتومتر مدل UV/Vis 2100 PC، میزان کلروفیل با استفاده از 9 طیف نوری با طول

1- Growth Rate (SGR)

موج‌های ۶۳۰، ۶۴۵، ۶۶۳ و ۷۵۰ و میزان کارتنوئید با استفاده از طیف نوری با طول موج ۴۵۰ طیف‌سنجی شد (Deres, 1998).

میزان زیست توده (وزن خشک)

نمونه‌های ۱۴ میلی‌لیتری از محیط پرورش به طور روزانه برداشت و سانتریفیوژ و پس از شسته شدن با آب مقطر، به مدت ۱۶ ساعت در دمای ۱۰۵ درجه سلسیوس قرار داده شدند (Ryckebosch *et al.*, 2012). میزان بازده دستگاه در حدود ۹۳ درصد بود که با محاسبهٔ اختلاف تراکم سلول‌های اندازه‌گیری شده با لام نئوبار قبل و بعد از سانتریفیوژ شدن به دست آمد.

استخراج لیپید

حجم نمونه‌ها در محیط‌های داخل فتوبیوراکتور به اندازه‌ای نبود که بتوان در مرحلهٔ استخراج لیپید استفاده کرد، از این رو نمونه‌ها در داخل آکواریوم با اعمال تمام شرایط مشابه با فتوبیوراکتور در حجم ۵۰ لیتر تولید و در پایان روز ۱۵ عملیات برداشت و خشک کردن اجراشد، ۲۰ گرم از هر نمونه زیست‌توده خشک شده، به آرامی با هاون یکنواخت گردید و استخراج لیپید از آن با دستگاه سوکسله مدل Soxtec2050 بدین روش دنبال شد: هر سیکل شامل جوشیدن 25 دقیقه، استخراج لیپید ۴۰ دقیقه و بازیابی حلال ۱۵ دقیقه است که استخراج تمامی نمونه‌ها به طور یکسان در پنج سیکل اجرا گردید. برای استخراج می‌توان از سه حلال متداول: دی‌اتیل اتر، ان هگزان و ان پنتان با دمای جوش متفاوت و درجهٔ خلوص بالا استفاده کرد که در این تحقیق از دی‌اتیل اتر استفاده گردید. برای حذف بقایای ریزجلبک، لیپید استخراج شده با فیلتر ۰/۴۵ میکرومتر جداسازی گردید (Converti *et al.*, 2009). میزان چربی بر حسب درصد از رابطهٔ ۲ به دست آمد.

(۲) درصد چربی = (وزن ظرف و چربی) - وزن ظرف / وزن نمونه) ×۱۰۰

آنالیز آماری

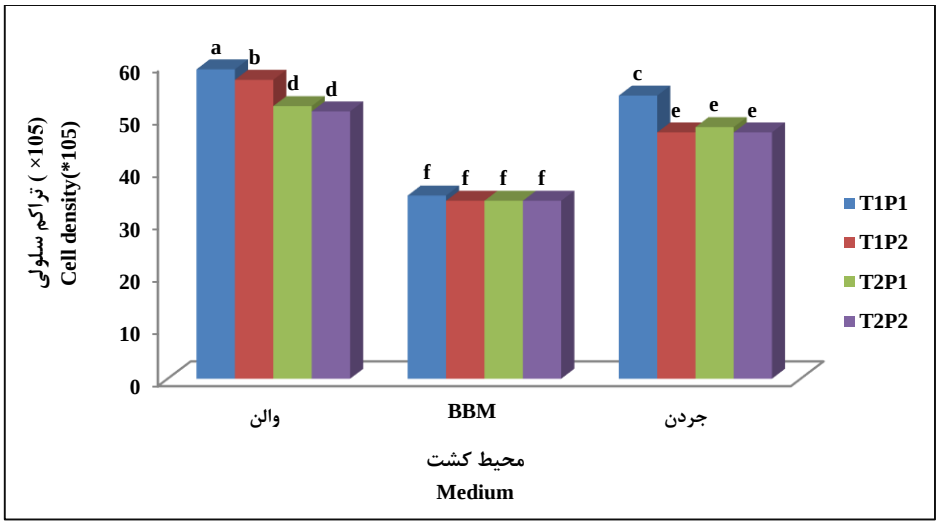
در این پژوهش، داده‌های به دست آمده از میزان تراکم سلولی، میزان کلروفیل *a*، میزان کارتنوئید، میزان زیست‌تودهٔ تولیدی و میزان لیپید تولیدی در تکرارهای مساوی به صورت مقادیر میانگین محاسبه و اطلاعات و داده‌های به دست آمده در نرم‌افزار Excel وارد و نتایج توصیفی به صورت نمودار تهیه شد. تحلیل آماری نتایج در برنامه SPSS21 و با به کارگیری شاخص آنالیز واریانس برای مقایسهٔ داده‌ها در سطح معنی‌داری ۱ درصد و ۵ درصد و برای بررسی اثر متقابل تیمارها از مقایسهٔ میانگین داده‌ها، از آزمون دانکن استفاده شد (Zar, 1984).

نتایج و بحث

رشد سلولی و میزان تراکم سلول

در مقایسهٔ رشد سلولی در محیط‌های کشت جردن، والن و BBM با تیمارهای مختلف دما و pH، نتایج به دست آمده نشان داد که در هر سه محیط کشت فاز اولیه رشد که همان فاز سازگاری‌است تا پایان روز سوم بدون تغییر ادامه داشت و تفاوت خاصی در تیمارهای مختلف مشاهده نشد. در فاز لگاریتمی بالاترین شیب رشد مربوط به محیط کشت والن و جردن و کمترین آن مربوط به محیط کشت BBM است (شکل ۲). این فاز در دو محیط کشت والن و جردن تا پایان روز سیزدهم و در محیط کشت BBM تا پایان روز یازدهم ادامه داشته است. در محیط کشت والن و جردن فاز سوم تا پایان روز چهاردهم طول کشیده بعد از آن وارد فاز کاهشی می‌شود. این تفاوت می‌تواند ناشی از ترکیبات موجود در محیط کشت و شرایط محیطی باشد. نتیجه به دست آمده

با یافته‌های تحقیق شارما و همکاران (Sharma *et al.*, 2014) همخوانی دارد که تغییر ترکیبات مهم درون جلبک را ناشی از تغییرات شرایط محیطی و نوع تغذیهٔ جلبک مانند نیتروژن، فسفر، میزان شوری، اسیدیته و دما می‌دانند. با توجه به اینکه از روز چهاردهم فاز کاهش رشد در هر دو محیط کشت شروع گردیده از این پس افزایش میزان هزینه‌های نگهداری روزانه نسبت به میزان تولید روزانه، افزایش میزان رسوب ریزجلبک به علت افزایش سایز و تشکیل و سرانجام افزایش مرگ و میر ریزجلبک‌ها باعث می‌شود تا بهترین زمان برداشت ریزجلبک در این محیط کشت‌ها پایان روز چهاردهم در نظر گرفته شود. در محیط کشت BBM، برداشت در پایان روز یازدهم توصیه می‌گردد. برای بررسی میزان تراکم سلولی در تیمارهای مختلف از داده‌های روز پانزدهم استفاده شد (شکل ۳).

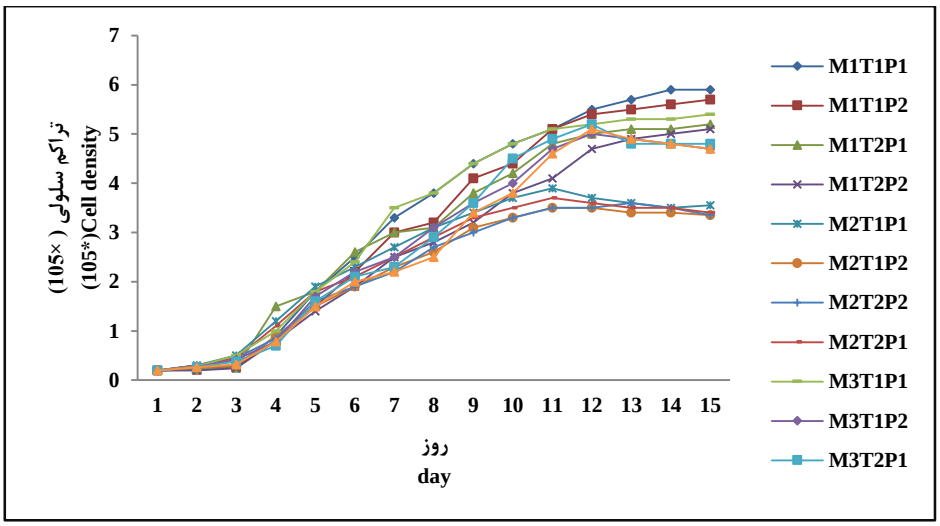


شکل ۲- تراکم سلولی تیمارهای مختلف

Fig. 2- Cell density of different treatments

ستون‌های دارای حروف یکسان در سطح احتمال ۵ درصد تفاوت معنی‌دار ندارند.

In each column, the figures with common letters have no statistically significant difference at the level of 5%.



شکل ۳- رشد سلولی تیمارهای مختلف طی ۱۵ روز

Fig. 3- Cell growth of different treatments during 15 days

نتایج آنالیز واریانس به دست آمده نشان می‌دهد که در بین محیط‌های کشت، pH انتخابی و دماهای تعیین شده در سطح یک درصد اختلاف معنی‌داری از نظر تأثیرگذاری بر میزان تراکم سلولی دارند. افزایش میزان نیتروژن باعث افزایش میزان رشد سلولی ریزجلبک می‌شود (Grobbelaar, 2004)، بررسی عناصر تشکیل‌دهندهٔ محیط‌های کشت این نظریه را تائید می‌کند. از سوی دیگر، زنجیرهٔ تولید در کشت جلبکی وابستگی مستقیم دارد به میزان ناخالص تثبیت کربن یا تولید اکسیژن و میزان این دو پارامتر نیز به دما و نور وابستگی شدید دارد. جاریان و همکاران (Jaryan *et al.*, 2019)در تحقیقات خود بهترین دما برای رشد سلولی اسپیرولینا را ۲۴ درجه سلسیوس به دست آوردند که با نتیجه این تحقیق همخوانی دارد. به‌عبارت دیگر نوع محیط کشت، دما و میزان pH بر میزان تراکم سلولی ریزجلبک اسپیرولینا تأثیر معنی‌دار دارد (جدول ۳). رفیعی و همکاران (Rafiei *et al.*, 2012) نیز بهترین دما را برای رشد ریزجلبک Sargassum boveanum، ۲۵ درجه سلسیوس اعلام کرده‌اند.

جدول ۳- تجزیهٔ واریانس تیمارها

Table 3- Analysis of variance of treatments

منابع تغییرات Sources	درجه آزادی (Degree of freedom)	تراکم سلولی Cell density	زیست توده biomass	کلروفیل a Chlorophyll	لیپید lipid	کارتنوئید Carotenoid µg/g
مدل اصلاح شده Corrected Model	21	11**	148608**	1237371**	809423**	785603**
عرض از مبدا Intercept	1	30566**	63840099**	216690499*	1112222491**	287867777*
محیط کشت Medium	2	66**	219224**	6770833**	264333**	2230577**
تکرار repetition	2	$3^{n.s}$	$3108^{n.s}$	$15833^{n.s}$	$40833^{n.s}$	$23811^{n.s}$
pH	1	46**	889877**	722500**	3062492**	1562499*❋
دما Temperature	1	38**	431211**	902499**	466944**	2969787*
اثر متقابل دما و pH Temp*pH	1	8*	16899**	266944**	6944*	6400**
اثر متقابل محیط کشت و دما Medium*Temp	2	0.005*	8002*	225833**	57777*	334211**
اثر متقابل دما ،محیط کشت و pH Temp*Med*pH	2	0.005*	2008*	36944*	21111**	92700*
اثر متقابل محیط کشت و pH Medium*pH	2	1*	64619*	47500*	729999*	155733*
خطا Error	14					
مجموع Sum	36					
Corrected Total	35					

ns، ❋ و ❋❋: به ترتیب غیر معنی‌دار، معنی‌دار در سطح یک و پنج درصد

ns, * and **: non significant and significant at the level of one and five percent, respectively

با توجه به اینکه دما و pH می‌توانند در میزان فعالیت و رشد سلول‌ها تأثیر گذارند و درصد جذب مواد غذایی را نیز تغییر دهند، اثر متقابل این پارامترها نیز بررسی شد. نتایج به دست آمده نشان می‌دهد که اثرهای متقابل این تیمارها نیز دارای اختلاف معنی‌دار هستند. نتایج مقایسهٔ میانگین تیمارها نشان می‌دهد در بین اکثر تیمارها اختلاف معنی‌داری وجود دارد (جدول ۴). همچنین، بیشترین میزان تراکم سلول مربوط به تیمار M1P1T1 و کمترین میزان مربوط به تیمار M2P2T2 است. این نتیجه با نتیجهٔ تحقیقات نیکولاس و بولد (Nicolas & Bold, 1965) که اپتیمم pH برای رشد ریزجلبک را ۷/۶ اعلام کرده نزدیک است (شکل ۳). افزایش هماهنگ رشد و تکثیر سلولی با مقادیر زیست توده در بیشتر موارد مشاهده شده است. تقسیمات سلولی، مخصوصاً در مرحلهٔ رشد لگاریتمی، اگر خیلی سریع باشد فرصت انباشته شدن زیست توده را نمی‌دهد و ممکن است بین وزن خشک و تراکم سلولی همخوانی وجود نداشته باشد (Jime´nez *et al*., 2003).

جدول ٤- مقایسهٔ میانگین متغیرهای مورد بررسی

Table 4- Comparison of the mean of variables

متغیرهای وابسته The dependent variables					تکرار	تیمار
کارتنوئید carotenoid	کلروفیل *a* Chlorophyll	لیپید Lipid (%)	زیست توده biomass (mg/lit)	تراکم سلولی Cell density ($\times 10^5$)	R	T
2060^{g}	7100^{ef}	4.86^{d}	910^{g}	34^{f}	3	$M_2T_2P_2$
2396^{fg}	7000^{f}	4.96^{d}	1066^{fg}	34^{f}	3	$M_2T_1P_2$
2306^{fg}	7166^{ef}	5.1^{d}	1480^{bc}	34^{f}	3	$M_2T_2P_2$
2460^{ef}	7333^{de}	5.56^{c}	1150^{ef}	47^{e}	3	$M_3T_2P_2$
2556^{de}	7266^{de}	5.23^{d}	1290^{cde}	35^{f}	3	$M_2T_1P_1$
3050^{c}	7500^{d}	6^{b}	1483^{bc}	48^{e}	3	$M_3T_1P_2$
3220^{b}	7300^{de}	5.96^{b}	1356^{cd}	47^{e}	3	$M_3T_2P_1$
3603^{a}	8066^{c}	6.3^{ab}	1826^{a}	54^{c}	3	$M_3T_1P_1$
2516^{ef}	8200^{c}	5.06^{d}	1200^{def}	51^{d}	3	$M_1T_2P_2$
3233^{b}	8566^{b}	6.11^{ab}	1363^{cd}	52^{d}	3	$M_1T_1P_2$
2680^{d}	8500^{b}	5.13^{d}	1300^{cde}	57^{b}	3	$M_1T_2P_1$
3850^{a}	9100^{a}	6.14^{a}	1553^{b}	58^{a}	3	$M_1T_1P_1$

ستون‌های دارای حروف یکسان در سطح احتمال ۵ درصد تفاوت معنی‌دار ندارند.

In each column, the figures with common letters have no statistically significant difference at the level of 5%.

زیست تودهٔ تولیدی

کاهش مواد مغذی، به ویژه نیتروژن، در محیط کشت باعث می‌شود تا رشد و ترکیبات بیوشیمیایی ریزجلبک‌ها از راه‌های مختلف تحت تأثیر قرار گیرد. برای مثال، وجود نیتروژن کافی در محیط کشت موجب بالا رفتن میزان زیست توده و مقدار پروتئین در سلول این ریزجلبک می‌شود. از سوی دیگر، سنتز کربوهیدرات هنگامی افزایش می‌یابد که میزان نیتروژن محیط کشت محدود شود (Fernandez Reiriz *et al*., 1989). به نظر می‌رسد سرعت تهی شدن میزان نیتروژن در کشت‌هایی با زیست تودهٔ بیشتر ، سریع‌تر است تا در سایر کشت‌هایی با زیست

تـودۀ کمتـر، زیـرا فقـدان نیتـروژن کـافی در غلظت‌هـای پایین‌تر سـبب می‌گـردد تـا کـارایی سـلول جلبکـی بـرای تکثیـر کـاهش یابـد (Göksan *et al*., 2007). نـوع ترکیبـات حـاوی نیتـروژن در محـیط کشـت می‌توانـد در میـزان زیسـت تـوده تأثیرگـذار باشـد. مطالعـات نشـان مـی‌دهـد میـزان زیسـت تـوده و پـروتئین تولیـد شـده ریزجلبـک اسـپیرولینا در محـیط کشـت حـاوی نیتـرات سـدیم، نسـبت بـه ترکیبـات دیگـر نیتـروژن‌دار، بیشـتر اسـت (Fernandez Reiriz *et al*., 1989). نتـایج بـه دست آمـده از ایـن تحقیـق نیـز نشـان می‌دهـد کـه بـین محـیط کشـت‌های انتخـابی، بیشـترین میـزان تولیـدی زیسـت تـوده مربـوط بـه محـیط کشـت‌های والـن و جردن است؛ امـا بـا توجـه بـه سـرعت تقسـیم سـلولی در فـاز لگـاریتمی در محـیط کشـت والـن، فرصـت انباشـت سلولی کـاهش مـی‌یابـد و بنـابراین بـه‌رغـم میـزان رشـد سـلولی بیشـتر، میـزان زیسـت تـوده آن نسـبت بـه مقداری کـه در محـیط کشـت جـردن بـه‌دسـت مـی‌آیـد کمتر است (Danesi *et al*., 2011).

نتایج بـه دسـت آمـده از جـدول تجزیـۀ واریـانس در خصـوص تـأثیر متغیرهـای مسـتقل (محـیط کشـت، دمـا و pH) بـر میـزان زیسـت تـودۀ تولیـدی در ریزجلبـک اسـپیرولینا نشـان می‌دهـد کـه در سـطح ۱ درصـد اختلاف معنـی‌دار وجـود دارد و نـوع محـیط کشـت، دمـا و pH نیز تـأثیر بسـزایی در میـزان زیسـت تـوده تولیـدی دارند. اثرهای متقابـل ایـن متغیـر مـا نیـز دارای اخـتلاف معنـی‌دار اسـت (جـدول ۳). از سـوی دیگـر، نتـایج مقایسۀ میـانگین‌هـا نشـان می‌دهـد کـه تیمـار M3T1P1 (محـیط کشـت جـردن، دمـای ۲۵ درجـه سلسـیوس بـا pH=۸±۰/۵) بیشـترین میـزان زیسـت تـوده تولیـدی را دارد و کمتـرین میـزان مربـوط بـه تیمـار M2T2P2 (محـیط کشـت BBM، دمـای ۳۰ درجـه سلسـیوس بـا pH=۱۰±۰/۵) اسـت (جـدول ۴). شـکل ۴ میـزان اختلاف زیسـت تـوده تولیـدی تیمارهـا را نشـان می‌دهـد. نتیجـۀ فـوق بـا نتیجـۀ تحقیقـات قـائنی و همکـاران (Ghaeni *et al*., 2019) همخـوانی دارد کـه محـیط کشـت و دمـای مطلـوب را بـرای کشـت اسـپیرولینا بـه‌ترتیب جردن و ۲۵ درجه سلسیوس معرفی کرده‌اند.

اسـماعیل و همکـاران (Ismaiel *et al*., 2016) گزارش دادنـد کـه بیشـترین تـودۀ سـلولی اسـپیرولینا در pH=۹، بـا دمـای ۲۷ درجـه سلسـیوس، دوره ۱۴ روزه در محیط کشـت زاروک تولیـد شـده اسـت کـه بـه نتـایج مطالعه حاضر نزدیک است.

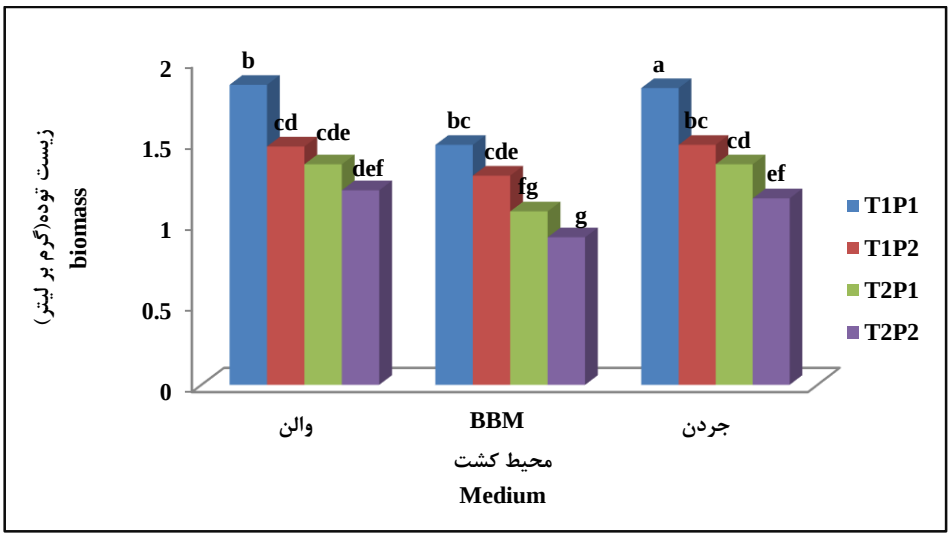
مقدار لیپید تولید شده

در زمینـۀ بررسـی توانـایی ریزجلبک‌هـای سـیانوباکتری بـرای تولیـد لیپیـد تحقیقـات وسـیعی در دنیـا در حـال اجراسـت. بهینه‌سـازی شـرایط رشـد سـیانوباکتری‌ها پیچیـده و بـه عوامـل مختلفـی مـرتبط اسـت کـه هریـک می‌توانـد بازدارنـده یـا تحریک‌کننـده باشـد. از آن جملـه می‌تـوان بـه عـواملی ماننـد مـواد غـذایی، دمـا، هـوادهی، تغییـرات گـازی، میـزان تـابش نـور، شـوری، و تـراکم سـلولی اشـاره کـرد (Gardner *et al*., 2011). زمانی‌کـه جلبک‌هـا تحـت شـرایط اسـترس ناشـی از محرک‌هـای شـیمیایی، شـوری، pH و کمبـود مـواد غـذایی ماننـد منبـع کـربن و نیتـروژن قـرار می‌گیرنـد، سـنتز و تجمـع تری‌آسـیل گلیسـرول در سـلول‌های آنهـا بـه همـراه تغییراتـی در ترکیـب اسـیدهای چـرب و لیپیـدها بـا مقدار زیاد افزایش می‌یابد (Hu *et al*., 2006).

در بررسـی میـزان لیپیـد تولیـدی متـأثر از تیمارهـای محیط کشـت، دمـا و pH ، نتـایج تجزیـۀ واریـانس نشـان می‌دهـد کـه در بـین کلیـۀ تیمارهـا در سـطح ۱ درصـد اخـتلاف معنـی‌دار وجـود دارد؛ بـه عبـارت دیگـر میـزان دمـا، اسـیدیته و نـوع محـیط کشـت بـر میـزان لیپیـد تولیـدی تـأثیر معنـی‌دار دارد (جـدول ۳). ایـن نتیجـه بـا نتـایج تحقیقـات گـاردنر و همکـاران (Gardner *et al*.,

2011) همخوانی دارد. باتوجه به نتایج مقایسهٔ میانگین‌ها دیده می‌شود که به‌رغم افزایش میزان رشد در محیط کشت والن با توجه به میزان بیشتر نیتروژن نسبت به محیط کشت جردن میزان لیپید تولیدی در این محیط کشت کاهش یافته است. این نتیجه با نتیجهٔ تحقیقات گرابلار (Grobbelaar, 2004) همخوانی داردکه افزایش نیترات در جلبک را باعث کاهش میزان تولید چربی در ریزجلبک دانسته‌اند، هرچند این اختلاف در بین دو محیط کشت والن و جردن معنی‌دار نیست. از سوی دیگر، میزان لیپید تولیدی بین دمای ۲۵ و ۳۰ درجه سلسیوس در محیط کشت والن تفاوت معنی‌دار وجود دارد در صورتی‌که در دو محیط کشت دیگر از نظر دمایی تفاوت معنی‌دار مشاهده نمی‌شود. بررسی میزان تفاوت در محیط کشت والن نشان می‌دهد که به‌رغم نبود تفاوت در پارامتر دما و اسیدیته به طور مجزا، در دو تیمار T2P2 و T1P1 تفاوت معنی‌دار وجود دارد که این موضوع می‌تواند ناشی از اثرهای متقابل دما و pH باشد. بیشترین میزان لیپید تولیدی مربوط به تیمار M1T1P1 و کمترین میزان مربوط به تیمار M2T2P2 است (جدول ۴). درصد لیپید به دست آمده در دو محیط کشت والن و جردن به ترتیب ۶/۴ و ۶/۳ است که با یافته‌های اوتلس و پیر (Ötles & Pire, 2001) همخوانی دارد.

گریفیتس و هریسون (Griffiths & Harrison, 2009) در تحقیقات خود گزارش می‌دهند تولید لیپید با میزان زیست توده ارتباط دارد و مقدار لیپید فاکتوری کلیدی در کشت جلبک‌هاست اما با افزایش pH میزان زیست‌توده و به تبع آن میزان لیپید کاهش می‌یابد. در تحقیق پاک‌نژادی و همکاران (Paknejadi *et al.*, 2012) بیشترین میزان لیپید با استفاده از غلظت پایین نیترات در دمای ۲۵ درجه سلسیوس با pH= ۷/۵ گزارش شده است.

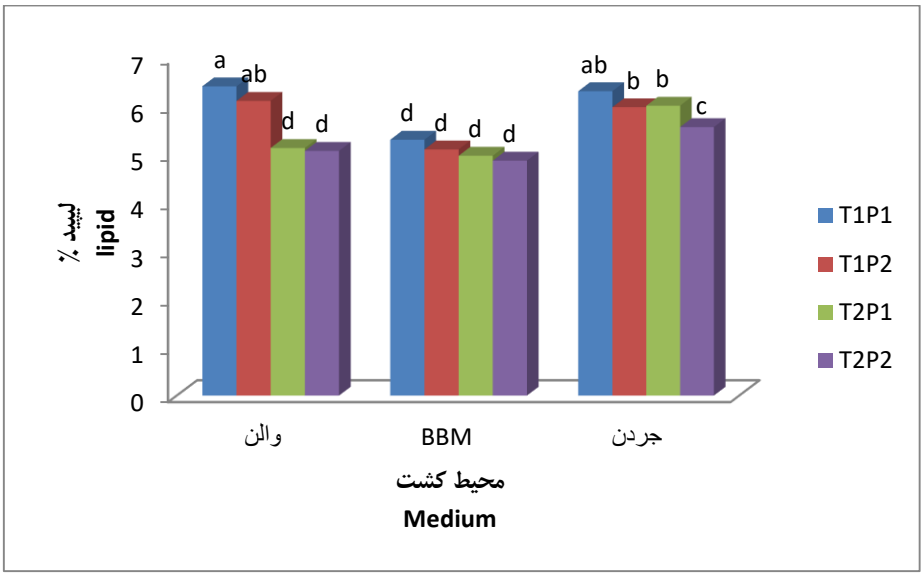


شکل ٤- میزان زیست تودهٔ تولیدی تیمارهای مختلف

Fig. 4- Biomass production of different treatments

ستون‌های دارای حروف یکسان در سطح احتمال ۵ درصد تفاوت معنی‌دار ندارند.

In each column, the figures with common letters have no statistically significant difference at the level of 5%.



شکل ۵- درصد لیپید تولیدی تیمارهای مختلف

Fig. 5- Lipid production of different treatments

ستون‌های دارای حروف یکسان در سطح احتمال ۵ درصد تفاوت معنی‌دار ندارند.

In each column, the figures with common letters have no statistically significant difference at the level of 5%.

میزان کلروفیل *a*

میزان کلروفیل *a* با افزایش میزان رشد رابطهٔ مستقیم دارد و میزان رشد نیز بستگی دارد به عوامل محیطی و تغذیهٔ ریزجلبک، از این رو انتظار می‌رود که میزان کلروفیل متأثر از نوع محیط کشت، دما و اسیدیته باشد. در مطالعات اکبرنژاد و همکاران (Akbarnejad *et al.*, 2020) در زمینهٔ بررسی اثر غلظت‌های مختلف نیتروژن به شکل NaNO3 بر میزان رشد و کلروفیل *a* ریزجلبک Chaetoceros calcitrans، گفته شده افزایش میزان نیتروژن سبب افزایش میزان رشد و کلروفیل *a* در این ریزجلبک گردیده است.

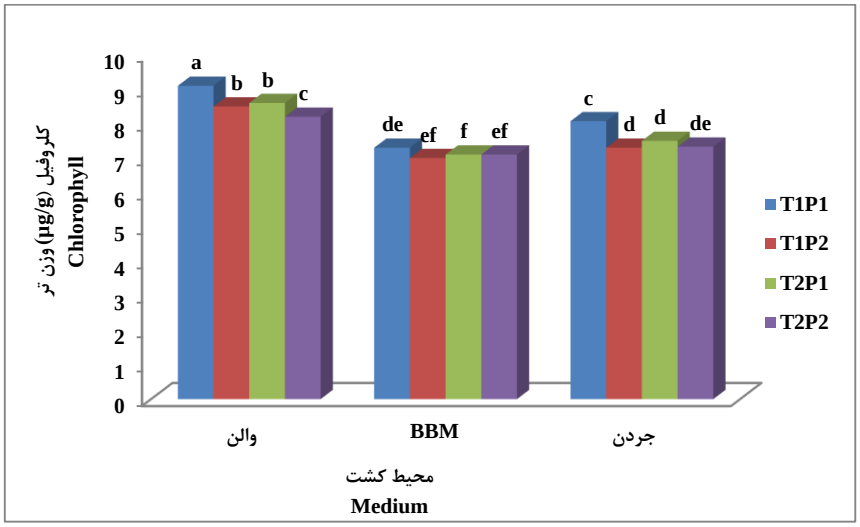
دانسی و همکاران (Danesi *et al.*, 2011) در تحقیقی در استفاده از منابع مختلف نیتروژنی در کشت ریزجلبک اسپیرولینا نشان دادند، این ریزجلبک هنگامی‌که با اوره کشت داده شود، نسبت به زمانی که پتاسیم نیترات به کار گرفته شود، رشد بهتری خواهد داشت. کولا و همکاران (Colla *et al.*, 2007) نشان دادند که افزایش میزان پتاسیم نیترات به محیط کشت ریزجلبک اسپیرولینا اثر معنی‌داری بر میزان رشد و مقدار پروتئین این ریزجلبک ندارد.

نتایج به دست آمده از این تحقیق نیز نشان می‌دهد نوع محیط کشت، دما و میزان pH بر میزان کلروفیل *a* بین تیمارهای محیط کشت و میزان pH و دما در سطح ۱ درصد اختلاف معنی‌دار وجود دارد. به عبارت دیگر، نوع محیط کشت، میزان اسیدیته و دما بر میزان کلروفیل تأثیرگذار است (جدول ۴). این نتیجه با نتیجهٔ تحقیقات کولا و همکاران (Colla *et al*, 2007) همخوانی دارد که نوع رژیم نیتراتی و دما را بر میزان رشد تاثیرگذار می دانند.

در تحقیق حاضر بیشترین میزان تولید کلروفیل مربوط به تیمار M1T1P1 و کمترین میزان مربوط به تیمار M2T2P1 است (جدول ۴). با توجه به اینکه میزان نیترات در محیط کشت BBM کمتر از دو محیط کشت دیگر است، نتیجهٔ به دست آمده با نتیجه تحقیقات یووان و همکاران (Yuan *et al.*,

2011) همخوانی دارد که کمبود نیترات را باعث کاهش میزان کلروفیل و میزان کارتنوئید می‌دانند.

میزان کلروفیل *a* تولیدی کلیه تیمارها به تفکیک در شکل ۶ آورده شده است.



شکل ٦- میزان کلروفیل *a* در تیمارهای مختلف

Fig. 6- Chlorophyll a in different treatments

ستون‌های دارای حروف یکسان در سطح احتمال ۵ درصد تفاوت معنی‌دار ندارند.

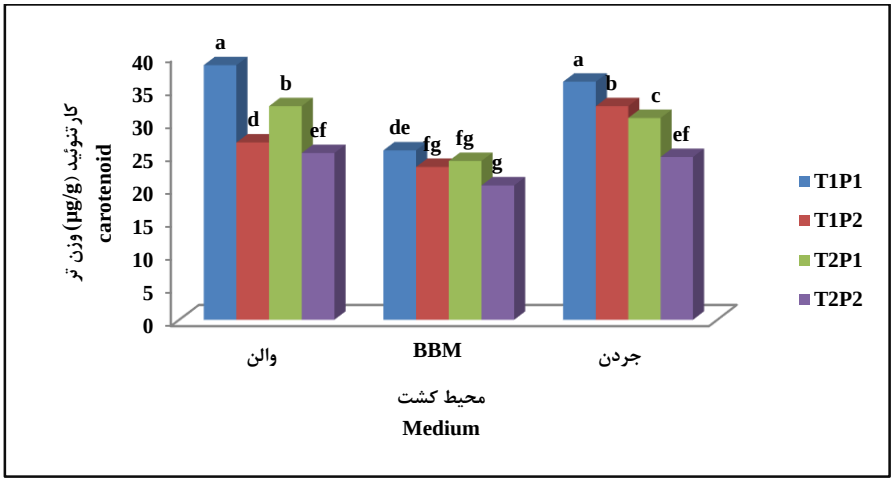
In each column, the figures with common letters have no statistically significant difference at the level of 5%.

میزان کارتنوئید تولید شده

میزان تغییرات کلروفیل و کارتنوئید همگام با افزایش سن سلول‌ها و کشت دچار کاهش می‌شود (Estak, 1963). مقادیر متفاوت شاخص‌ها و ترکیبات در پژوهش حاضر به نوع محیط کشت و شرایط محیطی از اسیدیته، شوری، شدت نور و دما بستگی دارد. با توجه به ثابت بودن پارامترهایی مانند نور و میزان شوری در این تحقیق می‌توان اختلاف به دست آمده را متأثر از ترکیبات محیط کشت، دما و اسیدیته دانست.

نتایج بررسی میزان کارتنوئید تولیدی از ریزجلبک اسپیرولینا با استفاده از محیط‌های کشت مختلف در دماهای تعیین شده و pH انتخابی نشان داد که بین متغیرهای محیط کشت و pH در سطح ۱ درصد و بین دماهای انتخابی در سطح ۵ درصد اختلاف معنادار وجود دارد (جدول ۳). به عبارت دیگر، تفاوت محیط‌های کشت، دما و میزان اسیدیتهٔ محیط می‌تواند به طور معنی‌دار میزان کارتنوئید تولیدی را تغییر دهد. نتایج مقایسهٔ میانگین‌ها نشان می‌دهد که بین اکثر تیمارها با هم اختلاف معنادار وجود دارد. نتیجه به دست آمده با نتیجه تحقیقات دانسی و همکاران (Danesi *et al.*, 2011) همخوانی دارد که بیشترین میزان کارتنوئید را در دمای پایین‌تر از ۳۰ درجه سلسیوس با شدت نور ۲۴ میکرو مول فوتون گزارش داده‌اند. تیمارها با توجه به معنادار بودن اختلاف‌ها سطح‌بندی شدند. بیشترین میزان کارتنوئید مربوط به تیمار M1T1P1 و کمترین میزان مربوط به تیمار M2T2P2 است (شکل ۷). با توجه به جدول مقایسهٔ میانگین‌ها بین محیط کشت والن و جردن تفاوت معنی‌دار وجود ندارد. بنابراین با در نظر گرفتن میزان هزینه، محیط کشت جردن مناسب‌تر است. همچنین بالاترین

میـزان کارتنوئیـد در هـر دو محـیط کشـت مربـوط بـه دمـای ۲۵ درجـه سلسـیوس و اسـیدیته۸±۰/۵ اسـت کـه نشـان‌دهنده مناسـب بـودن ایـن دمـا و pH بـرای کشت اسپیرولینا است.



شکل ۷- میزان کارتنوئید تولیدی در تیمارهای مختلف

Fig. 7- Carotenoids produced in different treatments

ستون‌های دارای حروف یکسان در سطح احتمال ۵ درصد تفاوت معنی‌دار ندارند.

In each column, the figures with common letters have no statistically significant difference at the level of 5%.

نتیجه‌گیری

تحقیقـات زیـادی در اسـتفاده از منـابع مختلـف نیتروژنـی بـه عنـوان مـاده غـذایی بـرای کشـت جلبـک اسـپیرولینا انجـام گرفتـه و همگـی بـر اهمیـت ایـن موضـوع تاکیـد دارنـد (Rodrigues *et al.*, 2011; Madkour *et al.*, 2012). بیشـترین میـزان هزینـهٔ تمـام شـدهٔ تولیـد اسـپیرولینا، مربـوط بـه مـواد مغذی محـیط کشـت اسـت، از ایـن‌رو کـاهش هزینـه‌های تولیـد بـا اسـتفاده از محـیط‌هـای کشـت ارزان قیمـت، یکـی از فاکتورهـای کلیـدی در فرآینـد توسـعهٔ تولیـد اسـپیرولینا اسـت. اگرچـه نیتـرات یکـی از منـابع نیتروژنـی مرسـوم در تهیـهٔ محـیط کشـت ایـن جلبـک بـه کـار مـی‌رود، ولـی بـه کـارگیری منـابع نیتروژنـی ارزان‌قیمـت ماننـد اوره، نیتـروژن مـورد نیـاز رشـد ایـن جلبـک را فـراهم می‌کنـد (Danesi *et al.*, 2011). بـا توجـه بـه اخـتلاف بـین سـه محـیط کشـت (والـن، جـردن و BBM) از نظـر مـواد مغـذی، نتایج آنـالیز نشـان می‌دهـد کـه بـین سـه محـیط کشـت انتخـابی از نظـر میـزان تـراکم سـلولی، زیسـت تـوده، لیپیـد، کلروفیـل a و کارتنوئیـد اخـتلاف معنـی‌دار وجـود دارد. مقایسـهٔ میـانگین عملکـرد محیط‌هـای کشـت نشـان مـی‌دهـد کـه بیشـترین میـزان به ترتیب مربـوط بـه محـیط کشـت والـن و جـردن اسـت و اخـتلاف معنـی‌دار بـین دو محـیط کشـت از نظـر عملکـرد کلـی وجـود نـدارد و از سـوی دیگـر بیشـترین میزان هزینهٔ تمـام شـده محـیط‌هـای کشـت بـاز هـم بـه ترتیـب مربـوط بـه محـیط کشـت والـن و جـردن اسـت. لذا محیط کشت جـردن بـا توجـه بـه عملکـرد مناسـب و هزینـه کمتـر می‌توانـد بـه عنـوان مناسـب‌ترین محـیط کشـت انتخـاب گـردد. ایـن نتیجـه بـا نتیجـهٔ تحقیقـات جاریـان و همکـاران (Jaryan *et al.*, 2019) مطابقـت دارد.

در خصـوص تـأثیر دمـا بـین دو تیمـار دمـایی (۲۵ و ۳۰ درجـه سلسـیوس) ازنظـر میـزان تـراکم سـلولی،

زیست توده، لیپید و کلروفیل *a* وکارتنوئید اختلاف معنی‌دار وجود دارد بررسی ما نشان داد که در اغلب تیمارها دمای ۲۵ درجه سلسیوس عملکرد بهتری داشته است. گنجی جاسکی و همکاران (Gargi Jaski *et al.*, 2018) نیز در تحقیقات خود در خصوص افزایش عملکرد اسپیرولینا در محیط کشت زاروک دمای ۲۵ درجه سلسیوس را پیشنهاد کرده‌اند.

یکی دیگر از فاکتورهای مؤثر بر رشد فیزیولوژیکی، فعالیت‌های متابولیکی و تولید زیست توده در زمان کشت ریزجلبک ها ،از جمله اسپیرولینا، pH است. در تحقیقی روی میزان رشد و عملکرد اسپیرولینا ، میزان رشد در pH=5 به میزان زیادی کاهش و در pH= ۷/۵ بالاترین میزان رشد دیده شده است (Rodrigues *et al.*, 2011). در بررسی بین دو رده pH انتخابی (۸±۰/۰۵ و ۱۰±۰/۵) از نظر میزان تراکم سلولی، زیست توده، لیپید، کلروفیل *a* و کارتنوئید اختلاف معنی‌دار وجود دارد؛ در اغلب تیمارها، pH=۸/۵±۰ عملکرد بهتری داشته است. این نتیجه با یافته‌های بسیاری از تحقیقات قبلی همخوانی دارد.

در بررسی اثرهای متقابل تیمارها، بهترین عملکرد زیست توده مربوط به تیمار M1T1P1 (محیط کشت والن –دمای ۲۵ درجه سلسیوس و pH=۸±۰/۵) و کمترین عملکرد مربوط به تیمار M2T2P2 (محیط کشت BBM، دمای ۳۰ درجه سلسیوس و pH=۱۰±۰/۵) است. در حالی‌که در میزان کلروفیل و کارتنوئید کمترین میزان مربوط به تیمار M2T1P2 (محیط کشت BBM، دمای ۲۵ درجه سلسیوس و pH=۱۰±۰/۵) است.

قدردانی

از ریاست محترم دانشگاه آزاد اسلامی واحد اراک برای تامین هزینه‌های آزمایشگاهی این پایان‌نامه سپاسگزاری می‌شود.

مراجع

Akbarnejad, M., Rajabi Islami, H., Javaheri Baboli, M., Shamsaie Mehragan, M., & Filizadeh, Y. (2020). Effect of ligh and nitrogen concentration on the growth and lipid content of marine diatom, Chaetoceros calcitrans. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, *19*(2), 986-993. Doi: 10.22092/ijfs.2018.117035. (in Persian)

Anon. (2013). A Review on culture, production and use of spirulina as food for humans and feeds for domestic animals and fish, FAO Fisheries and Aquaculture Circular No. 1034.

Assaf Sukenik, Y. C. T. B. (1989). Regulation of fatty acid composition by irradiance level in the Eustigmatophyte Nannochloropsis sp. *Journal of Phycology*, *25*(4): 686-692.

Barbosa, M.J.G.V. (2003). Micro algal photo bio reactors: scale-up and optimization (Ph. D. Thesis), Wageningen University, Wageningen, Netherlands.

Belay, A. (1997). Mass culture of Spirulina outdoors. The earthrise farms experience. In: Vonshak, A. (Ed.) Spirulina platensis (Arthrospira): physiology, cell-biology and biotechnology. Taylor and Francis. London.

Choonawala, B. (2007). Spirulina production in brine effluent from cooling towers. Durban University of Technology.

Colla, L. M., Reinehr, C. O., Carolina, R., & Jorge, A. V. C. (2007). Production of biomass and nutraceutical compounds by Spirulina platensis under different temperature and nitrogen regimes. *Bioresource Technology*, *98*, 489-493.

Converti, A., Casazza, A. A., Ortiz, E. Y., Perego, P., & Del Borghi, M. (2009). Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of Nannochloropsis oculata and Chlorella vulgaris for biodiesel production. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification, 48*(6):114-115.

Danesi, E. D .G., Rangel-Yagui, C. O., Sato, S., & de Carvalho, J. C.M. (2011). Growth and content of Spirulina platensis biomass and chlorophyll cultivated at different values of light intensity and temperature using different nitrogen sources. *Brazilian Journal of Microbiology, 42*, 362-373. Doi: 10.1590/S1517-83822011000100046.

Deres, E. (1998). Spectrophotometric determination of chlorophyll a,b and total carotenoid content of some algae species using different solvent. *Botany 22*, 13-17.

Del Campo, J. A., García-González, M., & Guerrero, M. G. (2004). Outdoor cultivation of microalgae for carotenoid production: current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *74*, 1163–1174. Doi: 10.1007/s00253-007-0844-9.

Estak, Z. (1963). Changes in the chlorophyll content as related to photosynthetic activity and age of leaves. *Photochemistry and Photobiology 2*, 101-110.

Fernandez Reiriz, M. J., Perez-Camacho, A., & Ferreiro, M. J. (1989). Biomass production and variation in the biochemical profile (total protein, carbohydrates, RNA, lipid and fatty acids) of seven marine microalgae. *Aquaculture*, *83*, 17–37. Doi:10.1016/0044-8486(89) 90057-4.

Ghaeni, M., Matinfar, A., Soltani, M., & Rabbani, M. (2019). Laboratory culture of Arthorospira platensis. *Journal of Marine Biology. Islamic Azad University of Ahvaz Publications, 8*, 37-50. (in Persian)

Gardner, R., Peters, P., Peyton, B., & Cooksey, K. E. (2011). Medium pH and nitrate concentration effects on accumulation of triacylglycerol in two members of the chlorophyta. *Journal Applied Phycology*, *23*, 1005-1016.

Gargi Jaski, M., Yahyawi, M., Rouhani, K., & Salarzadeh, K. (2018). The effect of different nitrogen sources on the amount of biomass and protein content of blue-green alga - Spirulina platensis. *Iranian Journal of Fisheries*, 6, 57-66. (in Persian)

Gouveia, L., Batista, A. P., Raymundo, A., Sousa, I., & Empis, J. (2006). Chlorella vulgaris and Haematococcus pluvialis biomass as coloring and antioxidant in food emulsions. *European Food Research and Technology, 222*, 362-367.

Grobbelaar, J. U. (2004). Inorganic algal nutrition. In: Richmond, A. (Ed.) Handbook of microalgal culture: Biotechnology and applied phycology. Blackwell Publishing Ltd., Oxford.

Griffiths, M., & Harrison, S. L. (2009). Lipid productivity as a key characteristic for choosing algal species for biodiesel production. *Journal of Applied Phycology, 21*(5), 493-507.

Göksan, T., Zekerüyaoúlu, A., & Ülknur, A. K. (2007). The growth of Spirulina platensis in different culture systems under greenhouse condition. *Turkish Journal of Biology*, *31*, 47–52.

Ismaiel, M. M., El-Ayouty, Y. M., & Pierecy-Normorea, M. (2016). Role of pH on antioxidants production by Spirulina (Arthrospira) platensis. *Brazilain Journal of Microbiology, 47*, 298-304.

Jaryan, R., Fatemi, M., & Machinchian Moradi, A. (2019). The effect of temperature and elements of magnesium and iron on the growth rate and live mass of Spirulina (Arthrospira plantensis). *Iranian Journal of Fisheries, 28*(6), 69-78. (in Persian)

Jime´nez, C., Cossı´o, B. R., Labella, D., & Niell, F. X. (2003). The feasibility of industrial production of Spirulina (Arthrospira) in southern Spain. *Aquaculture, 217*, 179–190.

Lavens, P., & Sorgeloos, P. (1996). Manual on the production and use of live food for aquaculture. FAO Fisheries Technical paper.

Lee, R. E. (2008). Phycology, fourth edition. 4th Ed. Cambridge University Press.

Lubzens, E., Gibson, O., Zmora, O., & Sukenik, A. (2003). Potential advatages of frozen algae (Nannochloropsis sp.) for plicatilis culture. *Aquaculture, 133*, 295-309.

Madkour, F. F., Kamil, A., & Nasr, H. S. (2012). Production and nutritive value of Spirulina platensis in reduced cost media. *Egyptian Journal of Aquaculture Research, 38*, 51–57. Doi:10.1016/j.ejar.2012.09.003.

Masoumi, S. Z., & Yavari, V. (2007). A study of the effect of light on the growth of Tetraselmis microalgae in the environment of vitamin-free and vitamin-free cultures. *Journal of Research and* Construction, 74, 130-139.

Nicholas, H. W., & Bold, H. C. (1965). Trichosarcina polymorpha gen. et sp. nov. *Journal of Phycology. 1*, 34-38.

Ötles, S., & Pire, R. (2001). Fatty acid composition of Chlorella and Spirulina microalgae species. *Journal of AOAC, 84*, 1708-1714.

Paknejadi, M., Malek Ahmadi, F., & Soltani, N. (2012). Investigation of the effect of different amounts of nitrogen and pH on the biomass of lipid content and fatty acid composition in Spirulina major. *Aquatic Ecology Neighborhood, 8*(2), 14-30. (in Persian)

Peck, M. A., Ewest, B., Holste, L., Kanstinger, P., & Martin, M. (2008). Impacts of light regime on egg harvests and 48-h egg hatching success of Acartia tonsa (Copepoda: Calanoida) within intensive culture. *Aquaculture, 275*, 102-107.

Puyfoulhoux, G., Rouanet, J. M., Besancon, P., Baroux, B., Baccou, J. C., & Caporiccio, B. (2001). Iron availability from iron-fortified Spirulina by an in vitro digestion/Caco-2 cell culture model. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 49*, 1625-29.

Pulz, O., & Gross, W. (2004). Valuable products from biotechnology of microalgae. *Applied Microbiology and Biotechnology, 65*, 635–648.

Rafiei, F., Ismaili, A., & Kermanshahi, H. (2012). Study of algae growth (Phaeophyta, Fucales) Sargassum boveanum under the influence of changes in temperature, light period and light intensity in laboratory conditions. *Marine Science and Technology Research, 7*(3), 27-35. (in Persian)

Rodrigues, M. S., Ferreira, L. S., Converti, A., & Sato, S. (2011). Influence of ammonia sulphate feeding time on fed-batch Arthrospira (Spirulina) platensis cultivation and biomass composition with and without pH control. *Bioresource Technology, 102*, 6587-6592.

Ryckebosch, E., Muylaert, K., & Foubert I. (2012). Optimization of an analytical procedure for extraction of lipids from microalgae. *Journal of the American Oil Chemists' Society. 89*(2), 189-198.

Sajilata, M. G., Singhal, R. S., & Kamat, M. Y. (2008). Fractionation of lipids and purification of y-linolenic acid (GLA) from Spirulina platensis. *Food Chemistry, 109*(3), 580-586.

Saleh, A. M., Dhar, D. W., & P. Singh, K. (2011). Comparative pigment profiles of different Spirulina strains. *Research in Biotechnology, 2*(2), 67-74.

Sharma, G., Kumar, M., Irfan Ali, M., & Dut Jusja, N. (2014). Effect of carbon content, Salinity and pH on Spirulina platensis for phycocyanin, allophycocyanin and phycoerythrin accumulation. *Microbial & Biochemical Technology, 6*, 202-206.

Todd, L.(2000). A review of spirulina as acarotenoid and vitamin source for cultured shrimp. Spirulina Pacifica Technical Bulletin.

Yuan, X., Kumar, A., Sahu, A. K., & Ergas, S. J. (2011). Impact of ammonia concentration on Spirulina platensis growth in an air lift photobioreactor. *Bioresource Technology, 102*, 3234–3239. Doi:10.1016/j.biortech.2010.11.019.

Zar, J. H. (1984). Biostatistical analysis. 2nd Edition. Prentice Hall Inc., Engewood Cliffs, New York. 718

Agricultural Mechanization and Systems Research/Vol.21/No.76/Winter2021/P:99-116

Research Paper

Effect of Culture Medium, Temperature and pH on the Performance of *Spirulina Platensis* Microalgae in Vertical Photobioreactor

M. H. Afsharbakhsh, A. Mohammadi*, H. Mashahdi and F. Mahmoudnia

* Corresponding Author: Assistant Professor, Department of Agricultural Mechanization, Faculty of Agriculture, Arak Branch, Islamic Azad University, Arak, Iran. Email: a-mohamady@iau-arak.ac.ir
Received: 18 June 2020, Accepted: 26 October 2020

Abstract

The current study quantified the effects of culture media and environmental factors (temperature and pH) on factors in the production of microalgae *Spirulina platensis* by photobioreactor. The culture of microalgae was done separately in Walne, BBM, and Jordan media. Temperature, pH, and light intensity (5000 lux for all stages and 16 hours per day) were applied in each culture medium separately. Cell density, biomass, lipid percentage, chlorophyll *a*, and carotenoids were measured for all treatments. The differences in parameter's effects were assessed by SPSS software. The results showed a significant difference at 1% in cell density, biomass, chlorophyll, carotenoid, and lipid content in the Walne, BBM, and Jordan culture medium at pH (8±0.5&10±0.5) and temperature (25 & 30 °C), respectively. Average data revealed that the highest cell density, amount of chlorophyll *a*, the number of carotenoids were found in M1T1P1 treatment (Walne culture medium at 25 ◦C and PH=8±0.5), and the lowest amount was found in M2T2P2 treatment (BBM culture medium at 30 °C and PH10±0.5). In terms of biomass, the highest levels were obtained in M3T1P1 treatment (Jordan culture medium at 25 °C and PH=8±0.5). Conclusions showed that Walne medium culture at pH=9 and temp 25 °C was suitable for microalgae of *Spirulina*. But from the point of the cost of culture medium, Jordan culture medium seemed to be more economical.

Keywords: Biomass, Carotenoid, Chlorophyl, Lipid, Microalgae

© 2020 Agricultural Mehanization and Systems Research, Karaj, Iran. This is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution 4.0 International (CC BY 4.0 license)