مجله بوم شناسی آبزیان

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

بررسی اثرگذاری عوامل تناوب هوادهی و غلظت محیط کشت بر شاخص‌های کمی و کیفی بیومس ریزجلبک اسپیرولینا به عنوان کاندید تصفیه فاضلاب

ساسان قبادیان[۱]، حسین گنجی دوست[۱]*، بیتا آیتی[۱]، ندا سلطانی[۲]

[۱]گروه مهندسی محیط زیست، دانشکده مهندسی عمران و محیط زیست، دانشگاه تربیت مدرس

[۲]گروه میکروبیولوژی نفت، پژوهشکده علوم پایه کاربردی جهاددانشگاهی

نوع مقاله:
پژوهشی

تاریخچه مقاله:
دریافت: ۹۳/۰۷/۱۱
اصلاح: ۹۳/۱۲/۱۹
پذیرش: ۹۳/۱۲/۲۵

کلمات کلیدی:
اسپیرولینا
کلروفیل
فیکوبیلی‌پروتئین
RSM-CCD

چکیده

کشت ریزجلبک‌ها دارای سه کاربرد زیست‌محیطی است؛ تصفیه فاضلاب، تولید منابع تجدیدپذیر انرژی و کاهش انتشار گازهای گلخانه‌ای. ریزجلبک اسپیرولینا هم به دلیل توانایی حذف نیتروژن و فسفر، کاندید مناسبی برای تصفیه فاضلاب است و هم به دلیل استفاده از CO_2 اتمسفر در کاهش گازهای گلخانه‌ای نقش دارد. فاکتورهای مختلفی بر نحوه رشد این گونه مؤثر است. در این مطالعه با بهره‌گیری از روش RSM-CCD نحوه اثرگذاری دو فاکتور تناوب هوادهی (۱۵ دقیقه تا ۱۲ ساعت) و غلظت محیط کشت Zarrok (۲۰-۱۰۰٪) بر شاخص‌های کمی (نرخ رشد مخصوص و وزن خشک) و کیفی (میزان کلروفیل و فیکوبیلی‌پروتئین) این جلبک بررسی شد. نتایج نشان داد که افزایش تناوب هوادهی و افزایش غلظت محیط کشت منجر به افزایش نرخ رشد مخصوص و وزن خشک می‌شود. همچنین بیشترین میزان کلروفیل در مقادیر میانی هر دو عامل به دست می‌آید. در مورد فیکوبیلی‌پروتئین، اثرگذاری عامل غلظت محیط کشت بر میزان این رنگیزه‌ها مانند اثر بر مقدار کلروفیل بوده اما تأثیرگذاری تناوب هوادهی کاملاً عکس کلروفیل می‌باشد. به نظر می‌رسد علیرغم آنکه فاکتور تناوب هوادهی کمتر مورد بررسی قرار گرفته اما نقش مؤثری بر شاخص‌های کمی و کیفی بیومس داشته باشد. این عامل می‌تواند تا حدی اثرات منفی کاهش غلظت محیط کشت را جبران کرده و موجب کاهش هزینه‌های کل فرآیند گردد.

مقدمــه

افزایش جهانی جمعیت از یک سو موجب افزایش نیاز به منابع انرژی و غذای جایگزین شده و از سوی دیگر مخاطرات زیست‌محیطی جدیدی نظیر 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 مفیدی نظیر رنگدانه‌ها، پروتئین‌ها، چربی‌ها، اسیدهای چرب چندگانه غیراشباع، کاروتنوئیدها، استروئیدها و ویتامین‌ها استفاده شده و در کنار آن توسط برخی سویه‌ها تصفیه فاضلاب‌ها را هدف قرار داده است (Sajilata *et al*., 2008; Pulz and Gross, 2004; Ogbonda *et al*., 2007). تحقیق بر روی ریزجلبک‌ها به ویژه بر روی گونه‌های جنس دونالیلا (*Dunaliella*)، اسپیرولینا (*Spirulina*) و سندسموس (*Scenedesmus*)، از دهه ۱۹۵۰ میلادی آغاز شده اما در طی سه دهه اخیر به واسطه استفاده از فرآیندهای مختلف بیوتکنولوژیکی پیشرفت زیادی داشته است (Spolaore

* نویسنده مسئول، پست الکترونیک: h-ganji@modares.ac.ir

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2025-12-15]

[DOR: 20.1001.1.23222751.1394.5.2.9.2]

et al., 2006). مطالعات ریزجلبک‌ها عمدتاً بر دو جنبه متمرکز است؛ دسته‌ای به تولید تجاری به عنوان یک افزودنی یا مکمل غذایی پرداخته (Celekli and Donmez, 2006; Spolaore *et al*., 2006) و تعدادی نیز بر روی استفاده از جلبک ها برای حذف مواد نامطلوب از فاضلاب انجام شده است (Lodi *et al*., 2008; Pane *et al*., 2008). برخی از این مطالعات گونه جلبکی اسپیرولینا را شامل می‌شود؛ این گونه یک سیانوباکتری رشته‌ای فتوسنتزکننده متشکل از چند سلول استوانه‌ای در طول یک رشته مارپیچ می‌باشد(Celekli and Yavuzatmaca, 2009). با توجه به اهمیت این گونه جلبکی، بهینه‌سازی فرآیند کشت آن جهت افزایش نرخ رشد، ترکیبات مغذی و اسید آمینه‌های کلیدی از اهمیتی بالایی برخوردار است (Li *et al*., 2007). محیط کشت‌های مختلفی برای کشت جلبک اسپیرولینا مورد استفاده قرار گرفته است که از آن بین می‌توان به Zarrouk (Li *et al*., 2007; Radmann *et al*., 2007)، Schlosser (Celekli *et al*., 2009) و ST medium (Rodrigues *et al*., 2010) اشاره کرد. فاکتورهای مؤثر بر رشد گونه اسپیرولینا شامل pH، شدت تابش و حضور آلاینده (Vonshak, 1997)، منبع نیتروژن (Celekli and Yavuzatmaca, 2009; Colla *et al*., 2007)، غلظت بیومس اولیه (Costa *et al*., 2004) و چگالی سلولی آن می‌باشد.

با بررسی مطالعات انجام شده بر فرآیند بهینه‌سازی کشت ریزجلبک اسپیرولینا، به نظر می‌رسد که تاثیر فاکتور هوادهی کمتر مورد ارزیابی قرار گرفته است. به ویژه آنکه طبق مطالعات انجام شده، تناوب قطع و وصل هوادهی پیش از این در هیچ تحقیقی بررسی نشده است. همچنین با توجه به اینکه سهم عمده‌ای از هزینه تولید محصولات ریزجلبکی به فرآیند کشت آنها برمی‌گردد، کاهش هزینه این فرآیند تأیر مهمی در قابلیت صرفه اقتصادی محصول نهایی خواهد داشت. لذا در این تحقیق با استفاده از روش پاسخ سطح- طراحی نقاط مرکزی[1]، به بررسی تأثیر دو فاکتور سیکل یا تناوب هوادهی و رقت محیط کشت Zarrouk بر کمیت و کیفیت بیومس تولیدی در کشت محدود[2] ریزجلبک اسپیرولینا پرداخته شده است. روش پاسخ سطح، مجموعه‌ای از تکنیک‌های ریاضی و آماری است که برای طراحی آزمایشات، ایجاد مدل‌ها و آنالیز تأثیر فاکتورهای مستقل بسیار مناسب است. طراحی مرکزی مرکب (CCD)، روش مناسبی برای آزمایشات متوالی است که اطلاعات مستدلی را برای ارزیابی میزان انطباق به کمک تعداد کمتری از آنالیز فراهم می‌کند و بنابراین در مجموع، هزینه‌های کلی آنالیزها را کاهش می‌دهد (Sharma *et al*., 2009).

مواد و روش‌ها

انتخاب گونه ریزجلبکی و محیط کشت

نمونه ریزجلبک *Spirulina* از آبهای سواحل خلیج فارس جمع‌آوری شد و پس از انتقال به آزمایشگاه طی پاساژهای متوالی بر روی پلیت‌های آگار جداسازی به عمل آمد (به روش پلیت آگار) و کلنی‌های خالص بر روی پلیت‌های جداگانه کشت گردید (Andersen, 2005). سپس نمونه‌های خالص به محیط کشت تخصصی مایع زاروک جهت افزایش بیومس، منتقل شدند.

شرایط رشد

کشت‌ها به صورت محدود و در ارلن‌های ۵۰۰ mL انجام شد. نمونه‌ها تحت تابش دائمی نور سفید با شدتی معادل ۲۰۰۰ lux قرار گرفتند و روشنایی توسط شش لامپ مهتابی ۶۰w تامین می‌شد. درب ارلن‌ها توسط پنبه بسته و هوادهی با پمپ آکواریوم HAILEA 9620 و با شدت خروجی ۱۴ L/min انجام شد. دمای اتاق کشت ۲±۲۶ درجه سلسیوس تنظیم شد.

طراحی آزمایش

پارامتر سیکل هوادهی (زمان فواصل قطع و وصل هوادهی) با بازه تغییرات ۱۵ دقیقه تا ۱۲ ساعت و پارامتر غلظت محیط کشت Zarrouk با بازه تغییر ۲۰-۱۰۰٪ ، به عنوان دو متغیر مستقل در نظر گرفته شدند. جدول ۱ طراحی آزمایش با روش

1. RSM-CCD: Response Surface Methodology-Central Composite Design
2. Batch Culture

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2025-12-15]

[DOR: 20.1001.1.23222751.1394.5.2.9.2]

پاسخ سطح، طراحی مرکب مرکزی را برای این دو متغیر نشان می‌دهد. لازم به ذکر است که علاوه بر چهار نقطه مرکزی، چهار آزمایش ۵، ۸، ۹ و ۱۰ به ترتیب با شماره های ۱۴، ۱۶، ۱۳ و ۱۵ مجدداً تکرار شدند و از این بین نتایج آزمایش شماره ۱۴ به دلیل اختلاف فاحش، در آنالیزهای رگسیون اثر داده نشد.

سنجش‌های فیزیولوژیک

نرخ رشد نمونه جلبکی از طریق قرائت یک‌روز در میان میزان جذب نوری در طول موج ۷۵۰ nm طی ۱۳ روز به روش Soltani و همکاران (۲۰۰۶) اندازه‌گیری شد. برای سنجش مقدار کلروفیل به روش Marker (۱۹۷۲) پس از عصاره‌گیری با متانول، جذب نوری در طول موج ۶۶۵ nm خوانده و مقدار کلروفیل محاسبه گردید. فیکوبیلی پروتئین‌ها پس از شوک اسمزی استخراج و با روش طیف‌سنجی در فاز لگاریتمی در طول موج‌های ۵۶۲، ۶۱۵ ، ۶۵۲ و ۷۵۰nm اندازه‌گیری شدند (Bermejo *et al*., 2002).

آنالیز آماری

به منظور پردازش داده‌ها، اطلاعات به‌دست آمده توسط نرم‌افزارهایی مانند Excel و SPSS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. تمام سنجش‌ها با سه بار تکرار انجام و داده‌ها بصورت میانگین همراه انحراف معیار گزارش شده‌اند. ارزیابی معناداری با استفاده از آزمون T[3] انجام و مقادیر P کوچکتر از ۰/۰۵ معنادار فرض شد.

جدول ۱. مقادیر سیکل هوادهی و رقت محیط کشت در طراحی آزمایش با روش RSM-CCD

شماره آزمایش	رقت محیط کشت (٪)		تناوب هوادهی (ساعت)	
	مقدار سطحی $-\alpha<x_1<\alpha$	مقدار واقعی $۲۰<x_1<۱۰۰$	مقدار سطحی $-\alpha<x_2<\alpha$	مقدار واقعی $۰,۲۵<x_2<۱۲$
۱	-۱	۳۱/۷۲	-۱	۱/۹۷
۲	-۱/۴۱۴	۲۰	۰	۶/۱۳
۳	۱	۸۸/۲۸	-۱	۱/۹۷
۴	۰	۶۰	۰	۶/۱۳
۵	-۱	۳۱/۷۲	۱	۱۰/۲۸
۶	۰	۶۰	۰	۶/۱۳
۷	۰	۶۰	۰	۶/۱۳
۸	۰	۶۰	-۱/۴۱۴	۰/۲۵
۹	۰	۶۰	۱/۴۱۴	۱۲
۱۰	۱	۸۸/۲۸	۱	۱۰/۲۸
۱۱	۱/۴۱۴	۱۰۰	۰	۶/۱۳
۱۲	۰	۶۰	۰	۶/۱۳
۱۳	۰	۶۰	۱/۴۱۴	۱۲
۱۴	-۱	۳۱/۷۲	۱	۱۰/۲۸
۱۵	۱	۸۸/۲۸	۱	۱۰/۲۸
۱۶	۰	۶۰	-۱/۴۱۴	۰/۲۵

3. T Student's Test

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2025-12-15]

[DOR: 20.1001.1.23222751.1394.5.2.9.2]

نتایــج

رگرسیون چندگانه و مدل‌های پیش‌بینی پاسخ‌ها

با استفاده از آنالیز رگرسیون چندگانه، نتایج به دست آمده آزمایشگاهی با یک رابطه چندجمله‌ای مرتبه سوم تطبیق داده شد. فرم کلی توسط رابطه (۱) نشان داده شده است که در آن y_i بیانگر پاسخ متغیر، b_0 نشانگر مقدار ثابت عرض از مبدأ، b_i،b_{ii} ، b_{ij}، c_{ij}، c_{ji}، c_{ii} نشانگر ضرایب رگرسیون، n تعداد متغیرهای بررسی شده و X_i و X_j متغیرهای مستقل بررسی شده‌اند.

$$y_i = b_0 + \sum_{i=1}^{n} b_i X_i + \sum_{i=1}^{n} b_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^{n} b_{ij} X_i X_j + \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^{n} c_{ij} X_i^2 X_j^1 + \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^{n} c_{ji} X_i^1 X_j^2 + \sum_{i=1}^{n} c_{ii} X_i^3 \quad (1)$$ رابطه

در این مطالعه متغیرهای سیکل هوادهی و رقت محیط کشت مورد ارزیابی قرار گرفته و تأثیر آنها بر پاسخ‌های مختلفی شامل نرخ رشد مخصوص[۴] (SGR)، میزان وزن خشک[۵] (DW)، میزان کلروفیل (Chl) و میزان کل فیکوبیلی‌پروتئین[۶] (PBP) بررسی شده است. جدول ۲ مقادیر ضرایب مندرج در رابطه (۱) را برای هریک از پاسخ‌های مورد اشاره نشان می‌دهد. تا حد امکان ساده‌سازی مدل با حذف ترم‌های کم‌اهمیت آماری انجام شده است. مقدار R^2 برای مدل و مقدار P[۷] (با سطح اطمینان ۹۵٪) برای مدل و عدم انطباق[۸] جهت سنجش معناداری مدل‌ها در جدول آورده شده است.

در جدول ۳ مقادیر پیش‌بینی شده پاسخ‌ها در مقایسه با مقادیر واقعی حاصل از نتایج آزمایشگاهی و میزان باقیمانده مربوط به هر پاسخ آورده شده است. با توجه به مقادیر R^2 و تفاوت مقادیر واقعی و پیش‌بینی شده از دو جدول ۲ و ۳ مشخص است که مدل‌های ارائه شده برای پاسخ‌های ذکر شده تطابق مطلوبی با مقادیر واقعی دارند.

تأثیر متغیرهای مستقل بر نرخ رشد مخصوص

شکل ۱ تأثیر فاکتورهای غلظت محیط کشت و سیکل هوادهی را بر میزان نرخ رشد مخصوص نشان می‌دهد. همانطور که در این شکل مشخص است، در یک غلظت ثابت از محیط کشت، با افزایش تناوب هوادهی، میزان نرخ رشد مخصوص افزایش می‌یابد. همچنین در یک سیکل ثابت هوادهی نیز با زیاد شدن غلظت محیط کشت و نزدیکی به ۱۰۰٪، نرخ رشد مخصوص زیاد می‌گردد. در واقع برای دستیابی به یک نرخ رشد ثابت، می‌توان افزایش سیکل هوادهی را جایگزین غلظت محیط کشت نمود و با افزایش سیکل، محیط کشت را رقیق‌تر ساخت بی‌آنکه کاهشی در میزان نرخ رشد مخصوص روی دهد.

جدول ۱. ضرایب مدل‌های رگرسیون مرتبه ۳ رابطه (۱) پاسخ‌های مختلف بر حسب دو متغیر مستقل سیکل هوادهی (hr) و غلظت محیط کشت (٪)

پاسخ	b_0	b_1	b_2	b_{11}	b_{22}	b_{12}	c_{12}	c_{21}	c_{11}	c_{22}	R^2	P-model	P-L o F
SGR	۰/۴۰۱۰	-۰/۰۹۸۴	-۰/۰۱۲۷	۰/۰۱۸۶	۰/۰۰۰۲	۰/۰۰۰۰	۰	۰	-۰/۰۰۰۹	۰	۰/۹۲۳۸	۰/۰۰۰۴	۰/۳۰۳۶
DW	۲/۴۴۹۱	-۰/۹۱۵۸	۰/۰۴۹۵	۰/۱۷۲۵	۰/۰۰۰۹	-۰/۰۰۰۴	۰	۰	-۰/۰۰۸۱	۰	۰/۹۴۷۰	۰/۰۰۰۶	۰/۴۳۶۵
Chl	-۰/۱۱۸۱	۱/۶۸۷۸	۰/۲۳۷۸	-۰/۱۲۶۱	-۰/۰۰۲۳	۰/۰۰۰۰	۰	۰	۰/۰۰۰۰	۰	۰/۸۰۴۴	۰/۰۰۱۴	۰/۳۳۵۶
PBP	۲۶/۵۰۵۳	-۱۰/۴۱۳۲	۱/۰۸۵۸	۰/۶۹۱۵	-۰/۰۰۹۴	۰/۰۳۲۴	۰	۰	۰	۰	۰/۸۳۰۷	۰/۰۰۲۸	۰/۶۶۲۰

4. Specific Growth Rate
5. Dry Weight
6. Pycobiliprotein
7. P-Value
8. Lack of Fit

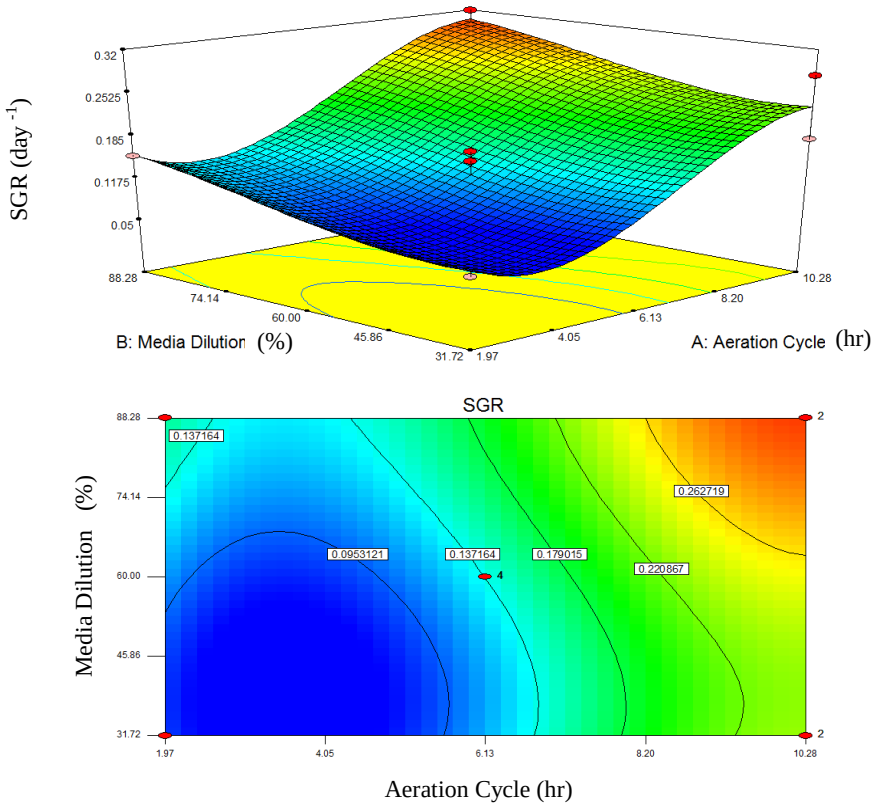
[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2025-12-15]

[DOR: 20.1001.1.23222751.1394.5.2.9.2]

جدول ۳. مقایسه مقادیر پیش‌بینی و واقعی مدل‌های جدول ۱ در هر آزمایش

شماره آزمایش		۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰	۱۱	۱۲	۱۳	۱۴	۱۵	۱۶
SGR (d^{-1})	A[۱]	۰/۰۷۱	۰/۱۴۱	۰/۱۵۳	۰/۱۴۵	۰/۱۸۰	۰/۱۶۰	۰/۱۴۵	۰/۲۱۹	۰/۲۱۹	۰/۳۲۰	۰/۱۹۸	۰/۱۰۰	۰,۲۳۶	۰,۲۸۰	۰,۲۷۸	۰,۲۳۶
	P[۲]	۰/۰۷۶	۰/۱۲۸	۰/۱۷۵	۰/۱۳۸	۰/۲۰۲	۰/۱۳۸	۰/۱۳۸	۰/۲۲۱	۰/۲۲۱	۰/۳۰۱	۰/۱۸۴	۰/۱۳۸	۰,۲۲۱	۰,۲۰۲	۰,۳۰۱	۰,۲۲۱
	R[۳]	۰/۰۰	۰/۰۱	−۰/۰۲	۰/۰۱	−۰/۰۲	۰/۰۲	۰/۰۱	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۲	۰/۰۱	−۰/۰۴	۰,۰۲	۰,۰۸	−۰,۰۲	۰,۰۲
DW (mg/mL)	A	۰/۳۶۲	۰/۷۷۴	۰/۷۶۲	۰/۸۵۳	۱/۴۳۰	۰/۶۵۷	۰/۵۲۶	۱/۵۲۴	۱/۲۹۷	۱/۵۶۸	۰/۹۲۹	۰/۳۶۳	۱,۲۶۹	۲,۰۹۵	۱,۷۴۹	۱,۵۹۸
	P	۰/۴۱۳	۰/۷۲۳	۰/۸۱۳	۰/۶۰۰	۱/۴۸۱	۰/۶۰۰	۰/۶۰۰	۱/۵۳۵	۱/۲۵۷	۱/۶۸۴	۰/۸۷۸	۰/۶۰۰	۱,۲۵۷	۱,۴۸۱	۱,۶۸۴	۱,۵۳۵
	R	−۰/۰۵	۰/۰۵	−۰/۰۵	۰/۲۵	−۰/۰۵	۰/۰۶	−۰/۰۷	−۰/۰۱	۰/۰۴	−۰/۱۲	۰/۰۵	−۰/۲۴	۰,۰۱	۰,۶۱	۰,۰۶	۰,۰۶
Chl (µg/mg DW)	A	۷/۱۴۰	۹/۷۴۴	۴/۱۱۶	۱۰/۲۳۲	۸/۶۲۷	۱۰/۲۶۸	۱۳/۱۷۲	۷/۴۶۰	۸/۶۲۳	۶/۶۳۴	۷/۵۲۲	۱۱/۶۴۲	۸/۰۴۵	۹/۵۶۳	۵/۰۶۵	۵/۸۷۴
	P	۷/۹۰۵	۹/۳۰۸	۵/۴۶۸	۱۱/۳۲۹	۹/۰۹۳	۱۱/۳۲۹	۱۱/۳۲۹	۶/۱۳۶	۷/۸۱۷	۶/۶۵۶	۵/۸۶۱	۱۱/۳۲۹	۷/۸۱۷	۹/۰۹۳	۶/۶۵۶	۶/۱۳۶
	R	−۰/۷۶	۰/۴۴	−۱/۳۵	−۱/۱۰	−۰/۴۷	−۱/۰۶	۱/۸۴	۱/۳۲	۰/۸۱	−۰/۰۲	۱/۶۶	۰/۳۱	۰/۲۳	۰/۴۷	−۱/۵۹	−۰/۲۶
PBP (µg/mg DW)	A	۳۴/۹۶۱	۱۴/۶۲۱	۳۷/۴۹۷	۳۰/۲۸۸	۲۱/۲۵۳	۱۸/۵۳۷	۴۴/۱۳۲	۵۱/۸۱۶	۶۲/۸۰۳	۴۵/۴۵۹	۲۵/۷۱۸	۳۴/۸۸۰	۵۶/۳۶۸	۴۸/۵۶۱	۳۸/۲۴۰	۵۸/۷۳۷
	P	۳۵/۶۹۹	۱۰/۵۹۷	۳۷/۰۸۶	۳۱/۹۵۹	۲۸/۰۸۸	۳۱/۹۵۹	۳۱/۹۵۹	۵۵/۸۲۷	۵۵/۸۲۴	۴۴/۶۹۳	۲۳/۳۱۹	۳۱/۹۵۹	۵۵/۸۲۴	۲۸/۰۸۸	۴۴/۶۹۳	۵۵/۸۲۷
	R	−۰/۷۴	۴/۰۲	۰/۴۱	−۱/۶۷	−۶/۸۴	−۱۳/۴۲	۱۲/۱۷	−۴/۰۱۰	۶/۹۸	۰/۷۷	۲/۴۰	۲/۹۲	۰/۵۴	۲۰/۴۷	−۶/۴۵	۲/۹۱

A[۱] : مقدار واقعی P[۲] : مقدار پیش‌بینی مدل R[۳] : میزان باقیمانده (تفاوت پیش‌بینی و واقعی)



شکل ۱. تأثیر فاکتورهای غلظت محیط کشت و سیکل هوادهی بر میزان نرخ رشد مخصوص؛ بالا: تصویر سه‌بعدی، پایین: کانتورهای دوبعدی

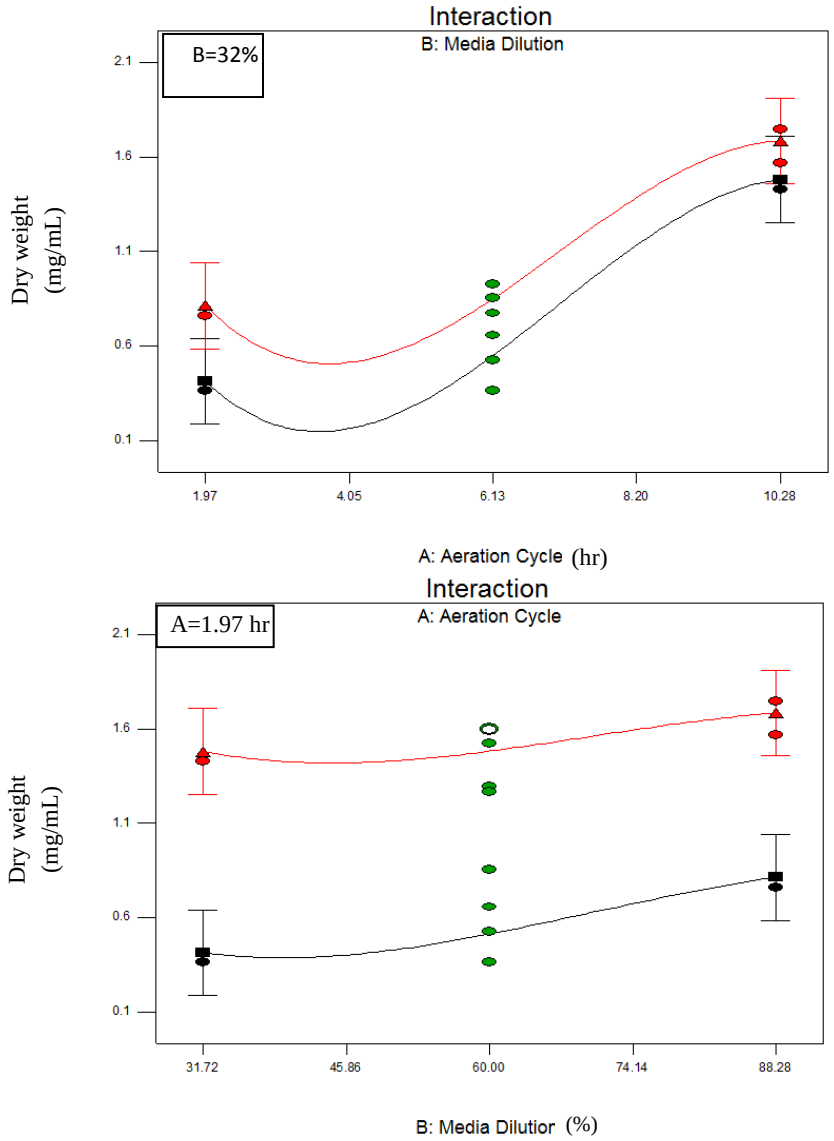
[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2025-12-15]

[DOR: 20.1001.1.23222751.1394.5.2.9.2]

تأثیر متغیرهای مستقل بر میزان وزن خشک

همانطور که از جدول ۲ مشخص است، مدل رگرسیون میزان وزن خشک، بیشترین R^2 را داراست که این مطلب بیانگر قدرت پیش‌بینی مناسب آن است. با توجه به تصاویر درج شده در شکل ۲، تأثیر سیکل هوادهی بر میزان وزن خشک حاصله زیاد بوده و بیشینه میزان وزن خشک در تناوب‌های هوادهی ۱۲ ساعته به دست آمده است. هرچند اثرگذاری میزان رقت محیط‌کشت بر میزان وزن خشک مشابه تأثیر سیکل هوادهی مستقیم است، اما شدت آن به مراتب کمتر است.

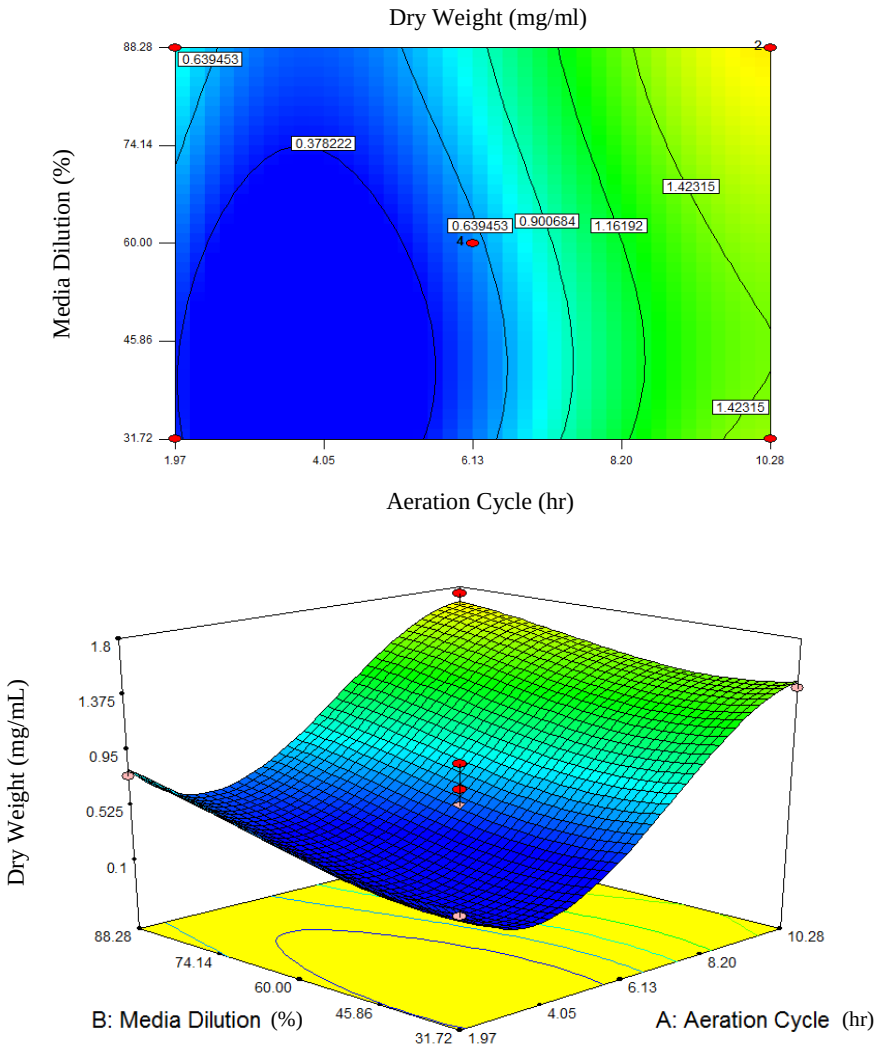
نمودارهای سه بعدی و کانتورهای رسم شده در شکل ۳ نیز به خوبی نشانگر نقش پررنگ‌تر فاکتور تناوب هوادهی در میزان وزن خشک است. لازم به ذکر است که در تیمارهای تحت سیکل‌های هوادهی بالاتر، میزان تراکم و تشکیل لخته‌های جلبکی بزرگتر، به مراتب بیشتر بوده و تمامی این نمونه‌ها قبل از انجام سنجش‌های اشاره شده مانند اندازه‌گیری چگالی نوری، کاملاً همگن می‌شدند.



شکل ۲. برهم‌کنش تأثیر فاکتورهای غلظت محیط و سیکل هوادهی بر میزان وزن خشک؛ بالا: اثر هوادهی، پائین: اثر محیط کشت

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2025-12-15]

[DOR: 20.1001.1.23222751.1394.5.2.9.2]

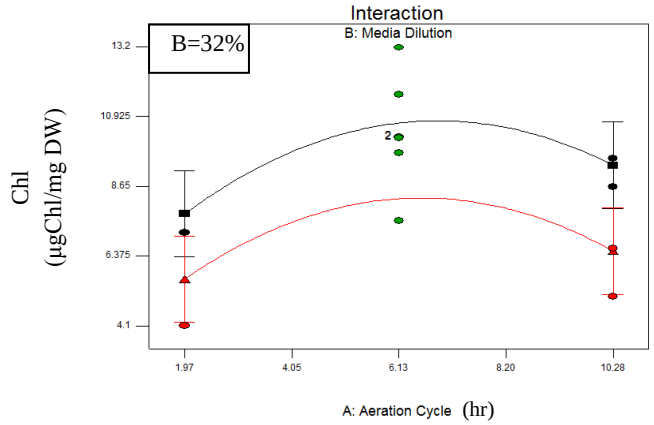


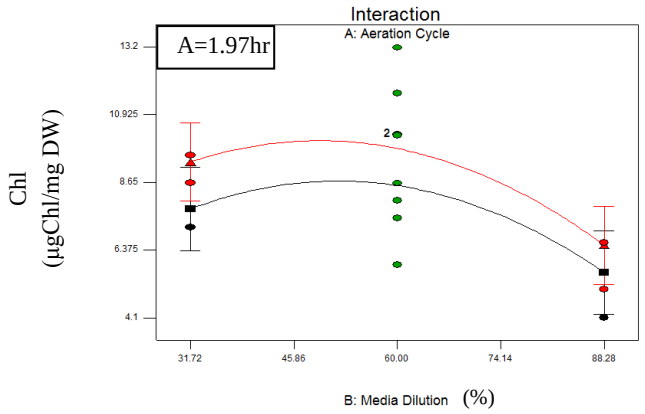
شکل ۳. تأثیر فاکتورهای غلظت محیط کشت و سیکل هوادهی بر میزان نرخ رشد مخصوص؛ بالا: کانتورهای دوبعدی، پائین: تصویر سه‌بعدی

تأثیر متغیرهای مستقل بر میزان کلروفیل

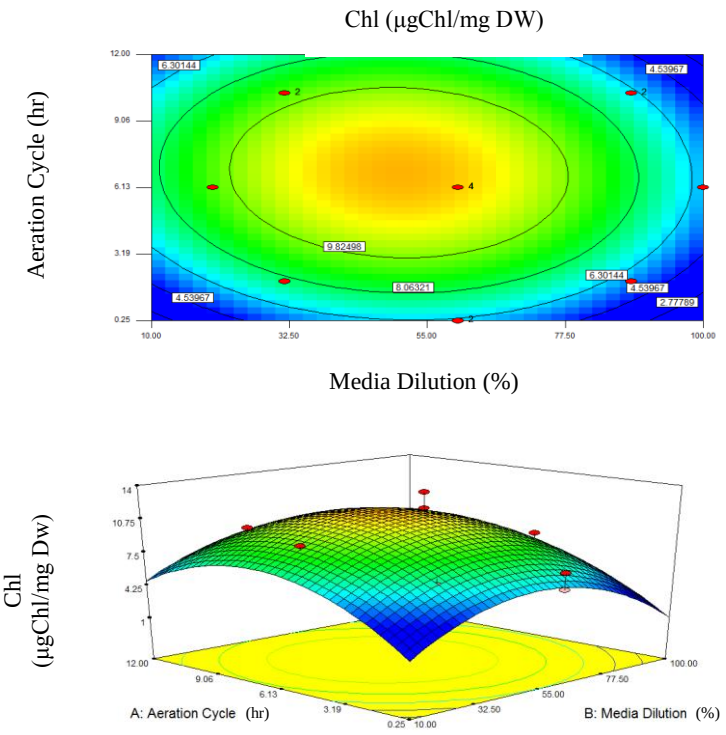
آنچه در شکل ۴ مشخص است، تأثیر اندرکنش دو فاکتور بر میزان کلروفیل می‌باشد. همانطور که در شکل۴ نشان داده شده است، غلظت محیط کشت تا حدود ۵۰٪ باعث افزایش میزان کلروفیل (در واحد بیومس تولیدی) شده و پس از آن موجب کاهش آن می‌گردد. این اثرگذاری در سیکل‌های هوادهی بزرگتر بیشتر است. همچنین افزایش سیکل هوادهی تا ۷ ساعت باعث افزایش اولیه کلروفیل و سپس کاهش دوباره آن می‌گردد. این اثرگذاری نیز در غلظت‌های پایین محیط کشت بیشتر است (شکل ۴). شکل ۵ تصویر سه بعدی و کانتور تأثیر اندرکنش دو فاکتور را بر میزان کلروفیل نشان می‌دهد. بیشترین میزان کلروفیل در نقطه‌ای که هر دو فاکتور در مقادیر میانی خود بوده و سیکل هوادهی ۶ ساعت و غلظت محیط کشت ۵۰٪ است دیده می‌شود.

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2025-12-15]
[DOR: 20.1001.1.23222751.1394.5.2.9.2]





شکل ۴. برهم‌کنش تأثیر فاکتورها بر میزان کلروفیل؛ بالا: اثر هوادهی، پائین: اثر محیط کشت



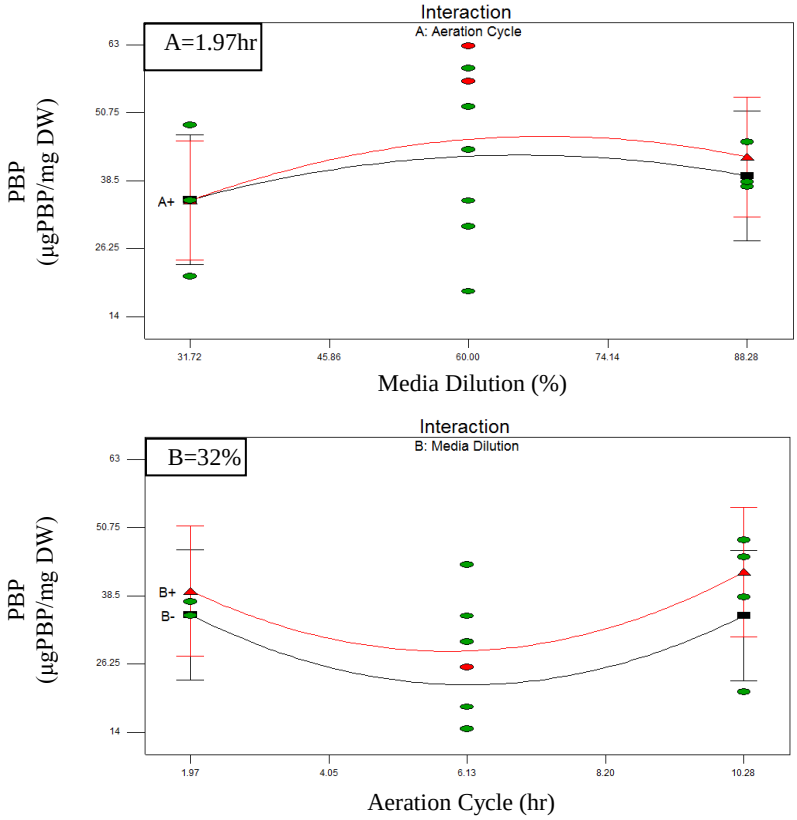
شکل ۵. تأثیر فاکتورهای غلظت محیط کشت و سیکل هوادهی بر میزان کلروفیل؛ بالا: کانتورهای دوبعدی، پائین: تصویر سه‌بعدی

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2025-12-15]

[DOR: 20.1001.1.23222751.1394.5.2.9.2]

تأثیر متغیرهای مستقل بر میزان کل فیکوبیلی پروتئین‌ها

نتایج حاکی از آن است که تأثیر سیکل هوادهی بر میزان فیکوبیلی‌پروتئین‌ها عکس اثر آن بر روی میزان کلروفیل است. همانطور که در شکل ۶ دیده می‌شود کمترین میزان فیکوبیلی‌پروتئین در سیکلی معادل ۷ ساعت به دست آمده است و با زیاد یا کم شدن مقدار سیکل هوادهی، میزان فیکوبیلی‌پروتئین زیاد می‌گردد و این اثرگذاری در غلظت‌های بالای محیط کشت بیشتر است. از سوی دیگر، هرچند تأثیر تغییرات رقت محیط کشت بر میزان فیکوبیلی‌پروتئین شکلی مشابه اثرگذاری این فاکتور بر میزان کلروفیل دارد اما با مقایسه شیب نمودارها مشخص می‌شود که کمیت این اثرگذاری نسبت به تأثیر بر میزان کلرفیل کمتر است. مقایسه شکل ۶ با شکل ۴ مؤید این نکته است. شکل ۷ با ارائه شمای سه‌بعدی و کانتورهای مربوطه، درک بهتری از اثرگذاری فاکتورهای مورد اشاره بر میزان فیکوبیلی‌پروتئین‌ها را نشان می‌دهد. به نظر می‌رسد بر خلاف فرآیند کلروفیل، برای دستیابی به بیشترین میزان فیکوبیلی‌پروتئین‌ها، نیازمند تنظیم فاکتورها در مقادیر ابتدایی یا انتهایی هستیم و این نکته در مورد فاکتور سیکل هوادهی بارزتر است.



شکل ۶. برهم‌کنش تأثیر فاکتورها بر میزان فیکوبیلی‌پروتئین؛ بالا: اثر محیط‌کشت، پائین: اثر هوادهی

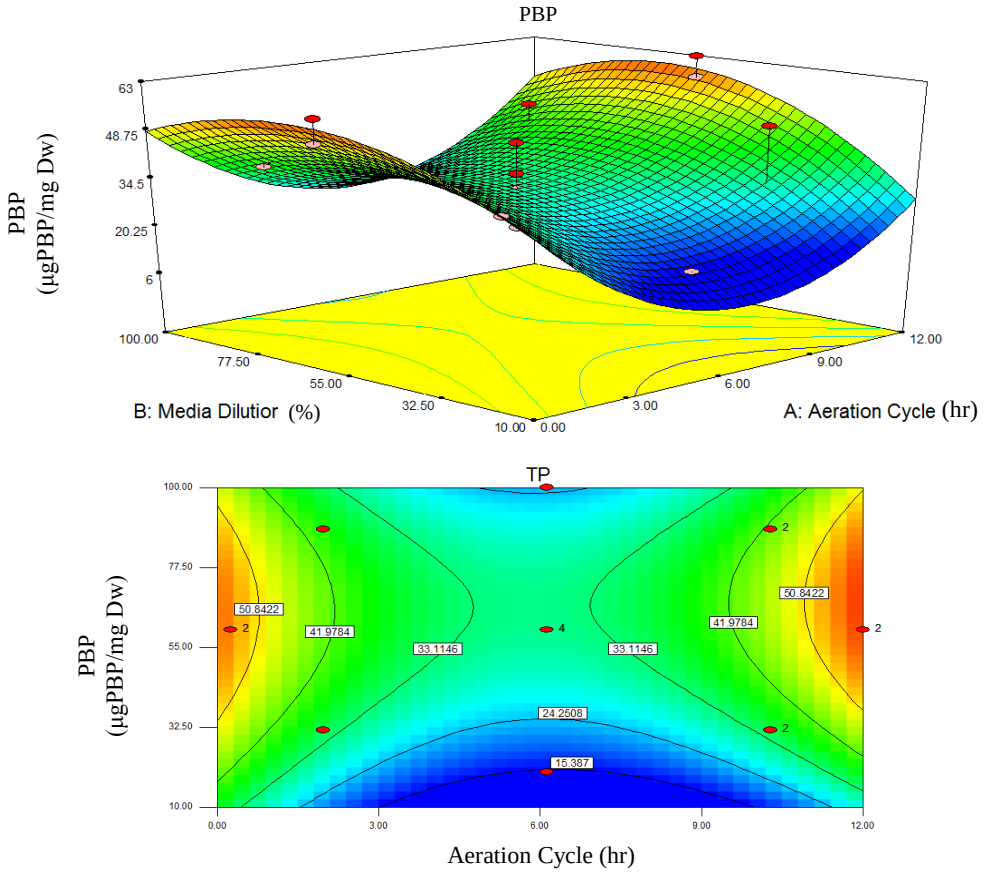
بحث

به طور کلی با توجه به نتایج بدست آمده می‌توان کیفیت اثرگذاری دو فاکتور سیکل هوادهی و رقت محیط‌کشت را به این شرح خلاصه کرد: افزایش تناوب هوادهی (سیکل‌های ۱۲ ساعته) و افزایش غلظت محیط کشت (تا ۱۰۰٪) هردو باعث افزایش میزان وزن خشک و نرخ رشد مخصوص می‌شوند. تأثیر بر میزان کلروفیل نیز در هردو فاکتور مشابه است؛ به این صورت که با افزایش تناوب هوادهی و افزایش غلظت تا مقادیر میانی میزان کلروفیل زیاد شده و در صورت ادامه افزایش فاکتورها کلروفیل کم می‌شود. در واقع بیشترین میزان کلروفیل در محدوده میانی مقادیر سیکل هوادهی (۶ ساعته) و غلظت (۵۰٪) روی می‌دهد. تاثیر غلظت محیط‌کشت بر میزان فیکوبیلی‌پروتئین‌ها مشابه میزان کلروفیل است اما اثرگذاری تناوب هوادهی بر میزان فیکوبیلی‌پروتئین دقیقاً عکس آن بوده و مقادیر میانی آن منجر به کمترین میزان پروتئین شده و سیکل‌های کوچک

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2025-12-15]

[DOR: 20.1001.1.23222751.1394.5.2.9.2]

(۱۵ دقیقه‌ای) و یا بزرگ (۱۲ ساعته) به بیشترین میزان پروتئین می‌انجامد. پس می‌توان گفت که ماهیت اثرگذاری این دو فاکتور در تمامی موارد یکسان و تنها بر پاسخ میزان فیکوبیلی‌پروتئین متفاوت است.



شکل ۷. تأثیر فاکتورها بر میزان فیکوبیلی‌پروتئین؛ بالا: کانتورهای دوبعدی، پائین: تصویر سه‌بعدی

بدیهی است با افزایش مواد مغذی، رشد بیشتر ریزجلبک‌ها مورد انتظار است و این امر چگونگی اثرگذاری غلظت محیط‌کشت بر نرخ رشد مخصوص و وزن خشک استحصالی را توجیه می‌کند (Davis *et al.*, 2009; Kuffner and Valerie, 2001) اما با توجه به نتایج، اگر هدف اصلی هوادهی را اختلاط سیستم در نظر بگیریم، به نظر می‌رسد در تناوب‌های بالای هوادهی، با توجه به قطع طولانی‌تر آن، فرصت و امکان تغذیه بیشتری برای سیانوباکتری‌ها فراهم می‌گردد که منجر به افزایش نرخ رشد و میزان وزن خشک در تناوب‌های بالاتر هوادهی می‌گردد. همچنین یکی دیگر از پیامدهای هوادهی، اختصاص نور بیشتر به بیومس است که در سیکل‌های بالای هوادهی (۱۲ ساعته) به دلیل سکون طولانی محیط، ریزجلبک‌ها روی هم انباشته شد و نور کمتری به مرکز آن نفوذ می‌کند. با توجه به آنکه اساساً جلبک‌های سبزآبی ماهیتی سایه‌پسند دارند (Soltani Ibelings, 1996 *et al.*, 2006;)، می‌توان در این شرایط افزایش شاخص‌های کمی رشد را انتظار داشت. نتایج به دست آمده از نظر شرایط بهینه نوری با نتایج Soltani و همکاران (2006) مطابقت دارد. اما از منظر کیفی شرایط متفاوت است. به نظر می‌رسد به لحاظ کمیت ترکیبات مغذی مورد نیاز برای دستیابی به بیشترین میزان کلروفیل و فیکوبیلی‌پروتئین، رقت‌های میانی مطلوب‌تر است که این مطلب را می‌توان به اهمیت حضور برخی عناصر در ساختار کلروفیل، مانند تتراپیرول‌های منیزیم نسبت داد که به نظر می‌رسد مقادیر میانی مواد معدنی بهینه‌ترند. با توجه به آنکه فیکوبیلی‌پروتئین‌ها رنگدانه‌های کمکی بوده و در مواقع کاهش کلروفیل برای جبران نور دریافتی تشکیل می‌شوند، می‌توان تأثیر عکس هوادهی بر میزان کلروفیل و فیکوبیلی‌پروتئین را توجیه کرد. با

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2025-12-15]

[DOR: 20.1001.1.23222751.1394.5.2.9.2]

فرض اینکه مواد مغذی مورد نیاز برای تشکیل کلروفیل و فیکوبیلی‌پروتئین‌ها یکسان باشد و به نوعی این دو شاخص در رقابت با یکدیگر باشند، به نظر می‌رسد برتری تشکیل کلروفیل در سیکل‌های میانی و به نوعی اعتدال سیستم است و هرگونه خللی در این اعتدال چه به صورت تناوب‌های سریع هوادهی و چه به صورت تناوب‌های طولانی، موجب سنگینی کفه به سمت تشکیل فیکوبیلی‌پروتئین‌ها خواهد شد و در مقادیر ابتدایی یا انتهایی سیکل هوادهی (به ترتیب تناوب‌ها ۱۵ دقیقه‌ای یا ۱۲ ساعته) با کاهش کلروفیل، فیکوبیلی‌پروتئین‌ها ضمن افزایش به عنوان آنتن‌های گیرنده نور به تهیه انرژی لازم فتوسنتز می-پردازند
(Taiz and Zeiger, 2015). هرچند سایر عوامل نیز در این امر دخیل هستند. مثلاً میزان کربن معدنی محلول[9] از عوامل مهم اثرگذار بر رشد ریزجلبک‌هاست که این اثرگذاری در سوش های مختلف متفاوت است و خود نیز متاثر از میزان هوادهی سیستم می‌باشد.

نسبت میزان فیکوبیلی‌پروتئین به میزان کلروفیل (PBP/Chl) از شاخص‌هایی است که می‌تواند ارتباط بین فتوسیستم I و II را مشخص کند و با توجه به نتایج، در مقادیر میانی هردو فاکتور، بیشترین میزان کلروفیل و در نتیجه کمترین حدود این شاخص حاصل می‌شود و در نقاط ابتدایی یا انتهایی سیکل هوادهی، با افزایش میزان فیکوبیلی‌پروتئین و کاهش کلروفیل میزان این شاخص به بیشترین حد خود می‌رسد.

به طور کلی در تمام پاسخ‌های مورد اشاره اثرگذاری پارامتر تناوب هوادهی بیش از تأثیر میزان رقت محیط‌کشت است و این مطلب بیانگر این نکته مهم است که علیرغم آنکه پیش از این فاکتور سیکل هوادهی کمتر مورد بررسی و مطالعه قرار گرفته است، اما می‌توان با توجه به هدف مورد نظر، این فاکتور را جایگزین رقت محیط‌کشت نمود. مثلاً در فرآیند دستیابی به وزن خشک بالاتر، ضمن کاهش غلظت محیط‌کشت به منظور کاهش هزینه‌ها، کاهش بیومس ناشی از آن با افزایش تناوب هوادهی قابل جبران است. در واقع به بهره‌گیری مناسب از فاکتور تناوب هوادهی، کاهش هزینه‌های کشت در اثر رقیق‌سازی محیط کشت ایجاد خواهد شد که منجر به کاهش هزینه‌های کلی فرآیندهای آتی نظیر تولید سوخت‌زیستی یا مکمل‌های غذایی و ... خواهد شد.

همانطور که اشاره شد، اثرگذاری فاکتور تناوب هوادهی در حیطه بررسی‌های انجام شده بر مطالعات سایر محققین مورد بررسی قرار نگرفته است؛ همچنین هرچند مطالعات زیادی بر نحوه اثرگذاری ترکیبات مختلف بر کمیت و کیفیت بیومس تولیدی انجام شده (Azma *et al.*, 2011; Rodrigues *et al.*, 2010; Dragone *et al.*, 2011; Soltani *et al.*, 2006) اما در مورد رقیق‌سازی محیط کشت Zarrouk این تلاش‌ها بسیار محدود است. به عنوان نمونه می‌توان به تحقیق انجام شده توسط Radmann و همکاران (۲۰۰۷) اشاره کرد که در طی آن کشت محدود تکرارشونده[10] و جایگزینی درصدی از مخلوط با محیط کشت تازه وقتی که بیومس به غلظت مشخصی رسیده باشد گونه اسپیرولینا مورد بهینه‌سازی قرار گرفته و با انتخاب مناسب دو فاکتور نرخ تجدید و غلظت مخلوط بیومس، کاهش رقت محیط‌کشت تا میزان ۲۰٪ حاصل شده است. به عنوان نمونه دیگری از تحقیقات صورت گرفته در راستای ارتقاء محیط‌کشت Zarrouk و جایگزینی ترکیبات آن با مواد و ترکیبات ارزان‌تر و تجاری‌تر برای کشت اسپیرولینا می‌توان به تحقیقات Madkour و همکاران (۲۰۱۲) و Raoof و همکاران (۲۰۰۶) اشاره کرد. با توجه به این مطالعات به نظر می‌رسد رقیق‌سازی محیط کشت و بهره‌گیری از فاکتور تناوب هوادهی برای جبران آن می‌تواند روش مناسبی جهت کاهش هزینه‌های کشت انواع گونه‌های ریزجلبکی باشد که مطالعات بیشتر بر روی این فاکتور می‌تواند به تبیین دقیق‌تر موضوع کمک کند.

9. DIC: Dissolved Inorganic Carbon
10. Repeated Batch

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2025-12-15]
[DOR: 20.1001.1.23222751.1394.5.2.9.2]

منابــع

Andersen, R.A. 2005. Algal culturing techniques. 1st edition. Elsevier Academic Press. 596 p.

Azma, M., Mohamed, M., Mohamad, R. Rahim, R., Ariff, A. 2011. Improvement of medium composition for heterotrophic cultivation of green microalgae, *Tetraselmis suecica*, using response surface methodology. Biochemical Engineering Journal. 53(2): 187-195.

Bermejo, R.N.R., Alva´rez-Pez, J.M., Acie´n Ferna´ndez, F.G., Molina Grima, E. 2002. Recovery of pure B-phycoerythrin from the microalga *Porphyridum Cruentum*. Journal of Biotechnology. 93(1): 73-85.

Çelekli, A., Dönmez, G. 2006. Effect of pH, light intensity, salt and nitrogen concentration on growth and b-carotene accumulation by a new isolate of *Dunaliella* sp. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 22(2): 183-189.

Çelekli, A., Yavuzatmaca, M. 2009. Predictive modeling of biomass production by *Spirulina platensis* as function of nitrate and NaCl concentrations. Bioresource Technology. 100(5): 1847-1851.

Çelekli, A., Yavuzatmaca, M., Bozkurt, H. 2009. Modeling of biomass production by *Spirulina platensis* as function of phosphate concentrations and pH regimes. Bioresource Technology. 100(14): 3625-3629.

Colla, L.M., Reinehr, C.O., Reichert, C., Costa, J.A.V. 2007. Production of biomass and nutraceutical compounds by *Spirulina platensis* under different temperature and nitrogen regimes. Bioresource Technology. 98(7): 1489-1493.

Costa, J.A.V., Colla, L.M., Duarte, P.F. 2004. Improving *Spirulina platensis* biomass yield using a fed-batch process. Bioresource Technology. 92(3): 237-241.

Davis, T.W., Berry, D.L., Boyer, G.L., Gobler, C.J. 2009. The effects of temperature and nutrient on the growth and dynamics of toxic and non-toxic strains of *microcyystis* during cyanobacteria bloom. Harmful Algae. 8(5): 715-725.

Dragone, G., Fernandes, B., Abreu, A.,Vicente, A., Teixeira, J. 2011. Nutrient limitation as a strategy for increasing starch accumulation in microalgae. Applied Energy. 88(10): 3331-3335.

Ibelings, B.W. 1996. Changes in photosynthesis in response to combined irradiance and temperature stress in cyanobacterial surface waterblooms. Journal of Phycology. 32(4): 549-557.

Kuffner, I.B., Valerie, J.P. 2001. Effects of nitrate, phosphate and iron on the growth on microalgae and benthic cyanobacteria from cocos lagoon, guam. Marine Ecology Progress Series. 222: 63-72.

Li, Z.Y., Guo, S.Y., Li, L., 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.

Lodi, A., Soletto, D., Solisio, C., Converti, A. 2008. Chromium (III) removal by *Spirulina platensis* biomass. Chemical Engineering Journal. 136(2): 151-155.

Madkour, F.F., Kamil A.E.W., Nasr, H.S. 2012. Production and nutritive value of *Spirulina platensis* in reduced cost media. Egyptian Journal of Aquatic Research. 38(1): 51-57.

Marker, A.F.H. 1972. The use of acetone and methanol in the estimation of chlorophyll in the presence of phaeophytin. Freshwater Biology. 2(4): 361-385.

Ogbonda, K.H., Aminigo, R.E., Abu, G.O. 2007. Influence of temperature and pH on biomass production and protein biosynthesis in a putative *Spirulina* sp. Bioresource Technology. 98(11): 2207-2211.

Pane, L., Solisio, C., Lodi, A., Mariottini, G.L., Converti, A. 2008. Effect of extracts from *Spirulina platensis* bioaccumulating cadmium and zinc on L929 cells. Ecotoxicology and Environmental Safety. 70(1): 121-126.

Pulz, O., Gross, W. 2004. Valuable products from biotechnology of microalgae. Applied Microbiology and Biotechnology. 65(6): 635-648.

Radmann, E.M., Reinehr, C.O, Costa, J.A.V. 2007. Optimization of the repeated batch cultivation of microalga *Spirulina platensis* in open raceway ponds. Aquaculture. 265(1): 118-126.

Raoof, B., Kaushik, B.D., Prasanna, R. 2006. Formulation of a low-cost medium for mass production of *Spirulina*. Biomass and Bioenergy. 30(6): 537-542.

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2025-12-15]

[DOR: 20.1001.1.23222751.1394.5.2.9.2]

Rodrigues, M., Ferreira, L., Converti, A., Sato, S., Carvalho, J. 2010. Fed-batch cultivation of *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis*: Potassium nitrate and ammonium chloride as simultaneous nitrogen sources. Bioresource Technology. 101(12): 4491-4498.

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.

Sharma, S. Malik, A. Satya, S. 2009. Application of response surface methodology (RSM) for optimization of nutrient supplementation for Cr (VI) removal by *Aspergillus lentulus* AML05. Journal of Hazardous Materials. 164(2): 1198-1204.

Soltani, N., Khavari-Nejad, R., Tabatabaei Yazdi, M., Shokravi, S., Fernandez Valiente, E. 2006. Variation of nitrogenase activity photosynthesis and pigmention of cyanobacterium *Fischerella ambigua* strain FS18 under different irradiance and pH. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 22(6): 571-576.

Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E., Isabert, A. 2006. Commercial applications of microalgae (review). Journal of Bioscience and Bioengineering. 101(2): 87-96.

Taiz, L., Zeiger, E. 2015. Plant physiology. 6th edition. Sinauer Associates Inc. 761 p.

Vonshak, A. 1997. *Spirulina platensis (Arthrospira)*: Physiology, Cell-Biology and Biotechnology.1ST edition. CRC Press. 233 p.

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2025-12-15]

[DOR: 20.1001.1.23222751.1394.5.2.9.2]