



## Optimization of industrial chemicals culture medium for the cultivation of microalgal consortium as biological fertilizer

Sasan Ghobadian\*<sup>1</sup>, Neda Solatani<sup>2</sup>, Pirooz Shokri Khatibi<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Department of Civil Engineering, Faculty of Civil Engineering and Architecture, Malayer University, Malayer, Iran, Email: s.ghobadian@malayeru.ac.ir

<sup>2</sup> Department of Research and Development, Afaghzist Company, Email: Soltani6@yahoo.com

<sup>3</sup> Department of Biosystems Engineering, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran, Email: pirooz.shokri@modares.ac.ir

### Article type:

Research article

### Abstract

With a look at the fundamental concepts of sustainable development, the increasing need for food resources alongside the environmental hazards of using chemical fertilizers highlights the necessity of producing organic fertilizers, especially utilizing microalgae as efficient biological cell factories. In this study, seeking to enhance productivity of algal consortium culture (parallel research has proved its significant role in the growth and development of agricultural products), optimization of the BG11 culture medium was considered based on four combinations of  $K_2HPO_4$ , NaCl,  $CaCl_2$  and  $FeNH_4$  Cit. The response surface methodology was employed to design the factors and analyze the responses. Dry weights on days 4, 8, 11 and 15 of cultivation were measured; Specific growth rates and chlorophyll levels calculation were analyzed. The maximum dry weight of 1.15 mg/L was obtained with the lowest salinity, while other factors fluctuated within intermediate ranges. The strong interaction of nutrients and the sensitivity of specific growth rates to this interaction were evident. The highest chlorophyll levels were achieved with intermediate levels of  $K_2HPO_4$  alongside the lowest levels of other factors. Based on the results, maintaining balance among the components appears to be more effective than consuming higher amounts of them. With this balance, it is possible to achieve the desired economic savings in cultivation costs through reduced consumption and increased productivity.

### Article history

Received: 03.03.2024

Revised: 05.04.2024

Accepted: 13.05.2024

Published: 21.06.2024

### Keywords

Microalgae cultivation

Chlorophyll

Biofertilizer

BG11 culture medium

Specific growth rate

**Cite this article as** Ghobadian, S., Solatani, N., Shokri Khatibi, P. (2023). The effect of co-inoculation of bradyrhizobium and mycorrhizal species on physiological traits and grain yield of soybean (*Glycine max* L.) under drought stress. *Journal of Plant Environmental Physiology*, 19(2): 87-102.



©The author(s)

Publisher: Islamic Azad University, Gorgan branch

## بهینه‌سازی محیط کشت BG11 جهت کشت کنسرسیوم جلبکی با کاربری کود بیولوژیکی

ساسان قبادیان<sup>۱\*</sup>، ندا سلطانی<sup>۲</sup>، پیروز شکری خطیبی<sup>۳</sup>

<sup>۱</sup> گروه مهندسی عمران، دانشکده مهندسی عمران و معماری، دانشگاه ملایر، ملایر، ایران، رایانامه: s.ghobadian@malayeru.ac.ir

<sup>۲</sup> گروه تحقیق و توسعه، شرکت آفاق نگران زیست گستر، تهران، ایران، رایانامه: [soltani6@yahoo.com](mailto:soltani6@yahoo.com)

<sup>۳</sup> گروه مهندسی مکانیک بیوسیستم، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران، رایانامه: pirooz.shokri@modares.ac.ir

### چکیده

### نوع مقاله:

مقاله پژوهشی

با نگاه به مفاهیم اصلی توسعه پایدار، نیاز روزافزون به منابع غذایی در کنار مضرات محیط زیستی بکارگیری کودهای شیمیائی، لزوم تولید کودهای زیستی آنهم با بهره‌گیری از ریزجلبک‌ها به عنوان کارخانه‌های سلولی بیولوژیکی کارآمد را روشن می‌سازد. در این پژوهش با هدف ارتقاء بهره‌وری جهت کشت تجاری یک کنسرسیوم جلبکی (که نقش موثر آن در رشد و نمو محصولات کشاورزی در پژوهش موازی اثبات شده) بهینه‌سازی محیط کشت BG11 با تکیه بر چهار ترکیب  $CaCl_2$ ،  $NaCl$ ،  $K_2HPO_4$  و  $FeNH_4Cit$  مد نظر قرار گرفت. از روش سطح پاسخ برای طراحی فاکتورها و تحلیل پاسخ‌ها استفاده شد و سنجش‌های وزن خشک در روزهای ۴، ۸، ۱۱ و ۱۵ کشت همراه با محاسبه نرخ رشد مخصوص و میزان کلروفیل انجام شد. بیشترین میزان وزن خشک ۱/۱۵ میلی گرم بر لیتر در آزمایشی با کمترین میزان شوری به دست آمد در حالیکه سایر فاکتورها در مقادیر میانی بازه تغییرات خود قرار داشتند. اندرکنش شدید مواد مغذی و حساسیت نرخ رشد مخصوص نسبت به این اندرکنش مشهود بود. بیشترین میزان کلروفیل، در مقادیر میانی  $K_2HPO_4$  در کنار کمترین مقدار سایر فاکتورها به دست آمد. بر اساس نتایج، بدلیل اثرگذاری شدید مواد بر روی یکدیگر و تعامل پیچیده بین عوامل محیطی و فیزیولوژی ارگانسیم‌های فتوسنتزی، به نظر می‌رسد حفظ تعادل بین ترکیبات موثرتر از مصرف مقادیر بالاتر آنها باشد و با بهره‌گیری از این تعادل می‌توان با کاهش مصرف و افزایش بهره‌وری، صرفه‌جویی اقتصادی مورد نظر در هزینه کشت را انجام داد.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۱۲/۱۳

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۳/۰۱/۱۷

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۲/۲۴

تاریخ چاپ: ۱۴۰۳/۰۴/۰۱

### واژه‌های کلیدی:

کشت ریزجلبک

کلروفیل

کود زیستی

محیط کشت BG11

نرخ رشد مخصوص

استاد: قبادیان، ساسان؛ سلطانی، ندا؛ شکری خطیبی، پیروز. (۱۴۰۳). بهینه‌سازی محیط کشت BG11 جهت کشت کنسرسیوم جلبکی با

کاربری کود بیولوژیکی. فیزیولوژی محیطی گیاهی، ۱۹(۲)، ۱۰۲-۸۷.

ناشر: دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرمان

© نویسنده‌گان.



مقدمه

تولید و کاربرد کودهای مصنوعی، آفت‌کش‌ها و سایر مواد شیمیائی جهت پاسخ به نیاز فزاینده مواد غذایی در کنار افت حاصلخیزی خاک بواسطه تغییرات اقلیم و برداشت بی‌رویه، نیاز به بهره‌گیری از کودهای زیستی را به عنوان جایگزین‌های سازگار با محیط زیست برای مواد شیمیائی مصنوعی روشن می‌سازد (Das et al., 2019). در این بین ریزجلبک‌ها به عنوان کارخانه‌های سلولی بیولوژیکی کارآمد توان تولید مقادیر بالائی از محصولات بیوشیمیایی مانند کربوهیدرات‌ها، پروتئین‌ها و لیپیدها و همچنین متابولیت‌های ثانویه مختلف با ارزش بالا را در دوره‌های زمانی کوتاه دارند. به همین دلیل منبع مناسبی برای مکمل‌های غذایی، کودهای زیستی و بیومواد مفید هستند (Sathasivam et al., 2019) که در بسیاری از حوزه‌های صنعتی و تجاری کاربری دارند. پژوهش‌های زیادی بر روی انواع گونه‌های ریزجلبکی جهت بکارگیری به عنوان بهبوددهنده‌های خاک صورت گرفته که بهره‌گیری از ریزجلبک *Scenedesmus* برای رشد گل اطلسی (Plaza et al., 2018)، ریزجلبک *Dunaliella* در فرآیند جوانه زنی بذر فلفل دلمه‌ای (Guzmán-Murillo et al., 2013) و ریزجلبک *C.vulgaris* و *S.quadricauda* در تولید چغندر قند (V Barone et al., 2018) نمونه‌هایی از آنهاست. تاثیر کلرلا و اسپیرولینا بر افزایش نیتروژن کل و فسفر قابل دسترس و کربن کل در خاک، اثر اسپیرولینا بر بهبود سطوح نترات خاک و همچنین افزایش مقادیر در دسترس این ترکیبات در افزایش تولید نخود در مطالعات گزارش شده است (Mahapatra et al., 2018). علاوه بر افزایش بهره‌وری و کیفیت خاک، ریزجلبک‌ها توان تولید هورمون‌های رشد موردنیاز گیاه، پلی‌ساکاریدها، ترکیبات آنتی‌باکتریال و سایر متابولیت‌های مفید را دارند (Ronga et al., 2019). بواسطه جذب مستقیم دی

اکسید کربن اتمسفر در زیست توده جلبکی آلی از طریق فتوسنتز، سیانوباکتری‌ها و ریزجلبک‌های سبز منابع اصلی ماده آلی در اکوسیستم کشاورزی هستند (Guo et al., 2020). بنابراین جلبک‌های سبز یوکاریوتی و جلبک‌های سبز-آبی پروکاریوتی با ماهیت تک‌سلولی یا چندسلولی، با بیش از دویست‌هزار گونه به عنوان بزرگترین تولیدکنندگان اولیه جهان هستند (Ammar et al., 2022). نظر به همین تنوع زیستی، بدیهی است. به دلیل لزوم سازگاری شرایط اقلیمی و نیز خصوصیات خاک با کود زیستی مورد استفاده در هر منطقه، استفاده از گونه‌های ریزجلبکی بومی منتخب نتایج رشد بهتری را ایجاد خواهد کرد.

اما مستقل از هرنوع کاربری، به دلیل بالا بودن هزینه‌های کشت در کنار پائین بودن بهره‌وری، چالش اقتصادی بزرگترین مانع برای کشت بزرگ‌مقیاس ریزجلبک‌ها محسوب می‌شود. از این رو کاهش هزینه‌های تولید برای بقاء و پایداری بسیاری از محصولات ریزجلبکی ضروری است (Khan et al., 2018). به‌طور مثال محیط کشت سبز-آبی مصنوعی (محیط BG11) که برای کشت ریزجلبک مرسوم است، برای کاربردهای در مقیاس بزرگ، گران و ناپایدار است (Ansari et al., 2019).

در این زمینه تلاش‌های زیادی جهت کاهش هزینه‌های فرآیند کشت صورت گرفته است که جایگزینی منابع کم هزینه مانند فاضلاب‌های مغذی با محصولات جنبی کشاورزی نمونه‌ای از آن است (Gong and Jiang, 2011). علاوه بر این، باز یا فت فاضلاب گلخانه‌ای برای تولید ریزجلبک‌ها، کاهش کودهای دیگر مانند کودهای معدنی را در کنار درآمد بیشتر از تولیدات مشترک هیدروپونیک ایجاد می‌کند (Valeria Barone et al., 2019). همچنین افزودن مکمل‌های رشد، فیتوهورمون‌ها و بهینه‌سازی نسبت نیتروژن به فسفر از دیگر تلاش‌های انجام شده

بهره‌گیری از روش‌های طراحی آزمایش، میزان ترکیبات شیمیایی اصلی موجود در محیط (BG11) جهت دستیابی به بیشترین میزان رشد و نیز محتوی کلروفیل در کنسرسیوم ریزجلبکی بهینه گردد تا از طریق کاهش هزینه‌های کشت، گامی در جهت کشت صنعتی با هدف تولید کود زیستی برداشته شود. انتخاب گونه‌های ریزجلبکی موجود در کنسرسیوم کود زیستی، پیشتر طی فرآیندهای غربالگری و با تکیه بر نتایج آزمایشگاهی موید بر اثربخشی بر رشد و نمو محصولات کشاورزی صورت گرفته که با توجه به اینکه فرآیند ثبت دانش‌بنیان محصول حاصل در شرکت آفاق نگران زیست‌گستر در دست پیگیری است از ذکر مشخصات جزئی و گونه‌های موجود در کنسرسیوم پرهیز می‌گردد.

#### مواد و روش‌ها

**محیط کشت:** محیط کشت مورد استفاده در پژوهش BG11 به شرح مندرج در جدول ۱: بوده است (Stanier et al., 1971). به جهت بهینه‌سازی این محیط جهت کشت کنسرسیوم خاص بومی و نیز قابلیت صنعتی‌سازی آن، ۴ ترکیب خاص به عنوان متغیرهای طراحی منظور شدند.

جدول ۱: ترکیب شیمیایی محیط کشت BG110

ترکیبات میکرو (A5)		ترکیبات ماکرو	
مقدار (گرم بر لیتر)	نام ماده شیمیایی	مقدار (گرم بر لیتر)	نام ماده شیمیایی
۲,۸۶۰	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	۱,۵	NaNO <sub>3</sub> *
۱,۸۱۰	MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	۰,۰۴	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .3H <sub>2</sub> O
۰,۲۲۲	ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	۰,۰۷۵	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O
۰,۳۹۰	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	۰,۰۳۶	CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O
۰,۰۷۹	CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	۰,۰۰۶	Citric acid
۰,۰۴۹۴	Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	۰,۰۰۶	Ferric ammonium citrate
		۰,۰۰۱	EDTA
		۰,۰۲	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>
		۱ml	Trace metal mix (A <sub>5</sub> )
		۱L	Distilled water

جدول ۱: طراحی آزمایش برای چهار فاکتور شیمیایی (مقادیر و حدود کد شده) و مقادیر پیش‌بینی و واقعی تیمارها

# تیمار	FeNH <sub>4</sub> Cit		NaCl		CaCl <sub>2</sub>		K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>		نرخ رشد مخصوص (یک بر روز)		کلروفیل (میکروگرم بر لیتر)	
	کد	واقعی (میلیگرم بر لیتر)	کد	واقعی (درصد)	کد	واقعی (میلیگرم بر لیتر)	کد	واقعی (میلیگرم بر لیتر)	واقعی	پیش‌بینی	واقعی	پیش‌بینی
۱	۰.۵	۷.۵۰	۰.۵-	۰.۵۰	۰.۵-	۵۱.۲۵	۰.۵-	۱۲۹.۵۰	۰.۰۸۲۸	۰.۰۷۶۷	۳.۱۹۰	۱/۹۰۴
۲	۰.۰	۵.۰۰	۰	۱.۰۰	۰	۶۷.۵۰	۰	۲۵۳.۰۰	۰.۲۱۵۹	۰.۳۲۶۸	۳.۰۳۰	۱/۶۸۷
۳	۰.۵-	۲.۵۰	۰.۵	۱.۵۰	۰.۵	۸۳.۷۵	۰.۵	۳۷۶.۵۰	۰.۰۶۳۹	۰.۰۶۸۸	۰.۱۸۰	۰/۲۰۶
۴	۰.۵	۷.۵۰	۰.۵-	۰.۵۰	۰.۵	۸۳.۷۵	۰.۵	۳۷۶.۵۰	۰.۱۱۵۴	۰.۱۰۹۸	۳.۰۲۰	۱/۹۱۷
۵	۰.۵-	۲.۵۰	۰.۵-	۰.۵۰	۰.۵	۸۳.۷۵	۰.۵-	۱۲۹.۵۰	۰.۳۰۳۹	۰.۳۰۳۹	۵.۲۲۰	۳/۹۷۵
۶	۰.۵-	۲.۵۰	۰.۵-	۰.۵۰	۰.۵-	۵۱.۲۵	۰.۵	۳۷۶.۵۰	۰.۲۱۹۳	۰.۲۰۳۳	۴.۰۵۰	۳/۰۹۶
۷	۰.۵	۷.۵۰	۰.۵	۱.۵۰	۰.۵	۸۳.۷۵	۰.۵-	۱۲۹.۵۰	۰.۳۰۴۰	۰.۲۲۰۳	۱.۳۰۰	۱/۴۵۶
۸	۰.۵	۷.۵۰	۰.۵-	۱.۵۰	۰.۵-	۵۱.۲۵	۰.۵	۳۷۶.۵۰	۰.۳۳۰۳	۰.۲۲۰	۰.۱۸۵	۰/۱۸۵
۹	۰	۵.۰۰	۰	۱.۰۰	۰	۶۷.۵۰	۰	۲۵۳.۰۰	۰.۳۱۰۱	۰.۳۱۶۸	۱.۴۳۰	۱/۶۸۷
۱۰	۰.۵-	۲.۵۰	۰.۵-	۱.۵۰	۰.۵-	۵۱.۲۵	۰.۵-	۱۲۹.۵۰	۰.۱۰۴۳	۰.۱۰۹۴	۱.۷۰۰	۱/۲۶۰
۱۱	۰.۵	۷.۵۰	۰.۵-	۰.۵۰	۰.۵-	۵۱.۲۵	۰.۵	۳۷۶.۵۰	۰.۳۵۱۱	۰.۳۳۷۸	۰.۹۷۰	۱/۲۰۸
۱۲	۰.۵	۷.۵۰	۰.۵-	۰.۵۰	۰.۵	۸۳.۷۵	۰.۵-	۱۲۹.۵۰	۰.۳۸۰۲	۰.۳۳۱۰	۲.۲۵۰	۳/۰۳۴
۱۳	۰.۵-	۲.۵۰	۰.۵	۱.۵۰	۰.۵-	۵۱.۲۵	۰.۵	۳۷۶.۵۰	۰.۳۷۱۶	۰.۲۵۵۸	۰.۲۶۰	۰/۲۵۴
۱۴	۰.۵	۷.۵۰	۰.۵	۱.۵۰	۰.۵-	۵۱.۲۵	۰.۵-	۱۲۹.۵۰	۰.۵۵۸۶	۰.۳۸۴۶	۱.۱۸۰	۰/۹۱۷
۱۵	۰	۵.۰۰	۰	۱.۰۰	۰	۶۷.۵۰	۰	۲۵۳.۰۰	۰.۴۱۸۴	۰.۳۲۶۸	۲.۴۶۰	۱/۶۸۷
۱۶	۰.۵-	۲.۵۰	۰.۵	۱.۵۰	۰.۵	۸۳.۷۵	۰.۵-	۱۲۹.۵۰	۰.۴۷۰۹	۰.۲۹۶۷	۰.۳۰۰	-
۱۷	۰.۵-	۲.۵۰	۰.۵-	۰.۵۰	۰.۵-	۵۱.۲۵	۰.۵-	۱۲۹.۵۰	۰.۴۷۰۸	۰.۴۱۴۹	۳.۷۹۰	۴/۸۵۵
۱۸	۰.۵-	۲.۵۰	۰.۵-	۰.۵۰	۰.۵	۸۳.۷۵	۰.۵	۳۷۶.۵۰	۰.۳۸۷۵	۰.۲۹۹۴	۱.۸۶۰	۲/۵۱۲
۱۹	۰	۵.۰۰	۰	۱.۰۰	۰	۶۷.۵۰	۰	۲۵۳.۰۰	۰.۳۲۴۴	۰.۳۲۶۸	۲.۰۴۰	۱/۶۸۷
۲۰	۰.۵	۷.۵۰	۰.۵	۱.۵۰	۰.۵	۸۳.۷۵	۰.۵	۳۷۶.۵۰	۰.۴۸۵۸	۰.۳۱۹۵	۰.۳۸۰	۰/۲۹۵
۲۱	۰	۵.۰۰	۰	۱.۰۰	۱-	۳۵.۰۰	۰	۲۵۳.۰۰	۰.۲۵۴۶	۰.۳۴۷۲	۰.۳۳۰	۱/۴۸۶
۲۲	۰	۵.۰۰	۰	۱.۰۰	۰	۶۷.۵۰	۱	۵.۰۰	۰.۲۸۰۵	۰.۲۷۷۰	۰.۲۴۰	۰/۲۶۴
۲۳	۱	۱۰.۰۰	۰	۱.۰۰	۰	۶۷.۵۰	۰	۲۵۳.۰۰	۰.۲۸۲۸	۰.۳۷۴۵	۰.۴۴۰	۰/۲۲۵
۲۴	۰	۵.۰۰	۱-	۰.۰۰	۰	۶۷.۵۰	۰	۲۵۳.۰۰	۰.۲۸۸۵	۰.۲۷۳۱	۰.۳۵۰	-
۲۵	۰	۵.۰۰	۱	۲.۰۰	۰	۶۷.۵۰	۰	۲۵۳.۰۰	۰.۲۶۸۵	۰.۲۹۰۷	۰.۳۰۰	۰/۳۳۶
۲۶	۰	۵.۰۰	۰	۱.۰۰	۰	۶۷.۵۰	۰	۲۵۳.۰۰	۰.۳۱۶۷	۰.۳۲۶۸	۱.۸۵۰	۱/۶۸۷
۲۷	۰	۵.۰۰	۰	۱.۰۰	۰	۶۷.۵۰	۰	۲۵۳.۰۰	۰.۲۷۹۴	۰.۳۲۶۸	۰.۹۲۰	۱/۶۸۷
۲۸	۱-	۰.۰۰	۰	۱.۰۰	۰	۶۷.۵۰	۰	۲۵۳.۰۰	۰.۲۵۴۶	۰.۲۸۹۰	۱.۱۶۰	۱/۱۲۵
۲۹	۰	۵.۰۰	۰	۱.۰۰	۱	۱۰۰.۰۰	۰	۲۵۳.۰۰	۰.۲۶۴۴	۰.۳۰۷۹۳۳۱	۱.۴۳۰	۱/۹۱۵
۳۰	۰	۵.۰۰	۰	۱.۰۰	۰	۶۷.۵۰	۱-	۶.۰۰	۰.۴۲۹۰	۰.۳۹۶۸۲۵۴	۱.۶۶۰	۲/۰۷۲

**استخراج گونه‌ها:** شش گونه سیانوباکتری‌های انتخابی مورد استفاده در این پژوهش از مناطق مختلف ایران و با غربالگری از بین ۵۰ گونه بومی (از کلکسیون ریز جلبکی شرکت دانش بنیان آفاق نگران زیست گستر)، جدا سازی و پس از خالص سازی بکار گرفته شده‌اند. کشت جامد و خالص سازی با روش پلیت آگار (Kaushik, 1987) و پس از رشد نمونه‌ها، کشت مایع در ارلن‌های حاوی محیط کشت در اتاق کشت انجام شد. همانطور که ذکر شد اثربخشی این کنسرسیون در ارتقاء نمو محصولات کشاورزی به طور جداگانه بررسی و تأیید شده است و نتیجه در قالب یک محصول دانش بنیان در حال ثبت است.

**شرایط محیطی کشت:** در اتاق کشت شرایط محیطی به صورت میز نور فلورسانت با شدت ۷۰ میکرو مول کوانتا بر متر مربع بر ثانیه، دمای هوا بین ۲۵-۳۰ درجه سانتی‌گراد و هوادهی با دبی ۳۵ لیتر بر دقیقه توسط پمپ هوادهی (Atman HP 4000) برقرار بود.

**طراحی آزمایش:** جهت بررسی تاثیر عوامل شیمیایی با بهره‌گیری از روش نقاط مرکب مرکزی - سطح پاسخ (RSM-CCD) طراحی آزمایش با کمک نرم‌افزار Design Expert 12 انجام شد. خطای آزمایشات بر اساس دو بار تکرار کل آزمایشات و گزارش میانگین و نیز ۶ بار تکرار نقطه مرکزی در هر بلوک محاسبه شد. برای هر قرائت نیز میانگین سه بار تکرار گزارش شده است. چهار ترکیب موثر در بهره‌وری کشت و

کلروفیل از تبدیل  $\ln(\text{chl})$  استفاده شده است. لذا چون با تبدیل  $1/\mu$  رابطه صریحی برای  $\mu$  حاصل نمیشود، در مقایسه ضرایب جدول در فاکتورهای کد شده، در واقع اثر فاکتورها بر میزان عکس نرخ رشد مخصوص نشان داده شده است اما در اشکال مندرج، میزان اثر گذاری مستقیم فاکتورها بر نرخ رشد مخصوص تحلیل شده است. لذا توجه به علامات مثبت و منفی ضرایب هر یک از فاکتورها میتواند نحوه تاثیرگذاری آنرا مشخص کند و مقایسه مقدار این ضرایب در حالت کد شده با یکدیگر می‌تواند نمایانگر مقایسه اهمیت فاکتورها باشد. هرچند بواسطه اندکشن بین فاکتورها بهتر است این تحلیل‌ها از روی گراف‌های آتی انجام شود.

میزان  $R^2$  برای مدل رشد و کلروفیل به ترتیب برابر  $0.94/7\%$  و  $0.88/5\%$  و مقدار Adeq Precision که بیانگر اختلاف مقدار پاسخ پیش‌بینی شده مدل با مقدار متوسط خطای پیش‌بینی است به ترتیب برابر  $20/8$  و  $13/5$  بوده که بزرگتر از ۴ و نشانگر کفایت مدل‌ها است. در جدول ۲ برای هر تیمار علاوه بر مقادیر کدشده و واقعی فاکتورهای ورودی تنظیمی، مقادیر خروجی پیش‌بینی شده در کنار مقادیر واقعی اندازه‌گیری شده درج شده است.

۱ نمایانگر تاثیر اندرکنش دوگانه فاکتورها بر نرخ رشد مخصوص است؛ در تمام حالات، دو فاکتوری که در شکل نشان داده نشده‌اند در مقادیر میانی خود قرار دارند. هرچند مقادیر میانی تمام فاکتورها ناحیه مطلوبی برای میزان نرخ رشد مخصوص را ایجاد میکند اما تقارن اشکال الف و ب، حول نیمسازهای ربع اول و سوم، بیانگر اثر همسو فاکتورهای A و B نیز فاکتورهای A و D می‌باشد. بدان معنی که برای دستیابی به بیشترین نرخ رشد مخصوص، هر دو فاکتور باید مقادیر کدشده یکسانی داشته باشند و به نوعی هر دو به یک میزان از مقادیر میانی خود چه در جهت

سنجش پاسخ‌های مربوطه حسب **Error! Reference source not found.** در بازه تغییرات داده

شده طی ۳۰ آزمایش مورد بررسی قرار گرفتند.

سنجش‌ها: در طی ۱۵ روز کشت هر تیمار، محاسبه میزان رشد و سنجش رنگی‌های کلروفیل بر اساس قرائت چگالی نوری (OD) با دستگاه اسپکتروفتومتر (UNICO UV-2100، امریکا) در طول موج بهینه ۶۶۵ نانومتر انجام شد. نرخ رشد مخصوص از اختلاف لگاریتم طبیعی وزن خشک روزهای اول و چهارم کشت حاصل شد؛ محاسبه وزن خشک به کمک قرائت جذب در طول موج ۷۵۰ نانومتر و براساس رابطه ۲ انجام شد؛ حسب روش Marker (۱۹۷۹) برای سنجش کلروفیل قرائت جذب در طول موج ۶۶۵ نانومتر در رابطه ۲ قابل استفاده است و میزان کلروفیل بر حسب میکروگرم بر لیتر از این طریق محاسبه گردید:

$$\text{رابطه ۱} \quad \text{BMs}_t = 0.769 \times \text{O.D.}_{750} - 0.0075$$

$$\text{رابطه ۲} \quad \text{C}_{\text{chl}} = 13.14 \times \text{O.D.}_{665}$$

## نتایج

بر اساس سنجش‌های انجام شده، بیشترین میزان وزن خشک استحصالی به مقدار  $15/1 \text{ mg/L}$  و در پایان ۱۵ روز کشت، در آزمایش شماره ۲۴ حاصل شد. در این آزمایش کلیه فاکتورها در مقدار میانی خود قرار دارند و مقدار شوری در کمترین میزان خود است. در آزمایش شماره ۱۷ نیز که تمام فاکتورها در مقدار کد شده  $0/5$  - قرار دارند، میزان وزن خشک  $1/05 \text{ mg/L}$  حاصل شده است. مدل برازش شده برای پیش‌بینی نرخ رشد مخصوص و مقدار کلروفیل در جدول ارائه شده است. دقت شود که برای پاسخ نرخ رشد مخصوص با توجه به بازه تغییرات اندک  $0/06$  تا  $0/55$  برای برازش بهتر از تبدیل  $1/\mu$  و برای میزان

مثبت و چه در جهت منفی فاصله بگیرند. اما همانطور که اشکال ج و د نشان می‌دهند این امر در مورد فاکتور C (CaCl<sub>2</sub>) کاملاً برعکس بوده و تقارن حول نیمساز ربع‌های دوم و چهارم بیانگر آنست که اگر

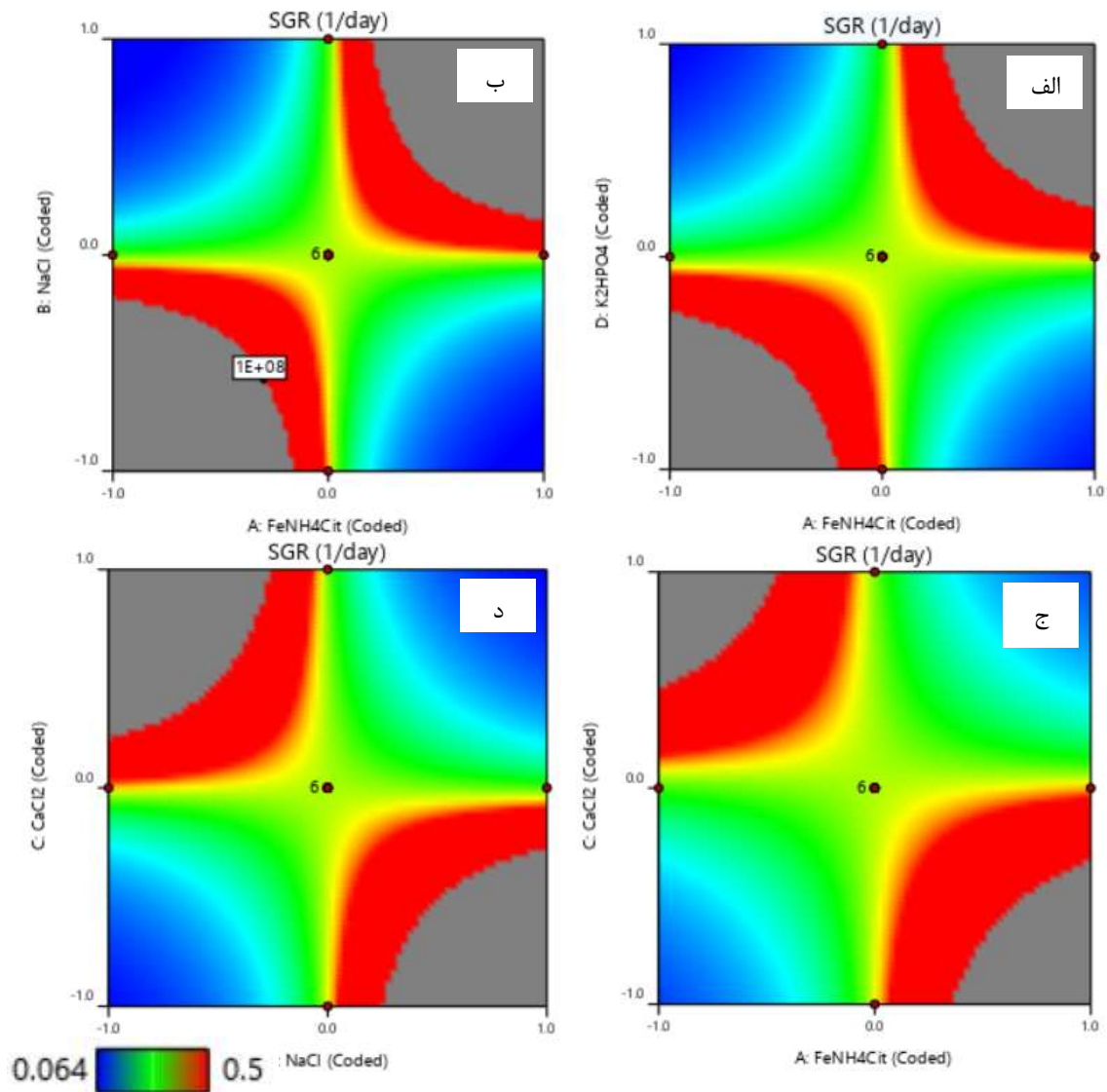
یکی از فاکتورها از مقدار میانی کد شده خود بیشتر می‌شود، فاکتور دیگر باید به همان نسبت از مقدار میانی خود کمتر شود.

جدول ۳: ضرایب فاکتورها و اندرکنش آنها در مدل برازش شده به عکس نرخ رشد مخصوص (ستون ۲ و ۳)  $\left[\frac{1}{\mu}\right]$  و لگاریتم طبیعی میزان کلروفیل (ستون ۴ و ۵) [Ln(Chl)] در دو حالت کد شده و واقعی

ستون شماره ۱	ستون شماره ۲	ستون شماره ۳	ستون شماره ۴	ستون شماره ۵
فاکتورها یا اندرکنش آنها	کد شده	واقعی	کد شده	واقعی
ضریب ثابت	+۳.۰۶	+۴۰.۴۲۶۷۱	۰.۵۲۳۰	+۲.۵۰۲۷۸
FeNH <sub>4</sub> Cit	-۰.۳۹۳۵	+۲.۷۲۵۹۹	-۰.۲۹۳۶	-۰.۱۸۲۶۰۱
NaCl	+۰.۳۷۷۴	+۰.۱۲۶۹۵۳	-۱.۶۱	-۱.۰۶۵۱۸
CaCl <sub>2</sub>	+۰.۱۸۵۴	-۱.۱۲۴۳۰	۰.۱۲۶۸	-۰.۰۱۶۷۳۹
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	+۰.۵۴۶۸	-۰.۰۵۳۴۶۰	-۱.۰۳	+۰.۰۰۷۲۹۸
FeNH <sub>4</sub> Cit × NaCl	-۱۷.۱۷	-۳.۴۳۳۸۸	۰.۶۲۳۶	+۰.۱۲۴۷۲۸
FeNH <sub>4</sub> Cit × CaCl <sub>2</sub>	+۷.۷۲	+۰.۰۴۷۴۹۳	۰.۶۷۰۸	+۰.۰۰۴۱۲۸
FeNH <sub>4</sub> Cit × K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	-۱۲.۵۸	-۰.۰۱۰۱۸۴	۰	۰
NaCl × CaCl <sub>2</sub>	+۱۲.۲۱	+۰.۳۷۵۵۳۹	۰	۰
NaCl × K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	-۷.۷۴	-۰.۰۳۱۳۴۰	-۱.۱۵	-۰.۰۰۴۶۳۷
CaCl <sub>2</sub> × K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	+۱۶.۴۰	+۰.۰۰۲۰۴۳	۰	۰
FeNH <sub>4</sub> Cit <sup>2</sup>	۰	۰	-۰.۶۹۸۷	-۰.۰۲۷۹۴۹
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> <sup>2</sup>	۰	۰	-۰.۸۲۲۶	-۱۳

فاکتور دیگر از کمینه مقدار تا مقدار میانی موجب افزایش نرخ رشد مخصوص می‌شود و بالعکس اگر مقدار فاکتور اول در بالاترین میزان باشد، کاهش فاکتور دوم از بیشینه تا مقدار میانی، موجب افزایش نرخ رشد مخصوص خواهد شد. اما در مورد فاکتور CaCl<sub>2</sub> این اندرکنش دقیقاً برعکس است.

در بررسی تاثیر فاکتورها بر میزان نرخ رشد مخصوص اندرکنش فاکتورها به شدت اثر گذار است. اما حول همین مقادیر میانی، تاثیر تعامل فاکتورها بسیار زیادتر می‌شود. در این بین فاکتور مقدار CaCl<sub>2</sub> اثر معکوسی نسبت به سه فاکتور دیگر دارد. به این صورت که در تعامل دوگانه هر سه فاکتور دیگر، وقتی یکی از فاکتورها در حد پائین خود قرار دارد، افزایش

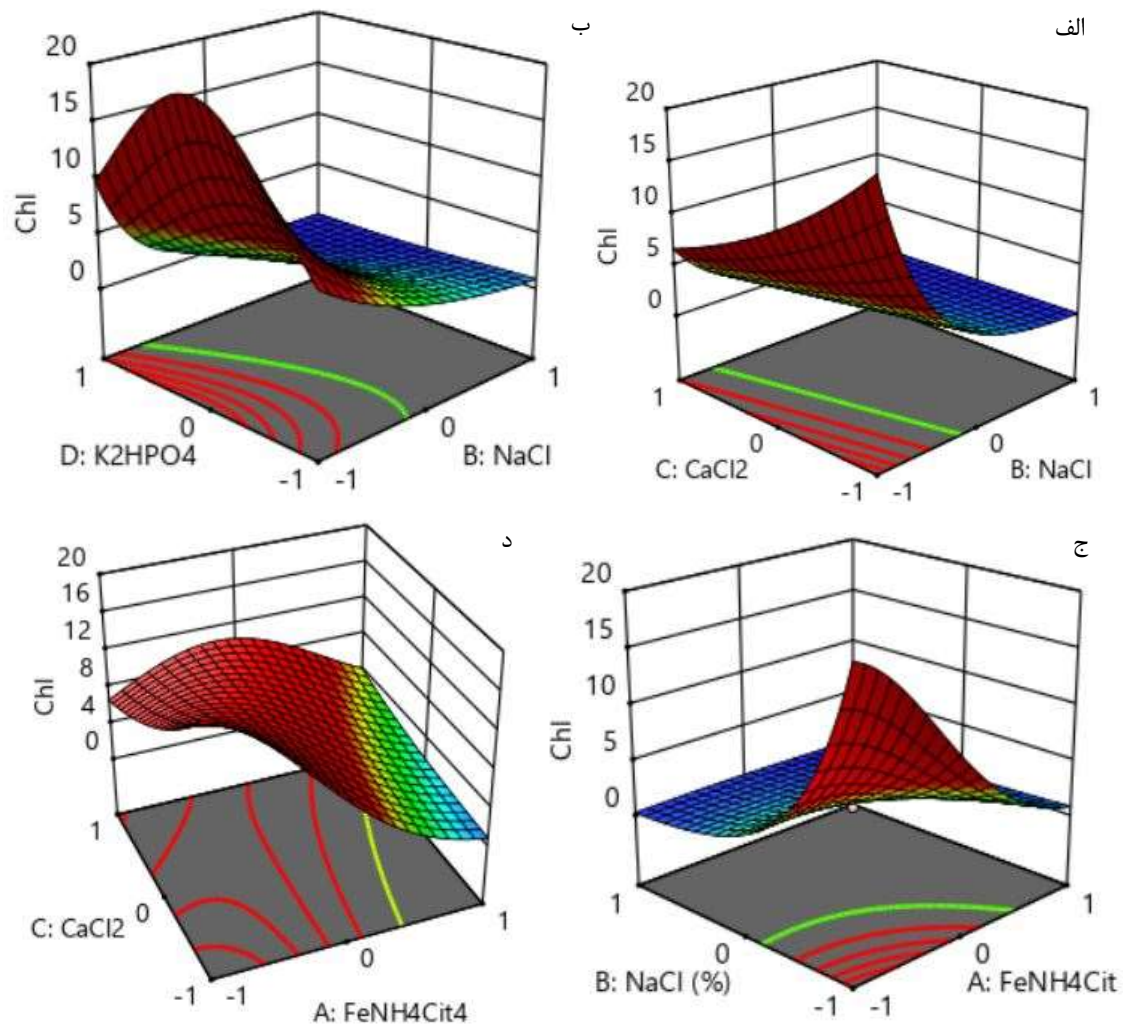


شکل ۱: تاثیر اندرکنش دوگانه فاکتورهای کد شده بر میزان نرخ رشد مخصوص زمانی که دو فاکتور دیگر در مقادیر میانی خود قرار دارند.

برای بیشترین میزان کلروفیل نمایان است. در اشکال الف و ب نیز همین میزان برای این فاکتور تنظیم شده است. تاثیر منفی میزان فاکتور  $\text{CaCl}_2$  بر کلروفیل در اشکال ب و ج مشخص است. در دو شکل دیگر الف و د نیز مقدار این فاکتور در کمینه خود قرار دارد. به همین صورت بیشترین کلروفیل در کمترین میزان  $\text{NaCl}$  حاصل شده است که در اشکال الف، ب و د مشخص است.

شکل ۲ تاثیر فاکتورهای مختلف را بر روی میزان کلروفیل نشان می‌دهد. هر شکل اثر دو فاکتور را بر روی دو محور نشان می‌دهد و مقادیر دو فاکتور دیگر در بهترین حالت تنظیم شده است. در شکل الف مشخص است که بیشترین میزان کلروفیل در مقادیر میانی فاکتور  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  حاصل شده است. در تمامی اشکال دیگر نیز این فاکتور در مقدار میانی است. در شکل‌های ج و د لزوم کمینه بودن فاکتور  $\text{FeNH}_4\text{Cit}$





شکل ۲: تاثیر فاکتورهای مختلف بر میزان کلروفیل: الف) اثر فاکتورهای B و D وقتی A=C=-1؛ ب) اثر فاکتورهای B و C وقتی D=0، A=-1؛ ج) اثر فاکتورهای A و C وقتی B=-1، D=0؛ د) اثر فاکتورهای A و B وقتی C=-1، D=0.

### بحث

در پژوهش قبلی برخی از فاکتورهای اساسی جهت کشت ریزجلبک‌ها و اختصاص گونه‌های مختلف به محیط‌های مختلف آبی و روش‌های بازیابی آب در کشت مورد نظر قرار گرفت (Ghobadian and Soltani, 2021). در این پژوهش هدف اصلی بهینه‌سازی محیط کشت مر سوم BG11 جهت کشت کنسرسیوم خاص جلبکی بود که با هدف تولید کود

زیستی و بر مبنای غربالگری‌های قبلی منتخب شده بودند.

به‌طور کلی بیوسنتز مولوکلهای غنی از کربن، تحت تاثیر ترکیبات مختلف محیط کشت است و در واقع کل متابولیسم سلول و بیوسنتز ماکرومولکول‌ها تحت تاثیر ترکیب محیط کشت است (Converti et al., 2009). دسترسی به ترکیباتی از محیط کشت نظیر فسفات و نیترات بر محتوای کربوهیدرات و پروتئین

کلیت ارگانیزم‌ها می‌بایست با احتیاط انجام گیرد و همچنین تعمیم نتایج این پژوهش نیز به حفظ کنسرسیون منتخب وابسته خواهد بود.

در واقع همانطور که اشاره شد این تعامل بسیار پیچیده بوده و از سوی دیگر بسیار به شرایط محیطی و حتی گونه‌های جلبکی تحت کشت وابسته است. این وابستگی نحوه اثرگذاری مواد مغذی به گونه جلبکی در مطالعات متعددی گزارش شده است. مثلاً هرچند گونه *S. rubescens* بهره‌وری کشت بیشتری در محیط کشت‌های دارای هر دو منبع اوره و نیترات، در مقایسه با محیط‌های دارای صرفاً یکی از این منابع به تنهایی داشته (Lin and Lin, 2011) اما به طریق عکس گونه *S. bijugatus* در محیط کشت حاوی نیترات رشد بیشتری نشان داده است (Arumugam et al., 2013). بر این اساس لزوم پرداختن به بهینه‌سازی محیط کشت این کنسرسیون جلبکی بومی که هدف اصلی این پژوهش بوده صریح‌تر روشن می‌شود.

به اندرکنش این مواد مغذی با هم در بسیاری پژوهش‌ها اشاره شده است. به طور مثال کاتابولیسم اوره به ATP، بی‌کربنات، یون‌های منیزیم ( $Mg^{2+}$ )، بیوتین و کاتیون‌های تک ظرفیتی ( $K^+$ ،  $Na^+$  یا  $NH_4^+$ ) نیاز دارد که انرژی بیشتری نسبت به متابولیسم آمونیوم مصرف می‌کنند (Covell et al., 2020). در این پژوهش این نوع اندرکنش‌ها به ویژه در زمان گذر از مقادیر میانی در گراف‌های شکل ۱ به خوبی مشهود است. زمانی که بیشترین نرخ‌های رشد مخصوص در افزایش همزمان دو فاکتور A و B یا A و D از مقادیر میانی ایجاد می‌شود و شرایط برای فاکتور C دقیقاً عکس آن است.

موثر است (Lee et al., 2015). مطابق مشاهدات قبلی (Rocha et al., 2017) گونه *S. obliquus* کشت شده در محیط BG11، دارای تولید بیومس کمتر و تجمع بیشتر ترکیبات غنی از N (رنگدانه و پروتئین) است. همچنین در نتایج تولید بیواتانول محتوای ذخیره کربن به صورت تابعی از منبع نیتروژن و غلظت آن تغییر می‌کند (C.-Y. Chen et al., 2013).

اشاره به اثر بسته<sup>۱</sup> که بر تعامل پیچیده بین عوامل محیطی و فیزیولوژی ارگانیزم‌های فتوسنتزی تاکید و پاسخ‌های تطبیقی آن‌ها را به تغییر در دسترس بودن مواد مغذی و سایر استرس‌های محیطی روشن می‌کند سبب طولانی دارد (Dubinsky et al., 1986). مثلاً نیتروژن به عنوان یک ترکیب اصلی (۵ تا ۱۰٪ وزن خشک) در اثر کمبود در محیط کشت می‌تواند آثار چندگانه‌ای بر متابولیسم سلول‌های جلبکی داشته باشد (Menezes et al., 2016). برخی مطالعات معتقدند که آنزیم روبیسکو هنگام محدودیت نیتروژن در جلبک‌ها مورد تخریب قرار می‌گیرد (García-Ferris and Moreno, 1994) و نقص نیتروژن در جلبک‌ها منجر به کاهش محتوای کلروفیل سلولی و افزایش کارتنوئید می‌شود (Geider et al., 1998). اما در برخی دیگر عنوان شده که در اثر کاهش نیتروژن سلول‌ها به دلیل کاهش انباشته شدن و جذب غشاهای تیلاکوئید، غلظت کلروفیل و مواجهه آن با نور بیشتر شده و بهره‌وری فتوسنتز بالاتر می‌رود (Falkowski and Raven, 1997). در همین راستا مشاهدات اشکال ج و د شکل ۲ این پژوهش نیز همین افزایش کلروفیل در مقادیر کمتر آمونیوم فریک سیترات را نشان می‌دهد. هرچند باید توجه داشت که هر مقاله گستره محدودی را مورد نظر قرار می‌دهد و تعمیم دادن آن به

<sup>1</sup> Package Effect

می‌شود که پس از شکسته شدن اوره توسط اوره کربوکسیلاز و آلوفانات هیدرولاز، دو مولکول آمونیوم و یک مولکول دی‌اکسید کربن آزاد می‌شود (Pinton et al., 2016). اما یافته‌های پژوهش جاری به اهمیت اندرکنش آمونیوم با دیگر مواد مغذی اشاره دارد.

در همان مطالعه (Covell et al., 2020) به سمیت کمتر اوره نسبت به نمک‌های آمونیوم نیز اشاره شده است. همین اثر سمیت در نحوه تاثیر آمونیوم فریک سیترات بر کلروفیل در این پژوهش مشاهده شده است. هرچند آهن یک زیرمغذی مورد نیاز برای سنتز کلروفیل، تنفس و فتوسنتز است که نقش کلیدی در زنجیره انتقال الکترون و فعالیت‌های آنزیمی داشته و در واقع یک عنصر مولکول کلروفیل است که موجب افزایش ظرفیت فتوسنتز می‌شود اما بواسطه همین اثر سمیت، بیشینه مقادیر کلروفیل با کمینه مقادیر آمونیوم فریک سیترات متناظر بوده است.

اما از آنجا که آهن به‌عنوان یک کوفاکتور برای آنزیم‌های متعددی است که در مسیرهای متابولیکی مختلف از جمله جذب نیتروژن، تثبیت و تبدیل آن به فرم بیولوژیکی قابل دسترس، تثبیت کربن و مکانیسم‌های دفاعی آنتی‌اکسیدانی دخیل هستند و همچنین نقش مهمی در تنظیم ردوکس و واکنش‌های انتقال الکترون و افزایش انعطاف‌پذیری جلبک‌ها در برابر نوسانات محیطی دارد، اثرگذاری همراستای این ترکیب با NaCl و  $K_2HPO_4$  که در اشکال الف و ب شکل ۱ مشاهده شده نیز قابل توجه است.

در پژوهشی دیگر مقایسه کشت گونه در دو محیط BG11 و *Chlamydomodium fusiforme* Bristol بیانگر برتری وزن خشک و غلظت کلروفیل در محیط اول می‌باشد (به ترتیب  $1/94$  g/L و  $1/94$  mg/L در  $79/6$  در مقایسه با  $1/58$  g/L و  $29/5$  mg/L علت

با توجه به مرسوم بودن محیط‌کشت BG11، مطالعات متعددی در اصلاح و بهینه‌سازی یا ترکیب این محیط با ترکیبات دیگر انجام شده است. در پژوهشی که برای کشت کلرلا محیط BG11 توسط عصاره لجن فاضلاب شهری با درصدهای مختلف رقیق شد، بیشینه بیومس  $1/4$  g/L در روز ۱۵ کشت در  $75\%$  لجن و  $25\%$  BG11 به دست آمد. وجود میزان بالای کربن آلی منجر به افزایش فعالیت آنزیم سیترات سنتاز و کاهش فعالیت آنزیم روبیسکو و غالب شدن شرایط هتروتروفی و کم اثر شدن نقش تابش در دو روز اول شده است (Chen et al., 2021). این نتایج کاملاً با مشاهدات این پژوهش پیرامون کاهش کلروفیل در غلظت‌های بالای سیترات آمونیوم سازگار است. این کاهش فعالیت‌های فتوسنتزی به دلیل وجود منابع کربن بیرونی و تمایل بیشتر ریزجلبک به کسب انرژی بیشتر از تنفس و مصرف انرژی نوری به صورت اتلاف حرارتی در مطالعات (Li et al., 2016) نیز اشاره شده است.

در پژوهشی دیگر با جایگزینی نیترات در محیط BG11، بوسیله آمونیوم، اوره یا ترکیب آنها بهره‌وری بیشتری از بیومس گزارش شده است. در صد چربی بیشتر در محیط دارای آمونیوم ( $25\%$  وزن خشک)، محتوای بیشتر کربوهیدرات ( $60\%$ ) و پروتئین ( $40\%$ ) به ترتیب در محیط‌های دارای آمونیوم و اوره به دست آمده است (Covell et al., 2020). به طور کلی کاتابولیسم و انتقال اوره تحت تاثیر آمونیوم است (Mérigout et al., 2008) هرچند جذب آمونیوم انرژی کمتری نسبت به سایر منابع N نیاز دارد (Remacle et al., 2014). به نوبه خود، اوره که حاوی درصد بیشتری از نیتروژن نسبت به سایر منابع N است، توسط ناقل DUR3 (انتقال دهنده اوره فعال) به داخل سلول منتقل

(2020). در پژوهش جاری نیز حسب شکل ۲-الف جهت دستیابی به بیشینه کلروفیل، مقادیر میانی  $K_2HPO_4$  مورد نیاز بوده است. باید توجه داشت که پتاسیم، نقش کلیدی برای تنظیم اسمزی و فعالیت‌های آنزیمی دارد.

کلسیم نیز در تشکیل دیواره سلولی، فعال سازی آنزیم و انتقال سیگنال، پایداری غشای سلولی و تنظیم فعالیت‌های سلولی و ایجاد توازن موازن مغذی موثر است. اما سمیت در سطوح بیش از حد آن منجر به اختلال عملکرد سلولی، مهار فعالیت آنزیم‌ها و تداخل در فرآیندهای جذب مواد مغذی و در نهایت توقف رشد جلبک‌ها می‌شود. همچنین به عنوان یک عامل ایجاد سختی آب، بر دسترسی مواد مغذی و ثبات pH موثر است. در پژوهشی با تیمار جلبک *Scenedesmus quadricauda* در محیطی با غلظت بالای کلسیم (تا 4.4 Mm)، از تجمع کمتر کلسیم در سلولها به این نتیجه رسیدند که برداشت مواد مغذی معدنی به دقت در سطح سلولی جلبکها مدیریت می‌شود هرچند تیمارهای با کلسیم بالا منجر به فعالیت‌های بالاتر آنزیم‌های آنتی اکسیدانی شده است (Kováčik and Dresler, 2018). همین اندرکنش بین مواد مغذی به ویژه در گراف‌های اثر فاکتورها بر نرخ رشد مخصوص در پژوهش حاضر به خوبی مشهود است. در مورد کاهش نرخ رشد مخصوص با افزایش غلظت نمک و افزایش کلروفیل کل، سمیت مقادیر بالای NaCl (توقف رشد در مقادیر بالاتر از ۰/۳ M) و اثر کاهنده نمک‌های کلسیم (منجر به افزایش تحمل شوری) در پژوهش (Chimiklis and Karlander, 1973) اشاره شده است. همین اثر منفی نمک‌های کلسیم بر رشد و نیز اثر کاهنده شوری NaCl بر میزان کلروفیل در نتایج این پژوهش نیز مشاهده شده است. مطالعات

این امر کمبود نیتروژن است که از ۹۶ ساعت به بعد در محیط Bristol اتفاق می‌افتد و سلول‌های رشد یافته در بریستول متابولیسم خود را عمدتاً به سمت سنتز کربوهیدرات‌ها هدایت می‌کنند که به عنوان یک منبع کاهش قدرت عمل می‌کند و این باعث کاهش وزن خشک شده است (Touloupakis et al., 2020). نویسنده اشاره دارد که در طی دوره تاریکی نه نیتروژنی جذب میشود و نه کلروفیلی ساخته میشود و افزایش بیومس در سیکل روشنایی و کاهش در سیکل تاریکی بواسطه مصرف انرژی انباشته شده در طی سیکل روشنایی جهت برآوردن نیازهای نگهداری روی می‌دهد.

خود فسفر نیز به عنوان ترکیب کلیدی اسیدهای نوکلئیک، فسفولیپیدها و اجزاء انرژی مانند ATP جهت پیش‌سازها و آنزیم‌های بیوسنتز کلروفیل مورد نیاز است. فسفر عمدتاً در DNA، RNA و فسفولیپیدها بوده و از طریق پیوند فسفات با انرژی بالا (ATP)، قند فسفات) نقش کلیدی در انرژی سلولی دارد (Puthiyaveetil et al., 2012). بواسطه تأثیر مستقیم فسفات بر فعالیت خاص رویسکو (آنزیم کلیدی سیکل کلورین و مسئول تثبیت کربن)، در دسترس بودن فسفات بر تنظیم چرخه کلورین تأثیر دارد (Brooks, 1986). اما غلظت‌های بالای آن منجر به عدم توازن برداشت مواد مغذی و پاسخ به تنش‌های مربوطه در سلول‌های جلبکی می‌شود که بر محتوای کلروفیل اثرگذار است. لذا دوز بهینه آن وابسته به شرایط محیطی و حضور سایر مواد مغذی است. در یک مطالعه کاهش فسفر در روز پنجم کشت در محیط BG11 گزارش شده که بر روی بهره‌وری کشت (۸ mg/L h) و افزایش کلروفیل بی‌تاثیر بوده اما باعث کاهش نرخ فتوسنتز شده است (Touloupakis et al.,

ایجاد استرس‌های غذایی در زمان‌های خاص با توجه به منحنی‌های رشد مربوطه می‌تواند از موضوعات مورد نظر در مطالعات آتی باشد.

### سپاسگزاری

نویسندگان مراتب قدردانی خود را از حمایت‌های ستاد توسعه زیست‌فناوری معاونت علمی و فناوری ریاست جمهوری اعلام می‌کنند. همچنین مراتب سپاسگزاری از زحمات سرکار خانم دکتر شقایق ایرانشاهی که با دقتی مثال‌زدنی یاریگر انجام این پژوهش بوده‌اند ابراز می‌شود.

(Gorain et al., 2013) هم بیانگر افزایش محتوای چربی تا ۴۰٪ وزن خشک در هردو گونه *Chlorella vulgaris* و *Scenedesmus obliquus* در اثر تنش اسمزی ناشی از NaCl و در مقابل کاهش شدید بازدهی بیومس بوده است. تقریباً همین میزان تجمع چربی در اثر گرسنگی کلیمی گزارش شده است.

### نتیجه‌گیری نهایی

در این پژوهش اصلاح محیط‌کشت BG11 مرسوم جهت کشت تجاری کنسرسیوم جلبکی بومی مذکور با بررسی چهار ترکیب مورد نظر قرار گرفت. نتایج بیانگر تاثیر منفی شوری بر میزان وزن خشک در کشت ۱۵ روزه بود. به طوری که بیشترین وزن خشک به مقدار ۱/۱۵ mg/L در کمترین میزان شوری و در حالی که سایر فاکتورها در حد میانی خود بودند حاصل شد. همچنین همین حدود میانی برای دستیابی به بیشترین نرخ رشد مخصوص ضروری بود و اندرکنش بسیار زیادی در صورت عدم برقراری حالت میانه بین فاکتورهای مغذی مشاهده شد. از منظر تولید بیشترین کلروفیل، حدود میانی فاکتور  $k_2HPO_4$  و کمینه مقدار سایر فاکتورها لازم بود. به طور کلی بررسی سایر مطالعات، وابستگی شدید نتایج به شرایط محیطی و به ویژه گونه‌های تحت بررسی را نشان می‌دهد و به این خاطر مطالعات تکمیلی در خصوص بهینه‌سازی این کنسرسیوم خاص بومی موثر به عنوان کود زیستی ضروری است. به طور مثال پرداختن به سایر رنگدانه‌ها و نیز توجه به نقش زمان برداشت و

### References

- Ammar, E. E., Aioub, A. A., Elesawy, A. E., Karkour, A. M., Mouhamed, M. S., Amer, A. A. and El-Shershaby, N. A. (2022). Algae as Bio-fertilizers: Between current situation and future prospective. Saudi Journal of Biological Sciences, 29(5): 3083-3096.

- Ansari, F. A., Ravindran, B., Gupta, S. K., Nasr, M., Rawat, I. and Bux, F. (2019). Techno-economic estimation of wastewater phycoremediation and environmental benefits using *Scenedesmus obliquus* microalgae. *Journal of Environmental Management*, 240:293-302.
- Arumugam, M., Agarwal, A., Arya, M. C. and Ahmed, Z. (2013). Influence of nitrogen sources on biomass productivity of microalgae *Scenedesmus bijugatus*. *Bioresource Technology*, 131:246-249 .
- Barone, V., Baglieri, A., Stevanato, P., Broccanello, C., Bertoldo, G., Bertaggia, M. and Mandolino, G. (2018). Root morphological and molecular responses induced by microalgae extracts in sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Journal of Applied Phycology*, 30:1061-1071.
- Barone, V., Puglisi, I., Fragalà, F., Lo Piero, A. R., Giuffrida, F. and Baglieri, A. (2019). Novel bioprocess for the cultivation of microalgae in hydroponic growing system of tomato plants. *Journal of Applied Phycology*, 31:465-470.
- Brooks, A. (1986). Effects of phosphorus nutrition on ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase activation, photosynthetic quantum yield and amounts of some Calvin-cycle metabolites in spinach leaves. *Functional Plant Biology*, 13(2):221-237.
- Chen, C.-Y., Zhao, X.-Q., Yen, H.-W., Ho, S.-H., Cheng, C.-L., Lee, D.-J. and Chang, J. S. (2013). Microalgae-based carbohydrates for biofuel production. *Biochemical Engineering Journal*, 78:1-10.
- Chen, X., Yang, Y., Lu, Q., Sun, X., Wang, S., Li, Q. and Wang, Y. (2021). The influence of light intensity and organic content on cultivation of *Chlorella vulgaris* in sludge extracts diluted with BG11. *Aquaculture International*, 29(5):2131-2144.
- Chimiklis, P. E. and Karlander, E. P. (1973). Light and calcium interactions in *Chlorella* inhibited by sodium chloride. *Plant Physiology*, 51(1):48-56.
- Converti, A., Casazza, A. A., Ortiz, E. Y., Perego, P. and 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):1146-1151.
- Covell, L., Machado, M., Vaz, M. G. M. V., Soares, J., Batista, A. D., Araújo, W. L. and Nunes-Nesi, A. (2020). Alternative fertilizer-based growth media support high lipid contents without growth impairment in *Scenedesmus obliquus* BR003. *Bioprocess and biosystems engineering*, 43:1123-1131.
- Das, P., Khan, S., Chaudhary, A. K., AbdulQuadir, M., Thaher, M. I. and Al-Jabri, H. (2019). Potential applications of algae-based bio-fertilizer. *Biofertilizers for sustainable agriculture and environment*, 55:41-65.
- Dubinsky, Z., Falkowski, P. G. and Wyman, K. (1986). Light harvesting and utilization by phytoplankton. *Plant and Cell Physiology*, 27(7):1335-1349.
- Falkowski, P., and Raven, J. (1997). *Photosynthesis in continuous light*. Aquatic Photosynthesis. Blackwell Science, Malden, Massachusetts, 193-227.
- García-Ferris, C. and Moreno, J. (1994). Oxidative modification and breakdown of ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase induced in *Euglena gracilis* by nitrogen starvation. *Planta*, 193:208-215.
- Geider, R. J., Macintyre, H. L., Graziano, L. M., and McKay, R. M. L. (1998). Responses of the photosynthetic apparatus of *Dunaliella tertiolecta* (Chlorophyceae) to nitrogen and phosphorus limitation. *European Journal of Phycology*, 33(4):315-332.
- Ghobadian, S. and Soltani, N. (2021). Advanced Factors Affecting Microalgae Large-Scale Cultivation and Their Effects on Productivity Improvement. *Journal of Plant Environmental Physiology*, 4 (63):129-148.
- Gong, Y. and Jiang, M. (2011). Biodiesel production with microalgae as feedstock: from strains to biodiesel. *Biotechnology letters*, 33:1269-1284.

- Gorain, P. C., Bagchi, S. K. and Mallick, N. (2013). Effects of calcium, magnesium and sodium chloride in enhancing lipid accumulation in two green microalgae. *Environmental Technology*, 34(13-14): 1887-1894.
- Guo, S., Wang, P., Wang, X., Zou, M., Liu, C. and Hao, J. (2020). Microalgae as biofertilizer in modern agriculture. *Microalgae Biotechnology for Food ,Health and High Value Products*, 397-411.
- Guzmán-Murillo, M. A., Ascencio, F. and Larrinaga-Mayoral, J. A. (2013). Germination and ROS detoxification in bell pepper (*Capsicum annuum* L.) under NaCl stress and treatment with microalgae extracts. *Protoplasma*, 250:33-42.
- Kaushik, B. D. (1987). *Laboratory methods for blue-green algae*: Assoc. Publishing Company.
- Khan, M. I., Shin, J. H. and Kim, J. D. (2018). The promising future of microalgae: current status, challenges, and optimization of a sustainable and renewable industry for biofuels, feed, and other products. *Microbial Cell Factories*, 17(1):1-21.
- Kováčik, J. and Dresler, S. (2018). Calcium availability but not its content modulates metal toxicity in *Scenedesmus quadricauda*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 147: 664-669.
- Lee, E., Jalalizadeh, M. and Zhang, Q. (2015). Growth kinetic models for microalgae cultivation: A review. *Algal Research*, 12:497-512.
- Li, T., Kirchoff, H., Gargouri, M., Feng, J., Cousins, A. B., Pienkos, P. T. and Chen, S. (2016). Assessment of photosynthesis regulation in mixotrophically cultured microalga *Chlorella sorokiniana*. *Algal Research*, 19:30-38.
- Lin, Q. and Lin, J. (2011). Effects of nitrogen source and concentration on biomass and oil production of a *Scenedesmus rubescens* like microalga. *Bioresource Technology*, 102(2):1615-1621.
- Mahapatra, D. M., Chanakya, H., Joshi, N., Ramachandra, T. and Murthy, G. (2018). Algae-based biofertilizers: a biorefinery approach. *Microorganisms for Green Revolution: Volume 2 : Microbes for Sustainable Agro-ecosystem*, 177-196.
- Menezes, R. S., Soares, A. T., Marques Júnior, J. G., Lopes, R. G., Da Arantes, R. F., Derner, R. B. and Filho, N. R. A. (2016). Culture medium influence on growth, fatty acid, and pigment composition of *Choricystis minor* var. *minor*: a suitable microalga for biodiesel production. *Journal of Applied Phycology*, 28:2679-2686.
- Mérigout, P., Lelandais, M., Bitton, F., Renou, J.-P., Briand, X., Meyer, C., and Daniel-Vedele, F. (2008). Physiological and transcriptomic aspects of urea uptake and assimilation in *Arabidopsis* plants. *Plant Physiology*, 147(3):1225-1238.
- Nahidian, B., Ghanati, F., Shahbazi, M. and Soltani, N. (2018). Effect of nutrients on the growth and physiological features of newly isolated *Haematococcus pluvialis* TMU1. *Bioresource Technology*, 255:229-237.
- Pandey, A., Gupta, A., Sunny, A., Kumar, S. and Srivastava, S. (2020). Multi-objective optimization of media components for improved algae biomass, fatty acid and starch biosynthesis from *Scenedesmus* sp. ASK22 using desirability function approach. *Renewable Energy*, 150:476-486.
- Pinton, R., Tomasi, N., and Zanin, L. (2016). Molecular and physiological interactions of urea and nitrate uptake in plants. *Plant signaling and behavior*, 11(1):e1076603.
- Plaza, B. M., Gómez-Serrano, C., Acién-Fernández, F. G., and Jimenez-Becker, S. (2018). Effect of microalgae hydrolysate foliar application (*Arthrospira platensis* and *Scenedesmus* sp.) on *Petunia x hybrida* growth. *Journal of Applied Phycology*, 30(5):2359-236.
- Puthiyaveetil, S., Ibrahim, I. M. and Allen, J. F. (2012). Oxidation–reduction signalling components in regulatory pathways of state transitions and photosystem stoichiometry adjustment in chloroplasts. *Plant, Cell and Environment*, 35(2):347-359.

- Remacle, C., Epe, G., Coosemans, N., Fernandez, E. and Vigeolas, H. (2014). Combined intracellular nitrate and NIT2 effects on storage carbohydrate metabolism in *Chlamydomonas*. *Journal of Experimental Botany*, 65(1):23-33.
- Renuka, N., Guldhe, A., Singh, P., Ansari, F. A., Rawat, I. and Bux, F. (2017). Evaluating the potential of cytokinins for biomass and lipid enhancement in microalga *Acutodesmus obliquus* under nitrogen stress. *Energy Conversion and Management*, 140:14-23.
- Rocha, R. P., Machado, M., Vaz, M. G. M. V., Vinson, C. C., Leite, M., Richard, R. and Martins, M. A. (2017). Exploring the metabolic and physiological diversity of native microalgal strains (Chlorophyta) isolated from tropical freshwater reservoirs. *Algal Research*, 28:139-150.
- Ronga, D., Biazzini, E., Parati, K., Carminati, D., Carminati, E. and Tava, A. (2019). Microalgal biostimulants and biofertilisers in crop productions. *Agronomy*, 9(4):192.
- Sathasivam, R., Radhakrishnan, R., Hashem, A. and Abd\_Allah, E. F. (2019). Microalgae metabolites: A rich source for food and medicine. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 26(4):709-722.
- Stanier, R. Y., Kunisawa, R., Mandel, M., and Cohen-Bazire, G. (1971). Purification and properties of unicellular blue-green algae (order Chroococcales). *Bacteriological Reviews*, 35(2):171-205. doi:doi:10.1128/br.35.2.171-205.1971.
- Touloupakis, E., Tartari, G., Zittelli, G. C. and Torzillo, G. (2020). Growth and photosynthetic performance of *Chlamydomodium fusiforme* cells cultivated in BG11 and Bristol media. *Journal of Applied Phycology*, 32(1):145-152.