

Investigating the Effect of Salinity and Nitrogen on Growth and Lipid Production in Microalgae *Chlorella vulgaris* EP 33 by Response Surface Methodology

Samira Saeidi Akbarzadeh¹, Elaheh Pourfakhraei^{2*} , Mohsen Zargar³ ,
Seyed Soheil Aghaei⁴, Farhad Jadidi⁵

¹Department of Microbiology, Qom branch, Islamic Azad University, Qom, Iran, Email: samirasaeidi2002@gmail.com

² Industrial and Environmental Biotechnology Department, Research Institute of Applied Science, ACECR, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran, Email: pourfakhraei@acecr.ac.ir

³ Production and Recycling of Materials and Energy Research Center, Qom branch, Islamic Azad University, Qom, Iran, Email: zargar@Qom-iau.ac.ir

⁴ Production and Recycling of Materials and Energy Research Center, Qom branch, Islamic Azad University, Qom, Iran, Email: Aghaei@Qom-iau.ac.ir

⁵ Industrial and Environmental Biotechnology Department, Research Institute of Applied Science, ACECR, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran, Email: f.jadidi1122@gmail.com

Article type:	Abstract
Research article	It is important to increase lipid content to use it in food supplements and biodiesel. Changing the concentration of salinity and nitrogen is one of the important and practical strategies in this direction. <i>Chlorella vulgaris</i> EP33 microalga, isolated and identified from the waters of the northern regions of Iran (Mazandaran province), can be used as a lipid source. This study uses a central composite design in Response Surface Methodology, including 3 replications at the central point and 11 experiments to optimize lipid accumulation. Lipid content was measured after 14 days, in culture conditions at 30°C, light intensity 2000 lux, pH 7 and 16/8 dark and light. The results showed that the highest lipid content was obtained in the optimal conditions of nitrogen 10 and salinity 115 mM (0.503 g/g dry biomass) and the growth rate in these conditions was half of the optimal conditions in nitrogen 10 and zero salinity. The experimental values and the values predicted by the software also had logical relationships, which indicated the appropriateness of the used models as well as the compatibility of the Response Surface Methodology to determine the optimal conditions. Changing the concentration of some effective factors in lipid production, can be used for economic optimization of lipid production with practical purposes. In this study, it was observed that nitrogen supply increases the tolerance level of microalgae to salinity as a practical way to increase lipid production. The results of optimization of process variables through response surface methodology reflect the leading research towards increasing lipid content using an economically efficient technological approach.
Article history	
Received: 20.12.2023	
Revised: 03.03.2024	
Accepted: 11.03.2024	
Published: 21.06.2024	
Keywords	
<i>Chlorella vulgaris</i>	
EP33	
Nitrogen	
Optimization with response surface methodology	
Salinity	

Cite this article as Saeidi Akbarzadeh, S., Pourfakhraei, E., Zargar, M., Aghaei, S.S., Jadidi, F. (2023). Investigating the effect of salinity and nitrogen on lipid production in microalgae *Chlorella vulgaris* EP 33 by response surface methodology. *Journal of Plant Environmental Physiology*, 19(2): 119-130.



©The author(s)

Publisher: Islamic Azad University, Gorgan branch

Doi: <https://doi.org/10.71890/iper.2024.984451>

بررسی اثر شوری و نیتروژن بر رشد و تولید لیپید در ریزجلبک *Chlorella vulgaris* EP 33 با روش سطح پاسخ

سمیرا سعیدی اکبرزاده^۱، الهه پورفخرایی^۲، محسن زرگر^۳، سید سهیل آقائی^۴، فرهاد جدیدی^۵

^۱ گروه میکروبیولوژی، واحد قم، دانشگاه آزاد اسلامی، قم، ایران، رایانامه: Samirasaeidi2002@gmail.com

^۲ گروه بیوتکنولوژی صنعت و محیط، پژوهشکده علوم پایه کاربردی، جهاددانشگاهی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران، رایانامه: pourfakhraei@acecr.ac.ir

^۳ مرکز تحقیقات تولید و بازیافت مواد و انرژی، واحد قم، دانشگاه آزاد اسلامی، قم، ایران، رایانامه: zargar@Qom-iau.ac.ir

^۴ مرکز تحقیقات تولید و بازیافت مواد و انرژی، واحد قم، دانشگاه آزاد اسلامی، قم، ایران، رایانامه: Aghaei@Qom-iau.ac.ir

^۵ گروه بیوتکنولوژی صنعت و محیط، پژوهشکده علوم پایه کاربردی، جهاددانشگاهی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران، رایانامه: f.jadidi1122@gmail.com

نوع مقاله:

مقاله پژوهشی

چکیده

افزایش محتوای لیپید با هدف استفاده در مکمل‌های غذایی و بیودیزل دارای اهمیت است. تغییر غلظت شوری و نیتروژن از استراتژی‌های مهم و کاربردی در این راستا می‌باشد. جلبک *Chlorella vulgaris* EP33 که از آب‌های مناطق شمالی ایران (استان مازندران) جداسازی و شناسایی شده، به عنوان منبع لیپید می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد. در این مطالعه برای بهینه‌سازی تجمع لیپید از طراحی مرکب مرکزی با روش سطح پاسخ شامل ۳ تکرار در نقطه مرکزی و ۱۱ آزمایش مورد استفاده و محتوای لیپید، به مدت ۱۴ روز، در شرایط کشت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد، شدت نور ۲۰۰۰ لوکس، pH ۷ و ۱۶/۸ تاریکی/روشنایی اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد که بیشترین محتوای لیپید در شرایط بهینه نیتروژن ۱۰ و شوری ۱۱۵ میلی‌مولار (۰/۵۰۳ گرم بر گرم بیومس خشک) به دست آمد و میزان رشد در این شرایط نصف مقدار شرایط بهینه در نیتروژن ۱۰ و شوری صفر بود. مقادیر تجربی و مقادیر پیش‌بینی شده با نرم‌افزار نیز دارای روابط منطقی بودند که نشان‌دهنده تناسب مدل‌های به کاررفته و نیز سازگاری روش سطح پاسخ برای تعیین شرایط بهینه بوده است. بر این اساس از تغییرات غلظت برخی عوامل مؤثر در تولید لیپید، می‌توان برای بهینه‌سازی اقتصادی تولید لیپید با اهداف کاربردی استفاده کرد. در این مطالعه مشاهده شد که تأمین نیتروژن باعث افزایش سطح تحمل ریزجلبک مدنظر به شوری به عنوان یک راه عملی برای افزایش تولید لیپید می‌شود. نتایج بهینه‌سازی متغیرهای فرآیند از طریق روش سطح پاسخ، منعکس‌کننده تحقیقات پیشرو در جهت افزایش محتوای لیپید با استفاده از یک رویکرد فن‌آوری اقتصادی کارآمد است.

واژه‌های کلیدی:

بهینه‌سازی با روش سطح

پاسخ

Chlorella vulgaris EP33

شوری

نیتروژن

استناد: سعیدی اکبرزاده، سمیرا؛ پورفخرایی، الهه؛ زرگر، محسن؛ آقائی، سیدسهیل؛ جدیدی، فرهاد. (۱۴۰۳). بررسی اثر شوری و نیتروژن بر رشد و تولید لیپید در ریزجلبک *Chlorella vulgaris* EP 33 با روش سطح پاسخ. فیزیولوژی محیطی گیاهی،

۱۹(۲)، ۱۱۹-۱۳۰.

Doi: <https://doi.org/10.71890/iper.2024.984451>

ناشر: دانشگاه آزاد اسلامی، واحد گرگان

© نویسندگان.



مقدمه

لیپیدها در ریزجلبک‌ها متابولیت‌های بسیار مهمی هستند. در واقع اسیدهای چرب به عنوان اجزای اصلی در فرآیندهای بیوشیمیایی، تشکیل ساختار غشایی، سیگنال دهی نقش دارند و نیز به شکل قطرات لیپیدی در سلول ذخیره می‌شوند (De Carvalho and Caramujo, 2018). تری آسیل گلیسرول (TAG)، یک لیپید ذخیره‌ای کلیدی، به دلیل قابلیت دستکاری در افزایش آن، یک هدف قابل توجه است. ریزجلبک‌ها به طور مؤثر TAG را ذخیره می‌کنند و این لیپید به انعطاف‌پذیری آن‌ها در برابر شرایط نامطلوب محیطی کمک می‌کند. اسیدهای چرب موجود در لیپیدهای ذخیره‌ای همزمان با القای سایر مسیرهای بیوسنتزی لیپیدی تولید می‌شوند و در نتیجه ترکیب اسیدهای چرب نمایانگر واکنش‌های متابولیک در جواب به محرک‌های محیطی است (Jónasdóttir, 2019). گونه‌های مختلف ریزجلبک‌ها دارای نوع و مقدار متفاوتی از لیپیدها هستند اما سطوح پایه را می‌توان با اصلاح متابولیسم لیپید به روش‌های مختلف تغییر داد. از روش‌های تغییر شرایط کشت مانند قرار گرفتن در معرض طول موج‌های مختلف و شدت نور، سطوح دی‌اکسیدکربن، دما، pH، مواد مغذی، تنش نسبت به فلزات سنگین، تش به شوری و استفاده از نانوذرات است. روش دیگر از طریق مهندسی ژنتیک است، که در آن ژن‌های خاص مرتبط با متابولیسم لیپیدها برای بهبود سنتز، ذخیره‌سازی و محتوای ساختاری لیپیدها در داخل سلول ریزجلبک دستکاری می‌شوند (Alishah Aratboni et al., 2019).

جلبک‌ها از ارگانسیم‌هایی هستند که قابلیت فتوسنتز اکسیژنی داشته و نقش مهم در زیست‌گاه‌های آبی دارند. ریزجلبک‌های یوکاریوتی در اکثر زیست‌بوم‌ها به عنوان تولیدکنندگان اولیه محسوب می‌شوند و دارای انعطاف‌پذیری و سازگاری بالایی با

اکثر تنش‌های غیر زیستی هستند. برخی از گونه‌های متعلق به یک جنس می‌توانند هم در آب شیرین و هم در آب شور رشد کنند (Shetty et al., 2019). ریزجلبک‌ها با تجزیه مواد آلی، جذب فلزات سنگین و نیز تنظیم نیاز شیمیایی و بیولوژیکی اکسیژن نقش مهمی در کاهش آلودگی دارند. آن‌ها حاوی پروتئین‌ها، لیپیدها و کربوهیدرات‌ها به ترتیب از ۲۸ تا ۷۰ درصد، ۱۰ تا ۲۰ درصد و ۱۰ تا ۵۰ درصد هستند و در آبی‌پروری برای تغذیه ماهی و میگو به کار گرفته می‌شوند که باعث رشد سریع و محتوای غذایی بالا می‌شوند. محتوای چربی بالای آن‌ها باعث می‌شود برای تولید سوخت زیستی مناسب باشند و در مقایسه با گیاهان خشکی به حداقل زمین نیاز دارند. نیتروژن از جمله مواد مغذی ضروری مؤثر بر رشد جلبک، عملکرد زیست‌توده، و تولید لیپید و اسیدهای چرب و از عوامل کلیدی در کشت ریزجلبک است (Yaakob et al., 2021). درواقع ریزجلبک‌ها منابع غذایی جایگزین و جدیدی هستند که می‌توانند در گسترش و بهبود تغذیه مورد استفاده قرار گیرند (Mutawie, 2015).

در تغییرات غلظت نمک، ریزجلبک‌های فتوسنتزی تک‌سلولی بسیار آسیب‌پذیر هستند زیرا نه تنها با عدم تعادل یونی و استرس اسمزی بلکه با گونه‌های فعال اکسیژن تولیدشده که در فتوسنتز تداخل دارند نیز دست‌وپنجه نرم می‌کنند (Shetty et al., 2019). تغییرات در غلظت نمک منجر به تغییرات متابولیک در ریزجلبک‌ها می‌شود که یکی از این تغییرات برای مقابله با تنش شوری افزایش محتوای لیپید است که می‌تواند به عنوان هدفی کاربردی در تولید اقتصادی لیپید مورد استفاده قرار گیرد (Kan et al., 2012; Sharma et al., 2012; Teh et al., 2021).

لیپیدها ترکیبات ذخیره‌سازی انرژی بالا هستند و زمانی که سلول‌های جلبک در شرایط محیطی

نامطلوب قرار دارند، سنتز می‌شوند. از افزایش غلظت نمک می‌توان برای تولید انبوهی از محصولات با ارزش استفاده کرد. مطالعات متعددی در مورد بهره‌برداری از شرایط شوری بالا به‌عنوان روشی برای بهبود تولید لیپید جلبکی انجام شده است. به‌طور کلی، تنش شوری باعث افزایش تولید لیپید و کاروتن می‌شود که پدیده‌ای قابل بهره‌برداری است و می‌تواند سبب تجاری‌سازی بهینه شود. چنین پدیده‌ای برای تولید کاروتن در *D. salina* مشاهده شد که هر یک از عوامل کمبود نیتروژن و افزایش غلظت نمک می‌تواند یک راه عملی برای افزایش تولید گلیسرول با استفاده از ریزجلبک‌ها باشد (Shetty et al., 2019).

استرس ناشی از غلظت بالای نمک تقسیم سلولی را کند می‌کند و اندازه را کاهش می‌دهد. نرخ رشد بلافاصله و مستقیماً تحت تأثیر قرار می‌گیرد. افزایش غلظت نمک بر رشد سایر گونه‌های جلبک آب شیرین مانند *Chlorella vulgaris*، *Chlorella salina* و *Chlorella emersonii* تأثیر منفی گذاشته است (Shetty et al., 2019).

همچنین غلظت نیتروژن به‌طور قابل‌توجهی بر رشد ریزجلبک‌ها و ترکیبات بیوشیمیایی آن‌ها تأثیر می‌گذارد. درعین‌حال، کاهش نیتروژن در محیط کشت باعث کاهش رشد با افزایش همزمان در تولید لیپید می‌شود. Yang و همکاران در سال ۲۰۰۸ نشان دادند که تحت شرایط کمبود نیتروژن، تجمع زیست‌توده در *Chlamydomonas reinhardtii* تا ۳۱/۷ درصد کاهش یافت که با افزایش همزمان در بازده کل اسیدچرب تا ۹۳ درصد، با افزایش تولید لیپید تا $1/78 \pm 113/46$ میلی‌گرم در لیتر همراه بود. بنابراین، می‌توان نتیجه گرفت که غلظت نیتروژن به نفع بهره‌وری زیست‌توده بالاتر است و کاهش نیتروژن، سرعت را به سمت تولید لیپید تغییر می‌دهد (Yaakob et al., 2021).

Zhu و همکاران در سال ۲۰۱۴ گزارش دادند که *Chlorella zofingiensis* رشد سریعی در محیط کشت با نیتروژن کافی دارد، درحالی‌که مهار رشد در شرایط کمبود نیتروژن مشاهده شد. با کمبود نیتروژن، تجمع چربی که برای تولید بیودیزل مطلوب است، به‌شدت افزایش یافت (Zhu et al., 2014). برای تولید متابولیت هدف با حفظ افزایش رشد نیاز به بهینه‌سازی وجود دارد. برای رشد بهینه و تجمع متابولیت‌ها، عوامل فیزیوشیمیایی مانند دما، pH، مواد مغذی، کیفیت و شدت نور، هم زدن، عرضه CO_2 ، دوره نوری و غیره نیازمند کنترل است. شرایط مؤثر در تغییر مسیرهای متابولیکی، تغییرات سطوح مواد غذایی، شوری، حضور فلزات سنگین و نانوذرات است. این عوامل مختص به سویه ریزجلبکی هستند (Mutanda et al., 2020).

روش سطح پاسخ^۱ (RSM) یک تکنیک آماری معتبر مورد استفاده در طراحی آزمایش است که دارای سه مرحله اصلی شامل طراحی و انجام تست‌های آماری، ارزیابی ضرایب در یک مدل ریاضی با پیش‌بینی پاسخ و بررسی مناسب بودن مدل می‌باشد. این تکنیک با ترسیم اثرات مستقیم و تعاملی پارامترها در فضاهای دوبعدی و سه‌بعدی، مجموعه پارامترهای آزمایشی را پیدا می‌کند که بالاترین و کمترین مقدار پاسخ را ایجاد می‌کند (Pankajand Awasthi, 2014). در این مطالعه از رایج‌ترین و عمومی‌ترین مدل، طراحی مرکب مرکزی^۲ (CCD)، برای فرمول‌بندی طرح آزمایشی استفاده شد. از آنجایی‌که سویه جدا شده به‌عنوان یک کاندید امیدوارکننده برای رشد و تولید لیپید است، هدف این پژوهش، امکان‌سنجی و بهینه‌سازی رشد و افزایش تولید لیپید با استفاده از غلظت‌های مختلف نیتروژن و شوری بود.

¹ Response Surface Methodology

² Central Composite Design

مواد و روش‌ها

کشت سویه: سویه *Chlorella vulgaris* EP33 در محیط N8 (Hamed et al., 2012) در فلاسک ۱۰۰۰ میلی‌لیتری به مدت ۱۴ روز در شرایطی که در مطالعات پیش‌تر بهینه‌سازی شده بود، دما ۳۰ درجه سانتی‌گراد، شدت نور ۲۰۰۰ لوکس، pH ۷ و ۱۶/۸ تاریکی/روشنایی کشت داده شد.

طراحی آزمایش: در مطالعه حاضر، مهم‌ترین مسئله بررسی اثرات اصلی و متقابل مقدار شوری، نیتروژن و پیش‌بینی بهینه این متغیرها با بالاترین بازده تولید لیپید بوده و طراحی آزمایش به روش سطح پاسخ و به‌صورت طرح مرکب مرکزی انجام شده است. بدین منظور از نرم‌افزار Design Expert نسخه ۱۲ استفاده شد. به دنبال هدف افزایش تولید لیپید، دو متغیر شوری و نیتروژن هرکدام در پنج سطح مورد آزمایش قرار گرفته‌اند. شوری در محدوده ۱۰-۱۵۰ میلی‌مولار و مقادیر نیتروژن نیز در بازه ۱۰-۰/۱ میلی‌مولار در نظر گرفته شد. تمامی آزمایش‌ها در شرایط ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی، شدت نور ۲۰۰۰ لوکس و شرایط دمایی ۳۰ درجه سانتی‌گراد که قبلاً برای بهبود رشد این گونه بهینه‌سازی شده بود، اجرا شدند. مقدار $\alpha=2$ ، نوع طراحی کوچک^۱ و تعداد سه عدد نقطه مرکزی برای تخمین خطای آزمایش‌کننده در نظر گرفته شده است. بنابراین محیط‌های کشت تغییر یافته N8 حاوی مقادیر نیتروژن ۰/۱-۲/۵۷۵-۵/۰۵-۱۰-۷/۵۲۵ میلی‌مولار و نیز شوری ۱۰-۴۵-۸۰-۱۱۵ میلی‌مولار تهیه شد. به همه محیط‌های کشت به میزان یکسانی ($OD_{690}=1/5$) از سویه مورد آزمایش تلقیح شد.

اندازه‌گیری میزان رشد: میزان رشد با خوانش جذب نوری با کمک دستگاه اسپکتروفتومتر (WPA,

S2000) در طول موج ۶۹۰ نانومتر در توالی‌های زمانی مشخص (یک روز در میان)، اندازه‌گیری و ثبت شد. **اندازه‌گیری میزان لیپید:** زیست‌توده‌ها توسط سانتریفیوژ (شرکت Pole Ideal Tajhiz, PIT320R, ایران) در ۷۰۰۰ دور در دقیقه و مدت ۲ دقیقه جمع‌آوری شدند، سپس ۲ بار با آب خالص شستشو و سپس در آون با دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۲ ساعت خشک شدند. برای تعیین محتوای چربی از روش بلای و دایر^۲ استفاده شد (Ruangsombhoon, 2015). به‌طور خلاصه، ۱۰۰ میلی‌گرم زیست‌توده توزین و سپس با هاون آسیاب شد. سپس با ۱۰ میلی‌لیتر کلروفرم/تانول (۲:۱) مخلوط و به مدت ۲ دقیقه ورتکس شد. مخلوط به‌دست‌آمده در داخل اولتراسونیک (VGT-180QTD, ULTRA®, کره) با ۴۰ کیلوهرتز به مدت ۳۰ دقیقه با فواصل هر ۱۰ دقیقه، ۵ دقیقه استراحت و به همراه یخ، اولتراسونیک شد. معادل ۲۵ درصد حجم مخلوط، NaCl ۰/۹ درصد اضافه شد. به مدت ۵ دقیقه در ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. لایه آلی به‌دقت به داخل ظرف شیشه‌ای که از قبل وزن شده بود ریخته شد. ۵ میلی‌لیتر مخلوط کلروفرم/تانول با نسبت ۲:۱ به پلت اضافه شد و مراحل فوق تکرار شد. لایه آلی با قرار دادن ظرف به مدت ۲۴ ساعت در زیر هود تبخیر شد. با استفاده از روش وزن سنجی، محتوای چربی به‌عنوان نسبت وزن عصاره لیپیدی به وزن زیست‌توده خشک تعیین شد.

تائید مدل پیشنهادی: برای تائید نتایج، یک کشت تازه از سویه موردنظر در محیط کشت N8 استریل ۲۰۰ میلی‌لیتری حاوی غلظت نیتروژن و میزان شوری پیشنهادشده با روش سطح پاسخ انجام و مقدار محتوای لیپیدی آن مطابق آنچه پیش‌تر گفته شد،

² Bligh and Dyer¹ Small design

نوری تقریباً مشابه در ۶۹۰ نانومتر تلقیح شدند و تحت شرایط پیش تر گفته شده، به مدت ۱۳ روز رشد کردند. اثر تغییرات غلظت نیتروژن و شوری در هر ۵ سطح مختلف مطابق جدول ۱ بررسی و نتایج در نرم افزار ثبت شد.

بررسی اثر غلظت های مختلف نیتروژن و شوری بر میزان رشد: بررسی اثر متقابل غلظت های مختلف نیتروژن و شوری بر روی میزان رشد نشان داد که کاهش غلظت نیتروژن و افزایش میزان شوری، اثر قابل توجهی بر رشد در طی ۱۳ روز دارد و آن را کاهش می دهد (شکل ۱) و حداکثر میزان رشد در غلظت های بالای نیتروژن و پایین شوری حاصل می شود.

اندازه گیری و تفاوت آن با نتیجه مدل پیشنهادی، با استفاده از آزمون نمونه مستقل t-test بررسی شد.

تجزیه و تحلیل آماری

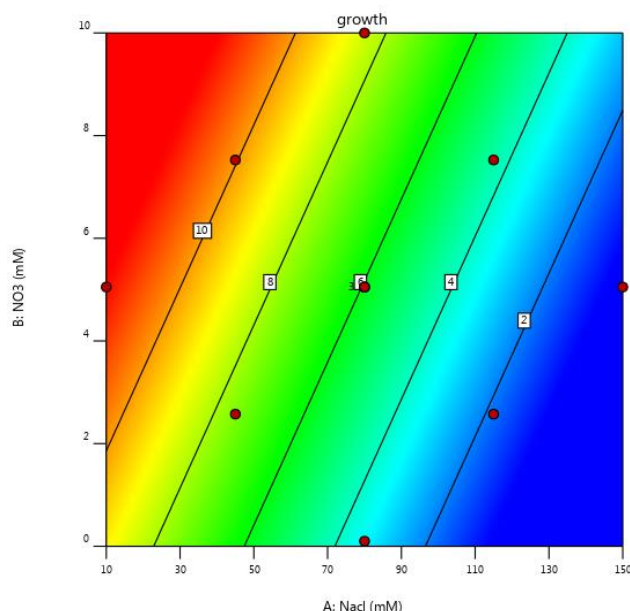
با استفاده از نرم افزار Design Expert نسخه ۱۲ کلیه داده ها تجزیه و تحلیل شد. هر یک از آزمایش ها سه بار انجام شد و مقدار میانگین به عنوان پاسخ گزارش گردیده است.

نتایج

برای تعیین اثر نیتروژن و شوری بر روی *C. vulgaris* EP33 رشد یافته در شرایط فوتواتروفیک، به محیط های کشت آماده شده بر طبق آزمایش طراحی شده در روش سطح پاسخ با جذب

جدول ۱: سطوح تعیین شده در روش سطح پاسخ برای بررسی اثر شوری و نیتروژن بر رشد و مقدار لیپید در ریزجلبک *C. vulgaris* EP33

متغیرها	کمترین	- آلفا	مرکزی	+ آلفا	بیشترین
غلظت سدیم کلراید (میلی مولار)	۱۰	۴۵	۸۰	۱۱۵	۱۵۰
غلظت نیتروژن (میلی مولار)	۰/۱	۲/۵۷۵	۵/۰۵	۷/۵۲۵	۱۰



شکل ۱: نمودار دوبعدی روش سطح پاسخ برای اثر دو متغیر شوری و نیتروژن بر رشد

تجزیه و تحلیل نتایج سطح پاسخ بهینه‌سازی رشد معادله (۱) نحوه ارتباط پارامترهای مستقل و پاسخ را نشان می‌دهد.

(معادله ۱)

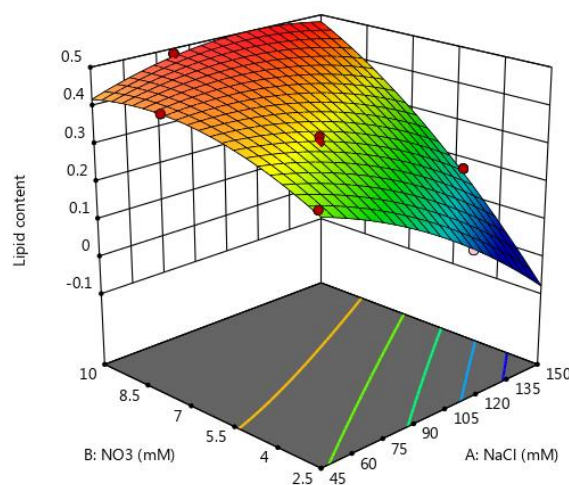
$$B \times 1/27 + (-2/85 \times A) + 5/94 = \text{میزان رشد}$$

در این معادله A مقدار غلظت نمک برحسب میلی‌مولار و B مقدار غلظت نیتروژن برحسب میلی‌مولار است. همچنین میزان رشد براساس میزان جذب نوری در طول موج ۶۹۰ نانومتر است. تحلیل آماری توسط نرم‌افزار Design Expert نشان می‌دهد مدل خطی با سطح اطمینان ۹۵ درصد، تطابق بسیار خوبی با داده‌های آزمایشگاهی دارد. مقدار P برای این معادله کمتر از ۰/۰۵ می‌باشد که نشان‌دهنده معنی‌دار بودن مدل می‌باشد. همان‌طور که معادله مدل نشان می‌دهد میزان رشد با غلظت نیتروژن رابطه مستقیم و با شوری نسبت عکس دارد. همچنین غلظت نمک دارای اثر بیشتری است. شرایط بهینه پیشنهادی برای حداکثر رشد، برای دو متغیر نیتروژن و شوری به ترتیب مقادیر ۱۰ و ۰ میلی‌مولار با میزان مطلوبیت ۰/۹۳۴ توسط این نرم‌افزار پیشنهاد شد. مقادیر P و F مربوط به مدل نشان می‌دهد مدل پیشنهادی صحت کافی را دارا است. همچنین از آنجا که مقدار عدم تطابق معنی‌دار

نمی‌باشد، نشان می‌دهد که داده‌های مدل کاملاً قابل اطمینان است. مقدار R^2 برای این مدل ۰/۹۷۰۱ می‌باشد که نشان می‌دهد مدل پیشنهادی به خوبی می‌تواند داده‌های آزمایش را پیش‌بینی کرده و صحت برازش تایید می‌شود. میانگین جذب نوری در طول موج ۶۹۰ نانومتر و انحراف معیار به ترتیب ۵/۹۴ و ۰/۶۷۰۶ می‌باشد.

آزمون تجربی جهت تأیید مدل پیشنهادی با دو کمیت تعیین شده از متغیرها انجام شد که میزان رشد با جذب نوری 0.275 ± 0.537 در طول موج ۶۹۰ نانومتر در روز ۱۳ به دست آمد که در مقایسه با میزان به دست آمده از نرم‌افزار که مقدار ۱۴/۹۹۱ بود، تفاوت معنی‌داری نداشت و نشان از کاربردی بودن مدل پیشنهادی دارد.

بررسی اثر غلظت‌های مختلف نیتروژن و شوری بر میزان لیپید: همان‌طور که شکل زیر (شکل ۳) نشان می‌دهد روند تولید لیپید (گرم بر گرم وزن خشک) در غلظت‌های نیتروژن و شوری مختلف متفاوت است به‌طوری‌که در غلظت‌های بالای نیتروژن، افزایش شوری منجر به افزایش میزان لیپید کل می‌شود. ولی در غلظت‌های پایین نیتروژن با افزایش شوری کاهش محتوای لیپید رخ می‌دهد.



شکل ۲: نمودار سه‌بعدی روش سطح پاسخ برای اثر دو متغیر شوری و نیتروژن بر محتوای لیپید

تجزیه و تحلیل نتایج سطح پاسخ بهینه سازی تولید لیپید معادله (۲) نحوه ارتباط پارامترهای مستقل و پاسخ را نشان می دهد.

(معادله ۲)

$$+ 0.0500 \times AB + (- 0.0200 \times A^2) + (- 0.0253 \times B^2) \\ + 0.1090 \times B - 0.0593 \times A + 0.3621 = \text{مقدار لیپید}$$

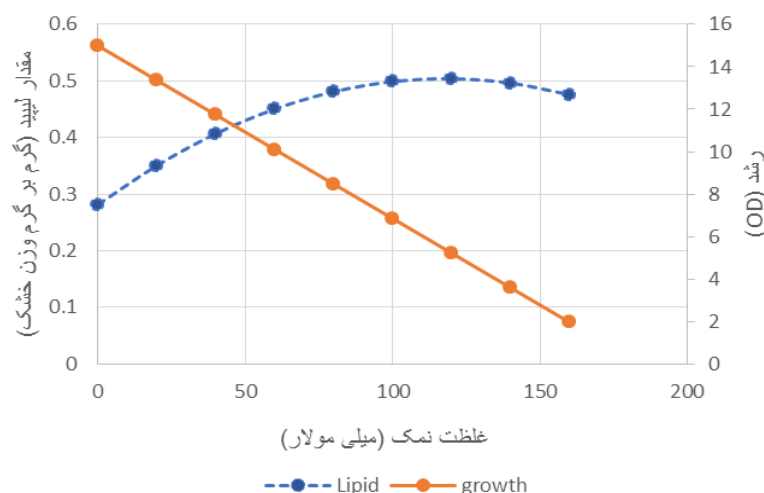
در این معادله A مقدار غلظت نمک بر حسب میلی مولار و B مقدار غلظت نیتروژن بر حسب میلی مولار است. همچنین مقدار لیپید بر حسب گرم بر گرم وزن خشک است.

همان طور که معادله مدل نشان می دهد غلظت نیتروژن دارای اثر بیشتری نسبت به تغییرات غلظت نمک است. تحلیل آماری توسط نرم افزار Design Expert نشان می دهد مدل درجه ۲ با سطح اطمینان ۹۵ درصد، تطابق بسیار خوبی با داده های آزمایشگاهی دارد. مقدار P برای این معادله کمتر از ۰/۰۵ می باشد که نشان دهنده معنی دار بودن مدل می باشد. جدول ANOVA برای اثر این دو متغیر بر رشد در زیر آورده شده است (جدول ۲). شرایط بهینه پیشنهادی برای حداکثر رشد، برای دو متغیر نیتروژن و شوری به ترتیب مقادیر ۱۰ و ۱۱۵ میلی مولار با میزان مطلوبیت ۰/۸۲۱ توسط این نرم افزار پیشنهاد شد. مقادیر F و P مربوط به مدل نشان می دهد مدل پیشنهادی صحت کافی را دارا می باشد. همچنین

از آنجا که مقدار عدم تطابق معنی دار نمی باشد، نشان می دهد که داده های مدل کاملاً قابل اطمینان است. مقدار R^2 برای این مدل ۰/۹۹۴۲ می باشد که نشان می دهد مدل پیشنهادی به خوبی می تواند داده های آزمایش را پیش بینی کرده و صحت برازش تایید می شود. میانگین مقدار لیپید کل بر حسب گرم بر گرم وزن خشک و انحراف معیار به ترتیب ۰/۳۱۲۷ و ۰/۰۱۵۷ می باشد.

آزمون تجربی جهت تایید مدل پیشنهادی با دو کمیت تعیین شده از متغیرها انجام شد که محتوای لیپید 0.13 ± 0.052 گرم بر گرم وزن خشک در روز ۱۳ به دست آمد که در مقایسه با میزان به دست آمده از نرم افزار که مقدار ۰/۵۰۳ گرم بر گرم وزن خشک بود، تفاوت معنی داری نداشت.

همچنین با مقایسه هر دو نمودار رشد و محتوای لیپید در شرایط نیتروژن ثابت ۱۰ میلی مولار و غلظت های مختلف شوری (شکل ۳) می توان دریافت که در شوری در حدود ۴۵ میلی مولار می توان به طور همزمان هم رشد و هم محتوای لیپید مطلوبی داشت. برای اثبات این نتیجه، یک آزمایش تجربی با این غلظت ها انجام شد که نتایج رشد و محتوای لیپید به ترتیب 0.123 ± 0.1114 و 0.004 ± 0.0425 گرم بر گرم وزن خشک بود که با نتایج مدل پیشنهادی (رشد و محتوای لیپید به ترتیب ۱۱/۳۲ و ۰/۴۱۹) تفاوت معنی داری نداشت و صحت مدل تایید گردید.



شکل ۳: نمودار رشد و محتوای لیپید بر اساس تغییرات شوری و در غلظت نیتروژن ثابت

بحث

در این پژوهش اثر نقش نیتروژن و شوری در کشت ریزجلبک *C. vulgaris* EP33 با هدف اصلی بررسی رشد و افزایش محتوای لیپید در حضور مقادیر متفاوت این دو فاکتور مورد بررسی قرار گرفته است. *C. vulgaris* یک ریزجلبک با قابلیت سازگاری برای رشد در محیط‌های با میزان شوری ۰ تا ۵۰ گرم در لیتر است (Shen et al., 2015). ریزجلبک‌ها نرخ رشد و تولید زیست‌توده بالاتری را نسبت به سایر منابع لیپید نشان می‌دهند که می‌تواند منبع جایگزینی برای محصولات زیستی به دلیل سطوح بالای لیپیدها در سلول‌ها باشد. علاوه بر این، محیط‌های کشت حاوی مقدار زیاد نیتروژن برای افزایش سرعت رشد ریزجلبک‌ها و تولید زیست‌توده مناسب‌تر هستند. شرایط محدودیت مواد مغذی و تنش‌ها در جهت تولید لیپید کارآمد هستند. بهینه‌سازی مواد مغذی در کشت ریزجلبک‌ها با هدف تغییرات متابولیک برای تولید محصولات با ارزش می‌تواند زمینه‌ساز استفاده بهتر آن‌ها در تولید لیپید، پروتئین، آنتی‌اکسیدان‌ها کاربردهای دارویی و غذایی باشد (Yaakob et al., 2021).

روش سطح پاسخ، روشی مؤثر و مناسب است و همچنین دارای مزایای بیشتری مانند تعیین متغیرهای مؤثر و تأثیر متقابل آن‌ها بر پاسخ‌ها و همچنین کاهش هزینه و زمان با حداقل تعداد آزمایش نسبت به روش‌های مرسوم است (Fawzy and Alharthi, 2021). بنابراین، این تحقیق به منظور بررسی اثر غلظت نیتروژن و شوری بر روی رشد و محتوای لیپید از طریق بهینه‌سازی با روش سطح پاسخ متمرکز شد. همان‌طور که در شکل ۱ مشاهده می‌شود، نتایج حاصل از این بررسی نشان می‌دهد که در شوری حداقل و نیتروژن کم، رشدی به‌طور متوسط ($OD = 9/86$) و در شوری حداکثر و نیتروژن حداکثر نیز رشد بسیار کم ($OD = 2/77$) بود. این در حالی است که در شوری حداقل و نیتروژن حداکثر بالاترین میزان رشد ($OD = 14/99$) مشاهده شد. ولی در شوری حداکثر و نیتروژن حداقل، رشد به‌طور کامل متوقف و سپس سلول‌ها روند رو به مرگ را در پیش گرفتند که این مسئله به دلیل عدم شرایط لازم برای تحمل فشار اسمزی ناشی از شوری توسط سلول‌هاست. این روند در صورتی که غلظت نیتروژن کمتر از ۷ میلی‌مولار و مقدار شوری از متوسط تا زیاد (۸۰-۱۵۰ میلی‌مولار)

تنظیم‌کننده اسمز است که وابسته به غلظت نیتروژن هستند. اکثر جلبک‌های سبز تحت تنش شوری تجمع مشخصی از لیپیدها را نشان می‌دهند (Shetty et al., 2019). درواقع به نظر می‌رسد که در این مطالعه اسمولایت اصلی در تنظیم فشار اسمزی داخل سلول این ریزجلبک، متابولیت‌های دارای نیتروژن هستند که در صورت فقدان و یا کمبود نیتروژن، توان تولید این متابولیت‌ها را ندارند و سلول می‌میرد.

با توجه به نوع گونه مورد مطالعه نوع پاسخ به تنش‌های محیطی می‌تواند متفاوت باشد (Shetty et al., 2019). در این مطالعه نشان داده شد که به علت مرگ سلولی در غلظت‌های بالای نمک و کم نیتروژن، میزان محتوای لیپید بسیار کم بود. ولی در غلظت ۱۰ میلی مولار نیتروژن که معادل غلظت آن در محیط کشت این ریزجلبک است و در شوری بالا میزان محتوای لیپید به حداکثر مقدار خود رسید که با مطالعه‌ای که Hopkins و همکاران در سال ۲۰۱۹ انجام دادند، مطابقت دارد (Hopkins et al., 2019).

لیپیدها به عنوان ترکیبات ذخیره‌سازی انرژی بالا تولید می‌شوند و زمانی که سلول‌های جلبک در شرایط محیطی نامطلوب قرار دارند، سنتز می‌شوند. هنگامی که سلول‌های جلبکی به شرایط بهینه منتقل می‌شوند، این مولکول‌های لیپیدی مورد استفاده قرار می‌گیرند. بااین حال، توجه به این نکته مهم است که تجمع لیپید در همه جلبک‌ها وجود ندارد و این یافتن گونه توانمند در تولید لیپید را دارای اهمیت می‌کند (Shetty et al., 2019). در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۷ انجام شد، محققان دو سویه ریزجلبک شامل *C. vulgaris* و *Acutodesmus obliquus* در محیط کشت BG11 با تنش شوری بین ۰/۶ تا ۰/۴ مولار NaCl رشد دادند. بالاترین محتوای چربی در *C. vulgaris* و *A. obliquus* به ترتیب ۴۹ و ۴۳ درصد در BG11 اصلاح شده با ۰/۴ مولار NaCl بود که این تفاوت می‌تواند به علت

باشد، به همین صورت است. Tavares و همکاران در سال ۲۰۲۳ مشاهده کردند که حداکثر تولید زیست توده، کلروفیل‌ها و کاروتنوئیدها در تیمار با غلظت بالاتر نیتروژن در *C. vulgaris* است (Tavares et al., 2023). در مطالعه دیگری اعلام شد که محرومیت از نیتروژن منجر به مهار شدید رشد سلولی و تخریب شدید کلروفیل در سلول‌های *C. zoofingiensis* شد. این محققان اعلام کردند که در شرایط فقدان نیتروژن، میزان رشد در روز دهم کشت، بیش از ۴ برابر کاهش یافت و از ۳/۱ گرم در لیتر به ۰/۷ گرم در لیتر رسید (Zhu et al., 2014). در مطالعه دیگری که در سال ۲۰۱۷ انجام شد، محققان با افزایش غلظت شوری ایجاد شده توسط سدیم کلراید و پتاسیم کلراید، کاهش قابل ملاحظه‌ای را در منحنی رشد *C. vulgaris* توسط هر دو عامل شوری مشاهده کردند. در این مطالعه از فاضلاب مصنوعی به عنوان محیط کشت استفاده شده است. میزان کاهش رشد در محیط حاوی نمک در مقایسه با محیط فاقد نمک ۴۳ درصد بود (Church et al., 2017). همان‌طور که پیش‌تر نیز اشاره شد، معادله مدل در این مطالعه نشان داد که میزان رشد با غلظت نیتروژن رابطه مستقیم و با شوری نسبت عکس دارد. Yaakob و همکاران در سال ۲۰۲۱ گزارش دادند که مقدار بیومس ارتباط مستقیمی با مقدار نیتروژن در محیط کشت دارد (Yaakob et al., 2021). در این مطالعه، در شرایط ۱۵۰ میلی مولار شوری و ۱۰ میلی مولار نیتروژن، ۷ برابر کاهش رشد مشاهده شد که با نتایج سایر پژوهشگران همخوانی دارد.

سلول‌های *Chlorella* sp. به دلیل سختی دیواره سلولی توانایی محدودی در تغییر حجم سلول دارند. ازاین‌رو، تنظیم اسمزی از طریق تولید املاح آلی و تجمع یون‌های معدنی برای حفظ هموستاز اسمزی استفاده می‌شود. پرولین، لیزین و لوسین از مواد

تفاوت در شرایط کشت از جمله نوع محیط کشت مورد استفاده و سویه باشد (Pandit et al., 2017). در مطالعه ای که در سال ۲۰۱۴ انجام شد، پژوهشگران از *Chlorella pyrenoidosa* در شرایط هتروتروف برای این مطالعه استفاده کردند و مشاهده کردند که در شرایطی که تمامی مواد غذایی فراهم است، بیومس در روز هفتم از ۰/۳۲ به ۰/۸۸ گرم بر لیتر رسید در حالیکه در شرایط فقدان نیتروژن، به میزان ۰/۶۴ گرم بر لیتر رسید. همچنین محتوای لیپید کل در روز هفتم در شرایط دارای نیتروژن و فقدان نیتروژن به ترتیب ۱۹/۶۹ درصد و ۴۹/۱۴ درصد بود (Fan et al., 2014).

تاکنون بسیاری از مطالعات نشان داده اند که تیمار با نمک به شدت سنتز لیپیدها را در ریزجلبک‌ها تقویت می‌کند، اما رشد سلولی را نیز مهار می‌کند. در مطالعه دیگری که در سال ۲۰۲۱ انجام شد، محققان با کشت یک گونه‌ای از *Chlorella* sp. که از منطقه‌ای بیابانی جدا شده بود، در غلظت‌های ۰ تا ۰/۸ مولار سدیم کلراید در یافتند که بالاترین میزان رشد و لیپید کل در غلظت ۰/۲ مولار است. آنها مشاهده کردند که در غلظت‌های بالا رشد کاهش یافت. به‌طوری‌که جذب نوری در طول موج ۶۸۰ نانومتر در روز دوازدهم در نمونه کنترل، تیمار ۰/۲ و تیمار ۰/۸ مولار سدیم کلراید به ترتیب ۰/۶، ۰/۷۵ و ۰/۴ بود. همچنین

محتوای لیپیدی نیز در گروه کنترل ۱۸ درصد و در تیمار ۰/۲ مولار به ۲۶ درصد رسید. تفاوت در پاسخ به استرس شوری به مقدار زیادی به سویه و شرایط کشت بستگی دارد (Li et al., 2021). نتایج به‌دست آمده در این پژوهش نتایج تحقیقات قبلی را تأیید می‌نماید با این تفاوت که در مطالعات پیشین کمتر به بررسی همزمان دو متغیر شوری و نیتروژن بر رشد و تولید محتوای لیپید پرداخته شده است و از این رو این مطالعه دارای نوآوری است.

نتیجه‌گیری نهایی

بر اساس نتایج حاصل از این پژوهش، همان‌طور که در شکل ۳ نیز نشان داده شده، می‌توان با استفاده از تنش شوری باعث افزایش لیپید کل شد که البته این در صورتی است که نیتروژن لازم جهت بقای سلول‌های ریزجلبکی جهت مقابله با فشار اسمزی ناشی از شوری با تأمین اسمولایت‌ها، در دسترس سلول باشد و می‌توان با بهینه‌سازی مقادیر نیتروژن و شوری میزان رشد و تولید لیپید را افزایش داد.

سپاسگزاری

نویسندگان از پژوهشکده علوم پایه کاربردی، جهاد دانشگاهی و وزارت علوم، تحقیقات و فناوری برای حمایت مالی از این پژوهش قدردانی می‌کنند.

References

- Alishah Aratboni, H., Rafiei, N., Garcia-Granados, R., Alemzadeh, A. and Morones-Ramírez, J. R. (2019). Biomass and lipid induction strategies in microalgae for biofuel production and other applications. *Microbial Cell Factories*, 18(1): 1-17 .
- Church, J., Hwang, J.-H., Kim, K.-T., McLean, R., Oh, Y.-K., Nam, B., Joo, J. C. and Lee, W. H. (2017). Effect of salt type and concentration on the growth and lipid content of *Chlorella vulgaris* in synthetic saline wastewater for biofuel production. *Bioresource Technology*, 243: 147-153 .
- De Carvalho, C. C. and Caramujo, M. J. (2018). The various roles of fatty acids. *Molecules*, 23(10): 2583 .
- Fan, J., Cui, Y., Wan, M., Wang, W. and Li, Y. (2014). Lipid accumulation and biosynthesis genes response of the oleaginous *Chlorella pyrenoidosa* under three nutrition stressors. *Biotechnology for Biofuels*, 7: 1-14 .

- Fawzy, M. A. and Alharthi, S. (2021). Use of response surface methodology in optimization of biomass, lipid productivity and fatty acid profiles of marine microalga *Dunaliella parva* for biodiesel production. *Environmental Technology and Innovation*, 22: 101485 .
- Hamed, S., Mahdavi, M. A. and Gheshlaghi, R. (2012). Lipid content and biomass production of *Chlorella vulgaris* is affected by growth conditions. 2012 Second Iranian Conference on Renewable Energy and Distributed Generation, 65-68 .
- Hopkins, T. C., Graham, E. J. S., Schwilling, J., Ingram, S., Gómez, S. M. and Schuler, A. J. (2019). Effects of salinity and nitrogen source on growth and lipid production for a wild algal polyculture in produced water media. *Algal Research*, 38: 101406 .
- Jónasdóttir, S. H. (2019). Fatty acid profiles and production in marine phytoplankton. *Marine drugs*, 17(3): 151 .
- Kan, G., Shi, C., Wang, X., Xie, Q., Wang, M., Wang, X. and Miao, J. (2012). Acclimatory responses to high-salt stress in *Chlamydomonas* (Chlorophyta, Chlorophyceae) from Antarctica. *Acta Oceanologica Sinica*, 31(1): 116-124 .
- Li, H., Tan, J., Mu, Y. and Gao, J. (2021). Lipid accumulation of *Chlorella* sp. TLD6B from the Taklimakan Desert under salt stress. *PeerJ*, 9: e11525 .
- Mutanda, T., Naidoo, D., Bwapwa, J., and Anandraj, A. (2020). Biotechnological applications of microalgal oleaginous compounds: current trends on microalgal bioprocessing of products. *Frontiers in Energy Research*, 8: 598803 .
- Mutawie, H. H. (2015). Growth and metabolic response of the filamentous cyanobacterium *Spirulina platensis* to salinity stress of sodium chloride. *Life Sci. J*, 12: 71-78 .
- Pandit, P. R., Fulekar, M. H., and Karuna, M. S. L. (2017). Effect of salinity stress on growth, lipid productivity, fatty acid composition, and biodiesel properties in *Acutodesmus obliquus* and *Chlorella vulgaris*. *Environmental Science and Pollution Research*, 24: 13437-13451 .
- Pankaj, V. P. and Awasthi, M. (2014). Optimization of Growth Condition for *Chlorella Vulgaris* Using Response Surface Methodology (Rsm). *International Journal of Engineering Science and Advanced Technology*, 4(5): 492-500 .
- Ruangsomboon, S. (2015). Effects of different media and nitrogen sources and levels on growth and lipid of green microalga *Botryococcus braunii* KMITL and its biodiesel properties based on fatty acid composition. *Bioresource Technology*, 191: 377-384 .
- Sharma, K. K., Schuhmann, H. and Schenk, P. M. (2012). High lipid induction in microalgae for biodiesel production. *Energies*, 5(5): 1532-1553 .
- Shen, Q.-H., Gong, Y.-P., Fang, W.-Z., Bi, Z.-C., Cheng, L.-H., Xu, X.-H. and Chen, H.-L. (2015). Saline wastewater treatment by *Chlorella vulgaris* with simultaneous algal lipid accumulation triggered by nitrate deficiency. *Bioresource Technology*, 193: 68-75 .
- Shetty, P., Gitau, M. M. and Maróti, G. (2019). Salinity stress responses and adaptation mechanisms in eukaryotic green microalgae. *Cells*, 8(12): 1657 .
- Tavares, L., Nudi, M. H., Arroyo, P. A., Godoy, R. F. B., and Trevisan, E. (2023). Effect of different concentrations of phosphorus and nitrogen on the growth of the microalgae *Chlorella vulgaris*. *International Journal of Energy and Environmental Engineering*, 14(4): 563-572 .
- Teh, K. Y., Loh, S. H., Aziz, A., Takahashi, K., Effendy, A. W. M. and Cha, T. S. (2021). Lipid accumulation patterns and role of different fatty acid types towards mitigating salinity fluctuations in *Chlorella vulgaris*. *Scientific Reports*, 11(1): 438 .
- Yaakob, M. A., Mohamed, R. M. S. R., Al-Gheethi, A., Aswathnarayana Gokare, R., and Ambati, R. R. (2021). Influence of nitrogen and phosphorus on microalgal growth, biomass, lipid, and fatty acid production: an overview. *Cells*, 10(2): 393 .
- Zhu, S., Huang, W., Xu, J., Wang, Z., Xu, J. and Yuan, Z. (2014). Metabolic changes of starch and lipid triggered by nitrogen starvation in the microalga *Chlorella zofingiensis*. *Bioresource Technology*, 152: 292-298 .