Journal of
Plant Environmental Physiology
Print ISSN: 2423-7671
Online ISSN: 2783-4689
Islamic Azad University Gorgan Branch
PSI انجمن جلبک شناسی ایران Phycological Society of Iran

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

Samira Saeidi Akbarzadeh[1], Elaheh Pourfakhraei[2*], Mohsen Zargar[3], Seyed Soheil Aghaei[4], Farhad Jadidi[5]

[1]Department 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:
Research article

Article history
Received: 20.12.2023
Revised: 03.03.2024
Accepted: 11.03.2024
Published:21.06.2024

Keywords
Chlorella vulgaris
EP33
Nitrogen
Optimization with response surface methodology
Salinity

Abstract

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. *Chlorella vulgaris* 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.

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

فیزیولوژی محیطی گیاهی
شاپا چاپی: ۲۴۲۳-۷۶۷۱
شاپا الکترونیکی: ۲۷۸۳-۴۶۸۹
PSI
انجمن جلبک شناسی ایران
Phycological Society of Iran
دانشگاه آزاد اسلامی
واحد گرگان

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[٤]، فرهاد جدیدی[٥]

[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
[٤] مرکز تحقیقات تولید و بازیافت مواد و انرژی، واحد قم، دانشگاه آزاد اسلامی، قم، ایران، رایانامه:Aghaei@Qom-iau.ac.ir
[٥] گروه بیوتکنولوژی صنعت و محیط، پژوهشکده علوم پایه کاربردی، جهاددانشگاهی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران، رایانامه: f.jadidi1122@gmail.com

نوع مقاله:
مقاله پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱٤۰۲/۰۹/۲۹
تاریخ بازنگری: ۱٤۰۲/۱۲/۱۳
تاریخ پذیرش: ۱٤۰۳/۱۲/۲۱
تاریخ چاپ: ۱٤۰۳/۰٤/۰۱

واژه‌های کلیدی:
بهینه‌سازی با روش سطح پاسخ
Chlorella vulgaris EP33
شوری
نیتروژن

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 شناسایی‌شده، به‌عنوان منبع لیپید می‌تواند مورداستفاده 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 ١٤ روز، در شرایط کشت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد، شدت نور ۲۰۰۰ لوکس، pH ۷ و ١٦/٨ 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) به‌دست آمد و میزان رشد در این شرایط نصف مقدار شرایط بهینه در نیتروژن ۱۰ و شوری صفر بود. مقادیر تجربی و مقادیر پیش‌بینی‌شده با نرم‌افزار نیز دارای روابط منطقی بودند که نشان‌دهنده تناسب مدل‌های به‌کاررفته 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 به‌عنوان 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.

استناد: سعیدی اکبرزاده، سمیرا؛ پورفخرایی، الهه؛ زرگر، محسن؛ آقائی، سیدسهیل؛ جدیدی، فرهاد. (١٤٠٣). 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)، ۱۳۰-۱۱۹.

ناشر: دانشگاه آزاد اسلامی، واحد گرگان
© نویسندگان.

مقدمه

لیپیدها در ریزجلبک‌ها متابولیت‌های بسیار مهمی هستند. در واقع اسیدهای چرب به‌عنوان اجزای اصلی در فرآیندهای بیوشیمیایی، تشکیل ساختار غشایی، سیگنال دهی نقش دارند و نیز به شکل قطرات لیپیدی در سلول ذخیره می‌شوند (De Carvalhoand Caramujo, 2018). تری آسیل گلیسرول (TAG)، یک لیپید ذخیره‌ای کلیدی، به دلیل قابلیت دستکاری در افزایش آن، یک هدف قابل‌توجه است. ریزجلبک‌ها به‌طور 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 درنتیجه 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 طول‌موج‌های مختلف و شدت نور، سطوح دی‌اکسیدکربن، دما، pH، مواد مغذی، تنش نسبت به فلزات سنگین، تنش 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 ارگانیسم‌هایی هستند که قابلیت فتوسنتز اکسیژنی داشته و نقش مهم در زیست‌گاه‌های آبی دارند. ریزجلبک‌های یوکاریوتی در اکثر زیست‌بوم‌ها به‌عنوان 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 آب‌شور 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 آبزی‌پروری 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 ازجمله مواد مغذی ضروری مؤثر بر رشد جلبک، عملکرد زیست‌توده، و تولید لیپید و اسیدهای چرب و از عوامل کلیدی درکشت ریزجلبک است (Yaakob et al., 2021).درواقع ریزجلبک‌ها منابع غذایی جایگزین و جدیدی هستند که می‌توانند در گسترش و بهبود تغذیه مورداستفاده قرار گیرند (Mutawie, 2015)

در تغییرات غلظت نمک، ریزجلبک‌های فتوسنتزی تک‌سلولی بسیار آسیب‌پذیر هستند زیرا نه‌تنها 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 به‌عنوان هدفی کاربردی در تولید اقتصادی لیپید مورداستفاده 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 انجام‌شده است. به‌طورکلی، 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* *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 ۱/۷۸ ± ۱۱۳/٤٦ 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 ۲۰۱٤ 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 فیزیکوشیمیایی 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[1] (RSM) یک تکنیک آماری معتبر مورداستفاده 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[2] (CCD)، برای فرمول‌بندی طرح آزمایشی استفاده شد. ازآنجایی‌که سویه جداشده 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 (Hamedi et al., 2012) در فلاسک ۱۰۰۰ میلی‌لیتری به مدت ۱٤ روز در شرایطی که در مطالعات پیش‌تر بهینه‌سازی شده بود، دما ۳۰ درجه سانتی‌گراد، شدت نور ۲۰۰۰ لوکس، pH ۷ و ۱٦/۸ 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 قرارگرفته‌اند. شوری در محدوده ۱۵۰-۱۰ میلی‌مولار و مقادیر نیتروژن نیز در بازه ۱۰-۰/۱ میلی‌مولار در نظر گرفته شد. تمامی آزمایش‌ها در شرایط ۱٦ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی، شدت نور ۲۰۰۰ لوکس و شرایط دمایی ۳۰ درجه سانتی‌گراد که قبلاً برای بهبود رشد این‌گونه بهینه‌سازی شده بود، اجرا شدند. مقدار α=۲، نوع طراحی کوچک[1] و تعداد سه عدد نقطه مرکزی برای تخمین خطای آزمایش‌کننده در نظر گرفته‌شده است. بنابراین محیط‌های کشت تغییر یافته N8 حاوی مقادیر نیتروژن ۰/۱-۲/۵۷۵- ۵/۰۵-۷/۵۲۵-۱۰ میلی‌مولار و نیز شوری ۱۰-٤۵-۸۰-۱۱۵-۱۵۰ میلی‌مولار تهیه شد. به همه محیط‌های کشت به میزان یکسانی (OD_{690} =۱/۵) از سویه مورد آزمایش تلقیح شد.

اندازه‌گیری میزان رشد: میزان رشد با خوانش جذب نوری با کمک دستگاه اسپکتروفتومتر (WPA, S2000) در طول‌موج ٦۹۰ 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[2] استفاده شد (Ruangsomboon, 2015). به‌طور خلاصه، ۱۰۰ میلی‌گرم زیست‌توده توزین و سپس با هاون آسیاب شد. سپس با ۱۰ میلی‌لیتر کلروفرم/اتانول (۲:۱) مخلوط و به مدت ۲ دقیقه ورتکس شد. مخلوط به‌دست‌آمده در داخل اولتراسونیک (ULTRA®، VGT-180QTD، کره) با ٤۰ کیلوهرتز به‌مدت 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. به‌مدت 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/اتانول با نسبت ۲:۱ به پلت اضافه شد و مراحل فوق تکرار شد. لایه آلی با قرار دادن ظرف به‌مدت ۲٤ 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،

[1] Small design

[2] Bligh and Dyer

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

تجزیه و تحلیل آماری

با استفاده از نرم‌افزار Design Expert نسخه ۱۲ کلیه داده‌ها تجزیه و تحلیل شد. هر یک از آزمایش‌ها سه بار انجام شد و مقدار میانگین به‌عنوان پاسخ گزارش گردیده است.

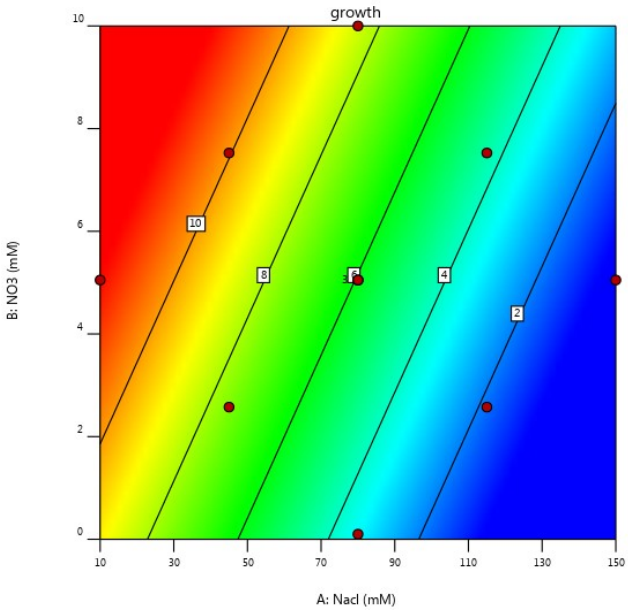
نتایج

برای تعیین اثر نیتروژن و شوری بر روی *C. vulgaris* EP33 رشد یافته در شرایط فوتواتوتروفیک، به محیط‌های کشت آماده‌شده بر طبق آزمایش طراحی‌شده درروش سطح پاسخ با جذب نوری تقریباً مشابه در ۶۹۰ نانومتر تلقیح شدند و تحت شرایط پیش‌تر گفته‌شده، به مدت ۱۳ روز رشد کردند. اثر تغییرات غلظت نیتروژن و شوری در هر ۵ سطح مختلف مطابق جدول ۱ بررسی و نتایج در نرم‌افزار ثبت شد.

بررسی اثر غلظت‌های مختلف نیتروژن و شوری بر میزان رشد: بررسی اثر متقابل غلظت‌های مختلف نیتروژن و شوری بر روی میزان رشد نشان داد که کاهش غلظت نیتروژن و افزایش میزان شوری، اثر قابل‌توجهی بر رشد در طی ۱۳ روز دارد و آن را کاهش می‌دهد (شکل ۱) و حداکثر میزان رشد در غلظت‌های بالای نیتروژن و پایین شوری حاصل می‌شود.

جدول ۱: سطوح تعیین‌شده درروش 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 (میلی‌مولار)	۱۰	٤٥	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.

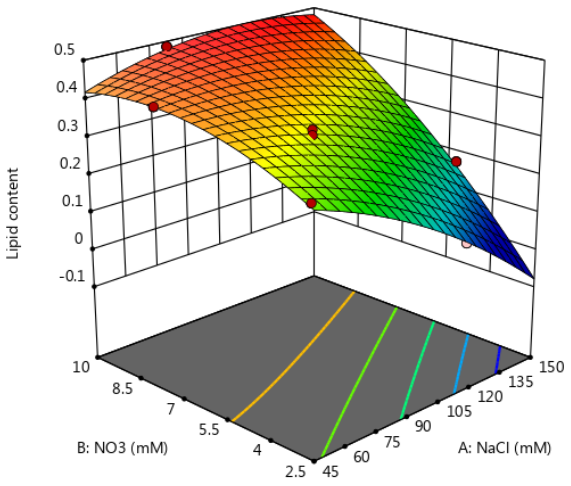
(معادله ۱)

میزان رشد = +۵/۹٤ + (−۲/۸۵×A) + ۱/۲۷×B

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 ٦۹۰ 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 میلی مولار با میزان مطلوبیت ۰/۹۳٤ توسط این نرم‌افزار پیشنهاد شد. مقادیر F و P مربوط به مدل نشان می‌دهد مدل پیشنهادی صحت کافی را دارا است. همچنین از آنجاکه مقدار عدم تطابق معنی‌دار نمی‌باشد، نشان می‌دهد که داده‌های مدل کاملاً قابل‌اطمینان 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 طول‌موج ٦۹۰ نانومتر و انحراف معیار به‌ترتیب ۵/۹٤ و ۰/٦۷۰٦ می‌باشد.

آزمون تجربی جهت تائید مدل پیشنهادی با دو کمیت تعیین‌شده از متغیرها انجام شد که میزان رشد با جذب نوری ۰/۲۷۵± ۱٤/۵۳۷ در طول‌موج ٦۹۰ نانومتر در روز ۱۳ به‌دست آمد که در مقایسه با میزان به‌دست‌آمده از نرم‌افزار که مقدار ۱٤/۹۹۱ 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

تجزیه‌وتحلیل نتایج سطح پاسخ بهینه‌سازی تولید لیپید معادله (۲) نحوه ارتباط پارامترهای مستقل و پاسخ را نشان می‌دهد.

(معادله ۲)

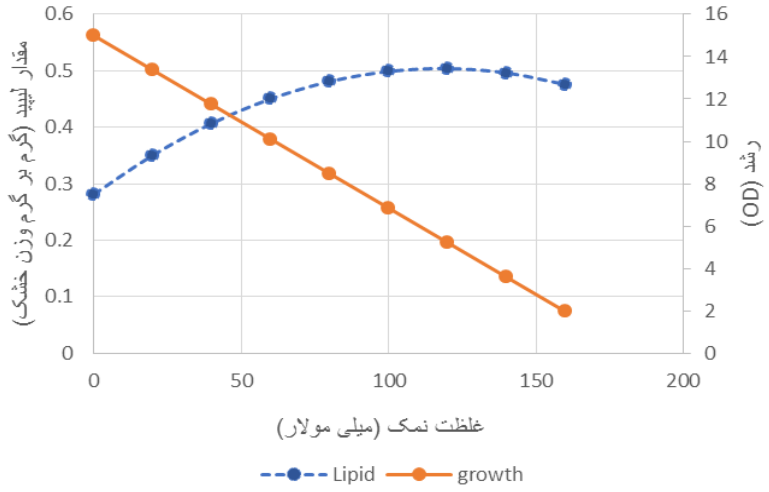
$$\text{مقدار لیپید} = +۰/۳۶۲۱ + (-۰/۰۵۹۳ \times A) + ۰/۱۰۹۰ \times B + (-۰/۰۲۵۳ \times B^۲) + (-۰/۰۲۰۰ \times A^۲) + ۰/۰۵۰۰ \times AB$$

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

همان‌طور که معادله مدل نشان می‌دهد غلظت نیتروژن دارای اثر بیشتری نسبت به تغییرات غلظت نمک است. تحلیل آماری توسط نرم‌افزار Design Expert نشان می‌دهد مدل درجه ۲ 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. 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 به‌ترتیب مقادیر ۱۰ و ۱۱۵ میلی‌مولار با میزان مطلوبیت ۰/۸۲۱ توسط این نرم‌افزار پیشنهاد شد. مقادیر F و P مربوط به مدل نشان می‌دهد مدل پیشنهادی صحت کافی را دارا می‌باشد. همچنین ازآنجا که مقدار عدم تطابق معنی‌دار نمی‌باشد، نشان می‌دهد که داده‌های مدل کاملاً قابل‌اطمینان است. مقدار R^2 برای این مدل ۰/۹۹۴۲ می‌باشد که نشان می‌دهد مدل پیشنهادی به خوبی می‌تواند داده‌های آزمایش را پیش‌بینی کرده و صحت برازش تایید می‌شود. میانگین مقدار لیپید کل بر حسب گرم بر گرم وزن خشک و انحراف معیار به‌ترتیب ۰/۳۱۲۷ و ۰/۰۱۵۷ می‌باشد.

آزمون تجربی جهت تائید مدل پیشنهادی با دو کمیت تعیین‌شده از متغیرها انجام شد که محتوای لیپید ۰/۰۱۳±۰/۵۲۰ گرم بر گرم وزن خشک در روز ۱۳ به‌دست آمد که در مقایسه با میزان به‌دست‌آمده از نرم‌افزار که مقدار ۰/۵۰۳ گرم بر گرم وزن خشک بود، تفاوت معنی‌داری نداشت.

همچنین با مقایسه هر دو نمودار رشد و محتوای لیپید در شرایط نیتروژن ثابت ۱۰ میلی مولار و غلظت‌های مختلف شوری (شکل ۳) می‌توان دریافت که در شوری در حدود ٤٥ میلی مولار می‌توان به‌طور همزمان هم رشد و هم محتوای لیپید مطلوبی داشت. برای اثبات این نتیجه، یک آزمایش تجربی با این غلظت‌ها انجام شد که نتایج رشد و محتوای لیپید به ترتیب ۰/۱۲۳ ± ۱۱/۱٤ و ۰/۰۰٤ ± ۰/٤۲٥ گرم بر گرم وزن خشک بود که با نتایج مدل پیشنهادی (رشد و محتوای لیپید به ترتیب ۱۱/۳۲ و ۰/٤۱۹) تفاوت معنی‌داری نداشت و صحت مدل تائید 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 درکشت ریزجلبک *C. vulgaris* EP33 باهدف 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 درکشت 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 (Fawzyand Alharthi, 2021). بنابراین، این تحقیق به‌منظور بررسی اثر غلظت نیتروژن و شوری بر روی رشد و محتوای لیپید از طریق بهینه‌سازی با روش‌سطح 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= ۹/۸۶) و در شوری حداکثر و نیتروژن حداکثر نیز رشد بسیار کم (OD=۲/۷۷) بود. این در حالی است که در شوری حداقل و نیتروژن حداکثر بالاترین میزان رشد (OD=۱٤/۹۹) 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 سلول‌ها ست. این روند در صورتی که غلظت نیتروژن کمتر از ۷ میلی‌مولار و مقدار شوری از متوسط تا زیاد (۱۵۰-۸۰ میلی‌مولار)

باشد، به همین صورت است. Tavares و همکاران در سال ۲۰۲۳ مشاهده کردند که حداکثر تولید زیست‌توده، 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. zofingiensis* شد. این محققان اعلام کردند که در شرایط فقدان نیتروژن، میزان رشد در روز دهم کشت، بیش از ٤ 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 قابل‌ملاحظه‌ای 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 ٤۳ 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 میلی‌مولار شوری و ۱۰ میلی‌مولار 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 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 به‌عنوان ترکیبات ذخیره‌سازی انرژی بالا تولید می‌شوند و زمانی که سلول‌های جلبک در شرایط محیطی نامطلوب قرار دارند، سنتز می‌شوند. هنگامی‌که سلول‌های جلبکی به شرایط بهینه منتقل می‌شوند، این مولکول‌های لیپیدی مورد استفاده قرار می‌گیرند. بااین‌حال، 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 ۰/۰٦ تا ۰/٤ مولار NaCl رشد دادند. بالاترین محتوای چربی در *C. vulgaris* و *A. obliquus* به‌ترتیب ٤۹ و ٤۳ درصد در BG11 اصلاح شده با ۰/٤ مولار NaCl بود که این تفاوت میتواند به علت تفاوت

در شرایط کشت از جمله نوع محیط کشت مورد استفاده و سویه باشد (Pandit et al., 2017). در مطالعه ای که در سال ۲۰۱٤ 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 ۰/٦٤ گرم بر لیتر رسید. همچنین محتوای لیپید کل در روز هفتم در شرایط دارای نیتروژن و فقدان نیتروژن به ترتیب ۱۹/٦۹ درصد و ٤۹/۱٤ 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 جداشده 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 ٦۸۰ نانومتر در روز دوازدهم در نمونه کنترل، تیمار ۰/۲ و تیمار ۰/۸ مولار سدیم کلراید به‌ترتیب ۰/٦، ۰/۷۵ و ۰/٤ بود. همچنین محتوای لیپیدی نیز در گروه کنترل ۱۸ درصد و در تیمار ۰/۲ مولار به ۲٦ 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 تائید 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.

Refrences

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 .

Hamedi, 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 .