

امکان‌سنجی و بهینه‌سازی تولید رنگدانه‌ها در کشت میکسوتروف *Spirulina platensis*

چکیده

شدت تغییرات درون سلول، بسته به مدت و شدت تنش متفاوت است، لیکن امکان بهره‌وری از تنش‌ها در ابعاد خاص، جهت افزایش تولید ترکیبات هدف وجود دارد. در این میان اگر شرایطی برای افزایش عملکرد کل فراهم آید، می‌توان بر عملکرد مواد مؤثره نیز افزود. در این مطالعه، تأثیر سطوح مختلف نمک و کربوهیدرات جهت بررسی گونه زراعی نوین *Spirulina platensis* در محیط‌های اتوتروفیک و میکسوتروفیک به‌منظور افزایش تولید رنگدانه‌ها طی سال‌های ۹۵-۱۳۹۳ اندازه‌گیری شدند. سطوح به‌کاررفته شامل ۱، ۱/۵ و ۳ گرم بر لیتر نمک سدیم کلرید و ۰، ۰/۵ و ۶ گرم بر لیتر گلوکز در قالب آزمایش فاکتوریل با طرح کاملاً تصادفی بودند. بر اساس نتایج، تیمار میکسوتروفی دارای ۱ گرم بر لیتر نمک و ۰/۵ گرم بر لیتر گلوکز جهت افزایش مقدار بیومس (۱۰۸/۶ درصد، ۱۱۱/۹۷ گرم بر لیتر وزن تر و ۱/۵۶ گرم بر لیتر وزن خشک)، کلروفیل (۱۳۶/۰ درصد، ۰/۳۴ گرم بر لیتر)، کاروتنوئیدها (۱۳۷/۵ درصد، ۰/۱۱ گرم بر لیتر)، فلاونوئید (۱۰۳/۵٪، ۰/۰۹ گرم بر لیتر) و تیمار میکسوتروفی ۱/۵ گرم بر لیتر نمک و ۰/۵ گرم بر لیتر گلوکز برای ارتقای مقدار آنتوسیانین (۱۱۱٪/۸، ۰/۰۴ گرم بر لیتر)، آلفوکوسیانین (۱۳۴/۳٪، ۰/۴۷ گرم بر لیتر) نسبت به تیمار شاهد اتوتروف، فیکوبیلی‌پروتئین‌ها (۱/۰۹ گرم بر لیتر)، فیکوسیانین (۰/۴۴ گرم بر لیتر) و فیکواریترین (۰/۴۷ گرم بر لیتر) معرفی می‌شوند. این میزان مواد مؤثره اساسی جلبک در دو تیمار پیشنهادشده، امکان کاربرد آن در صنایع غذایی (رنگ، اسانس، آرد، غذای دام) و دارویی (داروهای مکمل غذایی و درمانی) را بیان می‌نماید.

واژگان کلیدی: اسپیرولینا، اتوتروف، شوری، گلوکز، میکسوتروف.

زهرارسولی^۱

مهدی پارسا^{۲*}

۱. دانشجوی دکترا، گروه زراعت، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.
۲. استاد، گروه زراعت، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.

*مسئول مکاتبات:

parsa@um.ac.ir

کد مقاله: ۱۳۹۸۰۳۰۷۴۶

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۵/۳۱

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۹/۱۷

این مقاله برگرفته از رساله دکتری است.

مقدمه

ایران به‌عنوان کشوری درحال توسعه و مستقر در مناطق خشک و نیمه‌خشک، با تقاضای بیشتر مصرف آب در بخش کشاورزی و چالش‌های کمبود آن روبرو است. درحالی‌که میانگین بارندگی کشور از یک‌سوم میانگین بارندگی جهان کمتر است؛ فقدان بارندگی مناسب و افزایش دمای محیط در سال‌های اخیر، مشکل کمبود (و گاهی نبود) آب را بیش‌ازپیش بروز داده است. در این شرایط، آب زیرزمینی تنها منبع آب موجود در بسیاری از نقاط کشور می‌باشند؛ استفاده بی‌رویه از آن افت چشمگیری را در سطح سفره‌های زیرزمینی ایجاد نموده و شور شدن آن‌ها را نیز به همراه داشته است. بنابراین ترویج کشت گونه‌های مقاوم در برابر شوری یا کم‌آبی ضروری می‌نماید. پاسخ موجودات فتواتوتروف به شرایط نامساعد محیط به توانایی سازگاری دستگاه فتوسنتزی آن‌ها بستگی دارد (Allahverdiyev et al., 2011). جلبک‌ها از آغازیان فتواتوتروف و دارای نیازهای اولیه کمتر، زیست‌توده بیشتر و بازدهی سیستم‌های کشت چندین برابر هستند. میزان تولیدات فتوسنتزی، سرعت تکثیر و رشد آن‌ها نیز در انتخاب به‌عنوان گونه زراعی نوین مؤثر بوده است (Cardozo and Guaratini, 2007). از طرفی، تولید اسمولیت‌های مقابله‌کننده با تنش شوری در آن‌ها انجام می‌شود؛ برای مثال می‌توان از تولید مقادیر بالای کاروتنوئیدها (Ramakrishna et al., 2011) و گلیسرول (Hadi et al., 2008) از *Dunaliella* در شرایط نامساعد نام برد، که از لحاظ بیوتکنولوژی بسیار حائز اهمیت است. همچنین جلبک *D. salina* در شوری

زیاد، شدت نور بالا و محدودیت مواد غذایی قادر به تولید رنگدانه‌های کاروتنوئیدی از جمله مقادیر زیادی بتاکاروتن است که در داروسازی، تولید آنتی‌بیوتیک و صنایع غذایی کاربرد فراوان دارد (Del Campo et al., 2007). در شبیه‌ترین مطالعه به پروژه حاضر، اثر سطوح ۱۳-۳۵ میلی‌گرم بر لیتر شوری و سطوح ۰-۲٪ کربن دی‌اکسید بر رشد و محتوای پروتئین *S. platensis* ارزیابی شده و با موفقیت همراه نبود؛ به طوری که حداکثر نرخ رشد ویژه و غلظت پروتئین در شوری کم‌تر به دست آمد و زمان ورود جلبک به فازهای رشدی تحت اثر شوری قرار نگرفت (Ravelonandro et al., 2011). لیکن سازمان فضایی آمریکا، *Spirulina* را با عملکرد بالا تولید کرده و به‌عنوان مکمل غذایی در مسافرت‌های فضایی به کار می‌برد (Khan et al., 2005). در کشورهای اروپایی نیز برای بهبود رژیم غذایی، قرص *Spirulina* به‌صورت روزانه مصرف می‌شود. در مجموع، بیش از ۷۵٪ تولید سالانه آن به‌صورت پودر، قرص و کپسول می‌باشد (Pulz and Gross, 2004). کشت اتوتروفی این جلبک بر پایه فتوسنتز و کشت هتروتروفی با تجزیه کربن خارجی انجام می‌شود. ترکیب این فتوسنتز اتوتروفی و اسیمیلایسیون هتروتروفی، نوع دیگری از کشت به نام میکسوتروفی را پدید می‌آورد که افزایش زیست‌توده را ممکن می‌نماید (Soletto et al., 2008). تولید غذای بیشتر و مفیدتر با آب کمتر، تنها در صورت انتخاب گونه زراعی مناسب و سپس کاربرد راهکارهای مدیریتی صحیح دست‌یافتنی خواهد بود. در این راستا، مقاله حاضر به کشت *Spirulina platensis* در شرایط اتوتروفی و میکسوتروفی تحت تیمارهای شوری پرداخته و امکان تولید بهینه انواع رنگدانه‌های موجود در این جلبک برای کاربردهای دارویی و غذایی را می‌سنجد.

مواد و روش‌ها

S. platensis توسط مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی دانشگاه فردوسی مشهد فراهم و در محیط کشت زاروک (۱۹۶۶؛ دارای ۱ گرم بر لیتر نمک NaCl و فاقد گلوکز در ترکیب) در حجم‌های افزایشی طی سال‌های ۹۵-۱۳۹۳ کشت شد. این محیط با ۳ غلظت نمک شامل ۱، ۱/۵، ۳ گرم در لیتر NaCl (مرک، آلمان) و ۳ غلظت کربوهیدرات شامل ۰، ۰/۵، ۶ گرم در لیتر گلوکز (مرک، آلمان) غنی شد (جدول ۱). این غلظت‌ها با توجه به نتایج مطالعات پیشین و پیش‌آزمایش‌ها انتخاب شدند (Coca et al., 2015).

جدول ۱: نام دهی تیمارها و سطوح آزمایش در محیط پایه زاروک.

گلوکز	نمک		
	۰	۰/۵	۱
۱	۱۱Z	۱۲Z	۱۳Z
۱/۵	۲۱Z	۲۲Z	۲۳Z
۳	۳۱Z	۳۲Z	۳۳Z

محیط‌ها، ۱۵ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد اتوکلاو و pH اولیه ۹/۵ با ۱ مولار NaOH تنظیم شد. کشت پیوسته در فتوبیوراکتور با افزودن ۰/۷ میلی‌گرم بر لیتر بیومس، ۳۰ میکروگرم بر لیتر استرپتومایسین (زیگما الدریج، آلمان) و ۱ میلی‌گرم بر لیتر بنومیل (اگروکمیکال ملی، ایران) به هر مخزن شروع شد. آزمایش‌های ابتدایی جهت انتخاب شرایط مطلوب در فتوبیوراکتور و سیستم بیج در دانشگاه فردوسی مشهد طی سال‌های ۹۴-۱۳۹۳ انجام شد. سپس آزمایش‌های تداومی ۳۰ روزه در فتوبیوراکتورهای استرلیزه در سال‌های ۹۵-۱۳۹۴ ادامه یافت. ۱۰٪ حجمی هوا توسط یک کمپرسور کوچک برای اختلاط و تبادل گازها در محیط کشت تزریق شد. محیط‌های کشت به‌طور مداوم در دمای ۳۰ درجه

سانتی‌گراد هوادهی می‌شد. روشنایی موردنیاز توسط سه لامپ فلورسنت در فتوپریود ۱۶:۸ ساعت روشنایی با شدت نور ۳ کیلولوکس فراهم شد. چگالی شار فوتونی توسط حسگر داخلی کوانتوم سنچ (لای کور، آمریکا) اندازه‌گیری شد. دانسیته نوری محلول‌های کشت به‌صورت روزانه با اسپکتروفوتومتر (فوتونیکس، ایران) در ۷۵۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. جهت جلوگیری از تداخل به دلیل استفاده از محیط‌های کشت مختلف، تراکم نوری به‌عنوان تابعی از غلظت کلوکز تصحیح شد. وزن خشک در هر فاز با برداشت نمونه و خشک‌کردن سلول‌ها در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد در آون خلأ تا وزن ثابت تعیین شد. زمان دو برابر شدن جمعیت با رابطه زیر محاسبه شد که در آن W_2 وزن در انتها (گرم در لیتر)، W_1 وزن در ابتدا (گرم در لیتر) و Δt مدت‌زمان آزمایش (روز) هستند (Lavens and Sorgeloos, 1996).

$$\text{رابطه ۱: } \ln 2 / [(\ln W_2 - \ln W_1) / \Delta t] = \text{زمان دو برابری (روز)}$$

جهت اندازه‌گیری کلروفیل آ، ۱ میلی‌لیتر از هر نمونه سانتریفیوژ (۱۰ دقیقه در ۹۰۰۰ دور)، آبیگری و با ۱ میلی‌لیتر متانول ورتکس (بونکو، آلمان) شد. برای ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه و تاریکی قرار گرفت. سپس ۵ دقیقه در ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ (بهداد، ایران) و مقدار جذب توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج ۶۵۵ نانومتر (در مقابل شاهد متانول) خوانده شد (Marker, 1972). برای سنجش کاروتنوئیدها، ۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون جلبکی همگن‌شده، ۱۰ دقیقه با ۹۰۰۰ دور سانتریفیوژ شد و سپس بخش رویی خارج شد. ۱ میلی‌لیتر استون ۸۰٪ اضافه و با حداکثر دور ورتکس شد. نمونه‌ها ۲۴ ساعت در ۴ درجه و تاریکی قرار گرفتند. سپس با دور ۳۰۰۰ در دقیقه به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند و طیف بخش رویی با اسپکتروفوتومتر در طول موج ۶۵۵ و ۴۶۱ نانومتر خوانده شد. فلاونوئید با ترکیب و ورتکس ۱ میلی‌لیتر نمونه آبیگری شده و ۱ میلی‌لیتر اتانول اسیدی (اتانول و اسید استیک گلاسیال به نسبت حجمی ۱:۹۹) اندازه‌گیری شد. نمونه‌ها ۲۴ ساعت در دمای اتاق و تاریکی قرار گرفته، ۱۰ دقیقه با دور ۴۰۰۰ در دقیقه سانتریفیوژ و طیف بخش رویی با اسپکتروفوتومتر در طول موج ۳۰۰ نانومتر خوانده شد (Krizek et al., 1998). برای سنجش میزان آنتوسیانین، از روشی مشابه با فلاونوئید استفاده شد، اما ۱ میلی‌لیتر متانول اسیدی (متانول و اسید کلریدریک به نسبت حجمی ۱:۹۹) و طول موج ۵۵۰ نانومتر بکار رفت (Wagner, 1979). فیکوبیلی پروتئین‌ها شامل آلفیکوسیانین، فیکوسیانین و فیکواریترین سنجیده شدند (Sarada et al., 1999). به این منظور ۱ میلی‌لیتر سوسپانسیون جلبکی همگن‌شده، ۱۰ دقیقه با ۹۰۰۰ دور سانتریفیوژ و بخش رویی خارج شد. ۱۰۰ ماکرولیتزر گلیسرول خالص اضافه و ورتکس شدند. نمونه‌ها ۲۴ ساعت در ۴ درجه و تاریکی قرار گرفتند. سپس ۸۳۳/۳ ماکرولیتزر آب مقطر اضافه شد تا غلظت گلیسرول ۱۰٪ شود و شوک اسمزی رخ دهد. به مخلوط حاصل ۱۶ میلی‌گرم استات سدیم (۶۶/۶۶ ماکرولیتزر استات سدیم ۳ مولار) اضافه گردید. این مخلوط ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ و جذب بخش رویی در طول موج‌های ۵۶۲، ۶۱۵، ۶۵۲ و ۷۵۰ نانومتر خوانده شد (Tarko et al., 2012). از رابطه‌های زیر جهت محاسبه غلظت رنگدانه‌ها استفاده شد؛ در این روابط A مقدار جذب در طول موج ارائه‌شده (نانومتر)، ϵ ضریب خاموشی (۳۳۰۰۰ مول بر سانتی‌متر) و b عرض کووت (سانتی‌متر) می‌باشند.

$$\text{رابطه ۲: } 13.14 \times A665 = \text{میلی‌گرم بر لیتر کلروفیل}$$

$$\text{رابطه ۳: } [A461 - (0.046 \times A665)] \times 4 = \text{میلی‌گرم بر لیتر کاروتنوئید}$$

$$\text{رابطه ۴: } A300 / \epsilon b = \text{میلی‌مول بر لیتر فلاونوئید}$$

$$\text{رابطه ۵: } A550 / \epsilon b = \text{میلی‌مول بر لیتر آنتوسیانین}$$

$$\text{رابطه ۶: } [1000 (A652 - A750) - 208 (A615 - A750)] / 5.09 = \text{میلی‌گرم بر لیتر آلفیکوسیانین}$$

$$\text{رابطه ۷: } [1000 (A615 - A750) - 474 (A652 - A750)] / 5.34 = \text{میلی‌گرم بر لیتر فیکوسیانین}$$

$$\text{رابطه ۸: } [9.62 / (\text{آلفیکوسیانین} \times 0.949) - (\text{فیکوسیانین} \times 2.41) - 1000 (A562 - A750)] = \text{میلی‌گرم بر لیتر فیکواریترین}$$

$$\text{رابطه ۹: } \text{فیکواریترین} + \text{فیکوسیانین} + \text{آلفیکوسیانین} = \text{میلی‌گرم بر لیتر فیکوبیلی پروتئین}$$

جهت تعیین آثار هر فاز بر پارامترهای مختلف، تمامی صفات ۷ مرتبه طی ۳۰ روز اندازه‌گیری شدند. نرم‌افزار MSTATC برای تعیین میانگین، انحراف معیار و تفاوت معنی‌دار بین تیمارها در سطح ۰/۰۵ آزمون دانکن بر اساس آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی استفاده شد.

نتایج

وزن تر و خشک، تغییرات نسبتاً مشابهی را نشان دادند (جدول ۲). تیمارهای دارای ۱ و ۱/۵ گرم بر لیتر نمک و سطوح ۰/۵ و ۰ گرم بر لیتر گلوکز وزن‌های بیشتری داشتند. تیمارهای به ترتیب Z۱۲ (۱۱/۹۷ و ۱/۵۶ گرم بر لیتر)، Z۱۱ (۱۱/۰۲ و ۱/۴۳ گرم بر لیتر) و Z۲۲ (۱۰/۹۰ و ۱/۴۲ گرم بر لیتر) وزن بیشتر داشتند. بیشترین تقسیم و کمترین زمان دو برابری کاملاً هماهنگ با وزن رخ داد و در Z۱۲ (۷/۳ روز)، Z۱۱ (۷/۵ روز) و Z۲۲ (۷/۶ روز) افزایش یافت (جدول ۲).

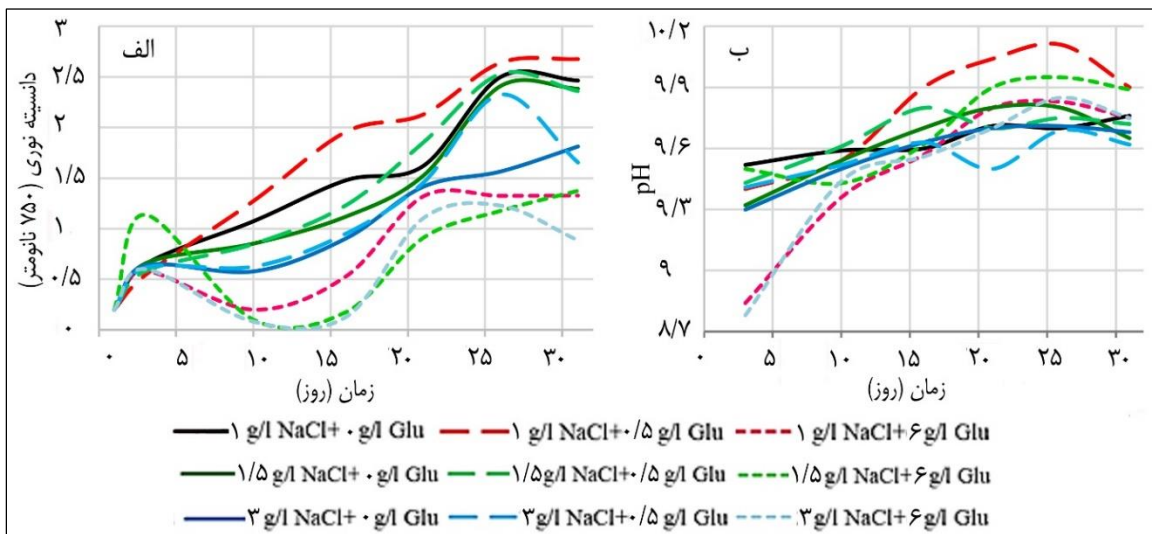
جدول ۲: تغییرات ویژگی‌های رشد *Spirulina platensis* در شرایط اتوتروفیک و میکسوتروفیک.

تیمار		صفات	
نمک (گرم بر لیتر)	گلوکز (گرم بر لیتر)	وزن تر (گرم بر لیتر)	وزن خشک (گرم بر لیتر)
زمان دو برابری (روز)			
	۰	B۱۱/۰۲	B۴۳/۱
۱	۰/۵	A۹۷/۱۱	A۵۶/۱
	۶	F۳۰/۷	F۹۳/۰
	۰	C۱۷/۱۰	C۳۲/۱
۱/۵	۰/۵	B۹۰/۱۰	B۴۲/۱
	۶	GH۹۱/۵	H۷۴/۰
	۰	EF۵۶/۷	E۹۶/۰
۳	۰/۵	D۵۱/۹	D۲۳/۱
	۶	G۵۸/۶	G۸۳/۰
			B۲۸/۹

حروف مشترک در هر ستون دارای سطح معنی‌داری مشابه در سطح ۰/۰۵ آزمون دانکن می‌باشند.

جهت تشخیص چرخه زندگی بر اساس فازهای رشد، مقادیر جلبک در قالب اندازه‌گیری روزانه دانسیته نوری انجام شد (شکل ۱. الف). با توجه به انتخاب دوره کشت مناسب، ۲ مرتبه شروع فاز دیده شد؛ لذا حداقل ۱ چرخه کامل زندگی برای هر تیمار وجود دارد. در تیمار شاهد یا Z۱۱، چرخه اول حدود ۲۱ روز به طول انجامید و دارای کمتر از ۱ روز رشد تأخیری، ۱ روز رشد نمایی، ۱۵ روز رشد نسبی با شیب افزایشی کند و ۴ روز فاز ثبات بود؛ در چرخه دوم ۳ روز رشد نمایی، ۳ روز رشد نسبی و سپس شروع فاز ثبات مشهود بود. بیشترین دانسیته نوری در این تیمار، مربوط به پایان رشد نسبی چرخه دوم در روز ۲۷ام می‌باشد. لذا جهت رسیدن به حداکثر تولید، دوره کشت ۲۷ روزه برای جلبک *S. platensis* ضروری است. تیمار Z۱۲ دارای بیشترین دانسیته نوری بود و یک چرخه کامل آن، ۲۱ روز به طول انجامیده و دارای کمتر از ۱ روز رشد تأخیری، ۱ روز رشد نمایی، ۱۵ روز رشد نسبی با شیب افزایشی زیاد و ۴ روز فاز ثبات می‌باشد. در این تیمار نیز دانسیته نوری در چرخه دوم و پس از تطبیق سلول‌ها با محیط کشت خود، بسیار بالاتر از چرخه اول می‌باشد و در روز ۲۷ام به اوج می‌رسد. پس‌از این تیمارها، Z۲۲ و Z۲۱ بالاترین و تیمارهای دارای ۶ گرم گلوکز کمترین دانسیته نوری را دارند. افزون بر این، کوتاه‌ترین چرخه‌ها و بیشترین شیب‌ها در رشد نمایی جلبک در تیمارهای Z۲۳،

Z_{۱۳} و Z_{۳۳} دیده شدند که به دلیل فرار از شرایط تنش در محیط اتفاق افتاده است. بنابراین، کاربرد بیش از ۰/۵ گرم گلوکز و ۱/۵ گرم نمک جهت افزایش دانسیته و در نتیجه آن بیومس موفقیت‌آمیز نیست. اما افزودن ۰/۵ گرم گلوکز و ۰/۵ گرم نمک به روش اصلی زاروک برای پرورش *S. platensis* مناسب است. ارتباط میان نور و غلظت‌های زیاد کربن ارگانیک در تمامی این محیط‌ها، سبب تداخل چرخه‌های اتوتروفی و هتروتروفی شده و دوره فاز ثابت را افزایش می‌دهد. بنابراین تیمارهای دارای ۶ گرم گلوکز، منحنی رشد یکنواخت با فاز ثبات طولانی‌تر دارند. از آنجاکه در پیش آزمایش‌های ابتدایی، اسیدیته تیمارهای مختلف مورد مطالعه در این طیف قرار داشتند و به دلیل امکان بررسی وضعیت رشد و تولیدی جلبک در هر تیمار - که برای اولین بار انجام می‌شد - اسیدیته اصلاح نشد. ثبات pH در محیط زاروک مشهود بود و مشخص است تعادل بالای میزان و ترکیب عناصر در این محیط، در متعادل نمودن جذب و دفع سلول‌ها بسیار مؤثر است (شکل ۱. ب). البته pH Z_{۱۱} به ۹/۷۶ در انتهای دوره رسید. در ادامه، محیط‌های Z_{۳۱} و Z_{۲۱} یکنواخت‌ترین pH را داشتند. Z_{۲۲} و Z_{۳۲} نیز تقریباً ثابت بودند؛ اما در انتهای رشد نسبی، افت کندی داشتند و با از سر گرفتن فاز ثبات به روند اصلی برگشت. سایر تیمارها، روند افزایشی تندی داشتند که در روزهای دارای حداکثر رشد و تقسیم، به بیشترین میزان رسید. pH ابتدایی برای Z_{۱۳} و Z_{۳۳} به دلیل شوک سلول در گلوکز زیاد طی چرخه اول تقسیم، در پایین‌ترین حد بود؛ اما با تطابق سلول به محیط و افزایش تقسیم به تعادلی رسید که تا انتهای دوره حفظ شد. این امر به دلیل افزایش ترشح کربنات در محیط و تنظیم pH توسط جلبک انجام می‌شود.



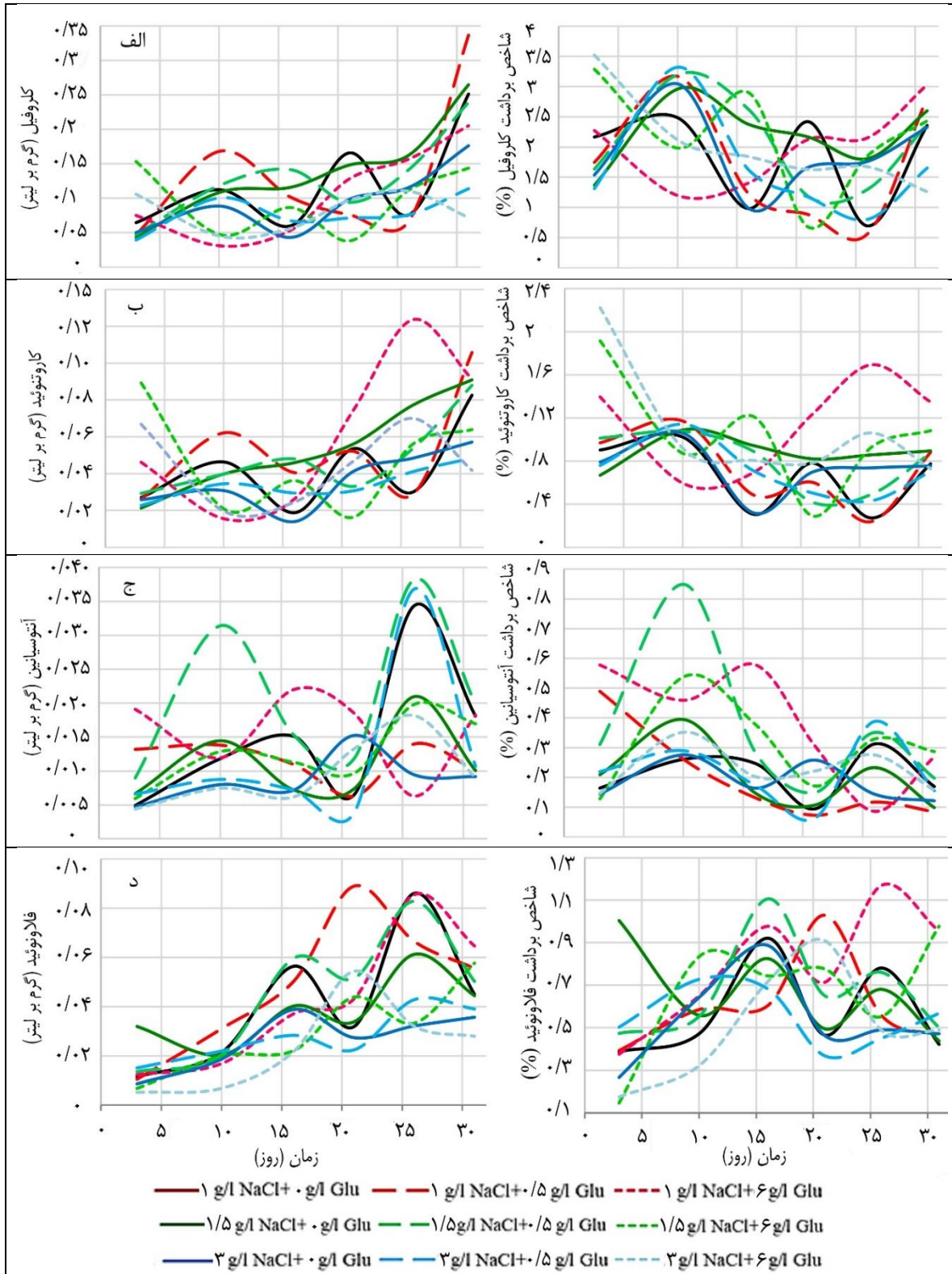
شکل ۱: الف. منحنی رشد و ب. اسیدیته *Spirulina platensis* در آثار متقابل شوری و کربوهیدرات.

تنها کلروفیل جلبک *S. platensis*، کلروفیل آ است که در Z_{۱۲}، Z_{۲۱} و Z_{۲۲} با ۰/۳۴، ۰/۲۶ و ۰/۲۴ گرم بر لیتر بالاترین مقادیر و Z_{۳۳}، Z_{۲۳} و Z_{۱۲} با ۳/۵۲، ۳/۳۲، ۳/۲۸، ۳/۲۰ و ۳/۰۵ بیشترین شاخص‌های برداشت را داشت (شکل ۲. الف). انباشت بیشتر کلروفیل، به‌عنوان اصلی‌ترین محرک رشد، در تیمارهای Z_{۱۲} و Z_{۲۱} نسبت به تیمار شاهد یا محیط مرسوم زاروک قابل توجه است. بیشترین مقادیر کلروفیل در روز ۳۱ام دیده شد. تیمارهای دارای ۰/۵ گرم گلوکز در تمامی سطوح نمک، بالاترین شاخص‌های برداشت کلروفیل را سبب شدند. هرچند، تراکم بیشتر گلوکز محیط در ابتدای رشد سبب تولید کلروفیل بیشتر شد؛ لیکن کمترین مقادیر در تیمارهای دارای ۶ گرم گلوکز و ۳ گرم نمک دیده شدند. میکرو جلبک‌ها دارای رنگدانه‌های فتوسنتزی کمکی مانند کاروتنوئیدها نیز می‌باشند. اوج نمودار کاروتنوئیدها با نمودارهای رشد و کلروفیل متناظر

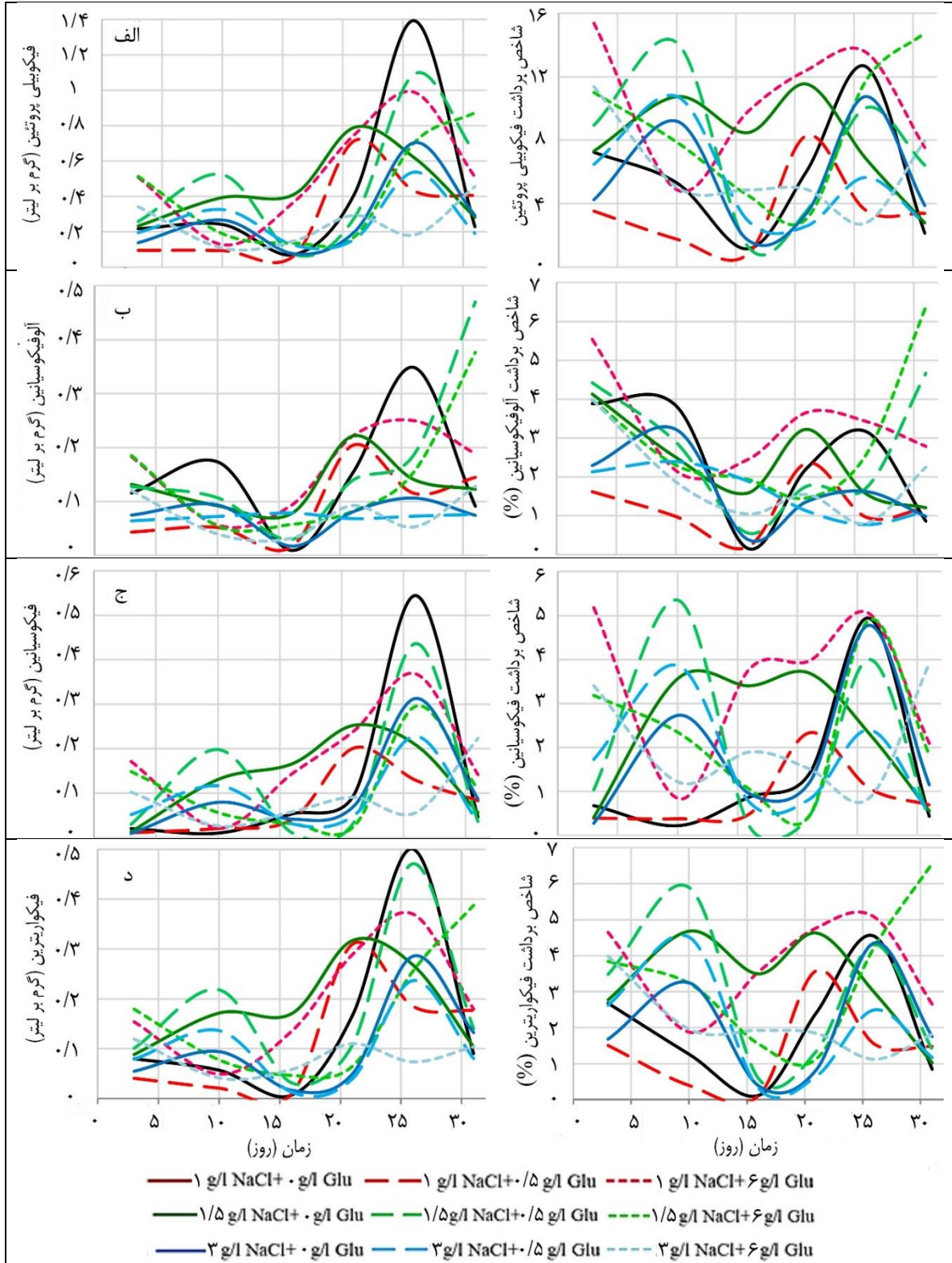
هم‌خوانی داشت و نقاط حداکثر، در روز ۳۱ام به دست آمد؛ البته این مقدار برای Z۱۳ در روز ۲۶ام به اوج رسید که با بیومس و توان کنترل تنش بیشتر این تیمار نسبت به سایر تیمارهای دارای ۶ گرم گلوکز همراه بود. به‌بیان‌دیگر، تیمارهای دارای حداکثر رشد، تقسیم، کلروفیل و پروتئین، بیشترین کاروتنوئیدها را نیز تولید نمودند؛ بنابراین کلروفیل آ و کاروتنوئیدها همکاری نزدیک و مرتبطی در سلول‌های جلبک دارند. Z۱۳، Z۱۲، Z۲۱ و Z۲۲ با ۰/۱۲، ۰/۱۱، ۰/۰۹ و ۰/۰۹ گرم بر لیتر بیشترین مقادیر و Z۲۳، Z۳۳ و Z۱۳ با ۲/۲۲، ۱/۹۱ و ۱/۶۹ درصد بالاترین شاخص برداشت کاروتنوئید را داشتند (شکل ۲. ب). تیمار شاهد یا محیط اصلی زاروک نیز در میان کمترین تولیدکنندگان کاروتنوئیدها قرار گرفت. در ارتباط با شاخص برداشت کاروتنوئیدها، درصدهای مربوط به تیمارهای ۶ گرم گلوکز، از طرفی با توجه به بیومس کمتر و تنش بیشتر در آن‌ها و از طرف دیگر به دلیل افزایش شاخص برداشت این ماده در تنش‌های محیطی، به‌خصوص در اوایل رشد بالابود.

تیمارهای دارای ۰/۵ گرم گلوکز در نمک بیشتر، آنتوسیانین بیشتری را نیز تولید کردند. Z۲۲، Z۳۲ و Z۱۱ با ۰/۳۸، ۰/۳۷ و ۰/۳۴ گرم بر لیتر بیشترین مقادیر و Z۲۲، Z۱۳، Z۲۳ و Z۱۲ با ۰/۸۵، ۰/۵۸، ۰/۵۴ و ۰/۵۰ درصد بالاترین شاخص‌های برداشت آنتوسیانین را داشتند (شکل ۲. ج). مقدار این ماده در روز ۲۶ام و نقطه اوج رشد در چرخه دوم به اوج خود رسید. شاخص برداشت در روزهای ابتدایی به دلیل بیومس کم سلول‌ها به حداکثر رسید. افزودن بالاترین سطوح نمک و گلوکز به محیط‌های کشت سبب کاهش تولید آنتوسیانین شد. البته سطوح متوسط تیمارها میزان آن را ارتقا داد. به نظر می‌رسد که تولید فلاونوئید با آنتوسیانین رابطه عکس داشته و با غلظت کمتر آن، ساخت فلاونوئید افزایش یابد؛ هرچند مطالعات بیشتر و تخصصی‌تر لازم است. فلاونوئید نسبت به سایر رنگدانه‌ها نیز به‌صورت مستقل رفتار کرد؛ اما به‌طور کلی در تیمارهای دارای رشد و تقسیم بیشتر، افزایش یافت. همچنین، محیط‌های دارای ۱/۵ گرم نمک بیشترین و ۶ گرم گلوکز کمترین فلاونوئید را سبب شد. تیمارهای Z۱۲، Z۱۱، Z۱۳ و Z۲۲ با به ترتیب ۰/۸۹، ۰/۰۸۳، ۰/۰۸۳ و ۰/۰۸۳ گرم بر لیتر در مرتبه نخست میزان و Z۱۳ (۱/۱۷٪)، Z۲۲ (۱/۰۶٪)، Z۱۲ (۱/۰۳٪) و Z۲۱ (۱/۰۰٪) در مرتبه نخست شاخص برداشت قرار گرفتند (شکل ۲. د). با افزایش نمک و گلوکز، از میزان و شاخص برداشت این ماده در این محیط کاسته شد.

در این مطالعه، سه گروه اصلی فیکوبیلی‌پروتئین شامل آلفوکیوسیانین، فیکوسیانین و فیکواریترین اندازه‌گیری شدند. Z۱۱، Z۲۲، Z۱۳، Z۲۳، Z۲۱ و Z۱۲ با به ترتیب ۱/۴۰، ۱/۰۹، ۰/۹۹، ۰/۸۷، ۰/۸۰، ۰/۷۲ و ۰/۷۰ گرم بر لیتر بیشترین میزان و Z۱۳ (۱۵٪/۳۷)، Z۲۳ (۱۴٪/۷۷)، Z۲۲ (۱۴٪/۱۵)، Z۱۱ (۱۲٪/۶۵)، Z۲۱ (۱۱٪/۵۵)، Z۳۳ (۱۱٪/۰۷)، Z۳۲ (۱۰٪/۷۷) و Z۳۱ (۱۰٪/۷۶) بالاترین شاخص برداشت مجموع فیکوبیلی‌پروتئین‌ها را داشتند (شکل ۳. الف). بنابراین محیط‌های دارای ۳ گرم نمک، کمترین میزان مجموع فیکوبیلی‌پروتئین‌ها را تولید نمودند. بالاترین میزان آلفوکیوسیانین با ۰/۴۷ گرم بر لیتر در تیمار Z۲۲ تولید شد. Z۲۳، Z۱۱، Z۱۳، Z۲۱ و Z۱۲ با ۰/۳۷، ۰/۳۵، ۰/۲۲ و ۰/۲۰ گرم بر لیتر نیز در ادامه رده‌بندی شدند. Z۲۳، Z۱۳، Z۲۲، Z۲۱ و Z۱۱ با ۶/۳۷، ۵/۵۴، ۴/۶۷، ۴/۱۳ و ۳/۸۴ درصد بالاترین شاخص‌های برداشت را داشتند (شکل ۳. ب). Z۱۱، Z۲۲، Z۱۳، Z۳۱، Z۲۳، Z۲۱، Z۳۲، Z۳۳ و Z۱۲ به ترتیب ۰/۵۴، ۰/۴۴، ۰/۳۷، ۰/۳۱، ۰/۳۰، ۰/۲۶، ۰/۲۳، ۰/۲۲ و ۰/۲۰ گرم بر لیتر فیکوسیانین را تولید کردند (شکل ۳. ج). بیشترین فیکوسیانین در تیمار شاهد یا محیط اصلی زاروک و کمترین مقادیر در تیمارهای دارای ۳ گرم نمک دیده شدند. در تیمارهای Z۲۲ (۵٪/۳۵)، Z۱۳ (۵٪/۱۸)، Z۱۱ (۴٪/۹۴)، Z۲۳ (۴٪/۹۰)، Z۳۱ (۴٪/۷۸)، Z۳۲ (۳٪/۸۷) و Z۲۱ (۳٪/۶۹) شاخص‌های برداشت به ترتیب از زیاد به کم بودند. تیمارهای Z۱۱، Z۲۲، Z۱۳، Z۲۱ و Z۱۲ با ۰/۵۰، ۰/۴۷، ۰/۳۸، ۰/۳۷، ۰/۳۲ و ۰/۳۱ گرم بر لیتر، بیشترین میزان فیکواریترین را تولید نمودند (شکل ۳. د). در مقابل، تیمارهای دارای ۳ گرم نمک، کمترین میزان را داشتند. شاخص برداشت فیکواریترین در تیمارهای Z۲۳، Z۲۲، Z۱۳، Z۲۱، Z۱۱، Z۳۲، Z۳۱، Z۳۳ و Z۱۲ با ۵/۹۰، ۴/۶۸، ۴/۵۴ و ۴/۵۱، ۴/۳۵ و ۴/۰۰ و ۳/۵۹ درصد از بیشترین به کمترین حد رسید. تیمارهای دارای ۱/۵ گرم نمک، بیشترین و ۳ گرم نمک، کمترین فیکواریترین را داشتند.



شکل ۲: میزان و شاخص برداشت الف. کلروفیل آ، ب. کاروتنوئیدها، ج. آنتوسیانین، د. فلاونوئید.



شکل ۳: میزان و شاخص برداشت الف. فیکوبیلی پروتئین‌ها، ب. آلفوکوسیانین، ج. فیکوسیانین و د. فیکوارترین.

بحث و نتیجه‌گیری

متابولیسم فتوسنتز و تنفس هوازی، هر دو به‌صورت مستقل و همزمان در *S. platensis* گزارش شده‌اند (Stengel et al., 2011)، اما افزودن کربن ارگانیک و کاهش نسبت کربن به نیتروژن، می‌تواند هر دو شرایط را تغییر دهد. البته محصولات تخمیری (اتانول، استات و لاکتات) در رشد میکسوتروفیک *S. platensis* گزارش نشده و فعالیت‌های تنفسی حتی در نور نیز اجازه فعالیت چنین محصولاتی به‌عنوان مهارکننده را نمی‌دهند (Marquez et al., 1995). شرایط کشت مانند کدر شدن محیط در حضور گلوکز زیاد، نور کم در دسترس و تولید مواد جدید می‌تواند مسیرهای اتوتروفی یا هتروتروفی را تغییر دهد (Minhas et al., 2016). این پدیده در کشت‌های دارای ۶ گرم بر لیتر گلوکز اتفاق افتاده و مسیرهای اتوتروفی را به دلیل کمبود نور و افزایش کربن در دسترس با مشکل مواجه ساخته است. در طرف مقابل، ارتباط میان نور و غلظت‌های کم کربن به‌صورت هم‌افزاییست و هر دو کشت اتوتروفیک و هتروتروفیک (میکسوتروفیک) به‌صورت بهینه و هم‌زمان انجام می‌شوند (Chen and Walker, 2011). برای مثال، وزن‌تر جلبک *Chlorella protothecoides* نیز با افزودن ۳ گرم بر لیتر گلوکز در ۶ روز از ۱۵ به ۲۴ گرم افزایش یافت (Perez-Garcia et al., 2011).

در این مطالعه، غلظت بالای گلوکز آثار منفی بر چرخه زندگی سلول‌ها داشت. چراکه تلقیح در غلظت بالای گلوکز بر پتانسیل اسمزی داخلی تأثیر می‌گذارد، فشار تورگر به‌عنوان نیروی محرکه رشد مختل شده (Karsten, 2012) و سبب کاهش سرعت رشد ویژه و تولید بیومس به دلیل فقدان تولید و تکامل اکسیژن می‌شود (Kaplan et al., 2012). کاربرد سطوح ۱-۷ گرم بر لیتر ملاس در کشت *S. maxima* در ملاس چغندر تخمیر شده موفقیت‌آمیز گزارش شد (Barrocal et al., 2010) و در تیمار ۵ گرم بر لیتر ملاس غلظت زیست‌توده، میزان تکثیر، نرخ رشد ویژه و دوره برداشت به ترتیب به ۴/۸ گرم بر لیتر، ۰/۱ بر روز، ۰/۲۴ گرم بر لیتر بر روز و ۱۸ روز رسید. ترکیب آلی نیتروژن‌دار بتائین عامل رشد این گونه بود. در مطالعه دیگری، تیمارهای حاوی ۰/۲۵، ۰/۵ و ۰/۷۵ گرم بر لیتر ملاس به کار رفت و حداکثر غلظت زیست‌توده، نرخ رشد ویژه و تکثیر در تیمار ۰/۷۵ گرم مشاهده شد (Andrade and Costa, 2007). در پژوهشی مشابه، در میان تیمارهای ۰-۵ گرم بر لیتر ملاس چغندر، سطوح ۱ و ۲ گرم بر لیتر توانستند حداکثر غلظت زیست‌توده (به ترتیب ۶/۵ و ۳/۶ گرم بر لیتر) و پروتئین (به ترتیب ۱۶۸ و ۸۶ میلی‌گرم بر لیتر بر روز) *S. platensis* را تولید کنند (Coca et al., 2015).

فعالیت مهارکننده در غلظت‌های بالاتر گلوکز مانع تولید کلروفیل شد. در نتیجه ارتباط هماهنگ بین فرایندهای متابولیک و برهمکنش تولید کلروفیل و مواد مؤثره دیگر، رنگدانه‌های فتوسنتزی کاهش یافته و منجر به کاهش رشد شد (Chainapong et al., 2012). از این رو، فتوسنتز خالص در تنش اسموتیک به حدود ۲۰-۳۵٪ از مقدار اولیه کاهش می‌یابد (Kaplan et al., 2013)؛ کدر شدن محیط‌های کشت یکی از دلایل اصلی این کاهش می‌باشد. همچنین، اواخر رشد نسبی مناسب‌ترین زمان جهت تولید و انباشت کلروفیل بود. این نکته نیز قابل توجه است که تیمارهای دارای حداکثر رشد، تقسیم و پروتئین، بیشترین کلروفیل را تولید نمودند. این تیمارها دارای اسیدپتئ مناسب‌تری (۹-۸) بودند. تأثیر مثبت اسیدپتئ یکنواخت و متناسب در مطالعات پیشین نیز دیده شده بود (Pandey and Tiwari, 2010). اثر غلظت‌های ۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۲ گرم در لیتر نمک بر *S. platensis* مورد بررسی قرار گرفته و بالاترین زیست‌توده و کلروفیل در غلظت ۱/۵ گرم نمک حاصل شد (Çelekli and Yavuzatmaca, 2009). این در حالی است که در پژوهشی که بر *S. platensis* به‌عنوان مدل تمرکز داشت، آثار تنش شوری در بازه ۰-۰/۸ مولار NaCl مطالعه شد (Zhang et al., 2010) و نتایج حاکی از کاهش انتقال الکترون PSII و افزایش انتقال الکترون PSI و بیان کلروفیل بودند. در واقع با افزایش غلظت نمک، دستگاه PSII از دریافت انرژی مازاد با تغییر انتقال انرژی محرک به PSI محافظت می‌شود. در پژوهشی بر *D. bardawil* در ۱، ۲ و ۳ مولار نمک؛ هیچ‌یک از بخش‌های سیستم فتوسنتزی در زنجیره انتقال الکترون در شدت پایین تنش تحت تأثیر قرار نگرفت؛ در حالی که افزایش تنش، به اختلال عملکرد PSII منجر شده و میزان فعالیت بخش‌های مختلف به‌شدت کاهش یافت. در غلظت ۳ مولار نمک، در ابتدا فلورسنس کلروفیل رو به افزایش نهاد و پس از گذشت ساعات اولیه اعمال تنش، عملکرد PSII کاهش یافت.

چراکه کمپلکس تجزیه‌کننده آب نخستین مکانی است که تحت تنش شوری آسیب می‌بیند و میزان انتقال الکترون به پذیرنده‌های الکترون در زنجیر انتقال الکترون فتوسنتزی کاهش می‌یابد. اما پس از حذف تنش، از سرگیری فتوسنتز و تولید کلروفیل سبب افزایش کارایی سیستم در بازگشت به حالت طبیعی می‌شود (قاسمی کلاچای و شریعتی، ۱۳۹۱). در پژوهشی بر *C. vulgaris*، تأثیر شرایط اتوتروفی (روشنایی ۴:۲۰) و هتروتروفی (۰/۰۵ گرم بر لیتر گلوکز و سوکروز) در گیاه‌پالایی آلومینیوم با غلظت‌های ۰ و ۳۰۰ میکرومولار بررسی شد (سلیمانیان و همکاران، ۱۳۹۳). افزایش معنی‌دار رشد، اسیدیته و وزن تر در تیمار اتوتروفی مشاهده شد. مقدار کلروفیل a در اتوتروفی ۲ برابر و کلروفیل b، نصف مقدار آن در سلول‌های هتروتروف بود. مقدار بتاکاروتن در هتروتروفی ۳۱٪ کاهش یافت و با کاهش اندک پروتئین همراه شد. در تاریکی مطلق، نمونه تمایل به گلوکز و عدم فاز تأخیری داشته؛ دارای قابلیت تنظیم سریع ارگانیزم با شرایط هتروتروفی بود.

آنتی‌اکسیدان‌های غیر آنزیمی مانند کاروتنوئیدها در پاسخ به تنش با کاهش برخی از رادیکال‌های آزاد اکسیژن نقش مهمی را ایفا می‌کنند (Chen *et al.*, 2006). از طرف دیگر، افزایش عملکرد بیومس، لیپید و کاروتنوئید در گونه‌های میکرو جلبک در کشت میکسوتروف گزارش شده است؛ هرچند پایداری تولید کاروتنوئید در محیط‌های شیمیایی دیده نشد (Minhas *et al.*, 2016). در مطالعه دیگری، میزان کلروفیل، کاروتنوئیدها و فیکوسیانین در رشد هتروتروفیک *S. platensis* بسیار کم شد؛ لیکن محتوای کاروتنوئیدها در کشت میکسوتروف مشابه با کشت اتوتروف بود (Marquez *et al.*, 1995). در مطالعه‌ای، تأثیر سه سطح شوری ۶۰، ۱۷۵ و ۲۹۰ قسمت در میلیون دریاچه ارومیه بر رشد *D. salina* بررسی شد و افزایش شوری، تأثیر معنی‌داری بر تولید کاروتنوئید داشت. به طوری که بیشترین و کمترین میزان آن به ترتیب در شوری ۱۷۵ و ۶۰ قسمت در میلیون و بیشترین مقدار غلظت سلولی در شوری ۱۷۵ قسمت در میلیون مشاهده شد (سلمانی نژاد و همکاران، ۱۳۹۱). در مطالعه دیگر بر جنس یکسان، افزودن غلظت شوری از ۱/۵ به ۳ مولار سبب افزایش بتاکاروتن شد؛ گرچه شوری ۳ مولار سبب کاهش معنی‌دار رشد نسبت به شاهد (۱/۵ مولار) شد (معین و شریعتی، ۱۳۸۹).

به‌طور طبیعی، تمام رنگدانه‌ها در شرایط اتوتروفیک تولید می‌شوند، اما شگفت‌آور است که برخی از آن‌ها مانند فیکوبیلی‌پروتئین‌ها در مقادیر زیادی در شرایط هتروتروف و تاریک تولید می‌شوند (Del Campo *et al.*, 2007). در مطالعه‌ای، افزودن ۲ گرم بر لیتر گلوکز سبب افزایش مقادیر بیومس (۲/۵۷ گرم بر لیتر)، فیکوسیانین (۰/۲۸ گرم بر لیتر) و آلفوفیکوسیانین (۰/۱۳ گرم بر لیتر) در *S. platensis* شد، که بسیار بالاتر از کشت فتواتوتروف (به ترتیب ۱/۱، ۰/۱۲ و ۰/۰۴ گرم بر لیتر) بود (Chen *et al.*, 2006). البته غلظت‌های زیاد گلوکز دارای اثر مهارکنندگی بر میزان فیکوسیانین بود (Zhang *et al.*, 1999). هرچند بیشترین میزان مجموع فیکوبیلی‌پروتئین‌ها هماهنگ با حداکثر رشد دیده شد؛ نمودار هر یک از اجزای فیکوبیلی‌پروتئین‌ها تابع نمودار رشد نبود. لازم به توضیح است که هر یک از اجزای آلفوفیکوسیانین، فیکوسیانین و فیکواریترین بسته به نوع تیمار، تأثیر متفاوتی را بر مقدار کل فیکوبیلی‌پروتئین‌ها گذاشت و روند تغییرات این اجزا در تیمارهای یکسان نیز مشابه نبود. بنابراین، این سه رنگدانه دارای رابطه مستقیم با یکدیگر نیستند و مستقل از هم به شرایط محیطی پاسخ می‌گویند. در مطالعه‌ای ارتقای فیکوسیانین و آلفوفیکوسیانین تا میزان ۰/۱۲ و ۰/۲۸ گرم بر لیتر با کاربرد ۲ گرم گلوکز گزارش شد (Chen *et al.*, 2006)؛ که در این آزمایش ارتقا یافت. اما تولید آن در تیمارهای دارای ۳ گرم نمک افت کرد. فیکوسیانین در رشد هتروتروفیک *S. platensis*، ۴ برابر کم‌تر و در کشت میکسوتروف تقریباً مشابه با کشت اتوتروف بود (Marquez *et al.*, 1995). آثار غلظت ۰/۵، ۱، ۲ و ۵ گرم در لیتر گلوکز نیز بر رشد *S. platensis* مؤثر گزارش شد (Zhang *et al.*, 1999). تیمار ۲ گرم گلوکز موجب افزایش نرخ رشد، وزن خشک و فیکوسیانین به میزان به ترتیب ۰/۷۸، روز، ۲/۷ و ۰/۳ گرم در لیتر شد.

آثار چاپ‌شده متمرکز بر اثر گلوکز بر محصولات با ارزش *S. platensis* کم است؛ زیرا گمان می‌شد که از منابع کربن خارجی استفاده نمی‌کند و یک اتوتروف اجباری است (Minhas *et al.*, 2016). مصرف کل کربن با میزان کارآمدی متابولیسم و انتقال از غشای سلولی تخمین زده می‌شود (Azma *et al.*, 2011). این روند و انتقال یون در غشای سلول وابسته به پروتون است (De Swaaf *et al.*, 2003) که می‌تواند با

گلوکز محیط تأمین شود. زیرا ATP و NADPH در کشت میکسوتروف سریع‌تر تولید می‌شوند و نیازهای سلول را مرتفع می‌سازند (Coca et al., 2015). با توجه به نتایج، کشت موفق این جلبک در شرایط شوری در شرایط اتوتروپی و میکسوتروپی، نشانگر امکان کشت آن در آب دریاچه‌ها یا دریاچه‌های شور جنوب کشور و عصاره ملاس یا ضایعات کارخانه قند و شکر می‌باشد. آثار متقابل سطوح نمک و کربوهیدرات، موفقیت کاربرد هم‌زمان این دو ماده و آثار مثبت آن‌ها بر یکدیگر در تحمل تنش‌های محیطی را روشن می‌نماید. اما غلظت کربن مطلوبی برای رشد بهینه وجود دارد که پس‌از آن، اثر مهارکنندگی غلظت بالای گلوکز رخ می‌دهد.

با توجه به دادگان ارائه‌شده و آنچه پیرامون صفات کمی و کیفی *S. platensis* آمد؛ جهت افزایش معنی‌دار بهره‌وری کشت، تغییر فرمولاسیون محیط کشت مرسوم زاروک و افزودن ۰/۵ گرم بر لیتر گلوکز به آن جهت افزایش بیومس (۱۱/۹۷ گرم بر لیتر)، کلروفیل (۰/۳۴ گرم بر لیتر)، کاروتنوئیدها (۰/۱۱ گرم بر لیتر) و فلاونوئید (۰/۰۹ گرم بر لیتر) و افزودن ۰/۵ گرم بر لیتر گلوکز و ۱/۵ گرم بر لیتر نمک NaCl جهت افزایش عملکرد آنتوسیانین (۰/۰۴ گرم بر لیتر)، آلفیکوسیانین (۰/۴۷ گرم بر لیتر)، فیکوبیلی‌پروتئین‌ها (۱/۰۹ گرم بر لیتر)، فیکوسیانین (۰/۴۴ گرم بر لیتر) و فیکواریترین (۰/۴۷ گرم بر لیتر) ارائه می‌شود. محیط اتوتروف، بالاترین میزان مجموع فیکوبیلی‌پروتئین‌ها (۱/۳۹ گرم بر لیتر)، فیکوسیانین (۰/۵۴ گرم بر لیتر) و فیکواریترین (۰/۵۰ گرم بر لیتر) را تولید کرد. دوره کشت بهینه نیز بر اساس هدف و تیمار منتخب کشت متفاوت بوده و از ۲۶ تا ۳۱ روز متغیر است.

منابع

- سلمانی نژاد، م.، زارعی دارکی، ب. و کریم زاده، ق.، ۱۳۹۱. اثرات نور و شوری بر کاروتنوئیدهای *Dunaliella salina* دریاچه ارومیه. پایان‌نامه کارشناسی ارشد گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم دریایی. دانشگاه تربیت مدرس.
- سلیمانیان، س.، ساطعی، آ. و شکروی، ش.، ۱۳۹۳. بررسی برخی پاسخ‌های فیزیولوژیکی *Chlorella vulgaris* به حضور آلومینیوم در محیط کشت در شرایط اتوتروپی و هتروتروپی. پژوهش‌های اکوفیزیولوژی گیاهی. جلد ۹، دوره ۱: صفحات ۵۷-۶۶.
- قاسمی کلاچای، م. و شریعتی، م.، ۱۳۹۱. بررسی اثر تنش شوری تحت دو شرایط روشنایی و تاریکی بر عملکرد PSII جلبک *Dunaliella bardawil* سلول و بافت. جلد ۳، دوره ۲: صفحات ۱۴۱-۱۵۱.
- معین، م. و شریعتی، م.، ۱۳۸۹. اثر هم‌زمان سالیسیلیک اسید و تنش شوری بر روی رشد (تقسیم سلولی)، رنگیزه‌های فتوسنتزی و مقدار بتاکاروتن در جلبک تک سلولی *Dunaliella salina* زیست‌شناسی ایران. جلد ۲۳، دوره ۵: صفحات ۶۳۸-۶۴۷.
- Allahverdiyev, S., Atila, A., Ismail, B. S. and Sahnurova, A., 2011. Response of photosystem II and photosynthetic pigments to salt and Baikal EM1 in tree seedlings. *Biotechnology*. 10 (4): 535-538.
- Andrade, M. R. and Costa, J. A. V., 2007. Mixotrophic cultivation of microalga *Spirulina platensis* using molasses as organic substrate. *Aqua*. 264: 130-134.
- Azma, M., Mohamed, M. S., Mohomad, R., Rahim, R. A. and Ariff, A. B., 2011. Improvement of medium composition for heterotrophic cultivation of green microalgae, *Tetraselmis suecica*, using response surface methodology. *Biochemistry*. 53: 187-195.
- Barrocal, V. M., Garcia-Cubero, M. T., Iez-Benito, G. G. and Coca, M., 2010. Production of biomass by *Spirulina maxima* using sugar beet vinasse in growth media. *New Biotechnology*. 27 (6): 851-57.
- Cardozo, K.H. and Guaratini, T. 2007. Metabolites from algae with economical impact. *Comparative Biochemistry Physio., Part C: Tox. Pharm.* 146 (1): 60-78.

- Çelekli, A. and Yavuzatmaca, M. 2009.** Predictive modeling of biomass production by *Spirulina platensis* as function of nitrate and NaCl concentrations. *Bioresource Technology*. 100: 1847-51.
- Chainapong, T., Traichaiyaporn, S. and Deming, R. L., 2012.** Effect of light quality on biomass and pigment production in photoautotrophic and mixotrophic cultures of *Spirulina platensis*. *Agricultural Technology*. 8 (5): 1593-1604.
- Chen, T., Zheng, W., Wong, Y. S., Yang, F. and Bai, Y., 2006.** Accumulation of selenium in mixotrophic culture of *Spirulina platensis* on glucose. *Bioresource Technology*. 97: 2260-65.
- Chen, Y. H. and Walker, T. H., 2011.** Biomass and lipid production of heterotrophic microalgae *Chlorella protothecoides* by using biodiesel-derived crude glycerol. *Biotechnology Letters*. 33: 1973-83.
- Coca, M., Barrocal, V. M., Lucas, S., González-Benito, G. and García-Cubero, M. T., 2015.** Protein production in *Spirulina platensis* biomass using beet vinasse-supplemented culture media. *Food Bioprod Process*. 94: 306-312.
- Del Campo, J. A., García-González, M. and Guerrero, A. M. G., 2007.** Outdoor cultivation of microalgae for carotenoid production: current state and perspectives. *Microbiology and Biotechnology*. 74: 1163-74.
- De Swaaf, M. E., Sijtsma, L. and Pronk, J. T., 2003.** High-cell-density fed-batch cultivation of the docosahexaenoic acid producing marine *Cryptocodinium cohnii*. *Biotechnology Bioengineering*. 81: 666-72.
- Hadi, M. R., Shariati, M. and Afsharzadeh, S., 2008.** Microalgal biotechnology: carotenoid and glycerol production by the green algae *Dunaliella* isolated from the Gave-Khooni salt marsh, Iran. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. 13: 540-44.
- Kaplan, F., Lewis, L. A., Herburger, K. and Holzinger, A., 2013.** Osmotic stress in Arctic and Antarctic strains of *Zygnema*: Effects on photosynthesis and ultrastructure. *Micron*. 4: 317-30.
- Kaplan, F., Lewis, L. A., Wastian, J. and Holzinger, A., 2012.** Plasmolysis effects and osmotic potential of 2 phylogenetically distinct alpine strains of *Klebsormidium*. *Protoplasma*. 249: 789-804.
- Karsten, U., 2012.** Seaweed acclimation to salinity and desiccation stress. *Seaweed Ecology and Physiology*. 219: 87-107.
- Khan, Z., Bhadouria, P. and Bisen, P. S., 2005.** Nutritional and Therapeutic Potential of *Spirulina*. *Cur Pharm Biotechnology*. 6: 373-379.
- Krizek, D. T., Britz, S. J. and Mirecki, R. M., 1998.** Inhibitory effects of ambient levels of solar UV-A and UV-B radiation on growth cv. New Leaf Fire lettuce. *Physiology Plantarum*. 103: 1-7.
- Lavens, P. and Sorgeloos, P., 1996.** Manual on the production and use of live food for aquaculture. FAO Food and Agriculture Organization.
- Marker, A. F. H., 1972.** The use of acetone and methanol in the estimation of chlorophyll in the presence of phaeophytin. *Freshwater Biology*. 2 (4): 361-85.
- Marquez, F. J., Nishio, N., Nagai, S. and Sasaki, K., 1995.** Enhancement of biomass and pigment production during growth of *Spirulina* in mixotrophic culture. *Chemical Technology and Biotechnology*. 62: 159-64.
- Minhas, A. K., Hodgson, P., Barrow, C. J. and Adholeya, A., 2016.** A review on the assessment of stress conditions for simultaneous production of microalgal lipids and carotenoids. *Frontiers in Microbiology*. 3 (7): 546-65.
- Ramakrishna, A., Dayananda, C., Giridhar, P. and Rajacekaran, T. 2011.** Photoperiod influences endogenous indole amines in cultured *Dunaliella bardawil*. *Experimental Biology*. 49: 234-40.
- Ravelonandro, P.H., Ratianarivo, D.H., Joannis-Cassan, C., Isambert, A. and Raherimandimby M. 2011.** Improvement of the growth of *Arthrospira (Spirulina) platensis* from Toliara (Madagascar): Effect of agitation, salinity and CO₂ addition. *Food bioprod process*. 89: 209-16.
- Pandey J.P. and Tiwari A. 2010.** Optimization of Biomass Production of *Spirulina maxima*. *Algal Biomass Utilization*. 1 (2): 20-32.
- Perez-Garcia, O., Escalante, F. M. E., de-Bashan, L. E. and Bashan, Y., 2011.** Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products. *Water research*. 45: 11-36.

- Pulz, O. and Gross, W. 2004.** Valuable products from biotechnology of microalgae. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 65: 635-648.
- Sarada, R., Pillai, G. M. and Ravishankar G. A., 1999.** Phycocyanin from *Spirulina* sp: influence of processing of biomass on phycocyanin yield, analysis of efficacy of extraction methods and stability studies on phycocyanin. *Process in Biochemistry*. 34: 795-801.
- Soletto, D., Binaghi, L., Ferrari, L., Lodi, A., Carvalho, J. C. M., Zilli, M. and Converti, A., 2008.** Effects of carbon dioxide feeding rate and light intensity on the fed-batch pulse-feeding cultivation of *Spirulina platensis* in helical photobioreactor. *Biochemistry Engineering*. 3: 369-375.
- Stengel, D.B., Connan, S. and Popper, Z. A., 2011.** Algal chemodiversity and bioactivity: Sources of natural variability and implications for commercial application. *Biotechnology Adv.* 29: 483-501.
- Tarko, T., Duda-Chodak, A., and Kobus, M., 2012.** *Czech Journal of Food Sci.* 30: 258-267.
- Wagner, G. J. 1979.** Content and vacuole/extra vacuole distribution of neutral sugars free amino acids and anthocyanins in protoplast. *Plant Physiology*. 64: 88-93.
- Zhang, T., Gong, H., Wen, X. and Lu, C., 2010.** Salt stress induces a decrease in excitation energy transfer from phycobilisomes to photosystem II but an increase to photosystem I in the cyanobacterium *Spirulina platensis*. *Plant Physiology*. 167: 951-958.
- Zhang, X. W., Zhang, Y. M. and Chen, F., 1999.** Application of mathematical models to the determination optimal glucose concentration and light intensity for mixotrophic culture of *Spirulina platensis*. *Process in Biochemistry*. 34: 477-481.

