

(OPEN ACCESS)

Optimizing different physical conditions (temperature, light and pH) on the production of *Spirulina laxissima* biomass using response surface methodology

Matin Shakoori^{*1}, Reza Safari², Asieh Makhloogh³,
Mohammad Ali Afraei Bandpei⁴, Tahere Bagheri⁵

1. Corresponding Author, Researcher, Caspian Sea Ecology Research Center, Iranian Fisheries Science Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Sari, Iran. E-mail: matin.shakoori@yahoo.com
2. Assistant Prof., Caspian Sea Ecology Research Center, Iranian Fisheries Science Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Sari, Iran. E-mail: safari1351@gmail.com
3. Researcher, Caspian Sea Ecology Research Center, Iranian Fisheries Science Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Sari, Iran. E-mail: asieh_makhloogh@yahoo.com
4. Assistant Prof., Caspian Sea Ecology Research Center, Iranian Fisheries Science Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Sari, Iran. E-mail: mafraei1965@gmail.com
5. Assistant Prof., Offshore Water Research Center, Iranian Fisheries Science Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Chabahar, Iran. E-mail: bagheri1360@gmail.com

Article Info	ABSTRACT
Article type: Full Length Research Paper	Background and Objectives: Considering the importance of using commercial species of <i>Spirulina</i> microalgae, the aim of the present study was to identify native <i>Spirulina</i> species in the Caspian Sea and to optimize the growth conditions of this microalga in order to reduce production costs and increase its economic benefits. In this study, water samples were collected from a depth of 5 meters along the coast of Farahabad, Mazandaran (2023-2024).
Article history: Received: 09.03.2024 Revised: 10.10.2024 Accepted: 10.13.2024	
Keywords: Biomass, Purification, <i>Spirulina</i> , Surface response methodology	Materials and Methods: After observing the <i>Spirulina</i> genus, the microalgae were isolated and purified using the serial dilution method, ultimately resulting in pure single colonies. Initial identification was performed using a light microscope and validated identification keys. To confirm and verify the identification, molecular analysis and 16 SrRNA sequencing were employed. Phylogenetic analysis showed that the studied species has the least genetic distance from <i>Spirulina laxissima</i> . The Response Surface Methodology (RSM) was used in this study. RSM is a fractional method derived from full factorial designs, first introduced in the 1950s with initial applications primarily in the chemical industry. Recently, this method has been widely adopted for quality improvement, product design, and uncertainty analysis. RSM is a rigorous scientific approach that combines statistical techniques and applied mathematics to construct experimental models. The primary objective in such designs is to optimize the response (output variable), which is influenced by several independent variables.
	Result: The design of photosynthetic microorganism cultivation systems began worldwide in 1950s. Over the past thirty years, commercial cultivation of microalgae as a green technology, particularly <i>Spirulina</i> for

healthy food, has been developed in various countries around the world. Among the advantages of using algae in product manufacturing are their high reproductive capacity, high production efficiency in a small cultivation space, ease of cultivation, and independence from seasonal and weather conditions. In addition, their ability to utilize organic resources or various carbon sources including agricultural and industrial wastes, increases the range of their potential applications. These characteristics of microalgae make cultivation systems significantly more efficient and productive than other agricultural production processes. Microalgae are widely used in the food industry and incorporated into many food formulas as natural color additives. Spirulina microalgae is one of the most interesting microalgae strains due to its great potential. After identifying the cyanobacteria species under study, the effects of three physical factors, temperature (27-29 °C), light (3000-3500 lux), and pH (9-11), on biomass production rate were investigated using the response surface methodology. The results from the design of this experiment showed that after 14 days, the highest biomass (0.839 g) was obtained at a temperature of 29 °C, a light intensity of 3250 lux, and pH=10.

Conclusion: In general, it can be concluded that *Spirulina laxissima* can serve as a suitable alternative to commercial Spirulina species due to its compatibility with the culture medium and its favorable growth rate. Given the numerous applications of Spirulina microalgae, it is recommended that additional responses such as the amounts of protein, lipids, chlorophyll, and phycocyanin in the native Caspian Sea species be investigated under different cultivation conditions.

Cite this article: Shakoori, Matin, Safari, Reza, Makhloogh, Asieh, Afraei Bandpei, Mohammad Ali, Bagheri, Tahere. 2025. Optimizing different physical conditions (temperature, light and pH) on the production of *Spirulina laxissima* biomass using response surface methodology. *Journal of Utilization and Cultivation of Aquatics*, 14 (3), 195-210.



© The Author(s).

Doi: 10.22069/japu.2024.22769.1902

Publisher: Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

بهینه‌سازی شرایط مختلف فیزیکی (دما- نور و pH) بر تولید زیست‌توده اسپیرولینا (*Spirulina laxissima*) با استفاده از روش پاسخ سطح

متین شکوری^{۱*}، رضا صفری^۲، آسیه مخلوق^۳، محمدعلی افرائی بندپی^۴، طاهره باقری^۵

۱. نویسنده مسئول، محقق پژوهشگاه اکولوژی دریای خزر، مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، ساری، ایران. رایانامه: matin.shakoori@yahoo.com
۲. استادیار پژوهشگاه اکولوژی دریای خزر، مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، ساری، ایران. رایانامه: safari1351@gmail.com
۳. محقق پژوهشگاه اکولوژی دریای خزر، مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، ساری، ایران. رایانامه: asieh_makhlough@yahoo.com
۴. استادیار پژوهشگاه اکولوژی دریای خزر، مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، ساری، ایران. رایانامه: mafraei1965@gmail.com
۵. استادیار مرکز تحقیقات شیلات آب‌های دور، مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، چابهار، ایران. رایانامه: bagheri1360@gmail.com

اطلاعات مقاله	چکیده
نوع مقاله: مقاله کامل علمی- پژوهشی	سابقه و هدف: با توجه به اهمیت استفاده از گونه‌های تجاری ریزجلبک اسپیرولینا، هدف از انجام پژوهش حاضر، شناسایی گونه بومی اسپیرولینای دریای خزر و بهینه‌سازی شرایط رشد این ریزجلبک به منظور کاهش هزینه‌ها و افزایش مزایای تولید آن می‌باشد. در این پژوهش، نمونه‌برداری آب از عمق ۵ متر ساحل فرح‌آباد- مازندران در سال ۱۴۰۲-۱۴۰۳ انجام شد.
تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۶/۱۳	
تاریخ ویرایش: ۱۴۰۳/۰۷/۱۹	مواد و روش‌ها: بعد از مشاهده جنس اسپیرولینا، جداسازی و خالص‌سازی ریزجلبک آن با استفاده از روش رقیق‌سازی انجام شد و در نهایت تک‌کلونی‌های خالص به‌دست آمد. شناسایی اولیه با استفاده از میکروسکوپ نوری و کلیدهای شناسایی معتبر انجام شد. برای تأیید و صحت آن از شناسایی مولکولی و توالی‌یابی 16 SrRNA استفاده شد. نتایج حاصل از ترسیم درخت فیلوژنتیکی نشان داد که گونه مورد مطالعه کم‌ترین فاصله ژنتیکی را با ریزجلبک <i>Spirulina laxissima</i> دارد. از روش سطح پاسخ استفاده شد؛ که روش سطح پاسخ از جمله روش‌های کسری از فاکتوریل کامل است و طراحی آزمایش‌ها به روش سطح پاسخ (RSM) از سال ۱۹۵۰ میلادی شکل گرفت و کاربرد اولیه آن بیش‌تر برای صنایع شیمیایی بود ولی اخیراً به‌طور گسترده‌ای از روش سطح پاسخ برای بهبود کیفیت، طراحی محصول و آنالیز عدم قطعیت
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۷/۲۲	
واژه‌های کلیدی: اسپیرولینا، خالص‌سازی، روش پاسخ سطح، زیست‌توده	

استفاده می‌شود. این روش کاملاً علمی بوده و مجموعه‌ای از تکنیک‌های آماری و ریاضیات کاربردی برای ساخت مدل‌های تجربی است. هدف در این نوع طرح‌ها، بهینه‌سازی پاسخ (متغیر خروجی) می‌باشد که متأثر از چندین متغیر مستقل (متغیرهای ورودی) است.

یافته‌ها: طراحی سیستم‌های کشت میکروارگانیسم‌های فتوسنتزکننده در جهان از سال ۱۹۵۰ آغاز شده و در سی سال اخیر کشت تجاری ریزجلبک‌ها به‌عنوان تکنولوژی سبز^۱ به‌ویژه اسپیرولینا برای غذای سالم، در کشورهای مختلف جهان انجام می‌شود. از جمله مزایای استفاده از جلبک‌ها در تولید محصول می‌توان به مواردی چون قدرت تکثیر زیاد، بازده تولید محصول بالا در فضای کوچک دستگاه رشد، کشت آسان و عدم وابستگی به فصل و شرایط آب و هوایی و همچنین توانایی آن‌ها در استفاده از منابع آلی یا منابع کربنی مختلف حتی ضایعات کشاورزی و صنعتی اشاره کرد که دامنه استفاده و کاربرد آن‌ها را افزایش می‌دهد. این خصوصیات تولید ریزجلبک‌ها را بازدهی سیستم‌های کشت و بهره‌وری و در مقایسه با سایر فرآیندهای تولید در بخش کشاورزی را به مراتب بالاتر می‌برد. امروزه ریزجلبک‌ها در بخش بزرگی از صنایع غذایی و در بسیاری از فرمول‌های غذایی به‌عنوان مکمل‌های افزودنی رنگی استفاده می‌شوند. در این میان ریزجلبک اسپیرولینا با برخورداری از پتانسیل‌های بسیار بالقوه‌ای که دارد یکی از سویه‌های ریزجلبکی بسیار موردتوجه است. بعد از شناسایی گونه سیانوباکتری مورد بررسی، تأثیر ۳ فاکتور فیزیکی دما (۲۷-۲۹ درجه سانتی‌گراد)، نور (۳۵۰۰-۳۰۰۰ لوکس) و pH (۹-۱۱) بر میزان تولید زیست‌توده آن با استفاده از روش پاسخ سطح مورد بررسی قرار گرفت. نتایج به‌دست آمده از طراحی این آزمایش نشان داد که بعد از گذشت ۱۴ روز، بیش‌ترین زیست‌توده (۰/۸۳۹ گرم) در دمای ۲۹ درجه، نور ۳۲۵۰ لوکس و pH=۱۰ به‌دست آمد.

نتیجه‌گیری: به‌طور کلی می‌توان نتیجه گرفت که اسپیرولینا لاکسیسیما به‌دلیل سازگاری با محیط کشت مورد استفاده و سرعت رشد مطلوب می‌تواند به‌عنوان جایگزین مناسب گونه تجاری اسپیرولینا مورد استفاده قرار بگیرد. با توجه به کاربردهای فراوان ریزجلبک اسپیرولینا، پیشنهاد می‌گردد که سایر پاسخ‌ها مانند میزان پروتئین، لیپید، کلروفیل و فیکوسیانین گونه بومی دریای خزر در شرایط کشت مختلف مورد بررسی قرار گیرد.

استناد: شکوری، متین، صفری، رضا، مخلوق، آسیه، افرائی بندپی، محمدعلی، باقری، طاهره (۱۴۰۴). بهینه‌سازی شرایط مختلف فیزیکی (دما- نور و pH) بر تولید زیست‌توده اسپیرولینا (*Spirulina laxissima*) با استفاده از روش پاسخ سطح. نشریه بهره‌برداری و پرورش آبزیان، ۱۴ (۳)، ۲۱۰-۱۹۵.

Doi: 10.22069/japu.2024.22769.1902



© نویسندگان.

ناشر: دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

مقدمه

جلبک‌ها گروه بزرگی از موجودات هستند که از دو جنبه اکولوژیکی و اقتصادی دارای اهمیت فراوان هستند. از دیدگاه اکولوژیکی، جلبک‌ها در پایه هرم اکوسیستم‌های عظیم قرار دارند و به‌عنوان تولیدکنندگان اصلی زنجیره غذایی، تثبیت‌کننده نیتروژن و تامین غذای آبزیان دارای اهمیت هستند (۱). استفاده از گونه تجاری اسپیرولینا (*Spirulina platensis*) دارای ارزش غذایی بالا و حاوی درصد بالایی از پروتئین، ویتامین، مواد معدنی، اسیدهای چرب، رنگدانه و اسیدهای آمینه ضروری است و خواص ضد میکروبی، آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی آن اثبات شده است (۲ و ۳). در حقیقت اسپیرولینا پلاتنسیس یکی از پرمصرف‌ترین مواد طبیعی است که به‌عنوان مکمل غذایی در انسان، حیوانات، دام و طیور و آبزیان مورد استفاده قرار می‌گیرد (۴). استفاده از سویه‌های مختلف اسپیرولینا به‌دلیل ارزش غذایی بالای آن همیشه مورد توجه پژوهش‌گران بوده است (۵ و ۶). در واقع خالص‌سازی و شناسایی دقیق فیتوپلانکتون‌های بومی هر منطقه می‌تواند مبنای پژوهش‌های بعدی بر روی گونه‌ها باشد. پایه و اساس مطالعات در زمینه فیتوپلانکتون‌ها بر شناسایی دقیق گونه آن استوار است. و شناسایی گونه‌ها تنها بر اساس مرفولوژی بسیار دشوار است و امروزه استفاده از آنالیز مولکولی دیدگاه تازه‌ای را در بررسی‌های طبقه‌بندی و تکاملی پیش‌روی ما قرار داده است (۷). پژوهش‌گران بیان نمودند که به‌طورکلی ۷۸ درصد ژن‌های موجود در ریزجلبک اسپیرولینا پلاتنسیس با ژن‌هایی با عملکرد نامشخص در دیگر موجودات مشابهت دارند در صورتی‌که ۲۲ درصد ژنوم آن از ژن‌های شناخته شده تشکیل شده است (۸). مخلوق و همکاران (۹) گونه‌های *S. laxissima* و *S. major* از اسپیرولینا دریای خزر را در سال ۱۳۸۸ و عمق ۱۰ متر و فصل‌های تابستان و پائیز گونه

S. subtilissima را در فصل بهار و عمق ۱۰ متر

شناسایی و گزارش نمودند.

مطالعاتی در خصوص بهینه‌سازی رشد و کیفیت بیومس ریزجلبک اسپیرولینا پلاتنسیس انجام شده است (۱۰، ۱۱ و ۱۲). از بین فاکتورهای اثرگذار در فرآیند کشت اسپیرولینا می‌توان به نوع و میزان مواد مغذی یا محیط کشت، شدت تابش، pH، دما، میزان CO₂ و هوادهی اشاره نمود (۱۳، ۱۴ و ۱۵). نخستین قدم برای بهره‌برداری از ریزجلبک‌ها، جداسازی، خالص‌سازی و شناسایی سویه‌های آن‌هاست که از اهمیت و ضرورت ویژه‌ای برخوردار است بنابراین پژوهش حاضر با هدف شناسایی و بررسی بیش‌تر گونه بومی از سیانوباکتر اسپیرولینا در سواحل جنوب دریای خزر (مازندران- ساری) و بهینه‌سازی برخی شرایط فیزیکی رشد با استفاده از روش سطح پاسخ و طرح مرکب مرکزی به بررسی اثر سه فاکتور فیزیکی بر کمیت زیست‌توده تولیدی تنظیم شده است.

مواد و روش‌ها

معرفی منطقه مورد مطالعه و نمونه‌برداری: نمونه‌برداری به‌صورت مستمر از عمق ۵ متر ساحل فرح‌آباد- ساری در استان مازندران واقع در طول جغرافیایی (۱۸° ۵۳)، عرض جغرافیایی (۵۷° ۵۳) صورت گرفت. نمونه‌برداری در فصل تابستان و ساعات میانی (ظهر) روز که تابش نور حداکثر است و فیتوپلانکتون برای فتوسنتز به لایه‌های سطحی آب مهاجرت می‌کنند، توسط تور پلانکتون‌گیری انجام شد. نمونه‌های آب در بطری‌های شیشه‌ای جمع‌آوری شده و به آزمایشگاه کشت جلبک پژوهشکده اکولوژی دریای خزر منتقل شدند.

بعد از مشاهده و شناسایی جنس اسپیرولینا با ظاهر مارپیچ با استفاده از میکروسکوپ نوری Nikon و کلیدهای شناسایی معتبر (۱۶ و ۱۷) اقدام به

جداسازی شد. برای شناخت خصوصیات محیطی زیستگاه جلبک اسپیرولینا، برخی فاکتورهای فیزیکی و شیمیایی آب منطقه نمونه‌برداری شامل دما، شوری، pH، هدایت الکتریکی و نیتريت اندازه‌گیری شد. دمای هوا با استفاده از دماسنج جیوه‌ای، شوری و هدایت الکتریکی با استفاده از WTW cond 3110، pH با استفاده از WTW pH 3110 اندازه‌گیری شد (جدول ۱).

جدول ۱- برخی خصوصیات فیزیکی و شیمیایی آب منطقه نمونه‌برداری.

Table 1. Some physical and chemical characteristics of the water in the sampling area.

NO ₂ /N (µg/l)	EC (µz)	شوری Salinity	pH	دما Temperature
1.31	18.7	11.1	8.7	31

۲۹ درجه سانتی‌گراد، میانگین شدت نور ۳۵۰۰ لوکس و تناوب نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی تنظیم شد.

شناسایی مرفولوژیکی و مولکولی: بعد از جداسازی، کشت و تکثیر ریزجلبک اسپیرولینا، برای شناسایی گونه و بررسی خصوصیات ظاهری از جمله اندازه، رفتار، ضمایم با استفاده از میکروسکوپ نوری Nikon با بزرگنمایی $\times 100$ و کلیدهای شناسایی معتبر انجام شد (۱۶ و ۱۷). با توجه به پیشرفت روزافزون روش‌های بیولوژی مولکولی و اطمینان و راحتی شناسایی از طریق مقایسه ژن‌های حفاظت شده در سطح جنس و گونه ریزجلبک‌ها استفاده از روش مولکولی مناسب است. برای ارزیابی مولکولی و استخراج DNA، دو میلی‌لیتر از سوسپانسیون جلبکی برداشته و بعد از هموژن کردن آن، ۴۰۰ میکرولیتر بافر STE (Tris-Hcl 10mM, EDTA 1mM, PH=8, NaCl 100mM) به آن اضافه گردید و باقی‌مانده استخراج با روش فنل-کلروفرم انجام شد. و ارزیابی کیفیت و کمیت DNA استخراج شده با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز ۱ درصد صورت پذیرفت. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز جهت تکثیر قطعه ژنی سیتوکروم اکسیداز I انجام شد (۲۰). تکثیر ژن 16srRNA با استفاده از دستگاه PCR و آغازگرهای

جداسازی و کشت: جداسازی و خالص‌سازی با روش‌های تهیه رقت‌های سریالی با تکرار کشت مایع و استفاده از محیط کشت جامد انجام شد. در مواردی که فراوانی سلول‌ها در نمونه‌های جمع‌آوری شده کم بود برای تجمع بیش‌تر ۱۰ میلی لیتر از نمونه‌ها با دور ۲۰۰۰ rpm به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ (SIGMA 2-16 KL) شد و در نهایت تعداد سلول‌های بیش‌تری در ته لوله آزمایش تجمع یافت (۱۸). برای تهیه محیط کشت جامد، ۱/۵ گرم آگار در یک لیتر از محیط کشت زاروک^۱ استفاده شد (۸). پس از طی ۱۴ روز کلونی‌های رشد کرده بررسی و به لوله آزمایش حاوی محیط کشت مایع منتقل شدند. شمارش نمونه‌ها با استفاده از لام نفوبار آینه‌ای و میکروسکوپ نوری Nikon با بزرگنمایی $\times 100$ انجام گردید. جهت کشت و تکثیر اسپیرولینای بومی دریای خزر، از محیط کشت زاروک با فرمولاسیون متفاوت استفاده شد (۱۹). ترکیبات محیط کشت ذکر شده (گرم در لیتر) شامل NaHCO₃ ۸ گرم، K₂HPO₄ ۰/۵ گرم، NaNO₃ ۲/۵ گرم، K₂SO₄ ۰/۵ گرم، NaCl ۲ گرم، MgSO₄ ۰/۲ گرم، FeSO₄ ۰/۰۵ گرم و Urea ۰/۲ گرم بود. pH محیط کشت در محدوده ۹ تنظیم شد. دمای اتاق کشت در محدوده

1- Zarrouk medium

اختصاصی رفت و برگشت (جدول ۲) صورت پذیرفت. دستگاه PCR مورد استفاده در این پژوهش از نوع Thermo Cycler Bio Rad T100n بود.

جدول ۲- آغازگرهای رفت و برگشت مورد استفاده تکثیر قطعه‌ای از ژنوم 16srRNA.

Table 2. Forward and reverse primers used for fragment amplification of the 16srRNA genome.

نام آغازگر INITIATOR NAME	توالی آغازگر PRIMER SEQUENCE
27F	5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'
1492R	5'-T ACGGYTACCTTGTACGACTT-3'

جدول ۳- برنامه دمایی و شرایط واکنش زنجیره‌ای پلیمرز برای تکثیر ژنوم 16srRNA.

Table 3. Temperature program and polymerase chain reaction conditions for 16srRNA genome amplification.

دور Cycle	زمان Time	دما Temperature °C	مراحل واکنش زنجیره‌ای پلیمرز PCR Steps
1	3 min	95	واسرشت اولیه Primary nature
	30 s	95	واسرشت Nature
32	30 s	55	اتصال آغازگر Initiator connection
	90 s	72	بسط Expansion
1	8 min	72	بسط نهایی Final expansion

بهینه‌سازی شرایط مختلف فیزیکی رشد به‌منظور حداکثر تولید زیست‌توده آزمایشی با استفاده از روش پاسخ سطح مورد بررسی قرار گرفت.

طراحی آزمایش و تعیین سطوح مختلف دما، نور و pH: سه متغیر اصلی شامل دما- نور و pH برای بررسی مقدار اثرگذاری بر متغیرهای پاسخ در نظر گرفته شد. جهت بررسی هم‌زمان متغیرهای ورودی بر متغیرهای خروجی موردنظر در سه سطح بالا (+۱)، متوسط (۰) و پائین (-۱) (جدول ۴) و یک بلوک و ۶ تکرار در مرکز (۱، ۶، ۹، ۱۲، ۱۴ و ۱۸) برای محاسبه تکرارپذیری فرآیند و تخمین خطای آزمایش و پیش‌بینی ویژگی برازش مدل از روش آماری پاسخ

محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمرز جهت تعیین توالی به شرکت فراپژوه جهت خوانش از دو سر توالی انجام شد. توالی‌های به‌دست آمده با استفاده از نرم‌افزار Ver.7.09 BioEdit ویرایش شدند و صحت توالی‌های به‌دست آمده در این پژوهش، از طریق مقایسه با توالی‌های مشابه، با استفاده از نرم‌افزار BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) در پایگاه داده‌های ژنتیکی NCBI صورت گرفت. درخت فیلوژنتیکی بر اساس آنالیزهای Neighbor-Joining و با استفاده از ناحیه 16 SrRNA با پشته‌توانه تکرار ۱۰۰۰ (Bootstrop 1000) به‌دست آمد. بعد از شناسایی مولکولی سوبه اسپیرولینا و تکثیر آن، جهت

سطح (Response Methodology Surface) با نرم‌افزار Design-Expert و طرح مرکب مرکزی (کسری از فاکتوریل) استفاده گردید. بنابراین برای انجام آزمایش‌ها در این طرح، سه متغیر ورودی با سه سطح تعیین شده و در مجموع ۲۰ واحد آزمایشی طراحی شد (جدول ۵).

اجرای آزمایش: سوسپانسیون جلبکی از سلول‌های در حال رشد تهیه شد و در تمامی واحدهای آزمایشی به محیط کشت‌ها در شرایط استریل و میزان حجمی ۱۰ درصد در ارلن‌ها تلقیح شد. آزمایش به مدت ۱۴ روز ادامه یافت و این زمان بر اساس آزمایش‌های قبلی و زمانی که محیط کشت به بالاترین میزان رشد رسید، انتخاب شد. میزان تولید زیست‌توده در روز چهاردهم بررسی شد.

اندازه‌گیری غلظت زیست‌توده: میزان رشد با اندازه‌گیری جذب نوری در طول موج ۶۸۰ نانومتر و با دستگاه اسپکتوفتومتر (CECIL 2501) اندازه‌گیری شد (۲۱). سپس مقادیر جذب نوری با توجه به رابطه

به‌دست آمده میان جذب و وزن خشک زیست‌توده بر حسب گرم در لیتر تبدیل شدند. این کار با اندازه‌گیری توأم جذب نوری و وزن خشک زیست‌توده نمونه‌های با غلظت متفاوت، انجام شد تا میزان رشد بر اساس وزن خشک گزارش شود. بنابراین پس از مشاهده بلوم جلبکی، توده سلولی با استفاده از صافی‌های ۱۰۰ و ۲۰ میکرونی جمع‌آوری و توده سلولی ۳ بار برای از بین بردن اثرات محیط کشت با استفاده از آب مقطر شستشو داده شد. سپس در آون با دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت خشک شدند. مقدار وزن خشک زیست‌توده با ترازوی آزمایشگاهی با دقت ۰/۰۰۰۱ گرم اندازه‌گیری شدند و در نهایت مقدار زیست‌توده بر حسب گرم محاسبه شد (۴ و ۲۲). داده‌های به‌دست آمده توسط نرم‌افزار Design-Expert تجزیه و تحلیل شدند. داده‌ها براساس رگرسیون چندمتغیره انجام شدند. نمودارها با استفاده از DOE ترسیم شدند.

جدول ۴- دامنه تغییرات دما، نور و pH در واحدهای آزمایشی.

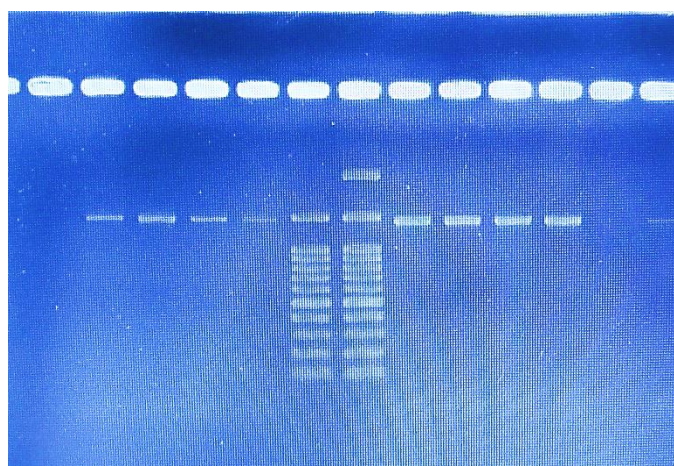
Table 4. Range of temperature, light and pH changes in experimental units.

کد و سطح مربوطه Relevant code and level			نماد ریاضی Mathematical symbol	متغیر مستقل Independent variable
-1	0	+1		
9	10	11	x_1	دما (°C) Temperature
27	28	29	x_2	نور (Lux) Light
3000	3250	3500	x_3	pH

نتایج

بررسی کمی و کیفی DNA استخراج‌شده: ارزیابی کمی DNA استخراج شده نشان داد که سنجش آن در جذب نوری ۲۶۰ به ۲۸۰ نانومتر در محدوده ۱/۸ تا ۲/۲ قرار داشتند که بیان‌کننده غلظت مناسب DNA جهت مطالعات مولکولی است. بررسی کیفیت استخراج

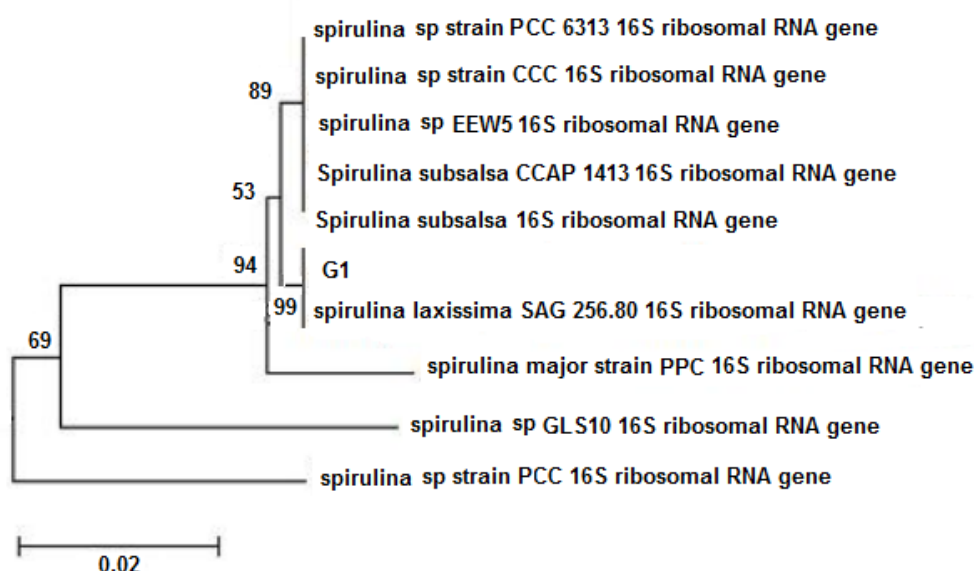
DNA با استفاده از الگوی حرکتی ژل آگارز نشان داد که DNA استخراج‌شده با این روش مناسب بود. پس از انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمرز، محصول تکثیرشده ژن 16 SrRNA بر روی ژل آگارز برده شدند (شکل ۱) طول تکثیری قطعه ژن 16 SrRNA، ۱۰۰۰ جفت باز بود.



شکل ۱- تصویر ژل رنگ‌آمیزی شده با اتیدیوم بر مایه در محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در محدوده ۱۰۰۰ جفت باز برای ژن 16S rRNA.

Figure 1. Image of an ethidium bromide-stained gel in the polymerase chain reaction product within 1000 base pairs for the 16S rRNA gene.

ارزیابی توالی‌های به دست آمده از قطعات تکثیر شده با استفاده از برنامه برهم‌نهی موضعی (BLAST) در سایت NCBI بررسی شد. نتایج آنالیز درخت فیلوژنتیکی نشان داد که به احتمال ۹۹/۹ درصد گونه ریز جلبک مورد مطالعه *Spirulina laxissima* است (شکل ۲).



شکل ۲- ترسیم درخت فیلوژنتیکی با استفاده از روش Neighbor-joining.

Figure 2. Drawing a phylogenetic tree using the Neighbor-joining method.

بهینه‌سازی شرایط کشت: در طراحی آزمایش انجام ۲۰ RUN به حاصل شد که نتایج بر اساس این ۲۰ مورد بررسی شده است (جدول ۵). براساس نتایج جدول ۵ آنالیز واریانس انجام گرفت و مدل به دست آمده، کوآتروآتیک است (جدول ۶).

جدول ۵- نتایج حاصل از طراحی آزمایش به روش پاسخ سطح (RSM).

Table 5. Results from the Response Surface Method (RSM) experimental design.

Run	عامل ۱	عامل ۲	عامل ۳	پاسخ ۱
	Factor 1	Factor 2	Factor 3	Response 1
	A:pH	B:Temperature °C	C:Photon Lux	Biomass gr/L
1	10	28	3250	0.773
2	10	29	3250	0.839
3	10	28	3250	0.769
4	9	29	3500	0.797
5	10	28	3250	0.745
6	9	28	3250	0.716
7	11	29	3000	0.715
8	10	28	3250	0.771
9	11	27	3000	0.532
10	9	27	3000	0.617
11	11	28	3250	0.636
12	9	29	3000	0.748
13	11	29	3500	0.788
14	11	27	3500	0.645
15	10	28	3250	0.779
16	10	27	3250	0.674
17	9	27	3500	0.673
18	10	28	3500	0.807
19	10	28	3000	0.754
20	10	28	3250	0.768

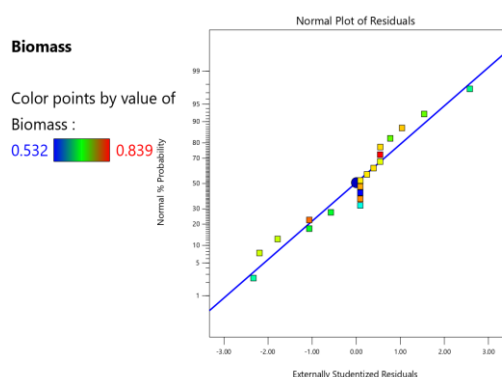
جدول ۶- جدول ANOVA به‌دست آمده از نتایج جدول ۵.

Table 6. ANOVA table obtained from the results of Table 5.

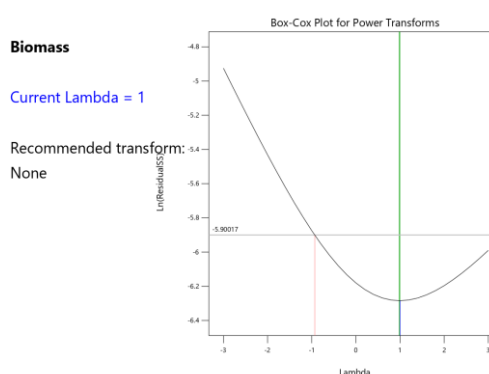
Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value	
Model	0.1084	9	0.0120	64.59	< 0.0001	Significant
A-pH	0.0055	1	0.0055	29.61	0.0003	
B-Temperature	0.0557	1	0.0557	298.35	< 0.0001	
C-Photon	0.0118	1	0.0118	63.44	< 0.0001	
AB	0.0006	1	0.0006	3.38	0.0959	
AC	0.0008	1	0.0008	4.40	0.0624	
BC	0.0003	1	0.0003	1.48	0.2517	
A ²	0.0210	1	0.0210	112.40	< 0.0001	
B ²	0.0001	1	0.0001	0.6854	0.4271	
C ²	0.0008	1	0.0008	4.35	0.0635	
Residual	0.0019	10	0.0002			
Lack of Fit	0.0012	5	0.0002	1.73	0.2811	not significant
Pure Error	0.0007	5	0.0001			
Cor Total	0.1103	19				

خالص است. همه این موارد شباهتی بر خوب بودن مدل به حساب می‌آید.
معادله به دست آمده برای پیش‌بینی نتایج مدل به شرح زیر است:

$$\text{Biomass} = +0.7657 - 0.0235A + 0.0746B + 0.0344C + 0.0089AB + 0.0101AC - 0.0059BC - 0.0873 A^2 - 0.0068 B^2 + 0.0172 C^2$$



با توجه به جدول به دست آمده نتایج نشان می‌دهد که مدل به دست آمده معنی‌دار است. هم‌چنین پارامتر دما به عنوان پارامتر مؤثر می‌باشد ($f_{call}=298/35$). برای مدل و پارامترها غالباً مقدار P کم‌تر از $0/00001$ مقدار F پایین برای نقض برازش^۱ در برابر خطای



شکل ۳- نمودارهای باکس کاکس و نرمال پلات در روز ۱۴.

Figure 3. Box-Cox and normal plots on day 14.

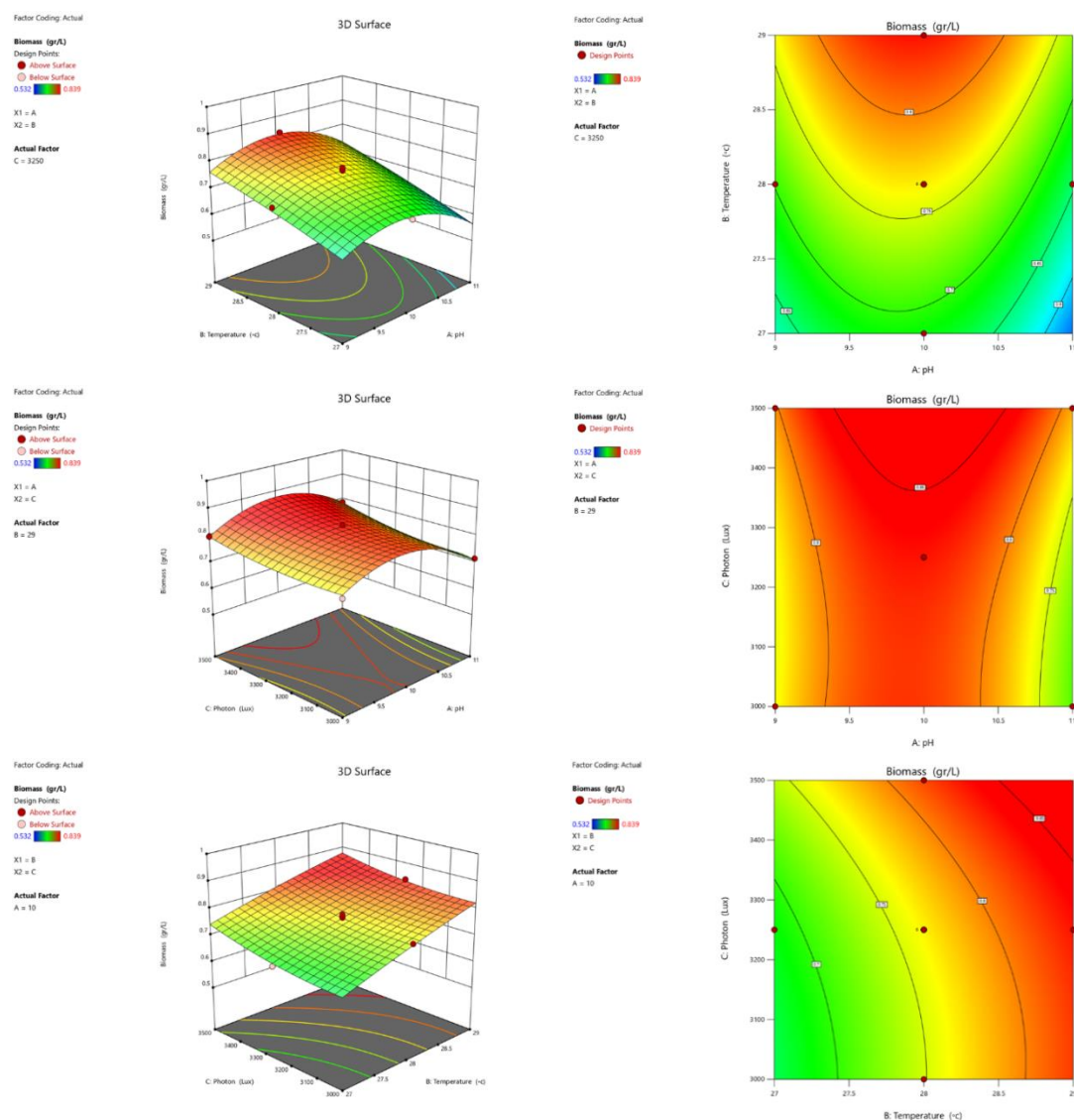
نشان‌دهنده قرارگیری باقی مانده‌ها در راستای یک خط و وجود توزیع نرمال داده‌ها می‌باشد (۲۳).
به منظور بررسی صحت مدل به دست آمده نمودارهای باکس-کاکس مورد بررسی قرار گرفت. زمانی یک مدل خوب می‌باشد که توزیع داده‌های آن مدل نرمال باشد. اگر داده‌ها دارای توزیع نرمال نباشند، با استفاده از نرمال سازی با تبدیل باکس-کاکس می‌توان توزیع احتمالی آن‌ها را تقریباً به توزیع نرمال نزدیک کرد. نمودار باکس-کاکس از جمله نمودارهای مهم می‌باشد که در نرمال سازی داده‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد. به منظور دستیابی به مدل‌های صحیح پایین‌ترین نقطه در نمودار باکس-کاکس بهترین مقدار لاندا را که در آن حداقل مجموع مربعات مانده در مدل تبدیل شده ایجاد می‌شود را نشان می‌دهد. همان‌طور که در شکل مشاهده می‌شود،

نمودار باقی مانده نرمال و نمودار باکس-کاکس^۲ دو نمودار مهم می‌باشند که می‌توان به عنوان خروجی از طراحی آزمایش با نرم افزار دیزاین اکسپرت به دست آورد. از جمله نمودارهای مورد نیاز که به وسیله آن توزیع داده‌ها مورد بررسی قرار می‌گیرد می‌توان به نمودار باقی مانده نرمال اشاره کرد. در این نمودار هر اندازه داده‌ها در راستای خط راست قرار بگیرند، توزیع داده‌ها نرمال تر خواهد بود و پراکندگی داده در اطراف این خط نشان‌دهنده خطای غیرنرمال است. در شکل‌های ۳ و ۴ نمودارهای باقی مانده نرمال نشان داده شده است. این نمودارها نشان می‌دهند، باقی مانده از توزیع نرمال پیروی می‌کند و خطای سیستماتیک مشاهده نمی‌شود. یعنی نزدیکی داده‌ها به خط مستقیم

1- Loc; of fit
2- Box-Cox

احتمالی داده‌ها برای هر سه دارو به توزیع نرمال نزدیک بوده است. همچنین در این نمودار محدوده اطمینان ۹۵ درصد می‌باشد (۲۳).

نمودارهای باکس-کاکس شکل های ۳ و ۴ در بالا به ترتیب نشان داده شده است. نتایج نشان می‌دهد نرمال‌سازی داده‌ها به درستی انجام شده است و توزیع



شکل ۴- نمودارهای به دست آمده از آنالیز داده‌های پاسخ روز ۱۴ که نشان‌دهنده دما و pH و نور دیده می‌شود.

Figure 4. Graphs obtained from the analysis of the 14-day response data showing temperature, pH and visible light.

کاهش هزینه‌ها انجام شد. مطالعات گذشته‌نگر نشان داد که شرایط محیطی، غلظت و نوع ترکیبات شیمیایی مورد استفاده برای محیط کشت بر میزان تولید توده سلولی نقش به‌سزایی دارند و با استفاده از تغییر در شرایط محیط و میزان مواد معدنی مورد استفاده در

بحث

پژوهش حاضر بعد از شناسایی ریزجلبک اسپیرولینا لاکسیسما با هدف بهینه‌سازی رشد این گونه سیانوباکتر با تغییر شرایط فیزیکی نور، دما و pH در مقیاس آزمایشگاه برای تولید حداکثر زیست‌توده و

کاهش دهد و تأثیر معکوس داشته باشد (۳۰). حسین‌پور آزاد و فتحعلی‌پور (۳۱) با شناسایی و بررسی ژنتیکی ریزجلبک *اسپیروولینا لاکسیسما* در سواحل جنوبی دریای خزر بیان نمودند که هرچه میزان نوکلئوتیدهای تغییر یافته بیش‌تر باشد نشان‌دهنده تأثیر عوامل محیطی و جهش در توالی موردنظر در طی دوران تکامل است و با افزایش تعداد نوکلئوتیدهای تغییر یافته، احتمالاً با میزان تشابه کم‌تری برای ژن موردنظر حاصل می‌شود. پاک‌نژادی و همکاران (۳۲) با بررسی روند رشد *اسپیروولینای* مازور، بیش‌ترین میزان رشد را در $pH=7/5$ مشاهده و بیان نمودند که میزان اسیدیته خاک یا آب عامل انتخابی برای تغییر جمعیت ریزجلبک‌هاست و پاسخ سیانوباکترها نسبت به تغییرات pH می‌تواند متفاوت باشد. نتایج به‌دست آمده از پژوهش حاضر نیز بیش‌ترین زیست‌توده را در $pH=10$ نشان داد.

تفاوت در مقدار زیست‌توده در مطالعات مختلف می‌تواند به‌دلیل نوع گونه، تغییرات مداوم در تسلط در پدیده فتوسنتز، تنفس و شرایط کشت باشد. به‌طور کلی می‌توان نتیجه گرفت که *اسپیروولینا لاکسیسما* به‌دلیل سازگاری با محیط کشت مورد استفاده و سرعت رشد مطلوب می‌تواند به‌عنوان جایگزین مناسب گونه تجاری *اسپیروولینا* مورد استفاده قرار بگیرد. با توجه به کاربردهای فراوان ریزجلبک *اسپیروولینا*، پیشنهاد می‌گردد که سایر پاسخ‌ها مانند بررسی میزان پروتئین، لیپید، کلروفیل و فیکوسیانین این گونه در شرایط کشت مختلف مورد بررسی قرار گیرد.

سپاسگزاری

نویسندگان مقاله بر خود لازم می‌دانند از پژوهشکده اکولوژی دریای خزر به جهت همراهی در همه مراحل اجرای پژوهش و آقای مهندس مجید ابراهیم‌زاده به پاس زحماتشان تشکر و قدردانی نمایند.

محیط کشت، می‌توان زیست‌توده بیش‌تری تولید کرد (۲۴). در مطالعه حاضر، مقدار زیست‌توده در روز چهاردهم مقدار زیست‌توده به $0/839$ (گرم در لیتر) رسید.

کولا و همکاران (۲۵) تأثیر دماهای مختلف را بر رشد *اسپیروولینا پلاتنسیس* بررسی و بیان نمودند که در دمای $30^{\circ}C$ زیست‌توده $0/82-0/92$ گرم بر لیتر) بود و در دمای بالاتر مقدار زیست‌توده کاهش و مقدار پروتئین، لیپید و فیکوسیانین افزایش یافت. و بیان نمود که در *اسپیروولینا* هرچه غلظت سلولی کم‌تر باشد، سرعت رشد بیش‌تر است و کاهش غلظت سلولی، نفوذ نور را افزایش می‌دهد. جرلی و پرابو (۲۶) در مطالعه‌ای که از محیط کشت تغییر یافته زاروک با $pH=9$ برای دوره ۹ روزه کشت *اسپیروولینا پلاتنسیس* استفاده و 280 میلی‌گرم در لیتر زیست‌توده خشک *اسپیروولینا* را گزارش کردند.

اسماعیل و همکاران (۲۷) بیان نمودند که برای کشت *اسپیروولینا پلاتنسیس* از محیط کشت اختصاصی زاروک با $pH=9$ بعد از دوره ۱۴ روزه، 1320 میلی‌گرم در لیتر توده خشک *اسپیروولینا* به‌دست آمد. هم‌چنین صفری و همکاران (۲۸) میزان 1120 میلی‌گرم زیست‌توده تولیدی این گونه تجاری با استفاده از محیط کشت زاروک تغییر یافته را بعد از ۱۶ روز گزارش کردند. بهینه‌سازی شرایط رشد سیانوباکترها پیچیده است و به عوامل مختلفی مانند ترکیب محیط کشت، دما، هوادهی، شوری، شدت نور و pH بستگی دارد که هر کدام می‌توانند تحریک‌کننده یا بازدارنده رشد باشند. به‌طور مثال هوادهی محیط کشت را تحریک کرده و باعث توزیع همگن رشته‌های *اسپیروولینا* در سیستم کشت برای قرار گرفتن در معرض نور کافی می‌شود (۲۹). هم‌چنین اگر هوادهی بیش از اندازه باشد، سبب تنش برشی شده و می‌تواند تولید زیست‌توده را به‌دلیل آسیب سلول

منابع

1. Enamala, M. K., Enamala, S., Chavali, M., Donepudi, J., Yadavalli, R., & Kolapalli, B. (2018). Production of biofuels from microalgae - A review on cultivation, harvesting, lipid extraction, and numerous applications of microalgae. *Renew Sustain Energy Rev*, 94(10), 49-68.
2. Ciferri, O. (1983). Spirulina, the edible microorganism. *Microbiological Reviews*, 47 (4), 551.
3. Nirae, D. G. (2021). A Review on Nutritional and Protective Role of *Spirulina Platensis*. *Journal of Nutrition & Food Sciences*, 11.S9 (1000), 398.
4. Sankarapandian, V., Nitharsan, K., Parangusadoss, K., Gangadaran, P., Ramani, P., Venmathi Maran, B. A., & Jogalekar, M. P. (2022). Prebiotic Potential and Value-Added Products Derived from *Spirulina laxissima* SV001-A Step towards Healthy Living. *BioTech*, 11(13), 1-15.
5. Neag, E., Stupar, Z., Varaticeanu, C., Senila, M., & Roman, C. (2022). Optimization of Lipid extraction from *Spirulina* spp. by Ultrasound Application and Mechanical Stirring Using the Taguchi Method of Experimental Design, 27, 6794.
6. Pinto, R. L. F., Ferreira, G. F., Beatriz, F. P., Cabral, F. A., & Filho, R. M. (2022). Lipid and phycocyanin extractions from *Spirulina* and economic assessment. *J. Supercrit.* 184, 105567. [CrossRef]
7. Alverson, A. J. (2008). Molecular systematic and the diatom species. *Protist.* 159(3), 339-353.
8. Nakao, M., Okamoto, S., Kohara, M., Fujishiro, T., Fujisawa, T., & Sato, S. (2010). CyanoBase: the cyanobacteria genome database update 2010. *Nucleic Acids Res.* 38(Database issue), D379-381.
9. Makhloogh, A., Nasralzadeh Saravi, H., Farabi, M. V., Roshan Tabari, M., Eslami, F., Rahmati, R., Tahami, F., Kayhan Thani, A. R., Dostdar, M., Khodaparast, N., Ganjian, A., & Mokrami, A. (2012). Investigating the diversity, biomass and abundance of phytoplankton in the southern basin of the Caspian Sea. Final report. *Research Institute of Fisheries Sciences of the country*. 122 p.
10. Ghobadian, S., Ganji Dost, S., Aiti, B., & Soltani, N. (2017). Designing a new engineering photobioreactor to optimize the amount of biomass produced in spirulina microalgae. *New findings in biological sciences*, 5 (1), 13-25.
11. Prabuthas, Srivastav, P. P., & Mishra, H. N. (2011). Optimization of environmental factors using RSM for *Spirulina platensis* cultivation. *Nutrition & Food Science*. 41 (3), 175-182.
12. Junique, L., Watier, L., Hortense, L., Viudes, F., Deblieck, M., & Watier, D. (2021). Determination by response surface methodology of optimal protein and phycocyanin productivity conditions in *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis* under different combinations of photoperiod variation and lighting intensity. *Bioresource Technology Reports*. 15, September 2021, 100763.
13. Rodrigues, M. S., Ferreira, L. S., Converti, A., Sato, S., & Carvalho, J. C. M. (2010). Fed-batch cultivation of *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis*: Potassium nitrate and ammonium chloride as simultaneous nitrogen sources. *Bioresour Technol.* 101(12), 4491-8.
14. Ogbonda, K. H., Aminigo, R. E., & Abu, G. O. (2007). Influence of temperature and pH on biomass production and protein biosynthesis in a putative *Spirulina* sp. *Bioresour. Technol.* 98(11), 2207-11.
15. Carvalho, J. C. M., Francisco, F. R., Almeida, K. A., Sato, S., & Converti, A. (2004). Cultivation of *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis* (Cyanophyceae) by fed-batch addition of ammonium chloride at exponentially increasing feeding rates. *J. Phycol.* 40(3), 589-97.
16. Carmelo, R. T. (1997). Identifying marine phytoplankton. London: Publication Harcourt Brace Company.

17. Zabelina, M. M., Kisselev, I. A., Proshkina-Lavrenko, A. I., & Sheshukova, V. S. (1951). *Diatoms*. In: Inventory of freshwater algae of the USSR. Moscow: Sov. Nauka. Russia.
18. Aminikhoei, Z., Hafizia, M., Ghafari, H., Irfanifar, A., Delukian, A., Jadgal, S., Hosseini, A., Baloch, G., Bakhshhot, H., Rajab Pour, A. R., Amirian, H., Kasalkha, N., Mirshamlou, Q., Akbari, P., Dashti, K., Mirzaei, M. R., Sufi Moghadam, A. R., Lalshanas, M. R., & Karimi, M. (2019). The effect of Dunaliella Salina production biomass harvesting methods on the amount of beta-carotene extraction. The final report of the country's fisheries science research institute. 62 p.
19. Safari, R., & Reyhani-Poul, S. (1402). Microalgae spirulina (*Spirulina platensis*) cell culture and comparing the efficiency of enzyme methods, ultrasound, freeze-freezing and inorganic solvent in extracting phycocyanin pigment. *Journal of researches of science and food industries of Iran*, 19(5), 649-661.
20. Morin, P. A., Archer, F. I., Foote, A. D., Vilstrup, J., Allen, E. E., Wade, P., & Harkins, T. (2010). Complete mitochondrial genome phylogeographic analysis of killer whales (*Orcinus orca*) indicates multiple species. *Genome research*, 20(7), 908-916.
21. Manirafasha, E., Murwanashyaka, T., Ndikubwimana, T., Rashid Ahmed, N., Liu, J., Lu, Y., Zeng, X., Ling, X., & Jing, K. (2018). Enhancement of cell growth and phycocyanin production in *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis* by metabolic stress and nitrate fed-batch. *Bioresource Technology*, 255, 293-301. DOI: 10.1016/j.biortech.2017.12.068.
22. Xie, Y., Jin, Y., Zeng, X., Chen, J., Lu, Y., & Jing, K. (2015). Fed-batch strategy for enhancing cell growth and Cphycocyanin production of *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis* under phototrophic cultivation. *Bioresource Technology*, 180, 281-287.
23. Shafiei, H., & Hassaninejad-Darzi, S. K. (2023). Simultaneous Electrocatalytic Measurement of Dopamine and Acetaminophen by Nanosensor Based on Ag@ Polyoxometalate@ Reduced Graphene Oxide and Ionic Liquid. *Electrocatalysis*, 14(6), 811-828.
24. Sharma, G., Kumar, M., Ali, M. I., & Jasuja, N. D. (2014). Effect of carbon content, salinity and pH on *Spirulina platensis* for phycocyanin, allophycocyanin and phycoerythrin accumulation. *Microbial and Biochemical Technology*, 6(4), 202-206.
25. Colla, L. M., Oliveira Reinehr, C., Reichert, C., & Costa, J. A. V. (2007). Production of biomass and nutraceutical compounds by *Spirulina platensis* under different temperature and nitrogen regimes. *Bioresour Technol.* 98, 1489-1493.
26. Jerley, A. A., & Prabu, D. M. (2015). Purification, characterization and antioxidant properties of C-Phycocyanin from *Spirulina platensis*. *Scrutiny International Research Journal of Agriculture, Plant Biotechnology and Bio Products*, 2, 7-15.
27. Ismaiel, M. M., El-Ayouty, Y. M., & Piercey-Normorea, M. (2016). Role of pH on antioxidants production by *Spirulina* (*Arthrospira*) *platensis*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 47, 298-304.
28. Safari, R., Bardani Amiri, Z., & Esmailzadeh Kanari, R. (1402). Evaluation of the effect of temperature, time and pH on the stability of phycocyanin pigment extracted from *Spirulina platensis*. *Scientific Journal of Iranian Fisheries*. 26 (5), 94-85.
29. Soni, R. A., Sudhakar, K., & Rana, R. S. (2019). Comparative study on the growth performance of *Spirulina platensis* on modifying culture media. *Energy reports*. 5, 327-336.
30. Khazi, M., Demirel, Z., & Conk, D. M. (2018). Enhancement of biomass and phycocyanin content *Spirulina platensis*. *Frontiers In Bioscience*, 10, 276-286.

31. Hosseinpour Azad, N., & Fathalipour, Kh. (1400). Phylogenetic identification of microalgae isolated from the southern shores of the Caspian Sea. *Oceanography*. 12 (47), 41-51
32. Paknejadi, M., Malek Ahmadi, F., & Soltani, N. (2017). Investigating the effect of different amounts of nitrogen on biomass production, lipid content and fatty acid composition in *Spirulina Major*. *Journal of Aquatic Ecology*, 8 (2), 14-30.