

الگوسازی رشد گونه سیانوباکتری سینکوکوس زیر رژیم‌های نوری متفاوت

فرناز محسنی^{۱*}، علیرضا موسوی زنونز^۲

۱- مربی مهندسی شیمی، دانشگاه پیام نور

۲- دکتری مهندسی شیمی، دانشگاه صنعتی امیرکبیر

پیام‌نگار: f_mohseni@pnu.ac.ir

چکیده

گونه سینکوکوس^۱ یکی از انواع سیانوباکتری‌ها است که در این پژوهش در یک زیست‌واکنشگاه نوری مجهز به سیستم نوردهی داخلی کشت داده شد. واکنشگاه به گونه‌ای طراحی شد تا کشت تک‌گونه‌ای در داخل آن انجام شود. هدف از این مطالعه، بررسی رفتار رشد این گونه در برابر تغییرات نوردهی است؛ بدین منظور، مقادیر مختلفی از تابش نور اولیه^۲ به داخل زیست‌واکنشگاه نوری تابیده و رشد سلول‌ها مطالعه شد. مشاهده شد که با افزایش تابش نور، میزان رشد سلول‌ها هم افزایش یافت، تا اینکه به حد رخداد مهارکنندگی نوری^۳ در تابش نور^۴ بیش از $250 \mu E m^{-2} s^{-1}$ رسید. به طور کلی، با افزایش تابش نور پیش از رخداد مهارکنندگی نوری، حداکثر چگالی نوری سلول‌ها (OD_{600})، بیشینه سرعت رشد و مقدار تولید زیست‌توده افزایش و در نتیجه ضریب خاموشی^۵ کاهش پیدا کرد. حداکثر میزان چگالی نوری برابر $5/91$ در تابش نور کم‌تر از $250 \mu E m^{-2} s^{-1}$ در طول یک دوره رشد ۸۰ روزه مشاهده شد. با استفاده از تابع مونود اصلاح‌شده، نتایج آزمایشگاهی داده‌های میزان رشد در برابر تابش نور، با دقت مناسبی الگوسازی شد. مقایسه انجام گرفته بین نتایج میزان رشد در برابر تابش نور برای سایر ریزاندام‌های نورساخت کننده، مؤید روندهای به دست آمده برای گونه سیانوباکتری در این مطالعه بود و رفتارهای مشابهی در قبال رخداد مهارکنندگی نوری به دست داد. اطلاعات به دست آمده از قبیل تابع مونود و ضرایب آن، تغییرات ضریب خاموشی و میزان شدت رشد برای طراحی زیست‌واکنشگاه نوری به کشت حجم بالای این گونه کمک کننده است.

تاریخ دریافت: ۹۸/۱۲/۲۳

تاریخ پذیرش: ۹۹/۰۱/۳۰

شماره صفحات: ۷۸ تا ۹۰

کلیدواژه‌ها: سینکوکوس، تابش نور، الگوسازی رشد، زیست‌واکنشگاه نوری، تابع مونود

۱. مقدمه

منفی تأثیرگذار بر محیط زیست [۱] و دی‌اکسیدکربن مهم‌ترین گاز گلخانه‌ای قلمداد شده‌است. تخمین زده شده که سوزاندن سوخت‌های فسیلی عامل پراکنش ۷۰ تا ۷۵ درصد کل کربن در هواکره است [۲ و ۳]. امروزه مشاهده می‌شود که پدیده گرمایش جهانی بر گونه‌های متفاوت جانوران و گیاهان به‌ویژه از نظر اعمال

گرمایش جهانی ناشی از پراکنش گازهای گلخانه‌ای یکی از عوامل

* تهران، دانشگاه پیام نور، صندوق پستی ۱۹۳۹۵-۳۶۹۷

1. *Synechococcus* sp.
2. Initial Light Irradiance
3. Photoinhibition
4. Light Irradiance
5. Extinction Coefficient

و منابع آب شیرین با محصولات کشاورزی رقابت نمی‌کنند، زیرا می‌توان آن‌ها را در زمین‌های غیرکشاورزی و با آب شور پرورش داد. بدین‌سان، این سلول‌ها می‌توانند منبعی مطمئن‌تر و بهینه‌تر برای تولید بیودیزل و راه‌حل بلندمدتی برای حل مسائل زیست‌محیطی و امنیت انرژی باشند [۲۰ و ۱۶]. وانگهی، استفاده از این سلول‌ها می‌تواند مشکل قدیمی بهره‌برداری از زمین‌های کشاورزی برای کشت محصولات مربوط به بیودیزل به جای محصولات غذایی را حل نماید [۲۱].

از نظر صنعتی، سیانوباکتری‌ها دارای برخی ویژگی‌های مناسب شامل سرعت رشد بالا و نیاز به ترکیبات مغذی ساده (آب، نور خورشید و دی‌اکسیدکربن) هستند [۲۳ و ۲۲]. افزون بر این، از نظر انجام تغییرات با مهندسی ژنتیک نیز این گونه‌ها مطلوب‌تر به شمار می‌آیند [۲۷-۲۴ و ۲۲]. همچنین گستردگی گونه‌های مختلف سیانوباکتری‌ها، کشت این گونه‌ها در مکان‌های مختلف، از جمله در زمین‌های غیرکشاورزی در نزدیکی مراکز مصرف را ممکن می‌کند که این مسأله به نوبه خود، موجب کاهش هزینه تولید سوخت‌های زیستی به وسیله کاهش هزینه‌های حمل و نقل سوخت تولیدی می‌گردد [۲۱].

گونه سینکوکوس یکی از انواع سلول‌های سیانوباکتری است که محتوای بالای پروتئین‌های جذب‌کننده نور از نوع فیکوبیلین^۳ را داراست و می‌توان از آن برای تولید بیودیزل استفاده کرد. انواع مختلف این گونه در محیط‌های مختلف از قبیل آب شیرین، چشمه‌های آب گرم و آب‌های ساحلی و اقیانوسی یافت شده‌اند و سهم عمده‌ای در زیست‌توده تولیدشده در دریاها بر اثر فرآیند نورساخت دارند [۳۲-۲۸ و ۱۰]. واپسین گزارش‌ها نشان داده که نه تنها گونه سینکوکوس دارای محتوای چربی بالایی است، بلکه این محتوای چربی بیش‌تر از انواع اسیدهای چرب C16-C18 تشکیل شده که برای تولید بیودیزل مناسب‌تر است [۳۴ و ۳۳ و ۹].

به‌طور کلی و در حین فرآیند کشت، سلول‌های ریزجلبک زیر سه منطقه مختلف نوری بر اساس میزان تابش نور در محیط کشت قرار می‌گیرند. اولین آن‌ها ناحیه با محدودیت نور^۴ است که در آن تمامی نور وارد شده به محیط در فرآیند نورساخت مصرف می‌شود؛ در این ناحیه میزان نورساخت با افزایش نوردهی، افزایش می‌یابد.

محدودیت‌های اندام‌شناختی اثرگذار است [۴]. در این راستا، برنامه‌ی اجماع کپنهاگ^۱ و معاهده کیوتو^۲ برای مقابله با روند رو به رشد گرمایش جهانی و ارائه راهبردهای کاهش مسأله پراکنش دی‌اکسیدکربن تشکیل شده است [۵ و ۶]. در عین حال، تغییرات مداوم قیمت فرآورده‌های نفتی و گاز طبیعی به‌عنوان اصلی‌ترین بخش سوخت‌های فسیلی، منجر به گسترش تلاش‌ها برای یافتن منبع قابل اتکای دیگری از انرژی گردیده است [۷ و ۸].

به‌تازگی بیودیزل به‌عنوان یک منبع سوختی دوستدار محیط زیست، مستقل از انرژی فسیلی و بدون افزایش کلی محتوای کربن هواکره مورد توجه قرار گرفته است. طبق تعریف، بیودیزل گروهی از متیل استرهای اسید چرب هستند که می‌توان آن‌ها را از منابع مختلف روغنی استخراج نمود [۹]. این منابع روغنی شامل محدوده وسیعی از محصولات؛ از قبیل: گیاهان خوراکی، باقی‌مانده‌های لیگنوسلولزی و چربی‌های به‌دست آمده از ریزجلبک‌ها است که هر کدام به‌عنوان یکی از نسل‌های مختلف بیودیزل به‌شمار می‌روند. سوزاندن بیودیزل هم‌ظاهراً باعث پخش شدن دی‌اکسیدکربن به‌عنوان یکی از انواع اصلی گازهای گلخانه‌ای می‌شود. با این‌وجود، منبع اصلی این کربن نه منبع فسیلی که دی‌اکسیدکربن اتمسفری است که در جریان فرآیند نورساخت سلول‌های گیاهی و جلبکی وارد اندام‌های آن‌ها شده است؛ لذا سوزاندن بیودیزل باعث افزایش کلی میزان کربن و افزایش اثر گلخانه‌ای نمی‌شود. با مصرف بیودیزل به‌عنوان منبع انرژی، میزان واقعی پراکنش کربن، صفر می‌باشد [۱۴-۱۰].

ریزجلبک‌ها یکی از انواع اندامگان‌های میکروسکوپی هستند که با دارا بودن ترکیب کلروفیل a می‌توانند درون سلول خود نورساخت کنند، ولی بدنه سلولی‌شان قادر به تقسیم به سلول‌های تخصصی گیاهی از قبیل ریشه، ساقه و برگ نیست [۱۷-۱۵]. محتوای چربی در داخل سلول‌های ریزجلبک به‌دلیل سرعت رشد بالای این سلول‌ها در مقایسه با سایر گیاهان در زمان کوتاهی به میزان کافی تجمع می‌یابد [۱۸]. سیانوباکتری‌ها دسته‌ای از ریزاندام‌های پروکاریوت با ویژگی‌هایی مشابه سلول‌های ریزجلبک می‌باشند [۱۹ و ۱۵]. ریزجلبک‌ها و سیانوباکتری‌ها دارای سرعت رشد و محتوای چربی بالاتری نسبت به سلول‌های گیاهی هستند و از نظر زمین کشاورزی

3. Phycobilin
4. Light-Limited Zone

1. Copenhagen Accord
2. Kyoto Protocol

علمی و صنعتی ایران (IROST) (تهران، ایران) تهیه شد. محیط کشت مورد استفاده از نوع RM^V بود که شامل این ترکیبات به ازای هر لیتر است [۴۲]:

۳۰۰ mg NaNO₃, ۲۰ mg KH₂PO₄, ۸۰ mg K₂HPO₄, ۲۰ mg NaCl, ۴۷ mg CaCl₂, ۱۰ mg MgSO₄.7H₂O, ۰-۱ mg ZnSO₄.7H₂O, ۱/۵ mg MnSO₄.H₂O, ۰-۱/۸ mg CuSO₄.5H₂O, ۰-۳ mg H₃BO₃, ۰-۳ mg (NH₄)₆Mo₇O₂₄.4H₂O, ۱۷ mg FeCl₃.6H₂O, ۰-۲ mg Co(NO₃)₂.H₂O, ۷/۵ mg Na₂EDTA

میزان شوری محیط کشت به میزان ۳۵ g/L از غلظت NaCl تنظیم شد که با شوری دریاهاى آزاد هم‌میزان است [۴۳].

۲-۲ کشت در زیست‌واکنشگاه نوری

سلول‌های سینکوکوس در داخل یک زیست‌واکنشگاه نوری خاص ساخته شده، کشت داده شدند. زیست‌واکنشگاه نوری از یک مخزن کشت شفاف از جنس PTFE تشکیل شده که مجهز به یک لوله نوردی داخلی به‌همراه مسیره‌های جداگانه هوادهی، مسیر خروجی^۸ و نمونه‌گیری است. در شکل (۱) نمای الگواره سیستم زیست‌واکنشگاه نوری که برای کشت استریل ریزجلبک مورد استفاده قرار گرفت، ارائه شده است. با قراردی منبع نوری در داخل زیست‌واکنشگاه نوری می‌توان از بهره‌برداری از کل میزان نور به‌دست‌آمده از منبع نور اطمینان حاصل نمود [۴۴].

میزان کافی از محیط کشت RM در داخل اتوکلاو در دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس به مدت ۲۰ دقیقه استریل شد. بدنه زیست‌واکنشگاه نوری با استفاده از یک لامپ پرتو فرابنفش گندزدا^۹ با نور UV-C (ساخت Philips، لهستان) با توان ۲۵ وات در شرایط بسته‌بودن تمامی مسیره‌های ارتباطی با داخل زیست‌واکنشگاه نوری به مدت ۳۰ دقیقه استریل شد. کشت اولیه به همراه محیط کشت استریل شده در زیر هود زیست‌شناختی به زیست‌واکنشگاه نوری وارد شد تا از انجام کشت تک‌گونه‌ای و استریل سلول‌ها اطمینان حاصل شود.

پیش‌کشت تهیه‌شده از سلول سینکوکوس در زیر هود زیست‌شناختی از نمونه اصلی در محیط کشت RM کشت داده و در زیر هود در دمای ۲۵ درجه سلسیوس نگهداری شد. میزان تزریقی به زیست‌واکنشگاه نوری برابر ۱۰ درصد حجم نهایی (حدود ۲ لیتر) برای کشت بوده، به طوری که OD₆₀₀ اولیه بعد از تلقیح برابر ۰/۰۵ را در اختیار باشد [۴۳].

دوم؛ ناحیه اشباع نوری^۱ است که در آن ظرفیت انجام نورساخت در سلول‌ها بالاترین میزان خود می‌رسد و میزان اضافی نور در محیط به‌صورت گرما یا تابش فلورسانس از سلول‌ها هدر می‌رود. در پایان سومین ناحیه، مربوط است به وجود مهارکنندگی نوری^۲ که در آن افزایش تابش نور موجب آسیب سلولی می‌شود؛ که به صورت کاهش سرعت رشد سلول خود را نشان می‌دهد و در ادامه به مرگ سلول‌ها منجر می‌شود [۳۵ و ۲۳].

در سال ۲۰۰۹، مولینا گریما و همکاران مراحل مربوط به طراحی زیست‌واکنشگاه نوری^۳ را توصیف نمودند که بر اساس میزان عملکرد نورساختانه^۴ گونه سلولی مورد نظر استوار است. یک زیست‌واکنشگاه نوری با عملکرد نورساختانه بالاتر، منجر به تولید زیست‌توده بیشتری از سلول ریزجلبک می‌شود و بنابراین از نظر اقتصادی مطلوب‌تر است. مناسب‌ترین ناحیه‌ها برای عملکرد زیست‌واکنشگاه نوری، ناحیه‌های با محدودیت نور و اشباع نوری است. باید توجه داشت که در فرایند طراحی باید از قرارگیری سلول‌های ریزجلبک در ناحیه با مهارکنندگی نوری جلوگیری شود [۴۱-۳۶].

در این پژوهش گونه سینکوکوس به شماره سویه^۵ PTCC 6021 که یکی از گونه‌های بومی ایران از زیرگونه سینکوکوس است، بررسی گردید و زیر تابش نورهای متفاوت در یک زیست‌واکنشگاه نوری با نوردهی داخلی کشت داده شد تا نواحی مختلف نوری مربوط به آن مشخص شود. سپس عملکرد نورساختانه این گونه با استفاده از تابع موند الگوسازی و نتایج به‌دست‌آمده با داده‌های آزمایشگاهی مقایسه شد. با نتایج به‌دست‌آمده از این الگوسازی می‌توان به طراحی زیست‌واکنشگاه نوری مناسب- با هدف میزان تولید حداکثری زیست‌توده از این گونه- اقدام کرد. همچنین، شناسایی نواحی نوری در این طراحی برای جلوگیری از ورود به ناحیه مهارکنندگی نوری که موجب کاهش میزان زیست‌توده تولیدی می‌شود، ضروری است.

۲. مواد و روش‌ها

۲-۱ گونه سلولی و شرایط محیط کشت

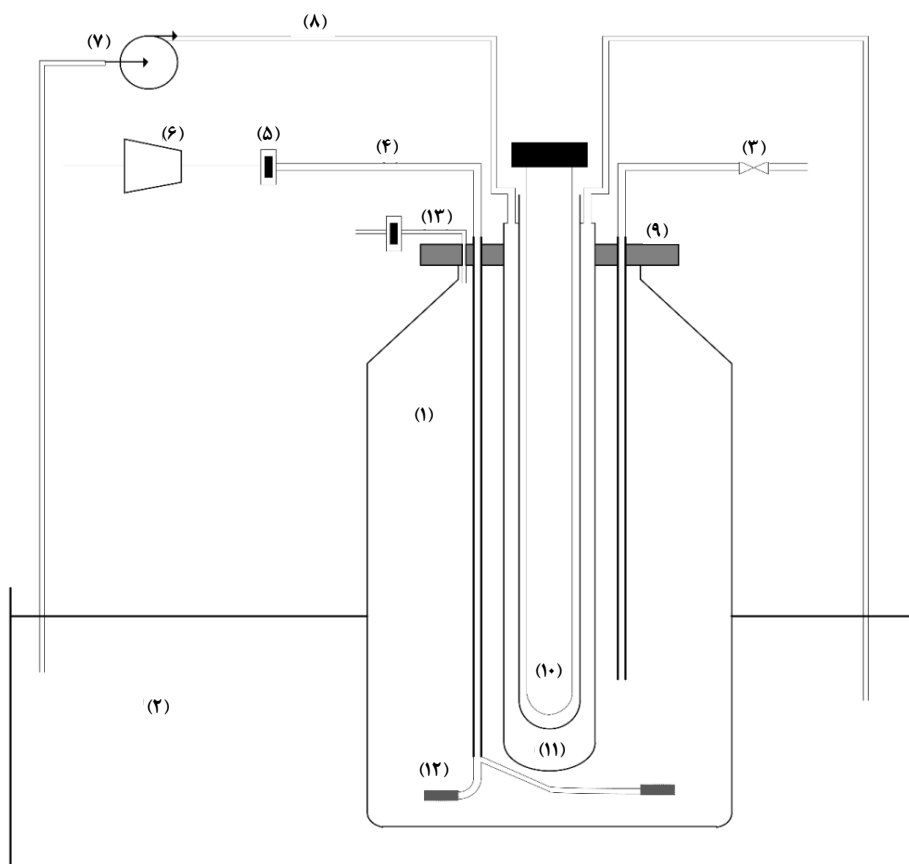
گونه سیانوباکتری آب شور سینکوکوس به شماره سویه^۵ PTCC 6021 از مرکز گرداورد ریزاندام‌های صنعتی ایران^۶ در سازمان پژوهش‌های

1. Light Saturation Zone
2. Photoinhibition
3. Photobioreactor
4. Photosynthetic Performance
5. *Synechococcus Sp. (PTCC 6021)*
6. Persian Type Culture Collection (PTCC)

7. Rudic's Medium

8. Vent

9. Germicidal Ultraviolet (UV) Lamp



شکل ۱. زیست‌واکنشگاه نوری با نوردهی داخلی و اجزای آن: (۱) بدنه اصلی زیست‌واکنشگاه نوری؛ (۲) حمام آب؛ (۳) لوله نمونه‌گیری؛ (۴) لوله هوادهی؛ (۵) پالایه هوا؛ (۶) مکنده هوا؛ (۷) مسیر گردش آب؛ (۹) seal؛ (۱۰) لامپ‌های رشته‌ای؛ (۱۱) لوله نوردهی؛ (۱۲) پخش‌کننده هوا؛ و (۱۳) مسیر vent [۴۳ و ۴۴].

ژاین) انجام گرفت. همچنین وزن خشک هم با پالودن نمونه ۵۰ سی‌سی از سلول‌ها روی پالایه غشایی با اندازه منافذ $0.45 \mu\text{m}$ ساخت Sartorius AG، آلمان و سپس خشک‌کردن در دماهای 10.5°C به مدت ۱۲ ساعت و 55.0°C به مدت ۶ ساعت تعیین شد. اختلاف بین وزن کاغذ صافی آغشته به ریزجلبک و خشک‌شده در دمای 10.5°C و باقی‌مانده مواد معدنی ناشی از خشک‌شدن در کوره با دمای 55.0°C را می‌توان وزن خشک توده زیست‌توده سلولی در نظر گرفت. در این‌وزن میزان نمک موجود در محیط در نظر گرفته نمی‌شود [۱۹].

میزان سرعت رشد ویژه سلول‌ها از روی تغییرات چگالی نوری در طول موج 600 nm و از روی رابطه (۱) به‌دست آمد:

$$\mu = \frac{1}{t} \ln \left(\frac{C_b}{C_0} \right) \quad (1)$$

محیط کشت ریزجلبک به‌طور مداوم با جریان هوایی که از یک پالایه $0.22 \mu\text{m}$ عبور می‌کرد، مورد هوادهی قرار می‌گرفت تا هم اختلاط محیط کشت صورت پذیرد و هم دی‌اکسیدکربن اتمسفری به‌عنوان منبع کربنی در اختیار سلول‌ها قرار گیرد. در نهایت زیست‌واکنشگاه نوری در یک حمام آب با دمای تنظیم شده 30°C قرار داده شد تا در طی دوره کشت، دمای ثابت حفظ شود. سلول‌ها در این شرایط با سه‌بار تکرار کشت داده شدند (هر بار به مدت ۸۰ روز)، و مقادیر گزارش‌شده حاصل از میزان متوسط داده‌های به‌دست آمده در سه‌بار تکرار است.

۲-۳ اندازه‌گیری میزان رشد ریزجلبک

میزان رشد سلولی با اندازه‌گیری روزانه چگالی نوری در طول موج 600 nm به‌وسیله یک‌دستگاه طیف‌نورسنج مدل UV 101 ultraviolet / visible (UV/VIS) ساخت JASCO Co.

مقدار متوسط تابش نور (I_{av})، میزانی از نور است که یک سلول در حال حرکت تصادفی در داخل محیط کشت آن را تجربه می‌کند [۴۷ و ۴۸]. توجه داشته باشید که حرکت تصادفی سلول‌ها ممکن است ناشی از حرکت خود سلول‌ها (در انواع متحرک^۳) یا اختلاط محیط کشت (ناشی از همزن یا هوادهی در این مطالعه) باشد.

میزان متوسط تابش در داخل محیط کشت ریزجلبک بر اساس فرم انتگرالی قانون بییر-لامبرت^۴ مطابق معادله (۲) به دست می‌آید.

$$I_{av} = \frac{I_0}{K_a \phi_{eq} C_b} [1 - \exp(-K_a \phi_{eq} C_b)] \quad (2)$$

که در این رابطه I_0 میزان تابش روی سطح محیط کشت، K_a میزان ضریب خاموشی^۵ در محیط کشت ریزجلبک، C_b میزان غلظت زیست‌توده و ϕ_{eq} طول فاصله‌ای که نور در داخل سیستم کشت ریزجلبک عبور می‌کند، هستند.

طول فاصله عبوری نور در داخل سیستم (ϕ_{eq}) به دو عامل قطر زیست‌واکنشگاه نوری (d_t) و زاویه‌ای که نور سطح زیست‌توده را روشن می‌کند (θ) وابسته است [۴۸] و بر اساس رابطه (۳) تعریف می‌شود.

$$\phi_{eq} = \frac{d_t}{\cos \theta} \quad (3)$$

شکل (۱) نشان می‌دهد که منبع نوری در مرکز زیست‌واکنشگاه نوری قرار گرفته تا روشنایی یکنواختی در تمامی جهات در داخل سیستم کشت وجود داشته باشد. در این مطالعه d_t فاصله بین شعاع استوانه نوری و زیست‌واکنشگاه نوری و برابر ۱۵ سانتی‌متر بوده و نور هم در جهت عمودی می‌تابد ($\theta = 0^\circ$).

ضریب خاموشی (K_a) نشان‌دهنده میزان فاصله‌ای است که یک طول موج خاص از نور بتواند در داخل محیط کشت ریزجلبک پیش از جذب شدن، نفوذ کند. این ضریب بر مبنای اندازه‌گیری میزان جذب محیط کشت ریزجلبک در غلظت‌های مختلف سلولی در حین دوره رشد به دست می‌آید. با استفاده از رابطه (۲) می‌توان میزان متوسط تابش (I_{av}) را در داخل محیط کشت ریزجلبک زیر میزان تابش اولیه متفاوت نوری (I_0) تعیین نمود.

که در آن C_0 و C_b به ترتیب میزان غلظت زیست‌توده در زمان t و در ابتدای دوره کشت (در زمان صفر) می‌باشد. غلظت زیست‌توده همان میزان وزن خشک سلولی در واحد حجم نمونه است؛ بنابراین نسبت $\frac{C_b}{C_0}$ برابر میزان نسبت وزن خشک در زمان t و در ابتدای دوره کشت (در زمان صفر) است.

۴-۲ منبع نوری و میزان شدت آن

نوردهی مصنوعی پیوسته به وسیله تعدادی لامپ رشته‌ای که در داخل لوله نوردهی قرار داده شدند، فراهم شد. این لوله در داخل زیست‌واکنشگاه نوری قرار داده شد تا محیط کشت را به‌طور یکنواخت در جهات مختلف، نوردهی کند. میزان نورتابی^۱ روی سطح لوله نوردهی داخلی (I_0) با استفاده از نورسنج دیجیتال (مدل TES-1332A ساخت TES Electrical Corp، تایوان) در مقادیر ثابت برابر 1000، 2500، 5000، 12'500 و 15'000 لوکس تنظیم شد [۴۶ و ۴۵]. این مقادیر با استفاده از ضریب تبدیل برابر ۰/۰۲ برای لامپ رشته‌ای به فلاکس فوتونی نورساخت^۲ (PPF) تبدیل شدند (مقادیر PPF بین ۲۰ تا ۳۰۰ می‌باشند). تمامی آزمایش‌های رشد حداقل سه‌بار تکرار شد و داده‌های ارائه‌شده، حاصل از متوسط‌گیری بین این تکرارها برای هر رژیم نوری است.

۵-۲ میزان تابش متوسط نور

کشت خودپرورهای (اتوتروفیک) ریزجلبک‌ها به‌طور کلی به میزان در دسترس بودن و شدت نور بستگی دارد؛ میزان شدت نور روی سطح محیط کشت ریزجلبک به‌صورت میزان تابش اندازه‌گیری می‌شود. منظور از میزان تابش، توان انرژی منبع نوری در واحد سطح در معرض است. در سیستم‌های کشت ریزجلبک، میزان تابش نور در داخل سیستم، تابعی از مکان و میزان نوری رسیده به سطح محیط کشت، می‌باشد. محل سلول در داخل محیط کشت تعیین‌کننده میزان تابش نور به سلول است؛ به‌طوری که سلول نزدیک‌تر به سطح، تابش نور بیشتری و سلول دورتر از سطح، تابش نور کم‌تری دریافت می‌کند. برای توصیف میزان تولید، باید مقدار متوسط تابش نوری در داخل محیط کشت به‌عنوان متوسط حجمی مقادیر تابش محلی در داخل محیط کشت تعریف شود. به‌طور خلاصه، منظور از

3. Motile

4. Beer-Lambert

5. Extinction Coefficient

1. Luminance

2. Photosynthetic Photon Flux (PPF)

بسته نرم‌افزاری مطلب برآزش شد. تابع مونود^۳ ارائه شده در رابطه (۵) بدین منظور مورد استفاده قرار گرفت.

$$\mu = \mu_{max} \frac{I}{I+k} - r \quad (5)$$

که در این رابطه، μ نشان‌دهنده میزان سرعت رشد بر حسب day^{-1} ، μ_{max} میزان حداکثر سرعت رشد بر حسب day^{-1} ، I میزان شدت تابش متوسط نور بر حسب $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ، k ثابت نیمه-اشباع نوری^۴ بر حسب $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ و r میزان نرخ افت سوخت و سازی سلولی (ناشی از تنفس^۵) بر حسب day^{-1} می‌باشند. در رابطه (۶) تابع مونود به صورتی اصلاح شده تا اثر مهارکنندگی نوری در حین رشد سلول‌های سینکوکوس در نظر گرفته شود.

$$\mu = \mu_{max} \frac{I}{I+k+\frac{I^2}{k_{inh}}} - r \quad (6)$$

در این رابطه، k ثابت مشخصه پاسخ رشد در شرایط نور کم بر حسب $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ و k_{inh} ثابت بازدارندگی نوری بر حسب $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ هستند. در صورت عدم وجود بازدارندگی نوری، میزان ثابت k_{inh} به بی‌نهایت میل کرده، روابط (۵) و (۶) یکسان می‌شوند [۴۹].

۲-۷ مقایسه میزان رشد

داده‌های مربوط به رفتار رشد بر اساس تابش نور برای سه‌گونه نورساخت‌کننده مختلف از مراجع جمع‌آوری شد؛ این‌گونه‌ها عبارتند از: گونه سیانوباکتری آنابائنا فلاس آکوا^۶، گونه دیاتوم نیتزچتا اس‌پی.^۷ و جلبک سبز اسفائروسیتیس اسکروتی^۸ [۳۸ و ۳۹ و ۴۹]. الگوی رفتار رشد به دست آمده برای گونه سینکوکوس با شماره سوییچ (PTCC 6021) در پایان با این داده‌ها مقایسه گردید.

۳. نتایج و بحث

۳-۱ اندازه‌گیری میزان رشد

گونه سینکوکوس با موفقیت در گستره وسیعی از تابش متوسط نوری (بین ۲۵ تا $300 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ برای لامپ رشته‌ای) رشد کرد.

برای طراحی زیست‌واکنشگاه نوری، لازم است ترم میزان تولید زیست‌توده^۱ در حین طراحی برای هر گونه ریزجلبک، محاسبه و بهینه شود. در یک سیستم کشت پیوسته ریزجلبک، میزان تولید زیست‌توده عبارت است از میزان زیست‌توده تولیدی در هر واحد زمان و حجم زیست‌واکنشگاه نوری که بر اساس رابطه (۴) محاسبه می‌شود.

$$P_{bv} = \mu \cdot C_b \quad (4)$$

که در این رابطه، P_{bv} میزان حجمی تولید زیست‌توده، μ میزان سرعت رشد ویژه و C_b غلظت زیست‌توده در داخل زیست‌واکنشگاه نوری است [۳۶ و ۳۷].

۲-۶ الگوسازی رشد بر اساس میزان تابش

می‌توان نواحی مختلف نوری را از طریق مقایسه رفتار رشد سلول‌ها زیر میزان مختلف تابش اولیه نور به دست آورد. نواحی اشباع نوری و مهارکنندگی نوری در داخل زیست‌واکنشگاه نوری و در نزدیکی حباب نوری رخ می‌دهند؛ در عین حال به واسطه سایه‌انداختن سلول‌ها روی هم^۲، با فاصله گرفتن از سطح حباب نوری، میزان تابش به شدت کاهش می‌یابد و باعث وجود ناحیه‌ای با محدودیت نوری در داخل زیست‌واکنشگاه نوری می‌شود.

برای انجام الگوسازی رشد بر اساس میزان نور باید مقادیر مختلف سرعت ویژه رشد را تحت تابش‌های مختلف نوری در دوره رشد سلول سینکوکوس به دست آورد. سرعت ویژه رشد در مراحل اولیه رشد سلولی فقط به میزان تابش نور وابسته است؛ در مراحل بعدی رشد سلولی، سایه‌انداختن سلول‌ها روی هم، به دلیل افزایش غلظت سلولی و کاهش مواد مغذی در محیط کشت جزء عوامل مؤثر بر سرعت رشد هستند. بنابراین الگوسازی رشد بر اساس تابش نور در مراحل اولیه کشت و در مرحله رشد مستقل از غلظت سلولی انجام می‌شود. این دوره از روی بخش خطی نمودار لگاریتم طبیعی چگالی نوری سلول‌ها، بر حسب زمان کشت تعیین می‌شود، سرعت رشد ویژه هم بر مبنای رابطه (۱) محاسبه می‌شود.

تغییر در داده‌های سرعت رشد، تحت مقادیر مختلف تابش متوسط نور به توابع مختلف با استفاده از ابزار *non-linear curve fitting* در

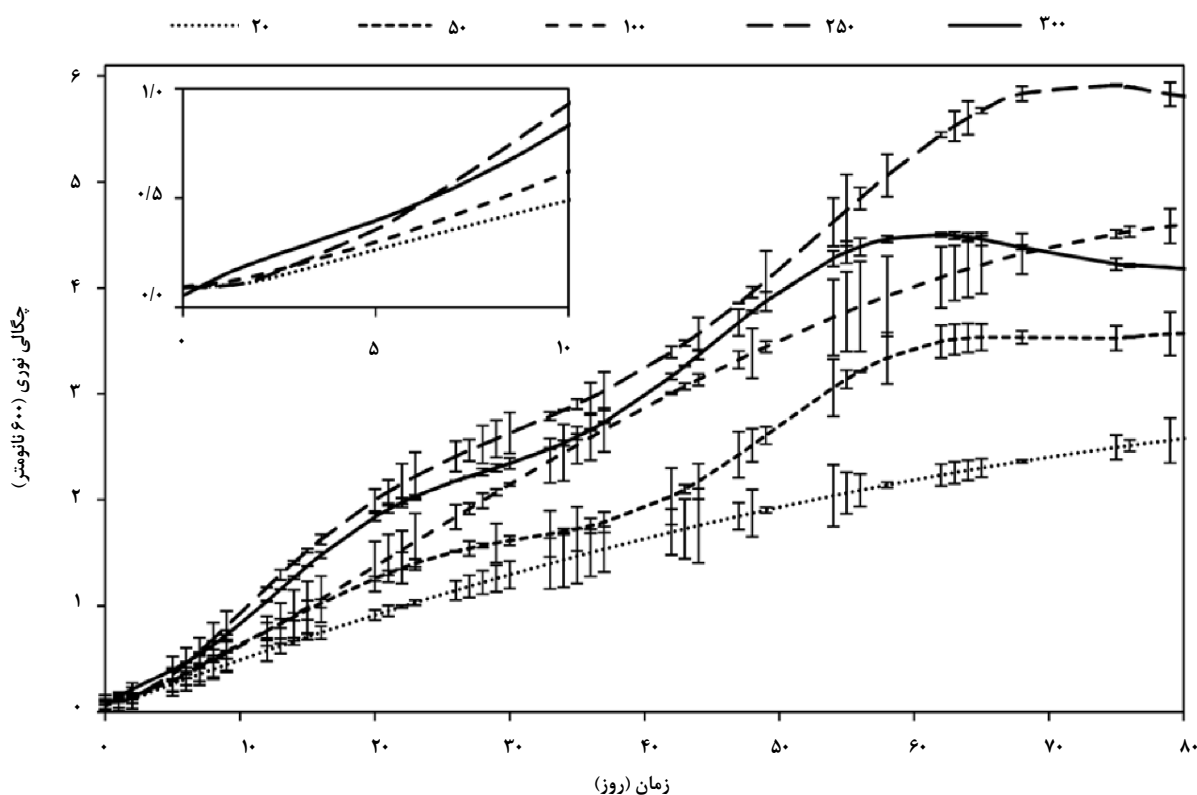
1. Biomass Productivity
2. Mutual Shading Of cells

3. Monod
4. Half-Saturation Constant
5. Respiration
6. *Anabaena flos-aquae*
7. *Nitzschia sp.*
8. *Sphaerocystis Schroeteri*

میزان تولیدی زیست توده به 0.383 g.L^{-1} کاهش پیدا کرد. برای تعیین دوره رشد سلولی مستقل از چگالی نوری، لگاریتم طبیعی مقادیر چگالی نوری در مقابل طول دوره کشت رسم شد. بخش خطی این نمودار، نشان دهنده دوره زمانی الگوسازی رشد سلول های سینکوکوس بر اساس میزان تابش نور است. از نظر زمانی این دوره برابر ۱۰ روز از زمان کشت بوده است. میزان رشد سلول های سینکوکوس در این دوره زمانی در شکل (۲) با بزرگنمایی نمایش داده شده است.

بین میزان چگالی نوری سلول ها (OD_{600}) و وزن خشک زیست توده رابطه خطی مشاهده شد، ولی میزان زیست توده تولیدی به میزان تابش نور بسیار وابسته بود. حداکثر چگالی نوری و بیشترین میزان زیست توده تولیدی در جدول (۱) ارائه شده اند.

طول مدت فاز لگ زیر شرایط مختلف نوری ثابت ماند ولی میزان حداکثر چگالی سلولی مشاهده شده با تغییر تابش نور، تفاوت قابل ملاحظه ای نشان داد. با افزایش میزان تابش نور از ۲۵ تا $250 \mu E m^{-2} s^{-1}$ میزان حداکثر چگالی نوری از ۲/۵ تا ۵/۹ افزایش یافت. تابش نوری بالاتر از میزان $250 \mu E m^{-2} s^{-1}$ موجب رخداد مهارکنندگی نوری شد (مطابق تغییرات در میزان OD_{600}) و حداکثر چگالی نوری به میزان ۴/۴ کاهش یافت. در شکل (۲) تغییرات چگالی سلولی برای گونه سینکوکوس (در طول موج 600 nm) در دوره زمانی کشت ارائه شده است. روندی مشابه با چگالی نوری برای میزان زیست توده تولیدی نیز مشاهده شد. افزایش میزان تابش از ۲۵ تا $250 \mu E m^{-2} s^{-1}$ موجب افزایش تولید از 0.107 g.L^{-1} تا 0.609 g.L^{-1} گردید؛ با این وجود و پس از رخداد مهارکنندگی نوری در تابش بالاتر از $250 \mu E m^{-2} s^{-1}$.



شکل ۲. تغییرات OD_{600} مربوط به سلول های سینکوکوس در طول دوره کشت زیر مقادیر مختلف تابش نوری:

$20, 50, 100, 250, 300 \mu E m^{-2} s^{-1}$ (در بخش بزرگنمایی شده، تغییرات چگالی نوری در دوره زمانی که رشد سلول ها فقط وابسته به میزان تابش نور است، نشان داده شده است).

جدول ۱. حداکثر میزان چگالی نوری (OD_{600})، زیست‌توده تولیدی ($g \Gamma^{-1} day^{-1}$) و ضریب خاموشی ($m^2 kg^{-1}$) برای سلول‌های سینکوکوس در طول دوره کشت و تحت میزان تابش مختلف نور.

میزان تابش نوری ($\mu E m^{-2} s^{-1}$)	ضریب خاموشی ($m^2 kg^{-1}$)	حداکثر میزان چگالی نوری (OD_{600})	میزان تولید زیست‌توده ($g \Gamma^{-1} day^{-1}$)	حداکثر سرعت رشد ویژه (day^{-1})
۲۰	۲۸۵/۷۱	۲/۵۰	۰/۰۱۰۷	۰/۲۱
۵۰	۱۷۵/۴۴	۳/۵۰	۰/۰۲۴۶	۰/۲۱
۱۰۰	۱۴۲/۸۶	۴/۵۰	۰/۰۳۹۳	۰/۲۳
۲۵۰	۱۱۷/۶۵	۵/۹۰	۰/۰۶۰۹	۰/۲۷
۳۰۰	۱۳۳/۳۳	۴/۵۰	۰/۰۳۸۳	۰/۲۲

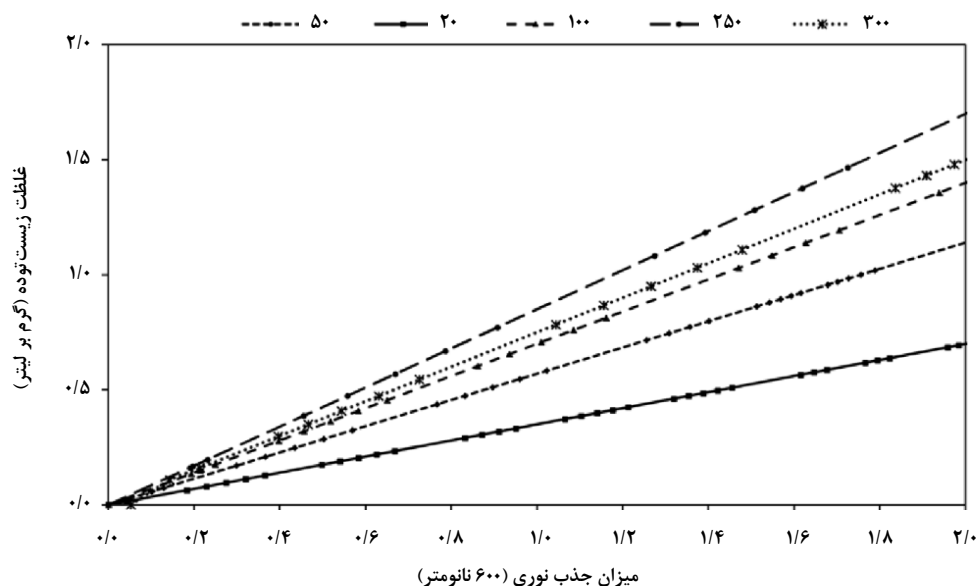
۲-۳ میزان ضریب خاموشی

مطابق با قانون بیر-لامبرت میزان جذب نور در یک محلول رقیق با غلظت محلول و فاصله‌ای که نور در داخل محلول طی می‌کند، متناسب است.

$$K_a \cdot l \cdot C_b = \text{جذب}^1 \quad (7)$$

استفاده از رابطه (۷) به‌دست آورد. در این رابطه، منظور از جذب چگالی نوری ریزجلبک در محیط کشت، C_b غلظت ریزجلبک و l میزان طول کووت^۲ دستگاه طیف‌نورسنج (برابر ۱ سانتی‌متر) هستند. میزان ضریب خاموشی (K_a) برابر شیب نمودار OD_{600} (جذب) مربوطه سلول‌های سینکوکوس در مقابل غلظت زیست‌توده (C_b) بوده، در شکل (۳) نشان داده شده‌است. مقادیر ضریب خاموشی به‌دست آمده برای تابش‌های مختلف نور در جدول (۱) ارائه شده‌است.

میزان ضریب خاموشی برای یک نمونه ریزجلبک را می‌توان با



شکل ۳. تغییرات جذب نوری (چگالی نوری) در طول موج ۶۰۰ نانومتر برای سلول‌های سینکوکوس در برابر غلظت زیست‌توده زیر مقادیر مختلف تابش نور.

1. Absorbance

2. cuvette

است. سلول‌ها افزایش تابش نور را تا حد مهارکنندگی نوری می‌توانند تحمل کنند و با افزایش تابش، میزان رشدشان افزایش یابد. با بیشتر شدن تابش نور و رخداد مهارکنندگی نوری، در چرخه نوساختی سلول فوتوسیستم-II آسیب می‌بیند که معمولاً منجر به مرگ سلول می‌شود؛ این مسأله را می‌توان علت کاهش سرعت رشد و میزان زیست‌توده تولیدی دانست. در جدول (۱) مقادیر حداکثر سرعت رشد نیز که از نتایج آزمایش‌های ارائه‌شده در شکل (۴) منتج شده، ذکر شده‌است.

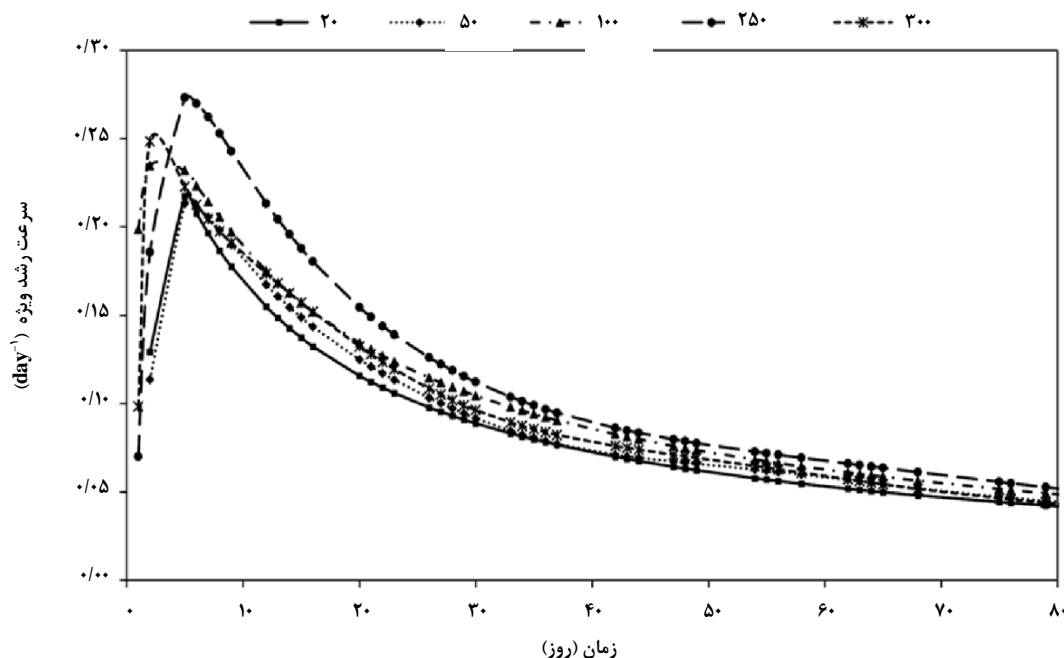
۳-۴ نمودارهای رشد-تابش نور

الگوسازی رشد با تابش نور، با استفاده از دو فرم معادله مونود انجام شد (روابط ۵ و ۶). در جدول (۲) نتایج برازش داده‌های آزمایشگاهی به روابط رشد-تابش نور ارائه شده‌است. رابطه (۶) به مناسب‌ترین صورت به داده‌ها برازش یافت (با R^2 برابر ۰.۹۳) ولی برازش برای رابطه (۵) به‌خوبی انجام نشد؛ علت، در نظر نگرفتن مهارکنندگی نوری در رابطه (۵) برخلاف رابطه (۶) است. مدل‌های برازش شده و داده‌های آزمایشگاهی در شکل (۵) ارائه شده‌اند.

مشاهده‌شده که ضریب خاموشی با افزایش تابش نور کاهش می‌یابد، اگرچه بعد از رخداد مهارکنندگی نوری میزان آن افزایش پیدا می‌کند. افزایش تابش نوری موجب می‌شود که سلول‌ها بتوانند نور مورد نیاز خود را با محتوای کلروفیل کم‌تری جذب نمایند؛ در نتیجه، سلول‌ها کم‌تر روی هم سایه می‌اندازند و به‌همین دلیل جذب نور و ضریب خاموشی هم کاهش می‌یابد. با رخداد مهارکنندگی نوری، سلول‌ها شدت تابش نور بالا را تحمل نمی‌کنند که در رشد سلولی کاهش کلی رخ می‌دهد که موجب افزایش در ضریب خاموشی می‌گردد.

۳-۳ سرعت رشد ویژه

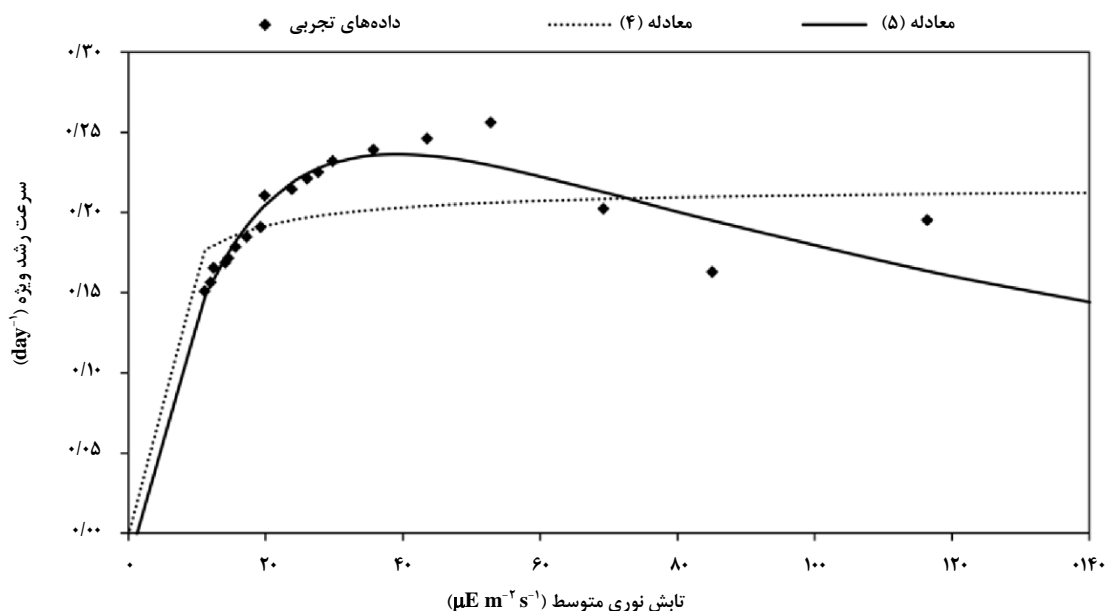
سرعت رشد ویژه سلول‌های ساینکوکوس بر اساس رابطه (۱) محاسبه و در شکل (۴) نشان داده شده‌است. دیده می‌شود که سرعت رشد سلول‌ها با افزایش تابش نور تا زمان رخداد مهارکنندگی نوری در شدت تابش $300 \mu E m^{-2} s^{-1}$ افزایش می‌یابد (در فاصله شدت نور ۲۵ تا $250 \mu E m^{-2} s^{-1}$). با این وجود، رخداد مهارکنندگی نوری در شدت تابش بیش از $250 \mu E m^{-2} s^{-1}$ موجب کاهش در سرعت رشد سلول‌ها شده‌است. این تغییر در سرعت رشد متناسب با تغییر در چگالی نوری سلول‌ها



شکل ۴. تغییرات سرعت رشد ویژه در طول دوره کشت ساینکوکوس زیر مقادیر مختلف تابش نوری (بر حسب $\mu E m^{-2} s^{-1}$).

جدول ۲. بهترین نتایج به دست آمده از برازش برای مؤلفه‌های رابطه‌های (۵) و (۶) مربوط به گونه سینکوکوس.

معادله	μ_{max} (day^{-1})	k ($\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	k_{inh} ($\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	r (day^{-1})	R^2 (%)
$\mu = \mu_{max} \frac{I}{I+k} - r$ (۵)	۰/۲۱۷۵	۲/۵۴۸	—	۰/۰۰۳۴	< ۹۰
$\mu = \mu_{max} \frac{I}{I+k+\frac{I^2}{k_{inh}}} - r$ (۶)	۰/۶۴۵۹	۲۹/۷۵۰	۵۱/۲۰۳۳	۰/۰۱۹۵۰	۹۳/۱۶



شکل ۵. نمودارهای رشد-تابش نور بر اساس داده‌های پیوسته نوری.

۳-۵ مقایسه داده‌های رشد-تابش نور

رشد سلولی به صورت متناسب افزایش یافت، در عین حال، مقدار ضریب خاموشی با افزایش تابش نور به غیر از وضعیت مهارکنندگی نوری کاهش و در این وضعیت، مقادیر حداکثر چگالی نوری، حداکثر سرعت رشد و میزان تولید زیست توده با افزایش تابش نور افزایش پیدا کرد.

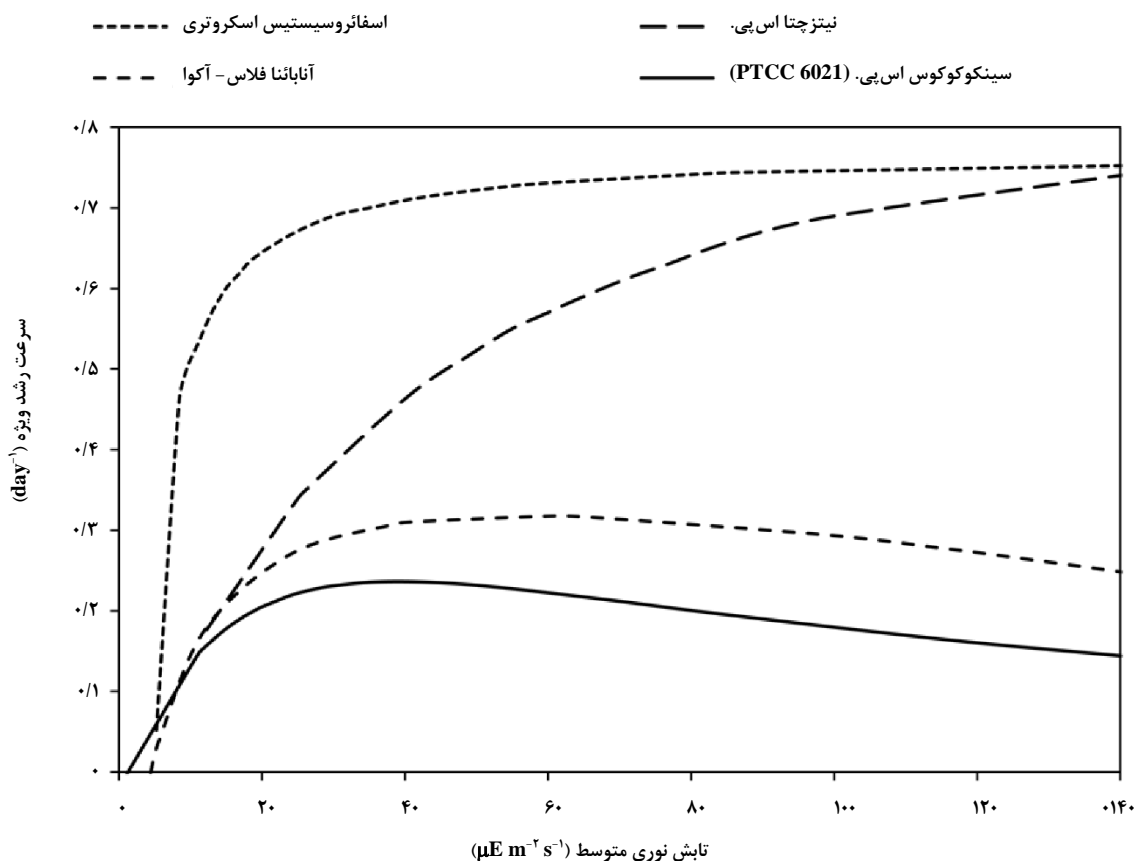
با استفاده از تابع مונود داده‌های آزمایشگاهی رشد با موفقیت الگوسازی شدند؛ با الگوی اصلاح شده موند امکان پیش‌بینی تولید زیست توده برای گونه سینکوکوس به شماره سویی PTCC 6021 زیر شرایط تابش نوری مختلف قابل انجام است و می‌توان از آن برای بهینه‌سازی مؤلفه‌های طراحی زیست‌واکنشگاه نوری تولید حجم بالای این گونه با هدف تولید حداکثری زیست توده زیر رژیم‌های نوری مختلف، استفاده کرد.

شکل (۶) نشان‌دهنده مقایسه‌ای بین رفتارهای رشد گونه سینکوکوس به شماره سویی PTCC 6021 با سایر انواع گونه‌های ریزجلبک و سیانوباکتری است. مشاهده می‌شود که گونه آنابنا فلوس-آکو^۱ روند مشابهی با سینکوکوس دارد و مهارکنندگی نوری در شدت تابش‌های بالای نور در آن رخ می‌دهد؛ در صورتی که گونه‌های دیاتوم و جلبک سبز سرعت رشد بالاتر و تحمل تابش نوری بیشتری نشان دادند.

۴. نتیجه‌گیری کلی

پدیده شد که رخداد مهارکنندگی نوری برای سلول‌های سینکوکوس به شماره سویی PTCC 6021 در شدت نور بالاتر از $250 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ است. در مقابل افزایش تابش نور، پیش از مهارکنندگی نوری،

1. *Anabaena Flos-Aquae*



شکل ۶. مقایسه نمودارهای رشد- تابش نور برای گونه سینکوکوس به شماره سویه PTCC 6021 با برخی گونه‌های دیگر.

مراجع

- [1] Liu, J., Ma, X., "The analysis on energy and environmental impacts of microalgae-based fuel methanol in China", *Energy Policy*, 37(4): pp. 1479-1488, (2009).
- [2] Wyatt Nicholas, B., Gloe Lindsey, M., Brady Patrick, V., Hewson John, C., Grillet Anne, M., Hankins Matthew, G., Pohl Phillip, I., "Critical conditions for ferric chloride-induced flocculation of freshwater algae", *Biotechnology and Bioengineering*, 109(2): pp. 493-501, (2012).
- [3] Rose, A., Stevens, B., "Policy Instruments for Mitigating Carbon Dioxide Emissions", in *Fossil Energy*, Malhotra R., Editor. Springer New York: New York, NY. pp. 519-537, (2020).
- [4] Li, Lanjuan, "Synthesis and Characterization of Starch-based Cationic Flocculants for Harvesting Microalgae", MSc Thesis, University of Minnesota, (2012).
- [5] Santilli, M., Moutinho, P., Schwartzman, S., Nepstad, D., Curran, L., Nobre, C., "Tropical Deforestation and the Kyoto Protocol", *Climatic Change*, 71(3): pp. 267-276, (2005).
- [6] Peters, G. P., Andrew, R. M., Canadell, J. G., Friedlingstein, P., Jackson, R. B., Korsbakken, J. I., Le Quéré, C., Pregon, A., "Carbon dioxide emissions continue to grow amidst slowly emerging climate policies", *Nature Climate Change*, 10(1): pp. 3-6, (2020).
- [7] Hill, J., Nelson, E., Tilman, D., Polasky, S., Tiffany, D., "Environmental, economic, and energetic costs and benefits of biodiesel and ethanol biofuels", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(30): pp. 11206, (2006).
- [8] Ali, M., Akbar, N., "Biofuel is a renewable environment friendly alternate energy source for the future", *Modeling Earth Systems and Environment*, 6(1): pp. 557-565, (2020).
- [9] Karatay, S. E., Dönmez, G., "Microbial oil production from thermophile cyanobacteria for biodiesel production", *Applied Energy*, 88(11): pp. 3632-3635, (2011).
- [10] Cheng, J. J., Timilsina, G. R., "Status and barriers of advanced biofuel technologies: A review", *Renewable Energy*, 36(12): pp. 3541-3549, (2011).

- [11] Fargione, J., Hill, J., Tilman, D., Polasky, S., Hawthorne, P., "Land Clearing and the Biofuel Carbon Debt", *Science*, 319(5867): p. 1235, (2008).
- [12] Tan, P., Hu, Z., Lou, D., Li, Z., "Exhaust emissions from a light-duty diesel engine with *Jatropha* biodiesel fuel", *Energy*, 39(1): pp. 356-362, (2012).
- [13] Mathews, J. A., "Carbon-negative biofuels", *Energy Policy*, 36(3): pp. 940-945, (2008).
- [14] Hosseinzadeh-Bandbafha, H., Tabatabaei, M., Aghbashlo, M., Khanali, M., Khalife, E., Roodbar, T., Mohammadi P., "Consolidating emission indices of a diesel engine powered by carbon nanoparticle-doped diesel/biodiesel emulsion fuels using life cycle assessment framework", *Fuel*, 267: p. 117296, (2020).
- [15] Amos, R., "Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology", Oxford, UK; Amsterdam, Iowa, USA: Blackwell Science, (2004).
- [16] Mata, T. M., Martins, A. A., Caetano, N. S., "Microalgae for biodiesel production and other applications: A review", *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14(1): pp. 217-232, (2010).
- [17] Geider, R. J., "Light and Temperature Dependence of the Carbon to Chlorophyll a Ratio in Microalgae and Cyanobacteria: Implications for Physiology and Growth of Phytoplankton", *The New Phytologist*, 106(1): pp. 1-34, (1987).
- [18] Metting, F. B., "Biodiversity and application of microalgae", *Journal of Industrial Microbiology*, 17(5): pp. 477-489, (1996).
- [19] Javadi, N., Zokaee, Ashtiani, F., Fouladitajar, A., Moosavi Zenooz, A., "Experimental studies and statistical analysis of membrane fouling behavior and performance in microfiltration of microalgae by a gas sparging assisted process", *Bioresour Technology*, 162: pp. 350-357, (2014).
- [20] Branco-Vieira, M., Costa, D., Mata, T. M., Martins, A. A., Freitas, M. A. V., Caetano, N. S., "A life cycle inventory of microalgae-based biofuels production in an industrial plant concept", *Energy Reports*, 6: pp. 397-402, (2020).
- [21] Dresselhaus, M. S., Thomas, I. L., "Alternative energy technologies", *Nature*, 414(6861): pp. 332-337, (2001).
- [22] Boussiba, S., Richmond, A. E., "C-phycocyanin as a storage protein in the blue-green alga *Spirulina platensis*", *Archives of Microbiology*, 125(1): pp. 143-147, (1980).
- [23] Ferreira, A., Ribeiro, L., Batista, A., Marques, P., Nobre, B., Palavra, A., da Silva, P., Gouveia, L., Silva, C., "A biorefinery from *Nannochloropsis* sp. microalga – Energy and CO₂ emission and economic analyses", *Bioresour Technology*, 138: pp. 235-244, (2013).
- [24] Heidorn, T., Camsund, D., Huang, H., Lindberg, P., Oliveira P., Stensjö, K., Lindblad, P., "Chapter Twenty-Four - Synthetic Biology in Cyanobacteria: Engineering and Analyzing Novel Functions, in *Methods in Enzymology*", C. Voigt, Editor, Academic Press. pp. 539-579, (2011).
- [25] Golden, S. S., Brusslan, J., Haselkorn, R., "Genetic engineering of the cyanobacterial chromosome", in *Methods in Enzymology*, Academic Press. pp. 215-231, (1987).
- [26] Kovacevic, V., Wesseler, J., "Cost-effectiveness analysis of algae energy production in the EU", *Energy Policy*, 38(10): pp. 5749-5757, (2010).
- [27] Hansel, P. A., Riefler, R., Stuart, B. J., "Efficient flocculation of microalgae for biomass production using cationic starch", *Algal Research*, 5: pp. 133-139, (2014).
- [28] Liu, S., Qiu, B., "Different responses of photosynthesis and flow cytometric signals to iron limitation and nitrogen source in coastal and oceanic *Synechococcus* strains (Cyanophyceae)", *Marine Biology*, 159(3): pp. 519-532, (2012).
- [29] Delavari Amrei, H., Nasernejad, B., Ranjbar, R., Rastegar, S., "Spectral shifting of UV-A wavelengths to blue light for enhancing growth rate of cyanobacteria", *Journal of Applied Phycology*, 26(3): pp. 1493-1500, (2014).
- [30] Philips, E. J., Zeman, C., Hansen, P., "Growth, photosynthesis, nitrogen fixation and carbohydrate production by a unicellular cyanobacterium, *Synechococcus* sp. (Cyanophyta)", *Journal of Applied Phycology*, 1(2): pp. 137-145, (1989).
- [31] Lee, D. H., "Algal biodiesel economy and competition among bio-fuels", *Bioresour technology*, 102(1): pp. 43-49, (2011).
- [32] Cai, T., Park, S., Racharaks, R., Li, Y., "Cultivation of *Nannochloropsis salina* using anaerobic digestion effluent as a nutrient source for biofuel production", *Applied Energy*, 108: pp. 486-492, (2013).
- [33] Silva, C. S. P., Silva-Stenico, M. E., Fiore, M. F., de Castro, H. F., Molgero Da Rós, P. C., "Optimization of the cultivation conditions for *Synechococcus* sp. PCC7942 (cyanobacterium) to be used as feedstock for biodiesel production", *Algal Research*, 3: pp. 1-7, (2014).
- [34] Peng, Z. Miao, X., "Monoglucosyldiacylglycerol participates in phosphate stress adaptation in *Synechococcus* sp. PCC 7942", *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 522(3): pp. 662-668, (2020).
- [35] Hillman, K. M., Sims, R. C., "Struvite formation associated with the microalgae biofilm matrix of a rotating algal biofilm reactor (RABR) during nutrient removal from municipal wastewater", *Water Science and Technology*, (2020).

- [36] Molina Grima, E., Fernández, F. G., García Camacho, F., Chisti, Y., "Photobioreactors: light regime, mass transfer, and scaleup", *Journal of Biotechnology*, 70(1): pp. 231-247, (1999).
- [37] Molina Grima, E., Fernández, F. G., García Camacho, F., Chisti, Y., "Tubular photobioreactor design for algal cultures", *Journal of Biotechnology*, 92(2): pp. 113-131, (2001).
- [38] Kurano, N., Miyachi, S., "Selection of microalgal growth model for describing specific growth rate-light response using extended information criterion", *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 100(4): pp. 403-408, (2005).
- [39] Mazzelli, A., Cicci, A., Di Caprio, F., Altimari, P., Toro, L., Iaquaniello, G., Pagnanelli, F., "Multivariate modeling for microalgae growth in outdoor photobioreactors", *Algal Research*, 45: p. 101663, (2020).
- [40] Zhou, W., Lu, Q., Han, P., Li, J., "Chapter 3-Microalgae Cultivation and Photobioreactor Design in Microalgae Cultivation for Biofuels Production", A. Yousuf, Editor. Academic Press. pp. 31-50, (2020).
- [41] Kazbar, A., Marec, H., Takache, H., Ismail, A., Pruvost, J., "Effect of design dark fraction on the loss of biomass productivities in photobioreactors", *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 43(2): pp. 207-216, (2020).
- [42] Imamoglu, E., Dalay, M. C., Sukan, F. V., "Influences of different stress media and high light intensities on accumulation of astaxanthin in the green alga *Haematococcus pluvialis*", *New Biotechnology*, 26(3): pp. 199-204, (2009).
- [43] Moosavi Zenooz, A., Zokae Ashtiani, F., Ranjbar, R., Javadi, N., "Synechococcus sp. (PTCC 6021) cultivation under different light irradiances Modeling of growth rate-light response", *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 46(6): pp. 567-574, (2016).
- [44] Moosavi Zenooz, A., Zokae Ashtiani, F., Ranjbar, R., Nikbakht, F., "Comparison of different artificial neural network architectures in modeling of *Chlorella* sp. flocculation", *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 47(6): pp. 570-577, (2017).
- [45] Cho, S., Ji, S. C., Hur, S. B., Bae, J., Park, I. S., Song Young, Ch., "Optimum temperature and salinity conditions for growth of green algae *Chlorella ellipsoidea* and *Nannochloris oculata*", *Fisheries Science*, 73(5): pp. 1050-1056, (2007).
- [46] Jian-Ming, L., Li-Hua, Ch., Xin-Hua, X., Lin, Zh., Huan-Lin, Ch., "Enhanced lipid production of *Chlorella vulgaris* by adjustment of cultivation conditions", *Bioresource Technology*, 101(17): pp. 6797-6804, (2010).
- [47] Chisti, Y., "Biodiesel from microalgae beats bioethanol", *Trends in Biotechnology*, 26(3): pp. 126-131, (2008).
- [48] Molina Grima, E., García Camacho, F., Fernández Sevilla, J. M., Ación Fernández, F. G., Pérez J. A. Sánchez, Sevilla J. M. Fernández, Fernández F. G. Contreras Gómez, A., "A mathematical model of microalgal growth in light-limited chemostat culture", *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 1994. 61(2) pp. 167-173, (2008).
- [49] Litchman, E., "Growth rates of phytoplankton under fluctuating light", *Freshwater Biology*, 44(2): pp. 223-235, (2000).