بررسی تاثیرغلظت های مختلف سدیم نیترات و سدیم بی کربنات بر میزان رشد و چربی کل ریز جلبک (*Neochloris oleoabundance*)

فرزانه مهرابی[۱]، سید علی جعفرپور*[۱]، قربانعلی نعمت زاده[۲]

*a.jafarpour@sanru.ac.ir

۱- گروه شیلات، دانشکده علوم دامی و شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران

۲ - گروه اصلاح نژاد گیاهی و بیوتکنولوژی، پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری طبرستان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران

تاریخ دریافت: خرداد ۱۳۹۶ تاریخ پذیرش: آبان ۱۳۹۶

چکیده

منابع کربن و نیتروژن از عوامل ضروری برای رشد ریز جلبک‌ها محسوب می‌شود، در این مطالعه اثر سدیم نیترات ($NaNO_3$) و سدیم بی‌کربنات ($NaHCO_3$) بر رشد ریز جلبک *N. oleoabundan* در محیط کشت BBM موردبررسی قرار گرفت. بدین منظور از محلول $NaNO_3$ با غلظت های (۰، ۰/۵، ۱، ۲/۵، ۵، ۱۰) گرم بر لیتر و محلول $NaHCO_3$ با غلظت های (۰، ۰/۲۵، ۰/۵، ۰/۷۵، ۱، ۱/۲۵) گرم بر لیتر در محیط BBM طی مدت زمان۲۱ روز استفاده گردید.

نتایج حاصله نشان داد که در غلظت ۱۰حاوی میلی مولار ازت بیشترین تعداد ۱۰^{۶}×(۰/۵۷۷ ±۸۴/۶۶) سلول در میلی لیتر و در صورت عدم وجود ازت هیچ افزایشی در تعداد سلول‌ها مشاهده نشد. از سویی، با افزایش میزان غلظت ازت میزان چربی کل کاهش یافت و بیشترین میزان چربی کل در شرایط نبود ازت ۰/۲۷ ±۱/۳۲ گرم در لیتر ثبت شد (p <۰/۰۵). از طرفی افزودن ۱/۲۵ گرم بر لیتر سدیم بی‌کربنات در محیط رشد ریز جلبک بیشترین تعداد سلولی ۱۰^{۶}×(۱/۰۰± ۹۶) سلول در میلی لیتر و در صورت عدم وجود سدیم بی‌کربنات کمترین تعداد سلول‌ها ۱۰^{۶}×(۰/۰± ۲) مشاهده شد. همچنین با افزایش میزان $NaHCO_3$ در میزان چربی کل کاهش مشاهده شد و بیشترین میزان چربی کل ۰/۱۴۴±۰/۳ گرم در لیتر در شرایط ۰/۲۵گرم بر لیتر $NaHCO_3$ مشاهده گردید (p <۰/۰۵). نظر به اثرات مثبت بی‌کربنات سدیم نسبت به سدیم نیترات بر رشد ریز جلبک *N. oleoabundans* در محیط کشت BBM که یک محیط کشت عمومی و ارزان‌قیمت می‌باشد، برای تولید انبوه ریز جلبک *N. oleoabundans* توصیه می‌گردد.

کلمات کلیدی: ریز جلبک *N. oleoabundan*، زی توده، سدیم نیترات ($NaNO_3$)، سدیم بی‌کربنات ($NaHCO_3$)، BBM

*نویسنده مسئول

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-02]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1397.27.1.5.9]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2018.116407]

مقدمه

امروزه پژوهش پیرامون محصولات گیاهی دارای روغن به منظور استحصال ماده اولیه تولید انرژی و حل مشکلات ناشی از محدودیت‌های آتی سوخت جهانی بسیار گسترش‌یافته است(Lee *et al*., 2012). میکرو جلبک‌ها بالاترین پتانسیل را برای تولید انرژی از خود نشان داده‌اند . این ارگانیسم‌ها از نور خورشید، آب و دی‌اکسید کربن برای تولید زیست‌توده استفاده می‌نمایند (Meier, 1955). ریز جلبک‌ها اهمیت تجاری و زیست‌محیطی زیادی به‌عنوان پایه زنجیره غذایی و تولیدکننده اکسیژن‌دارند و همچنین یک منبع طبیعی از ترکیبات باارزش مانند اسیدهای چرب، آستروئیدها و کاروتنوئیدها هستند (Lee *et al*., 2010). ترکیب چربی ریز جلبک‌ها برای مقاصد مختلفی موردبررسی قرار می‌گیرد، که از آن جمله میتوان به نقش آنها در اقیانوس‌شناسی ، در ایجاد کشندهای سمی و نشانگر زیستی، اهمیت آنها در آبزی‌پروری تغذیه آبزیان در مراحل لاروی و تولید سوخت زیستی اشاره کرد (Gordillo *et al*., 1998). ریزجلبک‌ها قادرند با شرایط مختلف محیطی سازگار شوند؛ بنابراین امکان یافتن شرایط محیطی مناسب‌تر ازلحاظ رشد و تولید چربی در گونه‌های مختلف ریز جلبکی بیشتر است(Halim *et al*., 2012). تغییر شرایط محیطی علاوه بر تأثیر بر میزان رشد و تولید چربی می‌تواند بر کیفیت لیپید ریز جلبک‌ها نیز اثرگذار باشد (کیایی و همکاران، ۱۳۹۲؛ Mata *et al*., 2010). ترکیب چربی جلبک‌ها تا حد زیادی به عوامل ژنتیکی و محیطی بستگی دارد(Nuzzo *et al*., 2013). ریز جلبک‌ها ترکیبی از اسیدهای چرب اشباع و غیراشباع ۵۲-۲۲ کربنه تولید می‌کنند که برخی از آن‌ها از خانواده‌ای امگا ۵ و امگا ۲ می‌باشند (Mata *et al*., 2010). امروزه، علم بیوتکنولوژی به دنبال یافتن محرک‌هایی مؤثر جهت افزایش نرخ رشد و محتوای ترکیبات مختلف بیوشیمیایی مانند لیپیدها و رنگ‌دانه‌ها در جلبک‌ها است . جلبک‌های میکروسکوپی به دلیل این‌که فتوسنتز کننده می‌باشند به منبع نور، دی‌اکسید کربن، آب و نمک‌های معدنی جهت رشد نیازمند هستند (Rodolfi *et al*., 2009) .به‌منظور افزایش بازدهی و تحریک افزایش تولید چربی در این ارگانیزم‌ها، امروزه از علوم مهندسی ژنتیک و متابولیک بهره گرفته می‌شود .در مهندسی متابولیک از طریق تغییر شرایط فیزیکی (مانند دوره نور، شدت نور) و شیمیایی (مانند نیتروژن، شوری، فسفات) محیط کشت در قالب طرح آزمایشگاهی، بهترین شرایط موردنیاز کشت هرگونه از جلبک به صنعت معرفی می‌شود (Liska *et al*., 2004) بیشتر جلبک‌های میکروسکوپی، تحت شرایط استرس مقادیر بالایی از لیپید تولید می‌کنند .درصورتی‌که به مدت طولانی در معرض تابش نور قرار گیرند، انرژی نورانی طی عمل فتوسنتز به‌صورت ذخایر چربی، در آن‌ها تجمع می‌یابد (Liska *et al*., 2004). در انتخاب نژادهای جلبک، عوامل مختلف موردتوجه قرار می‌گیرد که برخی از مهم‌ترین این ویژگی‌ها، نرخ رشد طبیعی جلبک، میزان تجمع زی‌توده در واحد زمان و در واحد حجم، کمیت و کیفیت تولید چربی، مقاومت در برابر استرس‌های محیطی مانند درجه حرارت، ورودی نور و مواد، CO_2مغذی، امکان رقابت با گونه‌های دیگر و باکتری‌ها، امکان استفاده از مواد مغذی گوناگون به‌ویژه فسفر و نیتروژن حاصل از زه آب کشاورزی، سهولت برداشت و فرآوری زیست‌توده، سهولت آنالیز، استخراج و خالص‌سازی چربی می‌باشند .به همین دلیل، جلبک‌های سبز به‌طور گسترده جهت کشت استفاده می‌شوند (Mata *et al*., 2010). ریز جلبک *Neochloris oleoabundans* یکی از گونه‌های ریز جلبک آب‌های شیرین بوده و متعلق به خانواده Chlorococcaceae هست. این ریز جلبک می‌تواند ۵۴-۳۵ درصد چربی در زیست‌توده خشک، تحت شرایط فوتوآتروفیک تولید کند. ٪۸۰ کل چربی‌ها تری‌گلیسرید؛ و بیشتر آن‌ها اسیدهای چرب غیراشباع که حاوی ۱۶-۲۰ کربن هستند (Tornabene *et al*., 1983) ، می‌باشد که در تولید روغن استفاده می‌شوند. اندازه سلول *N. oleoabundan* ۲ تا ۶ میکرومتر می‌باشد. مطالعات مختلفی درزمینه تأثیر ترکیبات محیط کشت بر تراکم زیست‌توده ریز جلبک *Neochloris oleoabundance* و بهبود کار آیی استخراج روغن از ریز جلبک انجام‌شده است. ازجمله آن‌ها می‌توان به پژوهش Santos و همکاران (۲۰۱۲)، به بررسی میزان رشد و تولید اسیدهای چرب در سطوح

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-02]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1397.27.1.5.9]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2018.116407]

مختلف pH و شوری با محدودیت نیتروژن، پژوهش‌های Jin و همکاران (۲۰۱۲) و Taher و همکاران (۲۰۱۴) تأثیر انواع روش‌ها بر شکست دیواره سلولی، مطالعات Bruwer و همکاران (۱۹۸۰) بررسی کشت ریز جلبک‌ها در شرایط کمبود ازت، تحقیقات Pruvost و همکاران (۲۰۰۹) در افزایش تولید زیست‌توده و اسیدهای چرب تحت شرایط محدودیت نیتروژن در فتوبیوراکتور اشاره کرد. از انجا که تاکنون هیچ مطالعه ای به صورت هم زمان به بررسی سطوح مختلف سدیم بی کربنات و سدیم نیترات در محیط BBM (Bold's Basal Medium) بر تعداد سلول های تولیدی و چربی کل در ریزجلبک *N. oleoabundan* چه در داخل و چه در خارج انجام نشده است بر این اساس هدف از این پژوهش بررسی قابلیت رشد سلولی ریز جلبک *N. oleoabundan* و تولید زیست‌توده و چربی کل در محیط BBM با سطوح مختلف سدیم نیترات و سدیم بی کربنات است.

مواد و روش‌کار

گونه و شرایط کشت

ریز جلبک *N. oleoabundans* از مجموعه محیط کشت جلبک از دانشگاه نانت کشور فرانسه تهیه شد. برای کشت جلبک، دو لیتر آب مقطر در ارلن مایرهای شیشه‌ای ریخته شده و به آن مقدار ۱۳ میلی‌لیتر در لیتر محیط (جدول ۱) BBM با غلظت های مختلف $NaNO_3$ (۰، ۰/۵، ۱، ۲/۵، ۵، ۱۰) گرم بر لیتر و $NaHCO_3$ (۰، ۰/۲۵، ۰/۵، ۰/۷۵، ۱، ۱/۲۵) گرم بر لیتر اضافه شد و سپس با استفاده از pH متر اسیدیته ابتدایی کشت ۷/۵ تنظیم شد. در مرحله بعد ظروف حاوی محیط کشت جلبک در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه در دستگاه اتوکلاو (مدل ۱۲۱ آ) ضدعفونی و استریل شد. پس از اتمام اتوکلاو و هم‌دما شدن با دمای آزمایشگاه، ۲۰۰ میلی‌لیتر از ذخیره جلبک *N. oleoabundans* (با غلظت ۱۰۵ سلول در میلی‌لیتر) به محیط کشت‌های جداگانه اضافه شد و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و شدت نور ۳۷۰۰ لوکس و در پروتکل نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی قرار داده شد(Olguín *et al*., 2013) کشت برای یک دوره ۲۱ روزه انجام شد. در این پژوهش برای تکثیر زیست‌توده این نوع ریز جلبک در طی انجام این پروسه از روش کلاسیک پرورش جلبک (Batch culture) استفاده گردید. اندازه‌گیری تراکم توده زنده با شمارش سلول‌ها به‌وسیله لام hemocytometer تعیین شد.

ریز جلبک *N. oleoabundans* از مجموعه محیط کشت جلبک از دانشگاه نانت کشور فرانسه تهیه شد. برای کشت جلبک، دو لیتر آب مقطر در ارلن مایرهای شیشه‌ای ریخته شده و به آن مقدار ۱۳ میلی‌لیتر در لیتر محیط (جدول ۱) BBM با غلظت های مختلف $NaNO_3$ (۰، ۰/۵، ۱، ۲/۵، ۵، ۱۰) گرم بر لیتر و $NaHCO_3$ (۰، ۰/۲۵، ۰/۵، ۰/۷۵، ۱، ۱/۲۵) گرم بر لیتر اضافه شد و سپس با استفاده از pH متر اسیدیته ابتدایی کشت ۷/۵ تنظیم شد.

جدول ۱: مشخصات محیط کشت BBM

Table 1: Specificaitons of BBM culture medium.

ترکیبات	غلظت (گرم در لیتر)
$NaNO_3$	۲۵/۰۰
$CaCL_2.2H_2O$	۲/۵۰
$MgSO_4.7H_2O$	۷/۵۰
K_2HPO_4	۷/۵۰
KH_2PO_4	۱۷/۵۰
NaCl	۲/۵۰
H_3BO_3	۱۱/۴۲

برداشت زیست‌توده

برای برداشت زیست‌توده جلبکی، پس از توقف هوادهی به مدت ۴ ساعت، حدود نیمی از حجم محیط کشت مایع به بیرون ریخته شده و نمونه به مدت ۱۰ دقیقه با دور rpm ۴۳۰۰ ، سانتریفیوژ شد سپس جلبک‌ها ته‌نشین شده و در دمای ۴ تا ۸ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند(Wang *et al*., 2015).

استخراج چربی کل ریز جلبک

استخراج لیپید مطابق با روش Bligh و Dyer (۱۹۵۹) انجام شد. بدین‌صورت که ۵۰ میلی‌لیتر ریز جلبک با گاز

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-02]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1397.27.1.5.9]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2018.116407]

نیتروژن خشک شد و با هاون یکدست شد سپس ۱۰ میلی‌لیتر محلول کلروفرم/ متانول به نسبت (۲:۱) اضافه شد. نمونه‌ها به مدت ۲ دقیقه در دستگاه شیکر (مدل،LS-100 ، Labtron) قرار داده شدند تا دیواره ضخیم ریز جلبک کاملاً شکسته شود نمونه‌ها بعد از اضافه کردن ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر، دوباره ۱۰ دقیقه در دستگاه شیکر قرار گرفتند. سپس به مدت ۱۰ دقیقه با دور۳۰۰۰rpm در دمای اتاق سانتریفیوژ شدند تا دو فاز ایجاد شود. فاز آلی حاوی لیپید جدا شد و به باقیمانده ۵ میلی‌لیتر کلروفرم خالص اضافه گردید و مانند مرحله قبل مراحل استخراج لیپید تکرار شد. فاز آلی جداشده در یک ویال که از قبل وزن شده بود (W1) ریخته شد و در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد در آون قرار داده شد تا حلال تبخیر شود. پس از آن ویال ها دوباره وزن شدند (W2) و میزان لیپید کل با اختلاف بین وزن اولیه و ثانویه برحسب درصد محاسبه شد (Nigam *et al.*, 2011).

وزن اولیه- وزن نهایی = درصد لیپید کل

روش‌های تجزیه و تحلیل آماری

این پژوهش به‌صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام‌شده و آزمایش‌ها در سه تکرار صورت گرفت. آنالیز آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS19 انجام شد. داده‌های مختلف به‌صورت میانگین± انحراف معیار بیان شد. تفاوت بین میانگین‌ها توسط آنالیز واریانس دوطرفه انجام و در صورت وجود اختلاف معنی‌دار بین داده‌ها، از آزمون دانکن در سطح $p <$ ۰/۰۵ استفاده شد.

نتایج

تاثیر غلظت های مختلف $NaNO_3$ بر افزایش تعداد سلول های ریزجلبک *N. oleoabundans* بعد از یک دوره کشت ۲۱ در جدول ۲ ارائه شده است. نتایج بیانگر این امر است که با گذشت زمان و افزوده شدن $NaNO_3$ تعداد سلول ها به طور معنی داری ($p <$ ۰/۰۵) افزایش می‌یابد.

جدول ۲: اثر غلظت‌های مختلف $NaNO_3$ بر تعداد سلول در هر میلی‌لیتر در مدت ۲۱ روز

Table 2: Effec of differenct concentrations of $NaNO_3$ on cell number per mili litre during 21 days.

تعداد سلول ×۱۰^۶ در میلی لیتر	روز	$NaNO_3$ (mM) ۰	۰/۵	۱	۲/۵	۵	۱۰
	۰	۰ aA	۰ aA	۰ aA	۰ aA	۰ aA	۰ aA
	۵	۰ aA	۷/۳۳ ±۱/۵۲۷ bB	۲۴/۶۶ ±۱/۱۵۴ cB	۳۷/ ۳۳ ±۱/۵۲۷ dB	۴۶/۳۳ ±۱/۵۲۷ eB	۶۱/۶۶ ±۱/۵۲۷ fB
	۱۰	۰ aA	۱۱/۶۶ ±۱/۵۲۷ bC	۲۷/۶۶ ±۱/۵۲۷ cC	۳۷/۳۳ ±۲/۰۸۱ dB	۴۸/۰۰ ±۱/۰۰ eC	۷۴/۳۳ ±۱/۵۲۷ fC
	۱۵	۰ aA	۱۵/۳۳ ±۰/۵۷۷ bD	۳۲/۰۰ ±۱/۰۰ cD	۳۸/۶۶ ±۰/۵۷۷ dB	۵۱/۰۰ ±۱/۰۰ eD	۸۱/۳۳ ±۱/۵۲۷ fD
	۲۱	۰ aA	۲۱/۳۳ ±۱/۵۲۷ bE	۳۳/۶۶ ±۳/۲۱۴ cD	۴۱/۰۰ ±۱/۰۰ dC	۵۵/۶۶ ±۱/۵۲۷ eE	۸۴/۶۶ ±۰/۵۷۷ fE

حروف بالانویس کوچک متفاوت در هر ردیف بیانگر اختلاف معنی دار بین غلظت های مختلف$NaNO_3$ است.

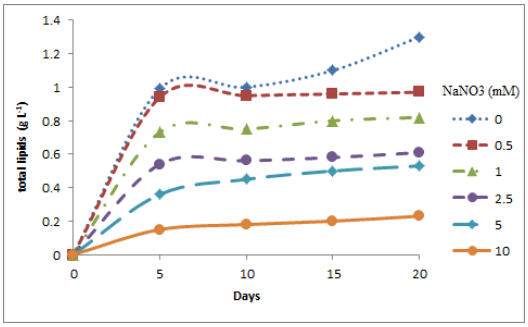
حروف بالانویس بزرگ متفاوت در هر ستون بیانگر اختلاف معنی دار در روزهای مختلف است.

Small superscript letters in each row indicates the significan difference among NaNO3 concentations
Capital superscrip letters in each column indicates the significanc difference during experimental days

در غلظت ۱ میلی مولار $NaNO_3$ در روزهای ۱۵ و ۲۱ و در غلظت ۲/۵ میلی مولار در روز های ۵، ۱۰ و ۱۵ اختلاف معنی داری در تعداد سلول های ریزجلبک مشاهده نشد($p >$ ۰/۰۵). همچنین شکل ۱ بیانگر تاثیر غلظت های مختلف $NaNO_3$ بر چربی کل تولید شده در سلول های ریزجلبک *N. oleoabundans* بعد از یک دوره کشت ۲۱ روزه است. همان طور که نشان داده شده است کمترین چربی کل تولیدی در سلول های ریزجلبک (۰/۰۱± ۰/۲۳ گرم بر لیتر) مربوط به غلظت ۱۰ میلی

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-02]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1397.27.1.5.9]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2018.116407]

مولار در روز ۲۱ و بیشترین چربی کل (۰/۲۷± ۱/۳۲ گرم بر لیتر) در شرایط بدون ازت در روز ۲۱ می باشد.



شکل ۱: اثر غلظت‌های مختلف $NaNO_3$ بر میزان چربی کل ریز جلبک *N.oleoabundans* در مدت‌زمان ۲۱ روز

Figure 1: Effect of different concentrations of $NaNO_3$ on total crude oil of *N. oleoabundans* microalgae during 21 days

مقادیر حاصل از شمارش سلول های ریز جلبک *N. oleoabundans* با سطوح مختلف $NaHCO_3$ در مدت زمان ۲۱ روز در جدول ۳ ارائه شده است. نتایج بیانگر این امر هستند که با گذشت زمان و افزایش سطوح $NaHCO_3$ تعداد سلول های ریزجلبکی به طور معنی داری(p <۰/۰۵) افزایش نشان می دهند. به طوری که بیشترین تعداد $۱۰^{۶}\times$(۹۶±۱/۰۰) سلول در میلی لیتر در سطح ۱/۲۵ گرم بر لیتر سدیم بی کربنات در روز ۲۱ می باشد. از سویی، شکل ۲ بیانگر میزان چربی کل تولیدی ریزجلبک با سطوح مختلف سدیم بی کربنات در مدت زمان ۲۱ روز می باشد و بیشترین میزان چربی کل (۰/۳±۰/۱۴۴) گرم بر لیتر) در سطح ۰/۲۵ گرم بر لیتر سدیم بی‌کربنات در روز ۲۱ می‌باشد.

جدول ۳: اثر غلظت های مختلف $NaHCO_3$ (گرم در هر لیتر) بر تعداد سلول در هر در مدت ۲۱ روز

Table 3: Effect of different concentrations of $NaNO_3$ (g/L) on number of cells during 21 days.

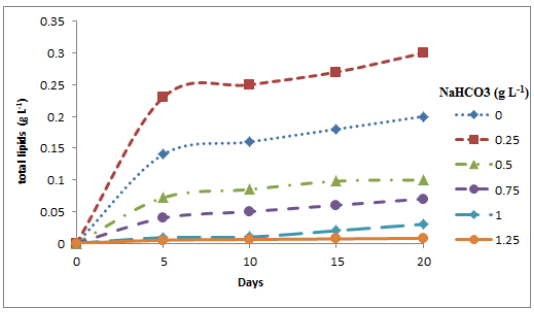
تعداد سلول ×$۱۰^{۶}$ در میلی لیتر	روز	$NaHCO_3$ (g L^{-1})					
		۰	۰/۲۵	۰/۵	۰/۷۵	۱	۱/۲۵
	۰	۲/۰۰^{aA}	۲/۰۰^{aA}	۲/۰۰^{aA}	۲/۰۰^{aA}	۲/۰۰^{aA}	۲/۰۰^{aA}
	۵	۲/۰۰^{aA}	۱۷/۶۶±۲/۰۸۱ ^{bB}	۲۹/۰۰±۱/۰۰۰^{cB}	۴۲/۶۶±۰/۵۷۷^{dB}	۵۸/۰۰±۱/۰۰۰^{eB}	۷۹/۰۰±۱/۰۰۰^{fB}
	۱۰	۲/۰۰^{aA}	۲۰/۰۰±۱/۰۰۰^{bC}	۳۲/۶۶±۲/۰۸۱^{cC}	۴۵/۳۳±۰/۵۷۷^{dC}	۶۳/۳۳±۰/۵۷۷^{eC}	۸۵/۶۶±۲/۰۸۱^{fC}
	۱۵	۲/۰۰^{aA}	۲۱/۳۳±۰/۵۷۷^{bD}	۳۸/۳۳±۰/۵۷۷^{cD}	۴۸/۳۳±۲/۰۸۱^{dD}	۶۸/۶۶±۱/۵۲۷ ^{eD}	۹۲/۶۶±۲/۵۱۶^{fD}
	۲۱	۲/۰۰^{aA}	۲۴/۶۶±۱/۵۲۷^{bE}	۴۱/۰۰±۱/۰۰^{cE}	۵۴/۶۶±۱/۵۲۷^{dE}	۷۱/۰۰±۰/۰۰ ^{eE}	۹۶/۰۰±۱/۰۰^{fE}

حروف بالانویس کوچک متفاوت در هر ردیف بیانگر اختلاف معنی دار بین میزان های مختلف $NaHCO_3$ در هر لیتر است.

حروف بالانویس بزرگ متفاوت در هر ستون بیانگر اختلاف معنی دار در روزهای مختلف است.

Small superscript letters in each row indicates the significan difference among NaNO3 concentations

Capital superscrip letters in each column indicates the significanc difference during experimental days



شکل ۲: اثر غلظت های مختلف $NaHCO_3$ (گرم در هر لیتر) بر میزان چربی کل ریز جلبک *N.oleoabundans* در مدت‌زمان ۲۱ روز

Figure 2: Effect of different concentrations of $NaNO_3$ (g/L) on total crude oil of *N. oleoabundans* microalgae during 21 days.

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-02]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1397.27.1.5.9]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2018.116407]

بحث

رشد خوب کشت‌های میکرو جلبک‌ها بـه تعـادل مناسب بـین مـواد غـذایی اصـلی و فرعـی بسـتگی دارد .عدم تعادل این مواد اغلب منجر به توقـف رشـد کشـت می‌شود. تمام شدن مواد غذایی یکی از مهم‌ترین عوامل محدودکننده رشد و کنترل‌کننده کیفیـت غـذایی در کشت‌های متـراکم اسـت. بسـیاری از کودهـا، حـاوی مقادیر ناکافی نیتروژن یا فلزات بی‌ثبات و به‌ویژه آهـن هستند که می‌تواند موجب کند شدن رشد ریز جلبک‌ها شود. میزان تأمین اکسـیژن و دی‌اکسید کربن می‌تواند درکشت هـای بـزرگ متـراکم (تولیـد انبـوه در مقیـاس صنعتی) یک عامل محدودکننده باشد. میکرو جلبک‌ها در طـول فتوسـنتز دی‌اکسید کربن مصـرف کـرده و اکسـیژن آزاد می‌کنند. بهبـود جریـان آب با افـزودن حساب‌شده دی‌اکسید کربن (CO_2)یـا بی‌کربنات سدیم ($NaHCO_3$) می‌تواند رشـد تصـاعدی را طولانی‌تر کند. دی‌اکسید کربن و بی‌کربنات سدیم هر دو روی pH کشت اثر می‌گذارند، بنابراین برای حفظ کشت در بهتـرین شـرایط رشـد، ایـن مـوارد باید به‌طور کامل پـایش شـود. درکشت هـای تجـاری کنترل‌شده با تراکم فوق‌العاده بالا، به‌منظور افـزایش رشد در طـول دوره روشـنایی دی‌اکسید کـربن اضـافه می‌شود(Meier, 1955). پرورش تمام آبزیان به‌خصوص جلبک‌های دریایی مستلزم وجود اطلاعـاتی در رابطـه بـا گونـه انتخاب‌شده، تکنولـوژی کشـت و پـرورش، پاسـخ گونه‌های انتخاب‌شده بـه بعضـی از پارامترهـای محیطـی و مشـخص نمـودن بهتـرین محـیط رشـد هـر کشـت و مـواد مغـذی بـرای آن‌هاست. رشد هر میکرو جلبک در محـیط بسـته بـا افـزایش مـواد مغذی، افزایشpH به‌وسیله جذب کربن و کاهش دی‌اکسید کربن و افزایش متابولیک هـای سـلولی همـراه می‌باشد(Nigam *et al*., 2011). در تحقیقی Li و همکاران (۲۰۰۸) به بررسی اثرات منابع نیتروژن و غلظت‌هایشان روی رشد سلول و انباشتگی لیپید در ریز جلبک *N.oleoabundans* پرداختند و به این نتیجه رسیدند که: بالاترین میزان لیپید سلول، ۰/۴g/g در پایین‌ترین غلظت سدیم نیترات (۳mM) بدست آمد، درحالی‌که بالاترین باروری زیست‌توده $0/63\ g\ l^{-1}\ day^{-1}$ در ۱۰ میلی مول سدیم نیترات تولید شد(Li *et al*., 2008) در این پژوهش بالاترین میزان چربی کل۱/۳۲ گرم در لیتر در شرایط بدون منبع ازت و بالاترین میزان زیست توده ۸۴×۱۰^{۶} سلول در میلی لیتر در ۱۰میلی مولار مشاهده شد. در پژوهش Pruvost و همکاران (۲۰۰۹) به بررسی توانایی ریز جلبک *N.oleoabundans* در افزایش تولید زیست‌توده و اسیدهای چرب تحت شرایط محدودیت نیتروژن در فتوبیوراکتور پرداختند و دریافتند که گرسنگی ناگهانی و یا تصاعدیِ نیتروژن ($0/7m^{-2}\ day^{-1}$ g) باعث کاهش نرخ رشد، افزایش تولید لیپیدهای مهم و انباشتگی تری اسیل گلیسرول می‌گردد (Pruvost *et al*., 2009). همچنین در مطالعه دیگری توسط Bruwer و همکاران (۲۰۱۳) به بررسی کشت ریز جلبک‌ها در شرایط کمبود ازت پرداختند و دریافتند که محتوای پروتئین و کلروفیل کاهش و میزان کربوهیدرات و چربی افزایش می‌یابد (Bruwer *et al*., 1980).

محتوای روغن و اسیدهای چرب یک میکروارگانیسم وابسته به شرایط رشد می‌باشد (Rodolfi *et al*., 2009, Salama *et al*., 2013). برای مثال کاهش یا حذف منبع ازت در محیط کشت باعث افزایش میزان روغن تولیدی توسط ریز جلبک می‌شود. بر مبنای تحقیقات انجام شده، تغییرات فصلی و محدودیت نیتروژن بر تولیدات کل چربی و اسیدهای چرب ریز جلبک *Nannochloropsis oculata* مؤثر است که باعث تجمع اسیدهای چرب اشباع و تک زنجیره غیراشباع (بالای ۹۰ درصد) می گردد (Olofsson *et al*., 2014). افزایش تولید زیست‌توده و چربی کل سلول‌های ریز جلبکی از پارامترهای مؤثر در تولید تجاری سوخت بیودیزل هستند (Chen *et al*., 2012). اگرچه افزایش تولید زیست‌توده در ارتباط با شرایط مطلوب کشت و افزایش چربی کل سلول ریز جلبکی در اثر کمبود مواد مغذی ایجاد می‌شود (Halim *et al*., 2012). محدودیت نیتروژن باعث افزایش میزان چربی کل در اکثر سلول‌های ریز جلبکی می‌گردد(Parrish and Wangersky, 1987). با توجه به یافته های تحقیق حاضر، تجمع روغن در سلول‌های ریز

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-02]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1397.27.1.5.9]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2018.116407]

جلبک *N. oleoabundans* وابسته به زمان و فقر نیتروژن است. از طرفی با افزایش میزان غلظت نیترات، رشد در سلول‌های ریز جلبکی اتفاق می‌افتد که این امر در بسیاری از ریز جلبک‌ها صادق است (Nigam *et al*., 2011). با توجه به افزایش تعداد سلول‌های ریز جلبک با افزایش غلظت نیترات، میزان چربی کل سلول کاهش یافت و با کاهش غلظت ازت تعداد سلول‌ها کاهش و میزان چربی کل سلول افزایش یافت.

در این بررسی بیشترین رشد *N. oleoabundans* (۹۶×۱۰^{۶} سلول در میلی‌لیتر) در تیماری که دارای غلظت ۱/۲۵ گرم بر لیتر از بیکربنات سدیم بوده است رخ داد(شکل-۲) و که نشان‌دهنده واکنش مطلوب این ریز جلبک بر این میزان سدیم بی‌کربنات است و برای تولید انبوه با اضافه کردن این میزان می‌توان بیشترین زیست‌توده را تولید نمود. نظر به اثرات مثبت بی‌کربنات سدیم نسبت به سدیم نیترات بر رشد ریز جلبک *N. oleoabundans* در محیط کشت BBM که یک محیط کشت عمومی و ارزان‌قیمت می‌باشد، پیشنهاد می گردد که این محیط کشت برای تولید انبوه ریز جلبک *N. oleoabundans* مناسب می باشد.

منابع

کیائی، ا.، سلطانی، ن.، مظاهری اسدی، م.، دزفولیان،م. ۱۳۹۲. بررسی شرایط بهینه به منظور استفاده از سیانوباکتری *Synechococcus sp. ISC106* به عنوان کاندید تولید بیودیزل. نشریه علمی بوم شناسی آبزیان, ۲, ۵۱-۴۰

Bligh, E. G., Dyer, W. J., 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. Canadian Journal of Biochemistry and Physiology, 37(8):911-917, DOI:10.1139/o59-099

Breuer, G., Lamers, P.P., Martens, D. E., Draaisma, R.B., Wijffels, R.H., 2013. Effect of light intensity, pH, and temperature on triacylglycerol (TAG) accumulation induced by nitrogen starvation in Scenedesmus obliquus. Bioresour. Technol., 143, 1-9, DOI: 10.1016/j.biortech.2013.05.105

Bruwer, J., Hugo, F. and HAWKINS, C., 1980. Sunflower seed oil as an extender for diesel fuel in agricultural tractors . DOI: 10.1016/S0021-8634(84)80003-7.

Chen ,F., Liu, Z., Li, D., Liu, C., Zheng, P. and Chen, S., 2012. Using ammonia for algae harvesting and as nutrient in subsequent cultures. Bioresource technology, 121, 298-303 . DOI: 10.1016/j.biortech.2012.06.076.

Gordillo, F.J., Goutx, M., Figueroa, F.L. and Niell, F.X., 1998. Effects of light intensity, CO 2 and nitrogen supply on lipid class composition of *Dunaliella viridis*. Journal of Applied Phycology, 10, 135-144. DOI: 10.1023/A:1008067022973.

Halim, R., Harun, R., Danquah, M.K. and Webley, P.A., 2012. Microalgal cell disruption for biofuel development. Applied energy, 91(1), 116-121 . DOI:10.1016/j.apenergy.2011.08.048.

Jin, G., Yang ,F., Hu, C., Shen, H. and Zhao, Z.K., 2012. Enzyme-assisted extraction of lipids directly from the culture of the oleaginous yeast Rhodosporidium toruloides. Bioresource technology, 111, 378-382 DOI**:** 10.1016/j.biortech.2012.01.152 .

Lee, A.K., Lewis, D.M. and Ashman, P.J., 2012. Disruption of microalgal cells for the extraction of lipids for biofuels: processes and specific energy requirements. biomass and bioenergy, 46, 89-101 .DOI: 10.1016/j.biombioe.2012.06.034.

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-02]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1397.27.1.5.9]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2018.116407]

Lee, J.Y., Yoo, C., Jun, S.Y., Ahn, C.Y. and Oh, H.M., 2010. Comparison of several methods for effective lipid extraction from microalgae. Bioresource technology, 1, S75-77, DOI:1016/j.biortech.2009.03.058.

Li, Y., Horsman, M., Wang, B., Wu, N ,.and Lan, C.Q., 2008. Effects of nitrogen sources on cell growth and lipid accumulation of green alga *Neochloris oleoabundans*. Applied microbiology and biotechnology, 81(4), 629-636 .DOI**:** 10.1007/s00253-008-1681-1.

Liska, A.J., Shevchenko, A., Pick, U. and Kktz, A., 2004. Enhanced photosynthesis and redox energy production contribute to salinity tolerance in Dunaliella as revealed by homology-based proteomics. Plant physiology, 136, 2806-2817. DOI: 10.1104/pp.104.039438

Mata, T.M., Martins, A.A., and Caetano, N.S., 2010. Microalgae for biodiesel production and other applications: a review. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 14(1), 217-232 . DOI:10.1016/j.rser.2009.07.020.

Meier, R., 1955. Biological cycles in the transformation of solar energy into useful fuels. Solar energy research, 23, 179-183. doi: 10.1063/1.2718755.

Nigam, S., Rai, M.P. and Sharma, R., 2011. Effect of nitrogen on growth and lipid content of Chlorella pyrenoidosa. Am J Biochem Biotechnol, 7(3), 124-129 .DOI: 10.3844/ajbbsp.2011.126.131.

Nuzzo, G., Gallo, C., D'ippolito, G., Cutignano, A., Sardo, A. and Fontana, A., 2013. Composition and quantitation of microalgal lipids by ERETIC 1H NMR method. Marine drugs, 11, 3742-3753. DOI: 10.3390/md11103742.

Olguin, E.J., Mendoza, A., Gonzalez-portela, R.E. and Novelo, E., 2013. Population dynamics in mixed cultures of *Neochloris oleoabundans* and native microalgae from water of a polluted river and isolation of a diatom consortium for the production of lipid rich biomass. New biotechnology, 30, 705-715. DOI: 10.1016/j.nbt.2013.03.003.

Olofsson, M., Lamela, T., Nilsson, E., Bergé, J.P., Del Pino, V., Uronen, P. and Legrand, C., 2014. Combined effects of nitrogen concentration and seasonal changes on the production of lipids in *Nannochloropsis oculata*. Marine drugs, 12(4), 1891-1910 . DOI:10.3390/md12041891.

Parrish, C.C. and Wangersky, P.J., 1987. Particulate and dissolved lipid classes in cultures of Phaeodactylum tricornutum grown in cage culture turbidostats with a range of nitrogen supply rates. Marine Ecology Progress Series, 119-128 .

Pruvost, J., Van Vooren, G., Cogne, G. and Legrand, J., 2009. Investigation of biomass and lipids production with *Neochloris oleoabundans* in photobioreactor. Bioresource technology, 100(23), 5988-5995 .DOI: 10.1016/j.biortech.2009.06.004.

Rodolfi, L., Chini Zittelli, G., Bassi, N., Padovani, G., Biondi, N., Bonini, G., and

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-02]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1397.27.1.5.9]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2018.116407]

Tredici, M.R., 2009. Microalgae for oil: Strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. Biotechnology and bioengineering, 102(1), 100-112 DOI: 10.1002/bit.22033.

Salama, E.S., Kim, H.C., Abou-Shanab, R.A., Ji, M.K., Oh, Y.K., Kim, S.H. and Jeon, B.H., 2013. Biomass, lipid content, and fatty acid composition of freshwater *Chlamydomonas mexicana* and *Scenedesmus obliquus* grown under salt stress. Bioprocess and biosystems engineering, 36(6), 827-833 .DOI: 10.1007/s00449-013-0919-1.

Santos, A., Janssen, M., Lamers, P., Evers, W. and Wijffels, R., 2012. Growth of oil accumulating microalga *Neochloris oleoabundans* under alkaline–saline conditions. Bioresource technology, 104, 593-599 .DOI**:** 10.1016/j.biortech.2011.10.084**.**

Taher, H., Al-Zuhair, S., Al-Marzouqi, A.H., Haik, Y. and Farid, M., 2014. Effective extraction of microalgae lipids from wet biomass for biodiesel production. biomass and bioenergy, 66, 159-167 .DOI: 10.1016/j.biombioe.2014.02.034.

Tornabene, T., Holzer, G., Lien, S. and Burris, N., 1983. Lipid composition of the nitrogen starved green alga *Neochloris oleoabundans*. Enzyme and Microbial Technology, 5(6), 435-440 .DOI: 10.1016/0141-0229(83)90026-1.

Wang, D., Li, Y., Hu, X., Su, W. and Zhong, M., 2015. Combined enzymatic and mechanical cell disruption and lipid extraction of green alga *Neochloris oleoabundans.* International journal of molecular sciences, 16(4), 7707-7722 .DOI**:** 10.3390/ijms16047707.

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-02]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1397.27.1.5.9]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2018.116407]

Investigating the influence of different concentrations of sodium nitrate and sodium bicarbonate ingredients on biomass and lipids production on microalgae (*Neochloris oleoabundans*)

Mehrabi F.[1]; Jafarpour S.A.[*1]; Nematzadeh Gh.A.[2]

[*]a.jafarpour@sanru.ac.ir

1 -Fisheries Department, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran
2 -Plant breeding and BiotechnologyDepartment, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-02]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1397.27.1.5.9]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2018.116407]

Abstract

Carbon and nitrogen sources are considering as the essential substances for microalgae growth. In this study the effects of sodium Nitrate ($NaNO_3$) and sodium bicarbonate ($NaHCO_3$) on the growth rate of *N. oleoabundans* microalgae in BBM culture medium were investigated. In this regards, different concentrations of $NaNO_3$ as 0, 0.5. 1.0, 2.5, 5 and 10 and $NaHCO_3$ as 0, 0.25, 0.5, 0.75, 1.0 and 1.25 in BBM during 21 days were tested. According to the results, by application of 10 mM $NaNO_3$ the highest number of microalgae as $(84.66\pm0.577)\times 10^6$ cells/mL was recorded and in case of nitrogen absence no increase in cell numbers was observed (p <0.05). However, by increasing of the concentration of $NaNO_3$, the lipid production was decreased which the highest amount of lipid was recorded as 1.32 ± 0.27 gL^{-1} without nitrogen addition (p <0.05). In case of $NaHCO_3$, by addition of 1.25 gL^{-1} sodium bicarbonate the highest cell number as $(96\pm1.00)\times 10^6$ cell/mL was recorded whereas in its absence the lowest number of $(2.00\pm0.00)\times 10^6$ cell/mL was obtained (p <0.05). Similarly, by addition of higher amounts of $NaHCo_3$, the lipid production was decreased as its highest amount as 0.3 ± 0.144 gL^{-1} was produced at level of 0.25 gL^{-1} of $NaHCO_3$ (p <0.05). Considering the positive effects of $NaHCO_3$ on growth of *N. oleoabundans* on BBM, it is recommended to use it for mass production of this microalgae.

Keywords: *N. oleoabudnans microalgae*, biomass, sodium nitrate, sodium bicarbonate, BBM

[*]Corresponding author