

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

فرزانه مهرابی^۱، سید علی جعفرپور^{۲*}، 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 جلبک ها محسوب می شود، در این مطالعه اثر سدیم نیترات (NaNO_3) و سدیم بی کربنات (NaHCO_3) بر رشد ریز جلبک *N. oleoabundans* در محیط کشت BBM مورد بررسی 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 زمان ۲۱ روز استفاده گردید.

نتایج حاصله نشان داد که در غلظت ۱۰ حاوی میلی مولار ازت بیشترین تعداد $10^6 \times (84/66 \pm 0/577)$ سلول در میلی لیتر و در صورت عدم وجود ازت هیچ افزایشی در تعداد سلول ها مشاهده نشد. از سویی، با افزایش میزان غلظت ازت میزان چربی کل کاهش یافت و بیشترین میزان چربی کل در شرایط نبود ازت $1/32 \pm 0/27$ گرم در لیتر ثبت شد ($p < 0/05$). از طرفی افزودن ۱/۲۵ گرم بر لیتر سدیم بی کربنات در محیط رشد ریز جلبک بیشترین تعداد سلولی $10^6 \times (96 \pm 1/00)$ سلول در میلی لیتر و در صورت عدم وجود سدیم بی کربنات کمترین تعداد سلول ها $10^6 \times (2 \pm 0/0)$ مشاهده شد. همچنین با افزایش میزان NaHCO_3 در میزان چربی کل کاهش مشاهده شد و بیشترین میزان چربی کل $0/3 \pm 0/144$ گرم در لیتر در شرایط ۰/۲۵ گرم بر لیتر NaHCO_3 مشاهده گردید ($p < 0/05$). نظر به اثرات مثبت بی کربنات سدیم نسبت به سدیم نیترات بر رشد ریز جلبک *N. oleoabundans* در محیط کشت BBM که یک محیط کشت عمومی و ارزان قیمت می باشد، برای تولید انبوه ریز جلبک *N. oleoabundans* توصیه می گردد.

کلمات کلیدی: ریز جلبک *N. oleoabundans*، زی توده، سدیم نیترات (NaNO_3)، سدیم بی کربنات (NaHCO_3)، BBM

*نویسنده مسئول

مقدمه

امروزه پژوهش پیرامون محصولات گیاهی دارای روغن به منظور استحصال ماده اولیه تولید انرژی و حل مشکلات ناشی از محدودیت‌های آبی سوخت جهانی بسیار گسترش یافته است (Lee et al., 2012). میکرو جلبک‌ها بالاترین پتانسیل را برای تولید انرژی از خود نشان داده‌اند. این ارگانیزم‌ها 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 اکسیژن دارند 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 آبی‌پروری 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 از لحاظ 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. در صورتی که 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، CO₂ مغذی، 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 فراوری 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. oleoabundans* ۲ تا ۶ میکرومتر می‌باشد. مطالعات مختلفی در زمینه تأثیر ترکیبات محیط کشت بر تراکم زیست‌توده ریز جلبک *Neochloris oleoabundans* و بهبود کارایی استخراج روغن از ریز جلبک انجام شده است. از جمله آن‌ها می‌توان به پژوهش Santos و همکاران (۲۰۱۲)، به بررسی میزان رشد و تولید اسیدهای چرب در سطوح

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 غلظت‌های مختلف NaNO_3 (۰، ۰/۵، ۱، ۲/۵، ۵، ۱۰) گرم بر لیتر و NaHCO_3 (۰، ۰/۲۵، ۰/۵، ۱/۲۵، ۱، ۰/۷۵) گرم بر لیتر اضافه شد و سپس با استفاده از pH متر اسیدیتیه ابتدایی کشت ۷/۵ تنظیم شد.

جدول ۱: مشخصات محیط کشت BBM.
Table 1: Specifications of BBM culture medium.

ترکیبات	غلظت (گرم در لیتر)
NaNO_3	۲۵/۰۰
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	۲/۵۰
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	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 Dyer و Bligh (۱۹۵۹) انجام شد. بدین‌صورت که ۵۰ میلی‌لیتر ریز جلبک با گاز

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 آنجا که تاکنون هیچ مطالعه‌ای به صورت هم‌زمان به بررسی سطوح مختلف سدیم بی‌کربنات و سدیم نیترات در محیط BBM (Bold's Basal Medium) بر تعداد سلول‌های تولیدی و چربی کل در ریزجلبک *N. oleoabundans* چه در داخل و چه در خارج انجام نشده است بر این اساس هدف از این پژوهش بررسی قابلیت رشد سلولی ریز جلبک *N. oleoabundans* و تولید زیست‌توده و چربی کل در محیط BBM با سطوح مختلف سدیم نیترات و سدیم بی‌کربنات است.

مواد و روش کار

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 غلظت‌های مختلف NaNO_3 (۰، ۰/۵، ۱، ۲/۵، ۵، ۱۰) گرم بر لیتر و NaHCO_3 (۰، ۰/۲۵، ۰/۵، ۱/۲۵، ۱، ۰/۷۵) گرم بر لیتر اضافه شد و سپس با استفاده از pH متر اسیدیتیه 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 هم‌دمای 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).

وزن اولیه- وزن نهایی = درصد لیپید کل

روش‌های تجزیه و تحلیل آماری

این پژوهش به صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شده و آزمایش‌ها در سه تکرار صورت گرفت. آنالیز آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS19 انجام شد. داده‌های مختلف به صورت میانگین $\pm$ 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 $p < 0.05$ استفاده شد.

نتایج

تأثیر غلظت‌های مختلف NaNO_3 بر افزایش تعداد سلول‌های 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 سلول‌ها به طور معنی‌داری ($p < 0.05$) افزایش می‌یابد.

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 دور ۳۰۰۰ rpm 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 جدا شده 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 ویال‌ها دوباره وزن شدند (W2) و میزان لیپید کل با اختلاف بین وزن اولیه و ثانویه برحسب درصد محاسبه شد (Nigam et al., 2011).

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

Table 2: Effect of different concentrations of NaNO_3 on cell number per mili litre during 21 days.

NaNO_3 (mM)						روز	تعداد
۱۰	۵	۲/۵	۱	۰/۵	۰		سلول
aA	aA	aA	aA	aA	aA		در
$61/66 \pm 1/527^{bB}$	$46/33 \pm 1/527^{eB}$	$37/33 \pm 1/527^{dB}$	$24/66 \pm 1/154^{cB}$	$7/33 \pm 1/527^{bB}$	aA	۵	$10^6 \times$
$74/33 \pm 1/527^{fC}$	$48/00 \pm 1/00^{eC}$	$37/33 \pm 2/081^{dB}$	$27/66 \pm 1/527^{cC}$	$11/66 \pm 1/527^{bC}$	aA	۱۰	میلی لیتر
$81/33 \pm 1/527^{fD}$	$51/00 \pm 1/00^{eD}$	$38/66 \pm 0/577^{dB}$	$32/00 \pm 1/00^{cD}$	$15/33 \pm 0/577^{bD}$	aA	۱۵	
$84/66 \pm 0/577^{fE}$	$55/66 \pm 1/527^{eE}$	$41/00 \pm 1/00^{dC}$	$33/66 \pm 3/214^{cD}$	$21/33 \pm 1/527^{bE}$	aA	۲۱	

حروف بالانویس کوچک متفاوت در هر ردیف بیانگر اختلاف معنی‌دار بین غلظت‌های مختلف NaNO_3 است.

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

Small superscript letters in each row indicates the significant difference among NaNO_3 concentrations

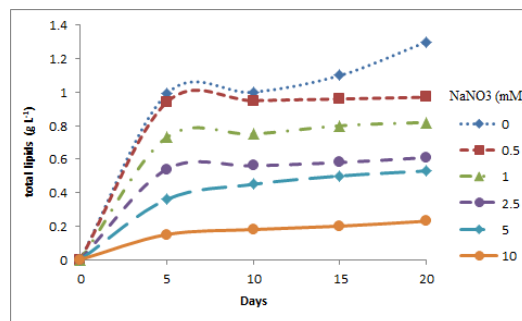
Capital superscript letters in each column indicates the significant difference during experimental days

سلول‌های ریزجلبک *N. oleoabundans* بعد از یک دوره کشت ۲۱ روزه است. همان‌طور که نشان داده شده است کمترین چربی کل تولیدی در سلول‌های ریزجلبک (0.23 ± 0.1) گرم بر لیتر) مربوط به غلظت ۱۰ میلی

در غلظت ۱ میلی مولار NaNO_3 در روزهای ۱۵ و ۲۱ و در غلظت ۲/۵ میلی مولار در روزهای ۵، ۱۰ و ۱۵ اختلاف معنی‌داری در تعداد سلول‌های ریزجلبک مشاهده نشد ($p > 0.05$). همچنین شکل ۱ بیانگر تأثیر غلظت‌های مختلف NaNO_3 بر چربی کل تولید شده در

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 ریز جلبکی به طور معنی داری ($p < 0.05$) افزایش نشان می دهند. به طوری که بیشترین تعداد $1.06 \times (96 \pm 1/0.0)$ 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 (۰/۳۵ ± ۰/۱۴۴ گرم بر لیتر) در سطح ۰/۲۵ گرم بر لیتر سدیم بی کربنات در روز ۲۱ می باشد.

مولار در روز ۲۱ و بیشترین چربی کل (1.32 ± 0.27) گرم بر لیتر) در شرایط بدون ازت در روز ۲۱ می باشد.



شکل ۱: اثر غلظت های مختلف NaNO_3 بر میزان چربی کل ریز جلبک *N. oleoabundans* در مدت زمان ۲۱ روز

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

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.

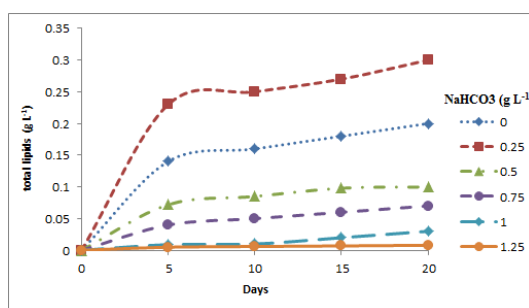
NaHCO_3 (g L ⁻¹)						روز	تعداد
۱/۲۵	۱	۰/۷۵	۰/۵	۰/۲۵	۰		سلول
۲/۰۰ ^{aA}	۲/۰۰ ^{aA}	۲/۰۰ ^{aA}	۲/۰۰ ^{aA}	۲/۰۰ ^{aA}	۲/۰۰ ^{aA}	۰	۱۰ ^۶ ×
۷۹/۰۰±۱/۰۰۰ ^{FB}	۵۸/۰۰±۱/۰۰۰ ^{EB}	۴۲/۶۶±۰/۵۷۷ ^{dB}	۲۹/۰۰±۱/۰۰۰ ^{cB}	۱۷/۶۶±۲/۰۸۱ ^{bB}	۲/۰۰ ^{aA}	۵	میلی لیتر
۸۵/۶۶±۲/۰۸۱ ^{FC}	۶۳/۳۳±۰/۵۷۷ ^{cC}	۴۵/۳۳±۰/۵۷۷ ^{dC}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

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 significant difference among NaNO_3 concentrations

Capital superscript letters in each column indicates the significant 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 مدت زمان ۲۱ روز

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

بحث

رشد خوب کشت‌های میکرو جلبک‌ها به تعادل مناسب بین مواد غذایی اصلی و فرعی بستگی دارد. عدم تعادل این مواد اغلب منجر به توقف رشد کشت می‌شود. تمام شدن مواد غذایی یکی از مهم‌ترین عوامل محدودکننده رشد و کنترل‌کننده کیفیت غذایی در کشت‌های متراکم است. بسیاری از کودها، حاوی مقادیر ناکافی نیتروژن یا فلزات بی‌ثبات و به‌ویژه آهن هستند که می‌تواند موجب کند شدن رشد ریز جلبک‌ها شود. میزان تأمین اکسیژن و دی‌اکسید کربن می‌تواند در کشت‌های بزرگ متراکم (تولید انبوه در مقیاس صنعتی) یک عامل محدودکننده باشد. میکرو جلبک‌ها در طول فتوسنتز دی‌اکسید کربن مصرف کرده و اکسیژن آزاد می‌کنند. بهبود جریان آب با افزودن حساب‌شده دی‌اکسید کربن (CO_2) یا بی‌کربنات سدیم (NaHCO_3) می‌تواند رشد تصاعدی را طولانی‌تر کند. دی‌اکسید کربن و بی‌کربنات سدیم هر دو روی pH کشت اثر می‌گذارند، بنابراین برای حفظ کشت در بهترین شرایط رشد، این موارد باید به‌طور کامل پایش شود. در کشت‌های تجاری کنترل‌شده با تراکم فوق‌العاده بالا، به‌منظور افزایش رشد در طول دوره روشنایی دی‌اکسید کربن اضافه می‌شود (Meier, 1955). پرورش تمام آبزیان به‌خصوص جلبک‌های دریایی مستلزم وجود اطلاعاتی در رابطه با گونه انتخاب‌شده، تکنولوژی کشت و پرورش، پاسخ گونه‌های انتخاب‌شده به بعضی از پارامترهای محیطی و مشخص نمودن بهترین محیط رشد هر کشت و مواد مغذی برای آن‌هاست. رشد هر میکرو جلبک در محیط بسته با افزایش مواد مغذی، افزایش pH به‌وسیله جذب کربن و کاهش دی‌اکسید کربن و افزایش متابولیک‌های سلولی همراه 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، 0.4 g/g در پایین‌ترین غلظت سدیم نیترات (3 mM) بدست آمد،

درحالی‌که بالاترین باروری زیست‌توده $1 \text{ day}^{-1} \text{ g l}^{-1}$ در ۱۰ میلی مول سدیم نیترات تولید شد (Li et al., 2008) در این پژوهش بالاترین میزان چربی کل $1/32$ گرم در لیتر در شرایط بدون منبع ازت و بالاترین میزان زیست توده 1.06×10^6 سلول در میلی لیتر در ۱۰ میلی 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 تصاعدی نیتروژن ($1 \text{ day}^{-1} \text{ g l}^{-1}$) 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) می‌گردد (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 یافته‌های تحقیق حاضر، تجمع روغن در سلول‌های ریز

- 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, CO₂ 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 *Rhodospiridium 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.
- 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* ($10^6 \times 96$ سلول در میلی‌لیتر) در تیماری که دارای غلظت $1/25$ 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 می‌گردد که این محیط کشت برای تولید انبوه ریز جلبک *N. oleoabundans* مناسب می‌باشد.

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 بوم‌شناسی آبریان، 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

- 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:10.1016/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/ajbbbsp.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**

- 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.

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 Biotechnology Department, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran

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 $(84.66 \pm 0.577) \times 10^6$ 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 $1.32 \pm 0.27 \text{ gL}^{-1}$ 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 $(96 \pm 1.00) \times 10^6$ cell/mL was recorded whereas in its absence the lowest number of $(2.00 \pm 0.00) \times 10^6$ 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 $0.3 \pm 0.144 \text{ gL}^{-1}$ 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. oleoabundans* microalgae, biomass, sodium nitrate, sodium bicarbonate, BBM

^{*}Corresponding author