



## بررسی اثر مقادیر مختلف نیتروژن و pH بر تولید بیومس، محتوای لیپید و ترکیب اسید چرب در اسپیرولینا ماژور

منصوره پاک نژادی<sup>۱\*</sup>، فاطمه ملک احمدی<sup>۲</sup>، ندا سلطانی<sup>۳</sup> و<sup>۴</sup>

<sup>۱</sup> گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهر قدس، تهران

<sup>۲</sup> گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم تحقیقات، تهران

<sup>۳</sup> گروه میکروبیولوژی نفت، پژوهشکده علوم پایه کاربردی، جهاددانشگاهی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران

<sup>۴</sup> پژوهشکده محیط زیست و توسعه پایدار سازمان حفاظت محیط زیست، تهران

### چکیده

نوع مقاله:

پژوهشی

تاریخچه مقاله:

دریافت: ۹۵/۰۶/۱۵

اصلاح: ۹۵/۱۱/۱۰

پذیرش: ۹۶/۰۹/۳۰

کلمات کلیدی:

اسپیرولینا

بیودیزل

پارامترهای

فیزیولوژیک

فاکتورهای محیطی

امروزه بیودیزل به دلیل مزیت‌های محیطی و پتانسیل تجدید پذیری‌شان، به‌عنوان یک سوخت مفید در دنیا مورد توجه قرار گرفته است. در این رابطه، ریز جلبک‌ها (سیانوباکتریها) به دلیل ترکیبات لیپیدی خود، به‌عنوان منابع مناسبی جهت تولید بیودیزل معرفی شده‌اند. هدف از این مطالعه، بررسی پتانسیل یک گونه از ریز جلبک‌ها به نام اسپیرولینا ماژور به‌عنوان یک تولیدکننده مناسب مواد خام بیودیزل می‌باشد. در این تحقیق، نمونه‌ها بعد از مرحله خالص‌سازی، در محیط کشت Zarrouk با دمای  $30^{\circ}\text{C}$ ، نور دائمی و  $\text{pH}=7$  نگهداری شدند. سپس تحت تأثیر مقادیر مختلف دو فاکتور محیطی نیتروژن ( $0/25-1/5\text{g/L}$ ) و  $\text{NaNO}_3=$  (۵ تا ۸) pH و نتایج نشان داد که میزان رشد و تولید ترکیبات مختلف به‌وسیله اسپیرولینا ماژور، با مقادیر دو فاکتور محیطی ارتباط دارند. غلظت پایین نیتروژن ( $0/25\text{g/L}$ ) و  $\text{pH}=7$  به‌عنوان بهترین شرایط برای افزایش میزان نرخ رشد، فتوسنتز، تولید اسیدهای چرب و سایر پارامترهای فیزیولوژیک از جمله فیکوبیلی پروتئین‌ها و کلروفیل در نظر گرفته شدند (به استثناء کارتنوئیدها که به غلظت بالایی از نیتروژن نیاز دارند). به‌علاوه، آنالیز لیپیدها نشان داد که ۸۰٪ اسیدهای چرب از نوع اشباع و غیراشباع با یک پیوند دوگانه بودند. همچنین پالمیتیک اسید و اولئیک اسید مهم‌ترین اسیدهای چرب جداسازی شده می‌باشند؛ بنابراین اسپیرولینا ماژور به دلیل تولید بالاترین و بهترین محتوای لیپیدی می‌تواند به‌عنوان یک کاندید مناسب برای سوخت بیودیزل معرفی گردد.

### مقدمه

استفاده بی‌رویه از سوخت‌های فسیلی می‌تواند خطر گرم شدن تدریجی زمین، آلودگی‌های زیست‌محیطی، کاهش تدریجی منابع سوختی و تولید گازهای گلخانه‌ای از قبیل دی‌اکسید کربن، دی‌اکسید گوگرد و اکسید نیتروژن را به همراه داشته باشد. این مسئله سبب شده است تا دانشمندان به‌منظور جلوگیری از عواقب ناشی از مصرف سوخت‌های فسیلی، درصدد تولید و جایگزین کردن منابع سوختی مناسب باشند (Milledge, 2011). بنابراین، تمایل محققین به منابع بیولوژیکی به‌عنوان یک انرژی جایگزین افزایش یافته است (Greenwell et al., 2010). رادولف دیزل (مخترع موتور دیزل) برای اولین بار در سال

\* نویسنده مسئول، پست الکترونیک: [paknejadi570@gmail.com](mailto:paknejadi570@gmail.com)

۱۹۰۰، فرضیه استفاده از روغن‌های گیاهی خوراکی را مطرح نمود، اما تولید بیودیزل از روغن‌های خوراکی باعث به وجود آمدن رقابت شدید در بازار و افزایش قیمت روغن گردید. استفاده از چربی‌های حیوانی با اینکه می‌تواند هزینه‌ها را کاهش دهد، اما به دلیل داشتن اسیدهای چرب اشباع فراوان، عدد ستان در این چربی‌ها بیشتر بوده و در دمای بالا تمایل زیادی به اکسیداسیون از خود نشان می‌دهند. امروزه محققین دریافته‌اند که در تولید بیودیزل، روغن‌های میکروبی به دلیل ساختار ویژه اسیدهای چرب خود نسبت به روغن‌های گیاهی ارجحیت دارند. بنابراین انتخاب ماده خام مناسب اولیه در تولید بیودیزل بسیار حائز اهمیت است (Jungblut et al., 2009; Ghasemi et al., 2012).

از مهم‌ترین میکروارگانیسم‌های مورد استفاده در این زمینه می‌توان به مخمرها، کپک‌ها، جلبک‌ها و ریز جلبک‌های یوکاریوتی و پروکاریوتی (سیانوباکتری‌ها) اشاره نمود (Angermayr et al., 2009; Tabatabaiea et al., 2011). به‌عنوان مثال، محققین از ریزجلبک‌هایی به نام *Neochloris oleoabundans*، *Haematococcus pluvialis* و *Nannochloropsis oceanica* جهت تولید بیودیزل استفاده کردند و به‌کارگیری نیترات را نسبت به اوره در تولید فراورده بیشتر ارجح دانستند (Li et al., 2008; Goksan et al., 2011; Chi et al., 2015). همچنین با استفاده از ریز جلبکی به نام *Chlorella vulgaris* و طی ایجاد یک تنش محیطی مانند کاهش غلظت نیترات در محیط کشت، افزایش قابل‌توجهی را در تولید بیومس و لیپیدهای مورد نیاز برای ساخت بیودیزل به دست آوردند (Jian-Ming et al., 2010; Scarsella et al., 2010).

تحقیق بر روی تولید بیودیزل از سیانوباکتری‌ها به‌ویژه گونه‌های جنس *دونالیلا* (*Dunaliella*)، *اسپیرولینا* (*Spirulina*) و *سندسموس* (*Scenedesmus*) از دهه ۱۹۵۰ میلادی آغاز شده است اما در طی سه دهه اخیر به‌واسطه استفاده از فرایندهای مختلف بیوتکنولوژی، پیشرفت زیادی داشته است (Spolaore et al., 2006). البته در ایران سابقه تحقیقات در این زمینه، از چند سال تجاوز نمی‌کند که از جمله می‌توان به تحقیقی بر روی شرایط بهینه سازی تولید سوخت بیشتر توسط سیانوباکتری‌هایی به نام *ISC106*، *Synechococcus* sp.، *Spirulina plantensis* و *Arthrospira (Spirulina) maxima* اشاره نمود. طی این تحقیق، pH قلیایی به عنوان یک فاکتور محیطی مفید معرفی گردید (Dejsungkranont et al., 2012; Mostafa et al., 2017; Kiaei et al., 2013). به‌طور کلی سیانوباکتری‌ها پروکاریوت‌های فتوسنتزکننده‌ای هستند که به صورت تک سلولی و گاهی چند سلولی وجود دارند. مانند گونه‌های جنس *اسپیرولینا* که از چند سلول استوانه‌ای در طول یک‌رشته ماریج تشکیل شده‌اند. سیانوباکتری‌ها دارای سرعت رشد بسیار بالایی در شرایط محیطی نظیر آب‌های شور و مناطق خشک می‌باشند. این میکروارگانیسم‌ها قادرند از انرژی خورشید، آب و دی‌اکسید کربن برای تولید ترکیبات ذخیره‌کننده انرژی از جمله کربوهیدرات، چربی و پروتئین استفاده کنند (Darzins et al., 2008; Celekli et al., 2009). بنابراین برای رشد خود به فاکتورهایی مانند نور، قند، دی‌اکسید کربن، آب، ازت، فسفر و پتاسیم نیاز دارند و می‌توانند در مدت زمان کوتاهی انواع لیپیدها، هیدرات‌های کربن و پروتئین‌ها را به‌عنوان محصولات متابولیکی با مقادیر قابل‌ملاحظه‌ای تولید کنند. بخش عمده این محصولات متابولیکی در اکثر سوخت‌های زیستی حائز اهمیت هستند (Mata et al., 2010).

آزمایشات نشان می‌دهند با اینکه اسپیریولینا حاوی ۷-۵ درصد ترکیبات لیپیدی می‌باشد، کم بودن میزان روغن و بیومس ریزجلبک‌ها یکی از دغدغه‌های اصلی تولید در مقیاس انبوه و صنعتی به شمار می‌آید. اما امروزه روش‌های کشت انبوه و استخراج فراورده‌های سوختی با شیوه‌های مختلف، سبب رفع این مشکل و توجیه منطقی در بعد صنعتی گردیده است (Otlis et al., 2001; Jansson, 2012).

یکی از مکانیسم‌هایی که سبب می‌شود ریزجلبک‌ها متابولیسم مواد لیپیدی خود را تغییر دهند، پاسخ به شرایط بحرانی و استرس ناشی از تغییر مقادیر منبع غذایی می‌باشد. بنابراین بسیاری از ریزجلبک‌ها تحت شرایط نامساعد محیطی یا استرس، مسیرهای بیوسنتتیک چربی خود را به سمت تشکیل و تجمع چربی‌های خنثی که عمدتاً به شکل تری اسیل گلسیرول (TAG) می‌باشد تغییر می‌دهند (Harwood, 1998). تحقیقات نشان داده است علاوه بر نرخ رشد، میزان تولید و کیفیت لیپید نیز در تولید بیودیزل مؤثر است. بنابراین کیفیت بیودیزل به عواملی چون چگالی، ویسکوزیته، عدد ستان (Cetane number)، نقطه ابری شدن (Cloud point)، نقطه ریزش و غیره بستگی دارد. با افزایش میزان اسیدهای چرب اشباع در بیودیزل، تعداد پیوندهای دوگانه کمتر و عدد ستان نیز بیشتر از ۶۰ خواهد شد در نتیجه زمان احتراق سوخت کاهش می‌یابد (Jungblut et al., 2009; Ghasemi et al., 2012).

بهینه‌سازی شرایط رشد سیانوباکتری‌ها پیچیده و به فاکتورهای مختلفی وابسته است؛ چون هرکدام از آن‌ها می‌توانند به‌عنوان عامل محدودکننده نیز عمل نمایند. از مهم‌ترین فاکتورها می‌توان به دما، هوادهی، تغییرات گازی، میزان تابش نور، شوری، pH و تراکم سلولی اشاره نمود. مطالعات نشان داده‌اند که میزان کم نیتروژن در محیط کشت، با افزایش محتوای چربی رابطه مستقیمی دارد. بنابراین اگر سیانوباکتری‌ها (ریز جلبک‌ها) که دارای میزان بالایی از چربی می‌باشند تحت شرایط استرس قرار گیرند، تجمع چربی به‌عنوان مواد ذخیره‌ای در غشاء تیلاکوئیدی آن‌ها افزایش می‌یابد (Rittmann, 2008).

هدف از این مطالعه، تعیین میزان اثر دو فاکتور محیطی pH و نیتروژن ( $\text{NaNO}_3$ ) بر شرایط بقا، رشد و تولید بیومس، وضعیت رنگیزه‌ای، تولید و پروفایل اسیدهای چرب یک سیانوباکتری به نام *Spirulina major* جهت تولید سوخت بیودیزل می‌باشد. لذا با استفاده از نرم‌افزار DOE تأثیر مقادیر pH و غلظت‌های متفاوت  $\text{NaNO}_3$  بر کیفیت و کمیت بیومس تولیدی در کشت محدود ریز جلبک/اسپیروولینا مورد بررسی قرار گرفت.

## مواد و روش‌ها

### جمع‌آوری و کشت اولیه نمونه‌ها

کشت اولیه نمونه‌های ریز جلبک/اسپیروولینا مازور نگهداری شده در آزمایشگاه (نمونه‌ها قبلاً توسط یک گروه تحقیقاتی متخصص، از آب‌های دریای خزر جمع‌آوری و با استفاده از تکنیک مولکولی جداسازی و شناسایی شده بودند) با کمک پاساژهای متوالی بر روی محیط کشت اختصاصی جامد زاروک (Zarrouk agar) انجام شد و کلنی‌های خالص مجدداً بر روی پلیت‌های جداگانه کشت و نگهداری شدند (Andersen, 2005).

### رشد و تولید بیومس

جهت افزایش رشد و تولید بیومس به‌منظور تعیین نرخ رشد و پارامترهای فیزیولوژیک در مراحل بعدی آزمایش، نمونه‌های خالص شده به یک محیط کشت اختصاصی مایع زاروک (Zarrouk broth) در ارلن‌های ۵۰۰ میلی‌لیتری منتقل و تحت شرایط محیطی تنظیم شده رشد داده شدند. نمونه‌ها تحت تابش دائمی نور سفید با شدتی معادل ۲۰۰۰ لوکس قرار گرفتند که این روشنایی توسط شش لامپ مهتابی (فلورسنت) ۶۰ وات تأمین شد. درب ارلن‌ها توسط پنبه بسته شدند و هوادهی فقط با پمپ آکواریوم HAILEA 9620 و با شدت خروجی ۱۴ L/min انجام گردید. دمای مورد نیاز در اتاق کشت نیز  $26 \pm 2$  درجه سانتی‌گراد تنظیم شد.

### اثر فاکتورهای pH و نیتروژن بر بیومس

به‌منظور تیمار نمونه‌ها با دو فاکتور pH و نیتروژن، ابتدا محیط کشت مایع زاروک بدون منبع نیتروژن تهیه شد و سپس مقادیر مختلفی از نیترات سدیم (۰/۲۵، ۰/۵، ۱ و ۱/۵ گرم بر لیتر) به‌عنوان منبع نیتروژن به محیط کشت اضافه گردید. pH محیط کشت نیز با کمک بافرهای Mes و Hepes تنظیم شد. محیط‌های کشت در اتاق کشت با دمای  $30 \pm 1$  درجه سانتی‌گراد و تابش دائمی نور سفید ناشی از لامپ‌های فلورسنت نگهداری شدند.

### اثر فاکتورهای pH و نیتروژن بر نرخ رشد و پارامترهای فیزیولوژیک

#### تعیین نرخ رشد

در این تحقیق به‌منظور ترسیم منحنی رشد ریز جلبک *Spirulina major*، پس از نگهداری آن‌ها در محیط کشت زاروک و فراهم کردن شرایط بهینه رشد ( $\text{pH}=7$ ، شدت نور ۲۰۰۰ لوکس و دمای  $26 \pm 2$  درجه سانتی‌گراد)، دانسیته نوری و میزان بیومس اندازه‌گیری شدند. منحنی رشد/اسپیروولینا طی ۳ بار تکرار در مدت ۱۰ روز با کمک دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج ۶۸۰ نانومتر و رابطه ذکر شده محاسبه و سپس رسم گردید (Soltani et al., 2006):

$$\mu = \frac{\ln(\text{OD } t_2) - \ln(\text{OD } t_1)}{t_2 - t_1}$$

**سنجش کلروفیل**

در این مرحله، ابتدا ۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون جلبکی به مدت ۵ دقیقه با دور ۱۴۰۰۰ rpm تحت عمل سانتریفیوژ قرار گرفت. سپس ۱ میلی‌لیتر متانول خالص پس از جداسازی محلول رویی جایگزین گردید و نمونه‌ها به مدت یک روز در دمای ۴°C قرار داده شدند. سرانجام جذب نوری سوپرناتانت در طول موج ۶۶۵ نانومتر اندازه‌گیری و با استفاده از رابطه زیر مقدار کلروفیل برحسب میکروگرم بر میلی‌لیتر محاسبه شد (Marker, 1972):

$$C_{chl} (\mu\text{g ml}^{-1}) = 13.14 \times OD_{665nm}$$

**سنجش کاروتنوئید**

برای اندازه‌گیری میزان کاروتنوئید، از ۱ میلی‌لیتر سوسپانسیون جلبکی که کاملاً با پوتر هموزن شده بود، استفاده گردید. سوسپانسیون مذکور ۱۰ دقیقه با حداکثر سرعت سانتریفیوژ شد و پس از خارج کردن بخش رویی، ۱ میلی‌لیتر استن ۸۰ درصد به رسوب باقیمانده اضافه و با شدت بالا ورتکس گردید. مجدداً نمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه با حداکثر سرعت سانتریفیوژ شدند و طیف جذبی بخش رویی با استفاده از اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۶۱ و ۶۶۵ نانومتر در مقایسه با شاهد (استن ۸۰ درصد) ثبت گردید. غلظت کاروتنوئید با استفاده از فرمول زیر برحسب میکروگرم بر میلی‌لیتر مورد محاسبه قرار گرفت (Chamovitz, 1993):

$$Car (\mu\text{g ml}^{-1}) = [OD_{461nm} - (0.046 \times OD_{665nm})] \times 4$$

**سنجش بیلی پروتئین‌ها**

در این مرحله، ابتدا ۱۵۰ میکرولیتر گلیسرول به ۵ میلی‌لیتر سوسپانسیون جلبکی که با استفاده از سانتریفیوژ محیط کشت (۱۴۰۰۰ دور در ۵ دقیقه) جداسازی شده بود اضافه گردید و سپس به مدت یک روز در یخچال نگهداری شد. پس از سپری شدن مدت زمان مربوطه، به‌منظور شکسته شدن سلول‌ها، آب و استات سدیم ۰/۳ نرمال به سوسپانسیون افزوده شدند. پس از قرار دادن این محلول به مدت یک روز در تاریکی و سرما، محلول رویی با استفاده از سانتریفیوژ به مدت ۵ دقیقه جداسازی و جذب نوری آن در طول موج‌های ۵۶۲، ۶۱۵، ۶۵۲ و ۷۵۰ نانومتر مشخص گردید. سرانجام توسط روابط زیر میزان بیلی پروتئین‌ها (آلوفیکوسیانین، فیکوسیانین و فیکواریترین) برحسب میکروگرم بر میلی‌لیتر محاسبه شدند (Bermejo *et al.*, 2002):

$$\text{آلوفیکوسیانین} = [1000 (A_{652} - A_{750}) - 208 (A_{615} - A_{750})] / 5.09$$

$$\text{فیکوسیانین} = [1000 (A_{615} - A_{750}) - 474 (A_{652} - A_{750})] / 5.34$$

$$\text{فیکواریترین} = [1000 (A_{562} - A_{750}) - 2.41(PC) - 0.948(AP)] / 9.62$$

**بررسی پروفایل اسیدهای چرب**

به‌منظور بررسی پروفایل اسید چرب از تکنیک گاز کروماتوگرافی استفاده گردید. ابتدا ۰/۲۵ گرم ماده خشک را داخل ویال ۲ میلی‌لیتر ریخته و به آن ۵۰۰ میکرولیتر از محلول متانول اسیدی اضافه شد. جهت جلوگیری از تبخیر متانول، درب و یال‌ها با پارافیلیم به دقت پوشانده شدند. پس از ۲۰ ثانیه ورتکس، ویال‌ها داخل دستگاه ترموسایکلر به مدت ۲ ساعت تحت دمای ۸۰°C و دور rpm ۷۵۰ قرار گرفتند و بعد از ۵ دقیقه در دمای اتاق سرد نگهداری شدند. در مرحله بعد، ۳۰۰ میکرولیتر از محلول سدیم کلراید ۰/۹ درصد و ۱۵۰ میکرولیتر هگزان نیز اضافه و به مدت ۲۰ ثانیه ورتکس شدند. ویال‌ها به مدت ۵ دقیقه در دمای ۲۵°C با دور rpm ۳۰۰ سانتریفیوژ شدند تا دو فاز تشکیل گردد. در پایان، با تزریق یک میکرولیتر از فاز رویی هگزان به دستگاه گاز کروماتوگرافی (GC-Mass، مارک Varian، مدل ۴۰۰۰) دارای دتکتور FID و ستون CBPI-M25-025، پروفایل اسید چرب مورد ارزیابی قرار گرفت (Lu *et al.*, 2011).

**بررسی خصوصیات و میزان کل اسیدهای چرب**

برای تعیین خصوصیات و میزان کل اسیدهای چرب از دستگاه طیف سنجی مادون قرمز (FTIR, Model 510 Ray Leight) استفاده گردید. ابتدا ۱/۵ میلی‌لیتر از نمونه در دور ۱۰۰۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. محلول رویی دور ریخته شد و رسوب به کمک دستگاه لیوفریز خشک گردید. سپس ۱۰۰ میلی گرم از نمونه با ۱۰۰۰ میلی گرم برمید پتاسیم (KBr) در هاون مخلوط شد. قرص‌های مخصوص در دستگاه پرس تهیه گردید. در نهایت، میزان کلی اسید چرب در سیانوباکتری مورد ارزیابی قرار گرفت (Dean et al., 2010).

### سنجش فعالیت فتوسنتزی

به‌منظور سنجش فعالیت فتوسنتزی، ابتدا الکتروود دستگاه Oxyview (Hansatech Model No: oxyv1, U.K) با افزودن ۲ ml آب مقطر و تزریق گاز آرگون در دمای ۲۵°C تنظیم گردید و سپس سوسپانسیون جلبکی جایگزین آب مقطر شد. به‌ازاء هر یک میلی‌لیتر سوسپانسیون، میزان تصاعد اکسیژن طی تاباندن نور در فواصل زمانی گوناگون با استفاده از ضریب کالیبراسیون محاسبه گردید (Dodds, 1989):

$$\text{ضریب کالیبراسیون} = \text{O}_2 / (253/4)$$

### میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM)

جهت تهیه عکس با SEM، ابتدا نمونه‌ها به مدت ۴ ساعت در گلوٹارالدئید ۲/۵ درصد فیکس و سپس در بافر فسفات (PBS) شستشو داده شدند. نمونه‌ها پس از سانتریفیوژ، در غلظت‌های متوالی الکل (۱۰، ۳۰، ۵۰، ۷۰، ۹۰ و ۱۰۰) دهیدراته شدند. در نهایت، تمام نمونه‌ها بر روی قطعات فلزی قرار داده شدند و پس از پوشانده شدن با لایه بسیار نازکی از طلا، عکس‌برداری ۳ بعدی با کمک میکروسکوپ الکترونی نگاره انجام گردید (Diestra et al., 2007).

### آنالیز آماری

کلید داده‌های به دست آمده، توسط نرم‌افزارهای Excel و Spss مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. آنالیزهای آماری بر اساس سه تکرار در هر آزمون و همچنین آنالیز واریانس یک‌طرفه انجام شدند. در نهایت با کمک نرم‌افزار DOE، نمودارهای مربوطه طراحی و رسم گردید.

### نتایج

در این مطالعه، تأثیر فاکتورهای pH و نیتروژن بر بیومس، نرخ رشد و پارامترهای فیزیولوژیک مانند میزان کلروفیل و کاروتنوئید، میزان کل بیلی پروتئین (فیکوسیانین، آلفوکیوسیانین و فیکواریترین)، میزان فتوسنتز، میزان کل اسیدهای چرب (با کمک دستگاه FTIR) و پروفایل اسیدهای چرب (با استفاده از GC) بررسی شدند.

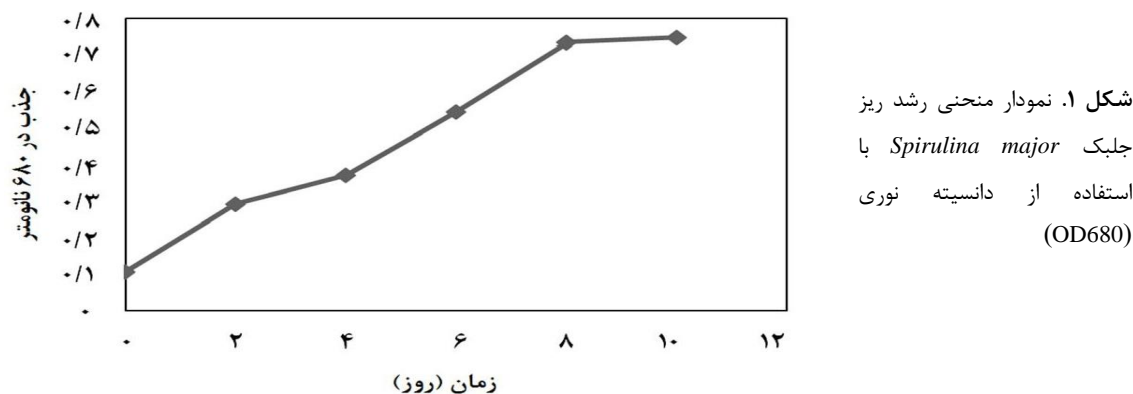
### بررسی تولید بیومس و نرخ رشد *Spirulina* جهت ترسیم منحنی رشد

بررسی منحنی رشد اسپیرولینا مازور نشان داد که این ریزجلبک بعد از طی فاز تأخیری (Lag Phase) در مدت دو روز، توانست خود را با محیط کشت سازگار نماید. با سپری کردن فاز رشد لگاریتمی (Log Phase)، رشد آن‌ها در محیط کشت به حداکثر رسید و سپس وارد فاز سکون (Stationary phase) شدند. بر این اساس در آزمایش‌های بعدی، نمونه‌برداری جهت بررسی تغییرات فیزیولوژیک، در ابتدای فاز سکون انجام شد و هر عدد به دست آمده جهت ترسیم نمودار، میانگین ۳ تکرار آزمایش می‌باشد (شکل ۱).

### بررسی فاکتورهای pH و نیتروژن بر نرخ رشد و پارامترهای فیزیولوژیک

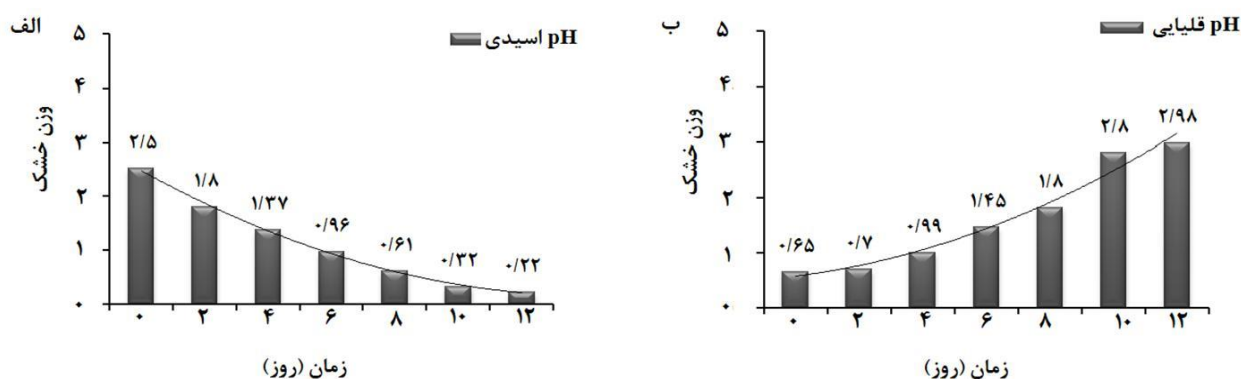
در این پژوهش اثر دو فاکتور pH و نیتروژن (نیترات سدیم) بر روی نرخ رشد و برخی از پارامترهای فیزیولوژیک نیز مورد ارزیابی قرار گرفتند. جهت بررسی هم‌زمان این دو فاکتور بر نرخ رشد و پارامترهای فیزیولوژیک از نرم‌افزار Design expert و

روش طراحی Central Composite استفاده شد. با کمک این روش، محاسبات طرح آماری سطح پاسخ برای بهینه‌سازی شرایط کشت و افزایش نرخ رشد طراحی و بررسی گردید. بر طبق جدول (۱) توسط روش Central Composite، مجموعه‌ای از ۱۳ آزمایش با ۵ تکرار در نقطه مرکزی طراحی شد.



### بررسی اثر pH و نیتروژن بر بیومس و آنالیز نتایج سطح پاسخ بر نرخ رشد

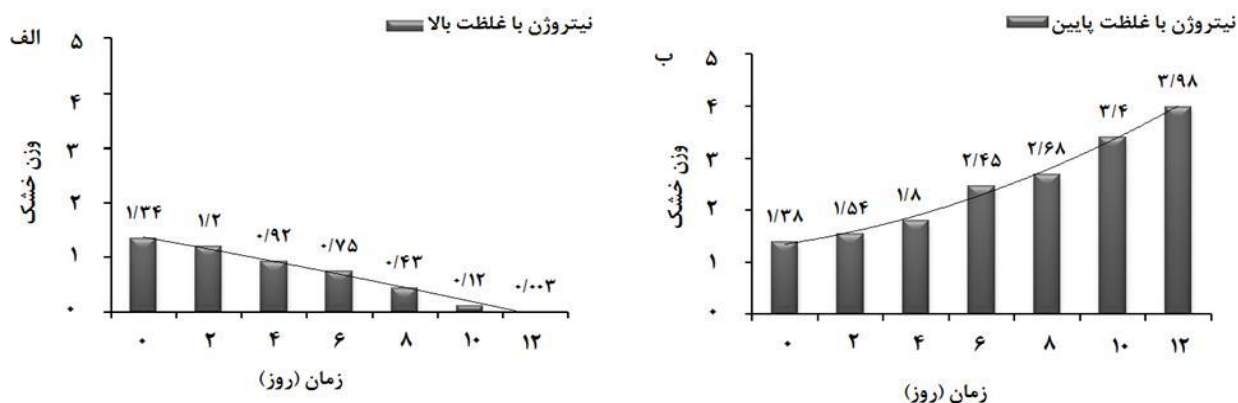
طی یک دوره ۱۰ روزه، نتایج میزان رشد و تولید بیومس (وزن خشک) در ریز جلبک *Spirulina major* نشان داد که در محیط قلیایی و غلظت‌های پایین نیترات نسبت به محیط اسیدی و غلظت‌های بالای نیترات، مقدار رشد و تولید بیومس بیشتر می‌باشد (شکل ۲ و ۳).



شکل ۲. نمودار تفاوت در وزن خشک (بیومس) جلبک *Spirulina major* در pH های (الف) اسیدی و (ب) قلیایی

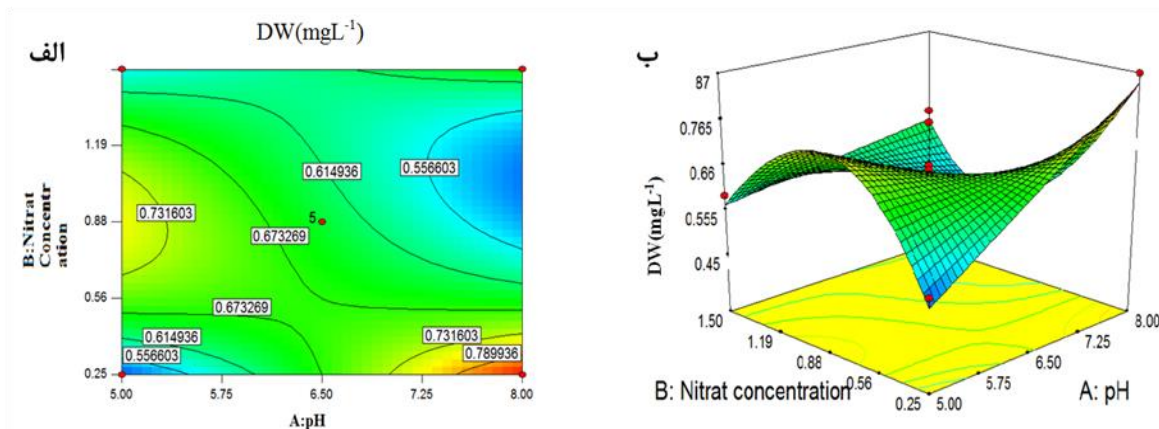
جدول ۱. طراحی آزمایش با نرم‌افزار Design expert و روش Central Composite

STD	RUN	pH	غلظت نیترات (%)	STD	RUN	pH	غلظت نیترات (%)
۱	۸	۷/۵۶	۰/۴۳	۱۰	۱	۵	۰/۸۸
۷	۵	۵/۴۴	۱/۳۲	۲	۲	۶/۵	۱/۵
۶	۱۰	۶/۵	۰/۲۵	۹	۳	۷/۵۶	۱/۳۲
۴	۱۱	۶/۵	۰/۸۸	۱۳	۴	۶/۵	۰/۸۸
۸	۱۲	۶/۵	۰/۸۸	۷	۵	۵/۴۴	۰/۴۳
۱۱	۱۳	۸	۰/۸۸	۳	۶	۶/۵	۰/۸۸
				۱۲	۷	۶/۵	۰/۸۸



شکل ۳. نمودار تفاوت در وزن خشک (بیومس) جلبک *Spirulina major* در غلظت‌های بالای نیترات (الف) و پایین نیترات (ب) پایین نیترات

با توجه به نمودار ۲ و ۳، بالاترین میزان رشد جلبک *Spirulina* در pH های بازی و غلظت‌های پایین نیترات به دست آمد. همچنین بیشترین میزان بیومس (وزن خشک)، در محیط‌های بازی (۲/۹۸ mg/ml) و غلظت‌های پایین نیترات (۳/۹۸ mg/ml) تولید گردید. جهت درک بهتر از تأثیر دو فاکتور مستقل pH و نیترات سدیم بر نرخ رشد از نمودار کانتور و سطح پاسخ استفاده شد که در شکل ۴ نشان داده شده است. در این بررسی مشاهده می‌شود که pH و غلظت‌های نیترات سدیم (نیتروژن) تأثیر عمده‌ای بر تغییرات نرخ رشد دارند ( $P < 0.0001$ ). به طوری که در محدوده  $\text{pH} = 7.5$  و  $\text{NaNO}_3 = 0.25 \text{ g/L}$  میزان رشد این جلبک به طرز چشمگیری افزایش یافته است. بنابراین محیط کشت دارای شرایط مذکور، به عنوان یک محیط مناسب جهت رشد ریز جلبک *Spirulina major* معرفی می‌گردد.



شکل ۴. نمودارهای کانتور (الف) و سطح پاسخ (ب) برای تأثیر فاکتورهای pH و نیترات سدیم بر نرخ رشد جلبک *Spirulina major*

آنالیز نتایج سطح پاسخ بر پارامترهای فیزیولوژیک

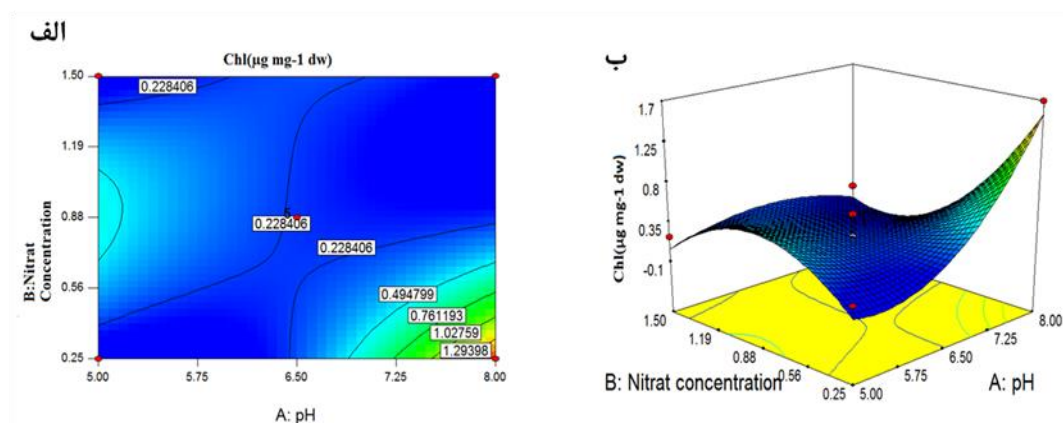
آنالیز نتایج سطح پاسخ بر میزان رنگیزه‌ها (کلروفیل و کاروتنوئید)

همانطور که در شکل ۵ مشخص شده است، در محدوده  $\text{pH} = 7.5$  و  $\text{NaNO}_3 = 0.25 \text{ g/L}$  میزان رنگیزه کلروفیل در این جلبک به طرز چشمگیری افزایش یافته است. در مقابل، میزان کاروتنوئیدها در محدوده pH اسیدی و غلظت نیترات سدیم  $1/5 \text{ g/L}$  بیشترین میزان را نشان داده است (شکل ۵ و ۶).

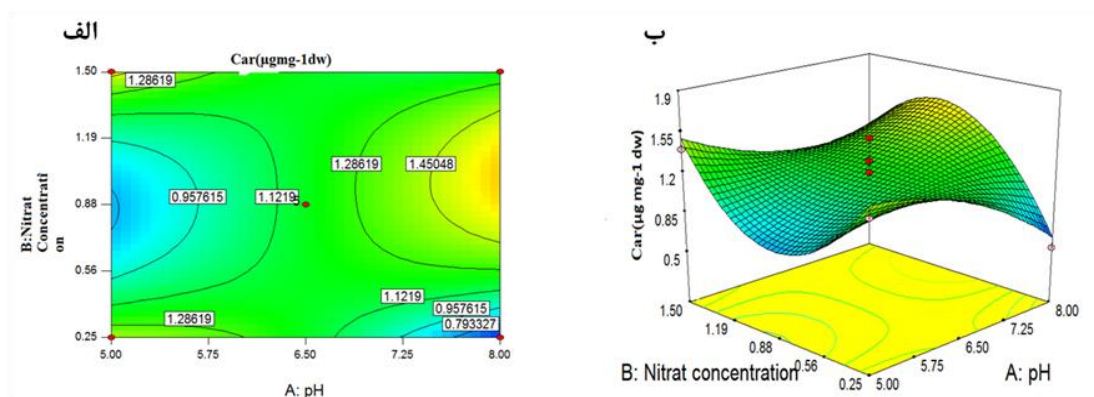
آنالیز نتایج سطح پاسخ بر میزان بیلی پروتئین‌ها

شکل ۷، نتایج آنالیز بر روی رنگیزه‌های بیلی پروتئین (فیکواریترین، آلفوکوسیانیین و فیکوسیانیین) جلبک اسپیرولینا ماژور را

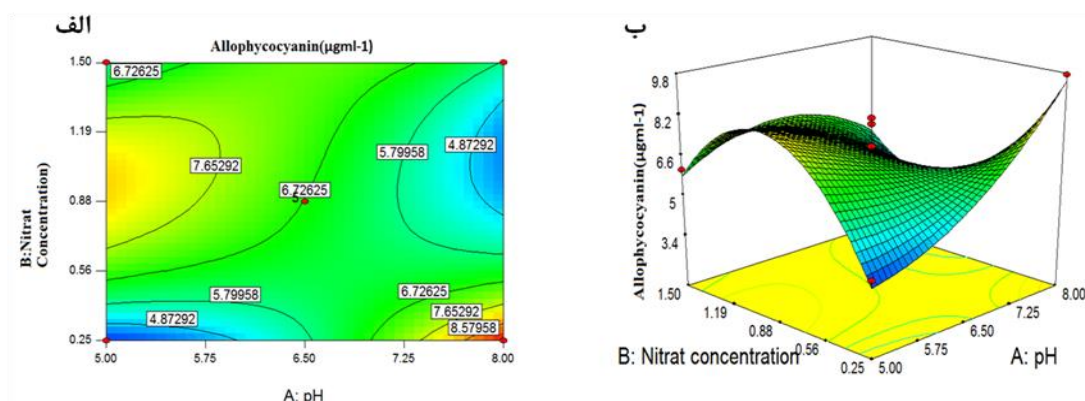
نشان می‌دهد که در تیمارهای بازی و غلظت پایین نیترات سدیم ( $\text{pH}=7/5$  و  $\text{NaNO}_3=0/25 \text{ g/L}$ )، میزان رنگیزه‌های مربوطه افزایش چشم‌گیری نشان دادند (شکل ۷، ۸ و ۹).



شکل ۵. نمودار کانتور (الف) و نمودار سطح پاسخ (ب) برای تأثیر pH و غلظت نیترات سدیم بر میزان کلروفیل در جلبک *Spirulina major*



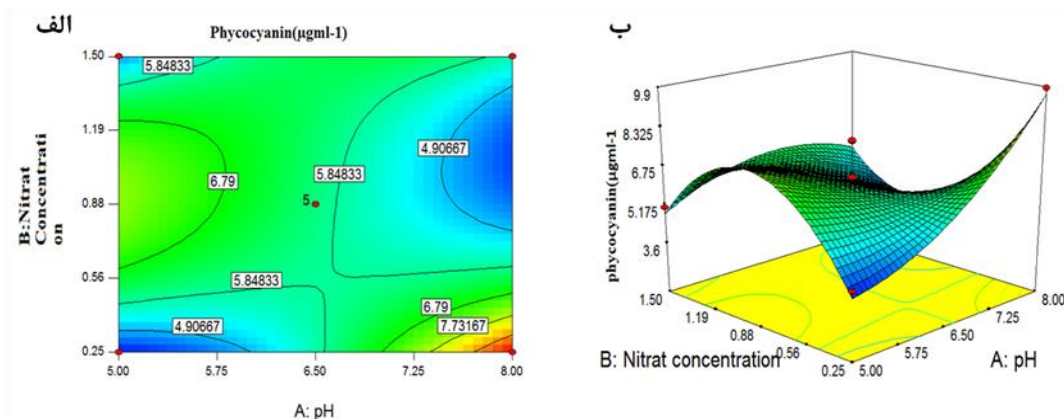
شکل ۶. نمودار کانتور (الف) و نمودار سطح پاسخ (ب) برای تأثیر pH و غلظت نیترات سدیم بر میزان کاروتنوئید در جلبک *Spirulina major*



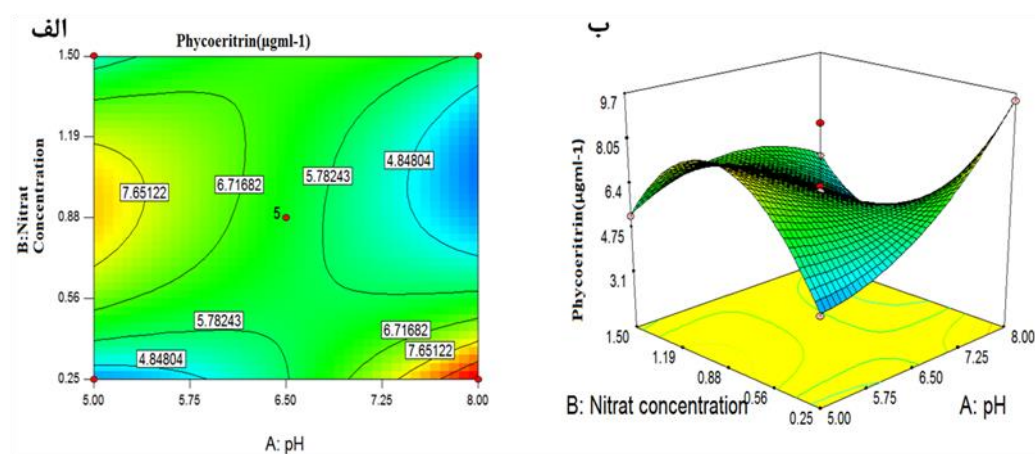
شکل ۷. نمودار کانتور (الف) و نمودار سطح پاسخ (ب) برای تأثیر pH و غلظت نیترات سدیم بر میزان آلفوفیکوسیانین در جلبک *Spirulina major*

#### آنالیز نتایج سطح پاسخ بر میزان فتوسنتز

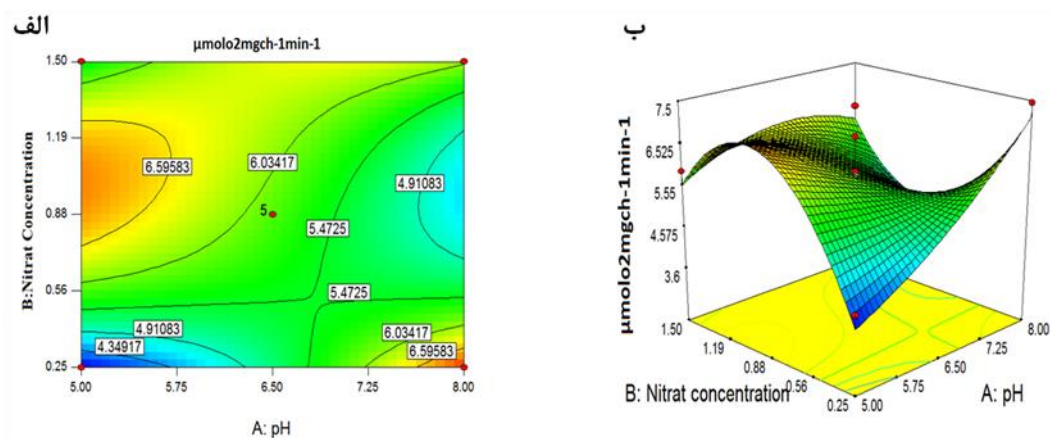
نتایج ما نشان داد که میزان فتوسنتز در محیطی با محتوای  $\text{HCO}_3^-$  بیشتر، افزایش می‌یابد. بنابراین در چنین محیطی، میزان فتوسنتز اسپیرولینا مائور به دلیل بازی شدن محیط افزایش می‌یابد. به طوری که بیشترین میزان فتوسنتز در  $\text{pH}=7/5$  و غلظت نیترات  $0/25 \text{ g/L}$  قابل تشخیص می‌باشد (شکل ۱۰).



شکل ۸. نمودار کانتور (الف) و نمودار سطح پاسخ (ب) برای تأثیر pH و غلظت نیترات سدیم بر میزان فیکوسیانین در *Spirulina major*



شکل ۹. نمودار کانتور (الف) و نمودار سطح پاسخ (ب) برای تأثیر pH و غلظت نیترات سدیم بر میزان فیکواریتین در جلبک *Spirulina major*

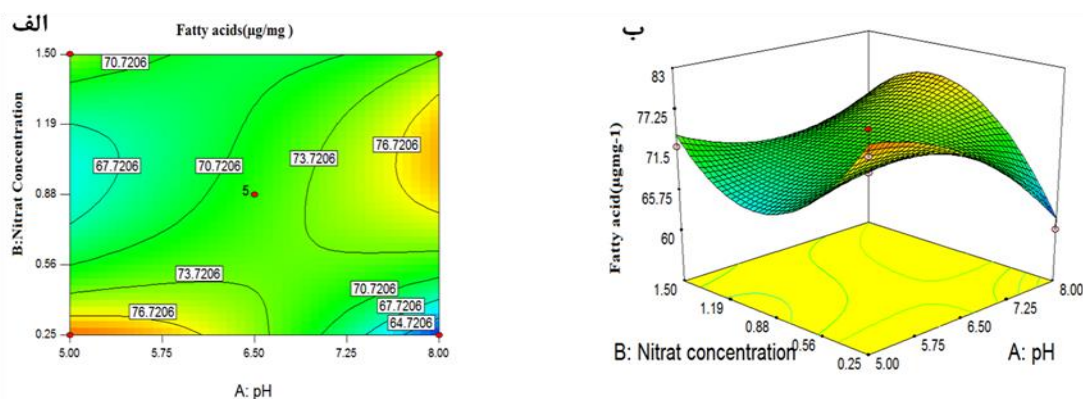


شکل ۱۰. نمودار کانتور (الف) و نمودار سطح پاسخ (ب) برای تأثیر pH و غلظت نیترات سدیم بر میزان فتوسنتز در جلبک *Spirulina major*

### آنالیز نتایج سطح پاسخ بر میزان پروفایل اسیدهای چرب

بر اساس نتایج به دست آمده توسط دستگاه GC-Mass، ۸۰٪ اسیدهای چرب از نوع اشباع و غیراشباع با یک پیوند دوگانه بوده و بیشترین سهم اسیدهای چرب در لیپیدهای مستخرج از اسپیرولینا مائور تیمار شده با فاکتورهای تحت بررسی (pH=۷/۵ و  $\text{NaNO}_3=0/۲۵ \text{ g/L}$ )، پالمیتوئیک اسید و اولئیک اسید می‌باشد. به‌علاوه، تری آسید گلیسرول (TAG) بیش از ۳۵٪ وزن این ریز جلبک را تشکیل می‌دهد و بیشترین سهم ترکیبات لیپیدی در مورد همه تیمارها، مربوط به اسیدهای چرب

۱۶ و ۱۸ کربنه است. در این مطالعه هنگامی که غلظت نیترات سدیم به بیشتر از ۱/۵ g/L رسید محتوی لیپید سلول‌های سیانوباکتری کاهش یافت در حالی که بیشترین میزان لیپید در محیط کشت در غلظت ۰/۲۵ g/L نیترات سدیم به دست آمد. بنابراین با افزایش غلظت نیتروژن، اسیدهای چرب اشباع کاهش و اسیدهای چرب غیراشباع افزایش یافت (شکل ۱۱). بدین ترتیب اسپیرولینا ماژور به دلیل تولید بالاترین محتوای لیپیدی به عنوان یک کاندید مناسب برای بیودیزل معرفی می‌گردد.



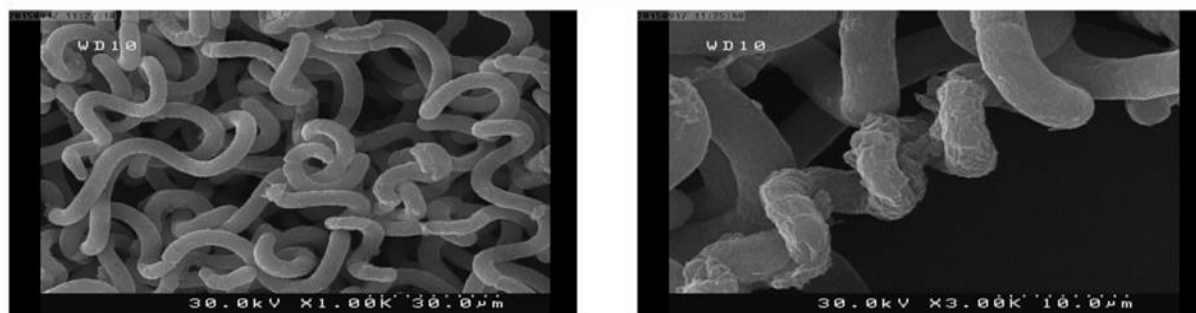
شکل ۱۱. نمودار کانتور (الف) و سطح پاسخ (ب) برای تأثیر pH و غلظت نیترات سدیم بر میزان اسیدهای چرب تولید شده در *Spirulina major*

#### آنالیز نتایج سطح پاسخ بر میزان طیف‌سنجی FTIR

در این تحقیق، با استفاده از FTIR ساختار اولیه لیپیدها به منظور شناسایی گروه‌های عاملی آنها تحت مطالعه قرار گرفتند. گروه‌های عاملی لیپیدی مستخرج از بیومس اسپیرولینا ماژور در محدوده  $4000-600 \text{ cm}^{-1}$  بررسی شدند. همه نمونه‌ها یک باند ارتعاشی در ناحیه  $3011-3010 \text{ cm}^{-1}$  دارند که مربوط به کشیدگی CH در پیوند C-H است. بنابراین مشاهده‌ی این باندها در طیف لیپیدهای مستخرج از سیانوباکتری اسپیرولینا نشان‌دهنده حضور گروه استری (C=O) می‌باشد. دو باند قوی نیز در نواحی  $2924-2922 \text{ cm}^{-1}$  و  $2854-2852 \text{ cm}^{-1}$  مشاهده شد که به ترتیب مربوط به کشیدگی متقارن و غیرمتقارن  $\text{CH}_2$  می‌باشند. تمامی این پیک‌ها می‌تواند ثابت کنند که نوع روغن مستخرج، قابل تبدیل به بیودیزل است. بنابراین استفاده از تکنیک FTIR جهت بررسی و تأیید بیودیزل تولید شده توسط ریز جلبک اسپیرولینا ماژور بسیار مفید می‌باشد.

#### نتایج میکروسکوپ SEM

تصاویر ۳ بعدی از جلبک اسپیرولینا توسط میکروسکوپ الکترونی نگاره (Scanning Electron Microscope) در شکل ۱۲ نشان داده شده است.



شکل ۱۲. تصاویر گرفته شده از جلبک اسپیرولینا با میکروسکوپ الکترونی SEM

## بحث

با توجه به محدودیت منابع انرژی فسیلی و اثرات نامطلوب آن‌ها بر محیط زیست، سوخت‌های با منشأ مواد آلی از جمله بیودیزل به دلیل شباهت به سوخت رایج به‌عنوان یک جایگزین مناسب مطرح می‌باشند. در سال‌های اخیر بیشترین مطالعات انجام شده در جهت یافتن منبع مناسب تولید سوخت‌های زیستی (از جمله بیودیزل)، استفاده از پسماندهای کشاورزی یا گیاهان (مانند سویا) می‌باشد. قبادیان با استفاده از روغن مستخرج از این گیاه، نتایج مشابهی با تحقیق اخیر و یافته‌های سایر محققان به دست آورد (Rostami et al., 2010). به دلیل اینکه روغن‌های گیاهی در زنجیره غذایی انسان قرار می‌گیرند، تولید بیودیزل از آن‌ها باعث افزایش قیمت روغن و ایجاد رقابت در بازار خواهد شد. لذا چنین مشکلاتی، سبب شد محققین مطالعات خود را معطوف به منابع دیگری از جمله استخراج روغن از ریزجلبک‌ها نمایند. نجفی و همکاران از یک ریزجلبک به نام *کلرلا ولکاریس* برای تولید بیودیزل استفاده نمودند و اذعان داشتند که استفاده از بیودیزل تأثیر محسوسی بر مصرف سوخت و کاهش تولید مونوکسید کربن دارد. بنابراین انتخاب ریزجلبک مورد نظر حائز اهمیت است زیرا علاوه بر بهره‌دهی مطلوب لیپید، اسید چرب مستخرج از نمونه‌های انتخاب شده باید دارای خواص فیزیکی و شیمیایی مورد نیاز برای تولید بیودیزل نیز باشند (Najafi et al., 2012).

در زمینه بررسی توانایی ریزجلبک‌های سیانوباکتری برای تولید بیودیزل تحقیقات وسیعی در دنیا در حال انجام می‌باشد. بهینه‌سازی شرایط رشد سیانوباکتری‌ها پیچیده بوده و به عوامل مختلفی مرتبط است که هرکدام می‌توانند بازدارنده یا تحریک‌کننده باشند. از آن جمله می‌توان به عواملی مانند مواد غذایی، دما، هوادهی، تغییرات گازی، میزان تابش نور، شوری، pH و تراکم سلولی اشاره کرد (Gardner et al., 2011). زمانی که جلبک‌ها تحت شرایط استرس ناشی از محرک‌های شیمیایی (شوری، pH و کمبود مواد غذایی مانند منبع کربن و ازت) قرار می‌گیرند، سنتز و تجمع تری آسید گلیسرول در سلول‌های آن‌ها به همراه تغییراتی در ترکیب اسیدهای چرب و لیپیدها با مقدار زیاد افزایش می‌یابد (Hu et al., 2006). در پژوهش حاضر، میزان رشد سیانوباکتری *Spirulina major* بر اساس جذب نوری در طول موج ۶۸۰ نانومتر اندازه‌گیری شد و نتایج (بر اساس نرم‌افزار طراحی آزمایش) نشان داد که افزودن  $\text{NaNO}_3$  در غلظت ۰/۲۵ g/L و  $\text{pH}=7/5$  می‌تواند موجب افزایش بیومس نسبت به نمونه‌ی شاهد شود.

Griffiths در تحقیق خود بیان کرد که تولید لیپید با میزان بیومس ارتباط دارد و محتوای لیپیدی به‌عنوان یک فاکتور کلیدی در کشت جلبک‌ها محسوب می‌شود اما با کاهش نیتروژن توانستند کاهش جزئی را در میزان بیومس مشاهده نمایند. بنابراین کمبود نیترات سبب کاهش بیومس و افزایش لیپید گردید (Griffiths et al., 2009). در نتایج به دست آمده از تحقیق ما نیز مشاهده شد که ریزجلبک *اسپیروولینا ماژور* در زمان کمبود نیترات (غلظت ۰/۲۵ g/L)، میزان تولید اسید چرب و بیومس خود را به ترتیب افزایش و کاهش می‌دهد. بنابراین میزان کم نیتروژن در محیط کشت با کاهش رشد و افزایش محتوای چربی رابطه مستقیمی دارد و تحت شرایط خاص، بسیاری از ریزجلبک‌ها می‌توانند چربی مناسب برای تبدیل به سوخت‌های مایع (جهت وسایل حمل و نقل) را تولید نمایند. این نتایج با تحقیق Ratledge و بسیاری از مطالعات دیگر همخوانی دارد (Ratledge, 2004).

موضوع کاهش رشد ریزجلبک‌ها و افزایش میزان تولید لیپیدها در شرایط فقر نیتروژن در اواخر سال ۱۹۴۰ مورد توجه زیادی قرار گرفت، به‌طوری‌که مشخص کردند میزان مواد لیپیدی تولید شده در جلبک‌ها تحت این شرایط بیش از ۷۵-۸۵ درصد افزایش می‌یابد و حتی میزان مواد لیپیدی نیز می‌تواند در جلبک *Prophydium cruentum* دو برابر تولید شود (Chisti, 2007). همچنین در سال ۱۹۸۴ گزارش شد که سوخت و ساز در سیانوباکتری‌های *Anacysti snidulans* و *Microcyxti* *Oscillatoria rubescens saeruginosa* و *Spirulina platensis* به‌طور قابل‌توجهی تحت تأثیر کمبود نیتروژن تغییر خواهد یافت (Piorreck et al., 1984). در تحقیقی دیگر نیز نشان داده شد که کاهش غلظت  $\text{NaNO}_3$  منجر به افزایش محتوای لیپید در سلول‌های *کلرلا* می‌شود، به‌طوری‌که در پایان زمان کشت، سلول‌هایی که در غلظت کمتری از  $\text{NaNO}_3$  کشت شدند، بیشترین میزان لیپید را تولید نمودند؛ زیرا مصرف سریع نیتروژن در محیط منجر به سنتز قابل‌توجهی از لیپیدها خواهد شد (Illman et al., 2000; Jian-Ming et al., 2010; Scarsella et al., 2010). Darzins و همکاران نیز در نتایج خود بیان کردند

گرچه کاهش ازت سبب توقف سیکل سلولی و مهار تولید انواع ترکیبات سلولی می‌شود ولی میزان سنتز لیپید به طرز چشمگیری افزایش می‌یابد که در نهایت باعث تجمع و ذخیره مواد چربی در این سلول‌های بحران‌زده ناشی از فقر منبع ازت می‌گردد (Darzins *et al.*, 2008). در سال ۲۰۰۹، محققین ثابت کردند که واکنش سیانوباکتری‌ها نسبت به کمبود ماده غذایی با جلبک‌های یوکاریوتی متفاوت می‌باشد. بنابراین برای تجمع چربی سلولی در سیانوباکتری‌ها،  $\text{NaNO}_3$  منبع نیتروژنی مناسب‌تری نسبت به سایر منابع مانند اوره می‌باشد (Widjaja *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2008; Goksan *et al.*, 2011; Chi *et al.*, 2015). این نتایج در تحقیقات مختلف و همچنین در تحقیق حاضر مورد تأیید قرار گرفته است.

یکی دیگر از فاکتورهای مؤثر بر رشد فیزیولوژیکی، فعالیت‌های متابولیکی و تولید بیومس در زمان کشت ریزجلبک‌ها از جمله اسپیرولینا ماژور، pH است. تحقیقات نشان می‌دهند که اسپیرولینا ماژور می‌تواند با شرایط محیطی دارای pH های متفاوت سازگار شود (Celekli *et al.*, 2009; Ogbondakh *et al.*, 2007). بنابراین پاسخ ریزجلبک‌ها نسبت به تغییرات pH، متفاوت است به طوری که کلروفیتا معمولاً pH پایین و pH بالا را می‌پسندند (Stanier *et al.*, 1977). به‌عنوان مثال، سیانوباکتری به نام *Synechococcus elongates* نسبت به pH=5 کاملاً حساس بوده و از روز هشتم رشد آن کاهش یافته و حتی در روز چهاردهم رشد کاملاً متوقف می‌شود. در تحقیقی دیگر که بر روی اسپیرولینا انجام شد، رشد آن‌ها نیز در pH=5 به میزان زیادی کاهش یافت ولی در pH=7/5 بالاترین میزان رشد را داشت (Ratledge, 2004). نتایج به دست آمده از تحقیق ما بر روی اسپیرولینا ماژور نیز نشان می‌دهد که رشد آن‌ها در pH زیر هفت کاهش می‌یابد و در pH=7/5 بالاترین میزان رشد را از خود نشان می‌دهد و این نتایج با یافته‌های بسیاری از تحقیقات قبلی همخوانی دارد (Dejsungkranont *et al.*, 2012; Kiaei *et al.*, 2013; Mostafa *et al.*, 2017). البته برخی از سیانوباکتری‌ها نظیر *Anabaena* دارای دامنه وسیعی از بردباری و سازگاری نسبت به تغییرات pH هستند که امکان رشد آن‌ها را در شرایط مختلف اکولوژیکی را فراهم می‌سازد (Amaro *et al.*, 2012). Soltani طی تحقیقی مشابه، اثر pH های مختلف (5، 7 و 9) را به همراه شدت‌های متفاوت نور (3 و 300 میلی مول فوتون بر متر مربع ثانیه) بر پاسخ‌های فیزیولوژیکی جلبک *Fischerella ambigua* بررسی نمود. نرخ رشد در pH=9 و pH=7 یکسان بود، اما رشد در pH=5 مشاهده نشد (Soltani *et al.*, 2006). همچنین Visviki در بررسی خود، رشد *Chlamydomonas* را در محدوده pH=1/4-8/4 مورد مطالعه قرار داد و بیان کرد که هیچ رشدی در محدوده 1/4 تا 3/4 وجود نداشت ولی بهینه رشد در pH های بالاتر (pH=7/4) مشاهده شد. البته با نگهداری محیط کشت برای بیش از 5 روز، رشد تصاعدی در 5/4 تا 4/8 مشاهده شد اما به‌طور کلی حداکثر رشد در pH=7/4 به دست آمد (Visviki *et al.*, 2000). از آنجایی که pH میزان حلالیت و دسترسی به دی‌اکسید کربن و دیگر مواد غذایی ضروری را تعیین می‌کند، می‌تواند تأثیر مهمی بر متابولیسم داشته باشد زیرا به علت جذب کربن غیر آلی توسط ریز جلبک‌ها، pH به‌طور معنی‌داری در محیط آن‌ها افزایش می‌یابد. همان‌طور که در تحقیقات نشان داده شده است حداکثر رشد جلبکی در محدوده pH خنثی رخ می‌دهد. بنابراین pH فاکتور اصلی تعیین‌کننده غلظت‌های انواع کربن در آب می‌باشد. pH بالاتر دسترسی به کربن حاصل از  $\text{CO}_2$  را محدود می‌کند و این موجب مهار رشد ریز جلبک‌ها می‌گردد. همچنین pH بالاتر تمایل جلبک را به  $\text{CO}_2$  آزاد کاهش می‌دهد (Juneja *et al.*, 2013; Feifei *et al.*, 2013). این موضوع در تحقیق ما نیز ثابت شد زیرا در pH=7/5، افزایش بیومس و بیشترین میزان تولید  $\text{C}_{16}$  و  $\text{C}_{18}$  نسبت به نمونه‌ی شاهد مشاهده گردید.

از پارامترهای فیزیولوژیک دیگری که تحت تأثیر فاکتورهای pH و نیتروژن می‌باشند می‌توان به رنگی‌های فتوسنتزی مانند کلروفیل، کاروتنوئید و بیلی‌پروتئین‌ها (فیکواریترین، آلفیکوسیانیین و فیکوسیانیین) اشاره نمود. نقش بیلی‌پروتئین‌ها محافظت از سیستم‌های فتوسنتزی در برابر تنفس نوری است که سبب تخریب فتوسیستم‌ها می‌گردد (Poza-carrion *et al.*, 2001). ساختار و عملکرد بیلی‌پروتئین‌ها در پاسخ به تنش‌های مختلف، متفاوت است. زیرا تمام سیانوباکتری‌ها فتواتوتروف بوده و بسیاری از آن‌ها می‌توانند از اجزای DOC (کربن آلی محلول) برای رشد هتروتروفی و یا میکسوتروفی خود در نور استفاده نمایند (Al-Hasan *et al.*, 2001). بیلی‌پروتئین‌ها که به سطح استرومایی غشای تیلاکوئیدی سیانوباکتری‌ها متصل هستند، به‌عنوان گیرنده‌های اولیه نوری برای فتوسیستم II (PSII) عمل می‌کنند. انتقال انرژی از پیگمان‌های اضافی مانند فیکواریترین (در صورت وجود) به فیکوسیانیین، سپس به آلفیکوسیانیین و در نهایت به گیرنده‌های نور با طول موج بالا صورت می‌پذیرد (Soltani *et al.*, 2006).

نتایج این تحقیق در مورد رنگیزه‌های فتوسنتزی، نشان داد که منحنی روند تغییرات کلروفیل، کاروتنوئید و فیکوبیلی پروتئین‌ها در تیمارهای اسپیرولینا ماژور نسبت به گروه‌های شاهد، افزایش معنی‌داری در  $\text{pH}=7/5$  و  $\text{NaNO}_3=0/25 \text{ g/L}$  دارد (به جز کاروتنوئید که در  $\text{NaNO}_3=1/5 \text{ g/L}$  افزایش می‌یابد). این نتیجه با برخی یافته‌های پیشین از جمله نتایج Al-Hasan همخوانی دارد (Al-Hasan et al., 1994). همچنین Poza-carrion نیز گزارش کرد که محتوای بیلی پروتئین‌های گونه‌های مختلف *Nostoc* می‌توانند در  $\text{pH}=7-9$  به‌طور مشخص افزایش یابند (Poza-carrion et al., 2001). Soltani طی تحقیق خود بر روی میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی در گونه‌های سیانوباکتری *Fischerella* در سه  $\text{pH}$  متفاوت (۵٫۷ و ۹) نشان داد که میزان فیکوسیانیین در  $\text{pH}=7$  و فیکواریترین، آلفیکوسیانیین و کلروفیل در  $\text{pH}=9$  افزایش می‌یابند (Soltani et al., 2006). در تحقیقی دیگر گزارش شد که کوچک‌ترین تغییری در مقدار کربن می‌تواند منجر به اثر مشخصی بر روی رشد و تجمع بیلی پروتئین‌ها شود به‌طوری‌که در محیطی با ۵۰٪ کاهش کربن و  $\text{pH}=7$  بیشترین میزان فیکواریترین و در  $\text{pH}=1$  کمترین میزان آن مشاهده شد. بنابراین میزان فتوسنتز اسپیرولینا ماژور در محیط‌های کشت حاوی  $\text{HCO}_3^-$  زیادتر، به دلیل بازی شدن محیط، افزایش می‌یابد و میزان تثبیت  $\text{CO}_2$  در سیانوباکتری‌ها به تجمع منابع کربن غیرآلی بستگی دارد (Chauhan et al., 2013). یافته‌های ما نیز این نتایج را تأیید می‌نماید زیرا در محیط‌های حاوی  $\text{HCO}_3^-$  بیشتر و  $\text{pH}=7/5$ ، میزان فتوسنتز افزایش یافت.

تنش‌های فیزیولوژیکی و غذایی (مانند افزایش نیتروژن) باعث تولید رادیکال‌های آزاد در سلول‌های جلبکی می‌شود، در نتیجه سبب تغییراتی نیز در محتوای آنتی‌اکسیدانی می‌گردد. رادیکال‌های آزاد، اشکال فعال اکسیژن هستند که در برخی از مراحل متابولیسم تولید می‌شوند و قادرند پروتئین‌ها، DNA و لیپیدهای غشایی را تخریب نمایند. ترکیبات آنتی‌اکسیدانی نظیر کاروتنوئیدها می‌توانند تا حدودی از تخریب‌های مذکور جلوگیری کنند. به‌عبارت‌دیگر، این ترکیبات با جذب انرژی تخریب‌کننده رادیکال اکسیژن، سبب تخریب این رادیکال‌ها می‌گردند (در اغلب موارد، این فرایند با تجزیه اسیدهای چرب غیراشباع با چند باند دوگانه شروع می‌شود) (Wang et al., 2015). Lee و همکاران ثابت کردند که وقتی ریزجلبک‌های جنس *Dunaliella* و *Haematococcus* تحت شرایط تنش محیطی قرار بگیرند مقادیر زیادی کاروتنوئید (چند برابر بیومس) در آن‌ها انباشته می‌گردد (Lee et al., 2010). این یافته با نتایج ما در خصوص افزایش کاروتنوئید به‌وسیله ازدیاد غلظت نیترات در محیط کشت همخوانی داشت. درحالی‌که Goiris و همکاران گزارش کردند که کاروتنوئیدها در محیط‌های کشت دارای محدودیت نیتروژن (حتی نسبت به محدودیت فسفر) افزایش قابل‌توجهی می‌یابند و این افزایش در کاروتنوئیدهای محافظتی نسبت به نوری بیشتر می‌باشد (Goiris et al., 2015).

تکنیک FTIR به‌عنوان یک روش مناسب جهت بررسی و تأیید بیودیزل تولید شده توسط ریز جلبک‌ها از جمله اسپیرولینا ماژور بسیار حائز اهمیت می‌باشد. به این منظور می‌توان از یک متد شناسایی استاندارد اروپایی با شماره EN14078 استفاده کرد (Elumalai et al., 2011). با کمک این روش، Dean و همکاران توانستند در دو یا چند باند لیپیدی، کشش قوی‌تری در ناحیه  $1300-1000 \text{ cm}^{-1}$  نسبت به باندهای دیگر شناسایی نمایند (Dean et al., 2010). محققان طی پژوهشی توانستند با بررسی طیف FTIR در تعدادی از لیپیدهای خالص مستخرج از ریز جلبک‌ها، دو باند قوی مربوط به  $\text{CH}_2$  و  $\text{CH}_3$  را در نواحی  $2925-2845$  و یک باند مربوط به  $\text{C}=\text{O}$  استری را در نواحی  $1746-1654 \text{ cm}^{-1}$  مشاهده نمایند. بنابراین ۳ گروه عاملی مذکور به‌عنوان اصلی‌ترین گروه‌های عاملی در ترکیبات لیپیدی معرفی شدند (Laurens et al., 2011). در تحقیقی دیگر نشان داده شده است که وجود یک باند در ناحیه  $2922-2870 \text{ cm}^{-1}$  مرتبط با  $\text{CH}_2$  می‌باشد (Albuquerque et al., 2003). همچنین در بررسی که توسط Kaplan انجام شد وجود باندی را در ناحیه  $1741-1737 \text{ cm}^{-1}$  (واقع در محدوده  $1750-1735 \text{ cm}^{-1}$ ) مشخص نمود که آن را به کشیدگی گروه کربوکسیلیک ارتباط داد (Kaplan et al., 1994). طی دو مطالعه دیگر، محققین در نقاط بین  $1820-1670 \text{ cm}^{-1}$  پیک قابل‌توجهی را مشاهده کردند که نشان‌دهنده حضور گروه‌های کربونیل بود. به‌علاوه در حد فاصل بین  $2930-2850 \text{ cm}^{-1}$  نیز پیک‌های ثبت شده، حضور گروه‌های متیلن را اثبات نمود. تمامی پیک‌های مشاهده شده در نواحی مذکور می‌توانند اثبات‌کننده نوعی روغن قابل تبدیل به بیودیزل باشند (Lin-vien et al., Elumalai et al., 2011).

(1991). نتایج FTIR به دست آمده در تحقیق ما، وجود هر سه پیک اصلی را در ترکیبات لیپیدی مستخرج از اسپیرولینا ماژور به وضوح نشان می‌دهد و آنالیز FTIR Spectroscopy نیز استخراج ترکیبات روغنی مناسب را تأیید می‌نماید. تکنیک گاز کروماتوگرافی یکی دیگر از روش‌های مناسب جهت بررسی اسیدهای چرب استخراج شده از ریزجلبک‌ها جهت تولید بیودیزل می‌باشد. نتایج این مرحله از تحقیق ما نشان داد که بیشترین سهم ترکیبات لیپیدی در همه تیمارهای اسپیرولینا ماژور، مربوط به اسیدهای چرب ۱۶ و ۱۸ کربنه است و اسیدهای چرب لینولئیک اسید، پالمیتیک اسید و اولئیک اسید بیشترین نقش را در تولید بیودیزل به خود اختصاص می‌دهند. این نتایج در موافقت با یافته‌های نجفی در مورد ریز جلبک *Chorella vulgaris* و همچنین Da Ros در رابطه با ۵ گونه از سیانوباکتری بود (Najafi et al., 2012; Da Rós et al., 2013). البته قابل ذکر است که تحت شرایط متفاوت رشد، تغییراتی در اسیدهای چرب حاصل از گونه‌های مختلف سیانوباکتری ایجاد می‌گردد. با این وجود، در تحقیقات مختلف و تحقیق حاضر، سیانوباکتریها به‌عنوان یک انتخاب مناسب برای تولید سوخت‌های بیودیزلی با کیفیت بالا در نظر گرفته می‌شوند زیرا حاوی مقادیر بالایی از اسیدهای چرب با یک پیوند دوگانه می‌باشند.

به‌طور کلی می‌توان نتیجه گرفت که سیانوباکتری اسپیرولینا ماژور به دلیل رشد سریع و قابلیت سازگاری با محیط‌های مختلف، یک نمونه بالقوه برای کارهای صنعتی می‌باشد و می‌تواند به‌عنوان منبع مطمئنی برای تولید سوخت و انرژی در نظر گرفته شود. میزان رشد و تولید فراورده‌های مختلف در این ریزجلبک به فاکتورهای متعددی در محیط کشت بستگی دارد از جمله pH و مواد غذایی (مانند منبع کربن و ازت). بنابراین در مباحث اکولوژی و اکوفیزیولوژی، میزان نیتروژن حائز اهمیت است و این مسئله در تحقیق حاضر نیز ثابت گردید به‌طوری‌که میزان نیتروژن با کاهش رشد و افزایش تولید فراورده‌ها رابطه مستقیم دارد. به این ترتیب، در غلظت  $\text{NaNO}_3 = 0/25 \text{ g/L}$  بیشترین میزان تولید لیپید و سایر پارامترهای فیزیولوژیک (به استثناء کاروتنوئید) مشاهده شد. همچنین اسیدیته خاک یا آب نیز یک عامل انتخابی برای تغییر جمعیت ریزجلبک‌ها و تولید فراورده‌های بیشتر آن‌ها قلمداد می‌شود در نتیجه پاسخ سیانوباکتری‌ها نسبت به تغییرات pH می‌تواند متفاوت باشد. این موضوع در تحقیق اخیر نیز به‌وضوح مشخص شده است و اسپیرولینا ماژور در  $\text{pH} = 7/5$  بهترین رشد و بیشترین میزان تولید لیپید را نشان داد.

### تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله، از همکاران در پژوهشکده جهاد دانشگاهی دانشگاه شهید بهشتی و معاونت پژوهشی فناوری دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهر قدس که در انجام این پروژه ما را یاری کردند، تشکر و قدردانی می‌نمایند.

### منابع

- Albuquerque, M.L.S., Guedes, I., Moreira, S.G.C. 2003. Infrared absorption spectra of Buriti (*Mauritia flexuosa* L.) oil. *Vibrational Spectroscopy*. 33: 127-131.
- Al-Hasan, R.H., Kanafer, M., Eliyas, M. and Radwan, S.S. 2001. Hydrocarbon accumulation by picocyanobacteria from the Arabian Gulf. *Journal of Applied Microbiology*. 91: 533-540.
- Amaro, H.M., Macedo, A.C., Malcata, F. 2012. Microalgae: An alternative as sustainable source of biofuels? *Review. Energy*. 44(1): 158-166.
- Andersen, R.A. 2005. *Algal culturing techniques*. 1st Edition. Elsevier Academic press. 165-184.
- Angermayr, S.A., Hellingwerf, K.J., Lindblad, P., Mattos, M.J. 2009. Energy biotechnology with cyanobacteria. *Current Opinion in Biotechnology*. 20: 257-263.
- Bermejo, R.N.R., Alva´rez-Pez, J.M., Acie´n Fern´andez, F.G., Molina Grima, E. 2002. Recovery of Pure B-phycoerythrin from the Microalga *Porphyridum Cruentum*. *Journal of Biotechnology*. 93: 7385.
- Celekli, A., Yavuzatmaca, M., Bozkurt, H. 2009. Modeling of biomass production by *spirulina platensis* as function of phosphate concentrations and pH regimes. *Bioresourc technology*. 100(14): 3625-3629.

- Chamovitz, D. 1993. Molecular analysis of the early steps of carotenoid biosynthesis in cyanobacteria: phytoene synthase and phytoenedesaturase. Ph.D. thesis. The Hebrew University of Jerusalem.
- Chauhan, S., Kaithwas, S., Kachauli, R. 2013. productivity of the cyanobacterium *spirulina platensis* inculture using high bicarbonate and different nitrogen sources. American Journal plant physiology. 8: 17-31.
- Chi, Y., Chen, F., Takiguchi, Y. 2015. Effect of Nitrogen Source on Biomass and Lipid Production of a Marine Microalga, *Nannochloropsis oceanica* IMET1. Green and Sustainable Chemistry. 5: 101-106.
- Chisti, Y. 2007. Biodiesel from microalgae. Biotechnology Advances. 25: 294-306.
- Da Rós, P.C.M., Silva, C.S.P., Silva-Stenico, M.E., Fiore, M.F. and De Castro, H.F. 2013. Assessment of Chemical and Physico-Chemical Properties of cyanobacterial Lipids for Biodiesel Production. Marine Drugs. 11(7): 2365-2381.
- Darzins, A., Hu, Q., Sommerfeld, M., Jarvis, E., Ghirardi, M., Posewitz, M., Seibert, M. 2008. Microalga triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. The Plant Journal. 54: 621-639.
- Dean, A.P., Sigeo, D.C., Estrada, B., Pittman, J.K. 2010. Using FTIR spectroscopy for rapid determination in response to nitrogen limitation in freshwater microalgae. Bioresource Technology. 101: 4499-4507.
- Dejsungkranta, M., Phoopat, N., Sirisansaneeyakul, S. 2012. Optimization of the Biomass Production of *Arthrospira (Spirulina)* Using Taguchi Method. The Open Conference Proceedings Journal. 3 (Suppl 1-M12): 70-81.
- Diestra, E., Esteve, I., Castell, O., Solé, A. 2007. Ultrastructural changes in *Microcoleus chthonoplastes* growing in the presence of crude oil. Applications for ecological studies. Modern Research and Educational Topics in Microscopy. Mendez-Vilas, A. and J. Diaz (eds.). Formatex, Hungary, ISBN-13: 9788461194209: 453-460.
- Dodds, W.K. 1989. Photosynthesis of two morphologies of *Nostoc paramelioides* (Cyanobacteria) as related to current velocities and diffusion patterns. Journal of Phycology. 25(2): 258-262.
- Elumalai, S., Sakthivel, R., Ganesh Kumar, S. 2011. Ultra Structural and Analytical Studies of Biodiesel Producing Microalgae (*Chlorella vulgaris* and *Senedesmis* sp). Collected from Tamil Nadu India. Current Botany. 2(6): 19-25.
- European Standard EN 14078: Liquid petroleum products – Determination of fatty acid methyl esters (FAME) in middle distillates – Infrared spectroscopy method.
- Feifei, H., Jiank, H., Yuanguang, L., Weilang, W., Minxi, W., Guomin, Sh., Jun, W. 2013. Enhanced lipid productivity of *Chlorella pyrenoidosa* through the culture strategy of semi-continuous cultivation with nitrogen limitation and pH control by CO<sub>2</sub>. Bioresource Technology. 136: 418-424.
- Gardner, R., Peters, P., Peyton, B., Cooksey, K.E. 2011. Medium pH and nitrate concentration effects on accumulation of triacylglycerol in two members of the chlorophyta. Journal Applied Phycology. 23: 1005-1016.
- Ghasemi, Y., Rasoul-Amini, S., Naseri, A.T. 2012. Microalgae biofuel potentials (Review). Applied Biochemistry and Microbiology. 48(2): 126-144.
- Goiris, K., Colen, W.V., Wilches, I., León-Tamariz, F., De Cooman, L., Muylaert, K. 2015. Impact of nutrient stress on antioxidant production in three species of microalgae. Algal Research. 7: 51-57.
- Goksan, T., Ak, I., Kilic, C. 2011. Growth characteristics of the alga *Haematococcus pluvialis* Flotow as affected by nitrogen source, vitamin, light and aeration. Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences. 11: 377-383.
- Greenwell, H.C., Laurens, L.M.L., Shields, R.J., Lovitt, R.W., Flynn, K.J. 2010. Placing microalgae on the biofuels priority list: a review of the technological challenges. Journal of the Royal Society of Medicine. Interface. 7(46): 703-726.
- Griffiths, M.J., Harrison, S.T.L. 2009. Lipid productivity as a key characteristic for choosing algal species for biodiesel production. Journal of Applied Phycology. 21: 493-507.

- Harwood, J.L. 1998. Membrane lipids in algae. In: Siegenthaler PA and Murata N (eds) Lipids in Photosynthesis: Structure, Function and Genetics (Siegenthaler, P.A. and Murata, N.). Dordrecht, the Netherlands: Kluwer Academic Publishers. pp. 53-64.
- Hu, Q., Zhang, CW. and Sommerfeld, M. 2006. Biodiesel from algae: lessons learned over the past 60 years and future perspectives. *Journal of Phycology*, 42(1): 12.
- Illman A.M., Scragg A. H., Shales S.W. 2000. Increase in chlorella strain calorific values when grown in low nitrogen medium. *Enzyme and microbial Technology*. 27: 631-635.
- Jansson, C. 2012. Metabolic engineering of cyanobacteria for direct conversion of CO<sub>2</sub> to hydrocarbon biofuels. *Progress in Botany*. 73: 81-93.
- Jian-Ming, L.V., Li-Hua, C., Xin-Hua, X., Lin, Z., Huan-Lin, C. 2010. Enhanced lipid production of *Chlorella vulgaris* by adjustment of cultivation conditions. *Bioresource Technology*. 101: 6797-6804.
- Juneja, A., Ceballos, R.M., Murthy, G.S. 2013. Effect of environmental factors and nutrient availability on the biochemical composition of alga for biofuels production. A Review. *Energies* 6: 4607-4638.
- Jungblut, A.D., Allen, M.A., Burns, B.P., Neilan, B.A. 2009. Lipid biomarker analysis of cyanobacteria-dominated microbial mats in meltwater ponds on the McMurdo Ice Shelf, Antarctica. *Organic Geochemistry*. 40(2): 258-69.
- Kaplan, M., Davidson, G., Poliakoff, M. 1994. Capillary supercritical fluid chromatography-Fourier transform infrared spectroscopy study of triglyceride and the qualitative analysis of normal and "unsaturated" cheeses. *Journal of Chromatography*. 673(2): 231-237.
- Kiaei, E., Soltani, N., Mazaheri Assadi, M., Khavarinegad, R., Dezfulian, M. 2013. Study of optimal conditions in order to the use of the cyanobacteria *Synechococcus* sp. ISC106 as a candidate for biodiesel production. *Journal of Aquatic Ecology*. 2(4): 40-51.
- Laurens, L.M.L., Wolfrum, E.J. 2011. Feasibility of spectroscopic characterization of algal lipids: chemometric correlation of NIR and FTIR spectra with exogenous lipids in algal biomass. *Bioenergy Research*. 4: 22-35.
- Lee, J.-Y., Yoo, C., Jun, S.-Y., Ahn, C.-Y., Oh, H.-M. 2010. Comparison of several methods for effective lipid extraction from microalgae. *Bioresource Technology*. 101(1): 75-77.
- Li, Y., Horsman, M., Wang, B., Wu, N., 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.
- Lin-Vien, D., Colthup, N.B., Fateley, W.G., Grasselil, J.G. 1991. *The Handbook of Infrared and Raman Characteristic Frequencies of Organic Molecules*. Academic Press, San Diego New York Boston.
- Lu, X., Guana, W., Zhao, H., Wang, C., Yanga, M., Baia, F. 2011. Quantitative analysis of fatty-acid-based biofuels produced by wild-type and genetically engineered cyanobacteria by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography*. 1218: 8289-8293.
- Marker, A.F.H. 1972. The use of acetone and methanol in the estimation of chlorophyll in the presence of phaeophytin. *Freshwater Biology*. 2: 361-385.
- Mata, T.M., Martins, A., Caetano, N.S. 2010. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 14: 217-232.
- Milledge, J.J. 2011. Commercial application of micro- algae other than as biofuels: a brief review. *Reviews in Environmental Science Biotechnology*. 10(1): 31-41.
- Mostafa, S.S.M., El-Gendy, N.Sh. 2017. Evaluation of fuel properties for microalgae *Spirulina platensis* bio-diesel and its blends with Egyptian petro-diesel. *Arabian Journal of Chemistry*. 10(2): S2040-S2050.
- Najafi, B., Torkian, M., Hejazi M.A., Zamzamin, A.A. 2012. Effect of Microalgae Biodiesel on Performance Parameters and Exhaust Emissions from IDI Diesel Engine. *Fuel and Combustion*. 4(2): 29-42.
- 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 Technology*. 98(11): 2207-2211.

- Otles, S., Pire, R. 2001. Fatty acid composition of *Chlorella* and *Spirulina* microalgae species. Journal of AOAC International. 84: 1708-1714.
- Piorreck, M., Pohl, P. 1984. Formation of biomass, total protein, chlorophylls, lipids and fatty acids in green and blue – green algae during one growth phase. Phytochemistry. 23(2): 217-233.
- Poza-Carrion, C., Fernandez-Valiente, E., Fernandez-Pinas, F., Leganes, F. 2001. Acclimation of photosynthetic pigments and photosynthesis of the Cyanobacterium *nostoc* sp. strain UAM206 to combined fluctuations of irradiance, pH, and inorganic carbon availability. Journal of Plant Physiology. 158(11): 1455-1461.
- Ratlidge, C. 2004. Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for single cell oil production. Biochemistry. 86(11): 807-15.
- Rittmann, B.E. 2008. Opportunities for renewable bioenergy using microorganisms. Biotechnology and Bioengineering. 100(2):203-212.
- Rostami, S., Ghobadian, B., Savadkouhi, L., Ebrahimi, R. 2010. Experimental Investigation of Effect of Injection Pressure on Performance of a Diesel Engine Using Blends of Biodiesel and Diesel. The Journal of Engine Research. 21: 73-83.
- Scarsella, M., Belotti, G., De Filippis, P., Bravi, M. 2010. Study on the optimal growing conditions of *Chlorella vulgaris* in bubble column photobioreactors. Chemical Engineering Journal. 20: 85-90.
- Soltani, N., Khavari-Nejad R.A., Tabatabaie, M. 2006. Variation of Nitrogenase Activity, photosynthesis and pigmentation of cyanobacterium *Fischerella ambigua* strain FS18 under different irradiance and pH. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 22(6): 571-576.
- Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E., Isambert, A. 2006. Commercial applications of Microalgae. Journal of Bioscience and Bioengineering. 101(2): 87-96.
- Stanier, RY., Cohenbazire, G. 1977. Phototrophic prokaryotes-Cyanobacteria. Annual Review Microbiology. 31: 225-274.
- Tabatabaie, M., Tohidfara, M., Salehi Jouzania, G., Safarnejad, M.R., Pazouki, M. 2011. Biodiesel production from genetically engineered microalgae: Future of bioenergy in Iran. Renewable and Sustainable Energy Reviews. 15: 1918-1927.
- Visviki, I., Santikul, D. 2000. The pH tolerance of *Clamidomonas applanata*. (Volvocales, Chlorophyta). Archives of Environmental Contamination and Toxicology. 38(2): 147-151.
- Wang, H-T., Yao, C-H., Liu, Y-N., Meng, Y-Y., Wang, W-L., Cao, X-P., Xue, S. 2015. Identification of fatty acid biomarkers for quantification of neutral lipids in marine microalgae *Isochrysis zhangjiangensis*. Journal of Applied Phycology. 27(1): 249-255.
- Widjaja, A., Chien, C.C., Ju, Y.H. 2009. Study of increasing lipid production from fresh water microalgae *Chlorella vulgaris*. Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers. 40: 13-20.