مجله بوم شناسی آبزیان

بررسی شرایط بهینه به منظور استفاده از سیانوباکتری *Synechococcus* sp. ISC106 به عنوان کاندید تولید بیودیزل

الهه کیائی[1*]، نداسلطانی[2]، مهناز مظاهری اسدی[3]، رمضانعلی خاوری نژاد[1]، مهروز دزفولیان[4]

[1] دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، گروه زیست شناسی، تهران، ایران

[2] پژوهشکده علوم پایه کاربردی جهاد دانشگاهی، گروه میکروبیولوژی نفت، تهران، ایران

[3] سازمان پژوهشهای علمی و صنعتی، گروه بیوتکنولوژی، تهران، ایران

[4] دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرج، گروه میکروبیولوژی، کرج، ایران

تاریخچه مقاله:

دریافت: ۹۲/۱۰/۱۵

اصلاح: ۹۲/۱۱/۰۸

پذیرش: ۹۲/۱۱/۲۰

کلمات کلیدی:

اسید چرب

کلروفیل

بیودیزل

سیانوباکتری *Synechococcus*

چکیده

گرم شدن تدریجی زمین به دلیل استفاده بی‌رویه از سوخت‌های فسیلی سبب شده تا دانشمندان درصدد تولید سوختی تجدیدپذیر و جایگزین سوخت‌های فسیلی باشند. هدف از این پژوهش تعیین شرایط بهینه برای تولید بیودیزل از سیانوباکتری *Synechococcus* sp. ISC106 در شرایط مختلف میزان نیتروژن و pH می‌باشد. نمونه‌برداری از جزیره خارک انجام شد. بعد از خالص سازی، نمونه در محیط کشت BG11 در دمای ۲۵ ^{o}C و pH ۷ نگهداری شدند. شناسایی نمونه به روش مورفولوژیک و مولکولی انجام شد. سپس نرخ رشد، میزان رنگیزه‌ها و فتوسنتز، تحت غلظت‌های ۰/۲۵، ۰/۵، ۱ و ۱/۵ درصد $NaNO_3$، و pHهای ۵، ۷ ، ۹ اندازه‌گیری شدند. میزان کل اسیدهای چرب با کمک دستگاه FTIR و پروفایل اسیدهای چرب با استفاده از GC سنجیده شد. نتایج نشان داد که بهترین شرایط رشد در غلظت ۱/۵ درصد $NaNO_3$ و pH ۷ رخ می‌دهد. بیشترین میزان رنگیزه و تولید اسید چرب در غلظت ۰/۲۵ درصد $NaNO_3$ و pH ۹ دیده شد. حداکثر محتوی لیپیدها از جمله متیل میرستات (۳۱/۸٪)، متیل پالمیتات (۱۴/۴۰٪)، متیل استئارات (۲۱/۴۹٪)، متیل اولئات (۵/۶۵٪)، متیل لینولئات (۱۴/۵۴٪)، متیل لینولنات (۵/۷۷٪) اندازه‌گیری شد. نتایج نشان می‌دهد، *Synechococcus* sp. ISC106 در شرایط استرس محیطی، تولید لیپید را افزایش می‌دهد.

مقدمه

امروزه انرژی به عنوان یکی از اساسی‌ترین نیاز صنایع، از جمله صتایع غذایی و کشاورزی محسوب می‌شود. درصد زیادی از کل انرژی جهان از سوخت‌های فسیلی تامین می‌شود، از آنجایکه منابع این سوخت‌ها محدود می‌باشد و با توجه به افزایش قیمت آنها افزایش گازهای گلخانه ای و مسایل زیست محیطی؛ تمایل به منابع بیولوژیک به عنوان انرژی جایگزین افزایش یافته است (Greenwell *et al.*, 2010). در سال ۱۹۹۰ رادولف دیزل برای اولین بار دیزل را از روغن گیاهی استخراج کرد. اما تولید

* نویسنده مسئول، پست الکترونیک: elahe_kiaei81@yahoo.com

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2026-11-23]

[DOR: 20.1001.1.23222751.1392.2.4.5.5]

بیودیزل از روغن های خوراکی باعث به وجود آمدن رقابت شدید در بازار و افزایش قیمت روغـن مـی گـردد. بنـابراین انتخـاب ماده خام مناسب اولیه در تولید بیودیزل مهم است. اگرچه استفاده از چربی‌های حیوانی می‌تواند هزینه‌ها را کاهش دهد اما بـه دلیل اسیدهای چرب اشباع زیاد، عدد ستان بالاتر داشته و به میزان زیادی در دمای بالا تمایل به اکسیداسیون دارند. بـه دلیـل ساختار ترکیب اسید چرب، روغن‌های میکروبی نسبت بـه روغـن‌هـای گیـاهی در تولیـد بیـودیزل تـرجیح داده مـی شـوند. از مهمترین میکروارگانیسم‌ها مورد استفاده می توان بـاکتری‌هـا، مخمرهـا، کپـک‌هـا، جلبـک‌هـا و سـیانوباکتری‌هـا را نـام بـرد (Tabatabaei *et al*., 2011; Angermayr *et al*., 2009).

سیانوباکتریها گروه بزرگی از میکروارگانیسم‌های فتوسنتز کننده‌ی پروکاریوتی به صورت تک‌سلولی و گاهی چند سلولی ساده می‌باشند. سرعت رشد بسیار بالا، همچنین رشد در شرایط سخت محیطی مانند آب‌های شور و مناطق خشک، تامین مواد غذایی از فاضلاب های گوناگون، فراهم سازی سود زیاد از پالایش زیستی فاضلاب ها، جذب دی اکسید کربن از گازهای حاصل از نیروگاه های با سوخت فسیلی و در نتیجه کاهش انتشار گازهای گلخانه ای، و همچنین تولید محصولات جانبی با ارزش، از مزایای استفاده از سیانوباکتری‌ها می باشد (Darzins *et al.*, 2008). این میکروارگانیسم ها برای رشد، به نور، قند، دی اکسید کربن CO_2، ازت، فسفر و پتاسیم نیاز داشته و در مدت زمان کوتاهی انواع لیپیدها، هیدرات‌های کربن و پروتئین‌ها را بعنوان محصولات متابولیکی به مقادیر قابل ملاحظه‌ای تولید می‌نمایند. بخش عمده این محصولات متابولیکی در غالب سوخت‌های زیستی حائز اهمیت هستند (Mata *et al*., 2010).

آزمایشات حاکی از آن است که حدود ۶۰-۸ درصد وزن خشک اغلب ریز جلبک ها را ترکیبات لیپیدی تشکیل می دهد، با این حال کم بودن میزان روغن و بیومس ریزجلبک ها یکی از دغدغه های اصلی تولید در مقیاس انبوه و صنعتی بوده است که با کمک روش‌های کشت انبوه و نیز استخراج فرآورده های سوختی به شیوه‌های مختلف از قبیل خشک کردن در دمای بالا، روش‌های مختلف ترموشیمیایی، اکسیداسیون بیومس جهت تولید گازهای قابل احتراق یا بیوگاز و سوزاندن مستقیم، تغییرات بیوشیمیایی جهت تبدیل بیومس به سوخت، استفاده از اولترا سوند و پالس‌های الکترومغناطیسی که در تخریب سلول‌ها و استخراج سوخت های مایع و یا سوخت های گازی مؤثرند، سبب رفع مشکل موصوف و توجیه منطقی در بعد صنعتی گردیده است (Jansson, 2011; Mutanda *et al*., 2011).

سوخت‌های زیستی، فاقد سولفور و ترکیبات آروماتیکی سوخت های فسیلی می باشند، احتراق آنها CO_2 اتمسفر را افزایش نمی‌دهد، تجزیه‌پذیر می‌باشد و غیرسمی است و تقریباً دارای ۱۰٪ اکسیژن می‌باشد که به احتراق آن در شرایط غنی از سوخت کمک می‌کند (Quintana *et al*., 2011). در طی فرآیند تولید بیودیزل مولکول های ترکیبات روغن یا چربی با یک الکل مانند متانول یا اتانول در حضور یک کاتالیزور اسیدی، قلیایی یا آنزیمی شرکت کرده و گروه OH الکل جایگزین زنجیره هیدروکربنی موجود در روغن می شود. در نتیجه استرهایی با ساختمان مولکولی جدید به نام استرهای آلکیل اسید چرب به وجود می آید (Lu *et al*., 2010).

یکی از مکانیسم‌هایی که سبب می شود ریزجلبک ها متابولیسم مواد لیپیدی خود را تغییر دهند، پاسخ به شرایط بحرانی و استرس ناشی از فقر منبع غذایی می باشد. تحت شرایط نامساعد محیطی یا استرس، بسیاری از جلبک ها مسیرهای بیوسنتتیک چربی خود را به سمت تشکیل و تجمع چربی خنثی (۲۰-۵۰ درصد وزن خشک) و عمدتاً به شکل تری اسیل گلیسرول (TAG) تغییر می دهند. بر خلاف گلیسرولیپیدهای موجود در غشاء، تری اسیل گلیسرول ها نقش ساختاری نداشته بلکه به عنوان منبع ذخیره کربن و انرژی در سلول عمل می کنند. با این حال، برخی از شواهد نشان می دهد که، در جلبک‌ها، مسیر بیوسنتز TAG ممکن است نقش فعالی در پاسخ به استرس های محیطی در کنار عملکرد آن به عنوان ذخیره کربن و انرژی ایفا می نماید.

همچنین وجود متغیرهای محیطی، از جمله مواد مغذی، میتواند اثر زیادی بر روی کمیت و کیفیت لیپید در ریزجلبک‌ها داشته باشد (Harwood, 1998).

تحقیقات نشان داده علاوه بر نرخ رشد و میزان تولید لیپید، کیفیت لیپید نیز در تولید بیودیزل موثر می باشد. کیفیت بیودیزل به عواملی مانند چگالی، ویسکوزیته، عدد ستان، نقطه ابری شدن، نقطه ریزش و ارزش حرارتی و... بستگی دارد. هرچه میزان

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2026-11-23]

[DOR: 20.1001.1.23222751.1392.2.4.5.5]

اسیدهای چرب اشباع بیودیزل بیشتر و پیوند دوگانه کمتر وجود داشته باشد، عدد ستان بیشتر از ۶۰ شده و زمان احتراق سوخت کاهش می یابد. اسیدهای چرب زنجیره کوتاه ویسکوزیته کمتری داشته و در نتیجه روانی آنها افزایش یافته و فشار کمتری به موتور وارد می گردد. همچنین افزایش میزان اسیدهای چرب اشباع باعث منجمد شدن در هوای سرد شده و بلورهایی در سوخت ایجاد می گردد. مشخص شده است که وجود اسیدهای چرب با طول حدود ۱۴ تا ۲۴ کربن و وجود یک پیوند دوگانه در طول آن در افزایش کیفیت سوخت موثر می باشد (Jungblut, 2009; Ghasemi *et al*., 2012).

این رویکرد مطالعه تولید بیودیزل از سیانوباکتریها در جهان چند دهه‌ای است که آغاز شده ولی در ایران این سابقه از چند سال تجاوز نمی کند. در تحقیقی قاسمی و همکاران جلبک *Chlamydomonas* sp. جدا شده از خاک زمین‌های کشاورزی در استان فارس را به عنوان کاندیدی برای تولید بیودیزل معرفی کردند. میزان لیپید آن نسبت به گونه‌های مطالعه شده در آن تحقیق ۲۵٪ افزایش نشان داد و حداقل ۹ نوع متیل استر اسید چرب در لیپید آن یافت شد (Morowvat *et al*., 2010).

Najafi و همکاران (۲۰۱۱) در مطالعه‌ای بر روی دریاچه‌های مختلف ایران به معرفی مختصری از منابع، وضعیت و چشم انداز جلبک‌ها به عنوان یک منبع انرژی پایدار برای تولید بیودیزل پرداختند.

هدف از این مطالعه تعیین شرایط بقا، رشد، وضعیت رنگیزه ای، تولید چربی و پروفایل اسیدهای چرب سیانوباکتری *Synechococcus* sp. ISC 106 در شرایط مختلف میزان نیتروژن و pH برای تولید بیودیزل می باشد.

مواد و روش‌ها

سیانوباکتری *Synechococcus* sp. ISC106 از سواحل جزیره خارک و جوامع اپی لیتیک موجود در این سواحل جمع‌آوری و بعد از انتقال به آزمایشگاه بر روی محیط‌های کشت جامد کشت داده شد. پس از پاساژهای متوالی کلنی های خاص مربوط به نمونه جداسازی شده و بر روی پلیت های مجزا قرار داده شدند (Andersen, 2005). سپس نمونه ها به محیط کشت تخصصی مایع BG11 منتقل شدند. به منظور تیماردهی، ابتدا محیط بصورت مایع بدون منبع نیتروژن تهیه شده و سپس مقادیر مختلفی (۰/۲۵ ، ۰/۵، ۱، ۱/۵ گرم بر لیتر) از نیترات سدیم به عنوان منبع نیتروژن به محیط کشت اضافه گردید و pH محیط کشت قبل از تلقیح در حدود ۷/۵ ثابت گشت. بعد از تعیین غلظت بهینه نیتروژن، pH محیط کشت BG11 با کمک بافرهای Mes (۵ pH) و Hepes (۷،۹ pH) تنظیم شد. نور مورد نظر نور سفید ناشی از لامپ های فلورسنت بود. دمای اتاق کشت۱ ±۳۰ درجه سانتیگراد تنظیم گردید.

نرخ رشد طبق روش Soltani و همکاران (۲۰۰۶) اندازه‌گیری شد. برای تعیین غلظت کلروفیل، کلروفیل سلول ها با متانول خالص استخراج شده و بعد از ۲۴ ساعت در دمای ۴ °C، توسط روش طیف سنجی در طول موج ۶۶۵ nm اندازه‌گیری شدند (Marker, 1972). فیکوبیلی‌پروتئین‌ها بعد از شوک اسمزی استخراج شده و به روش طیف سنجی در فاز لگاریتمی در طول موج های ۷۵۰، ۶۵۲، ۶۱۵ و ۵۶۲ نانومتر اندازه گیری شدند (Bermejo *et al*., 2002).

برای مطالعه مورفولوژی سلول‌ها از یک میکروسکوپ نوری دوربین دار Olympus CX 40 استفاده شد. برای تهیه عکس با استفاده از میکروسکوپ الکترونی (SEM)، نمونه ها به مدت ۴ ساعت در٪ ۲/۵ گلوتارآلدهید فیکس شدند، و در بافر فسفات (PBS) شستشو داده شدند. سپس نمونه‌ها سانتریفوژ شده و در غلظت‌های متوالی الکل (۱۰٪، ۳۰٪، ۵۰٪، ۷۰٪، ۹۰٪ و ۱۰۰٪) دهیدراته شدند. در نهایت، تمام نمونه‌ها بر روی قطعات فلزی گذاشته شده و با لایه‌ای از طلا پوشش داده شدند (Diestra *et al*., 2007).

به منظور شناسایی مولکولی نمونه مورد نظر، ابتدا DNA از نمونه تازه با استفاده از کیت استخراج DNA ژنومی شرکت فرمنتاز (K0512) استخراج شد (Nübel *et al*., 2000). تکثیر ژن 16S rRNA به وسیله PCR در نمونه ذکر شده برای اولین بار و با استفاده از دو گروه پرایمر رفتی (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3') PA و برگشتی (5'-AAG GAG GTG ATC CAG CCG CA-3') PH صورت گرفت. برای نشان دادن DNA از ژل الکتروفورز افقی ژل آگارز ۱/۲٪ حاوی رنگ DNA safe stain الکتروفورز گردید و نتیجه الکتروفورز با استفاده از دستگاه Gel Documentation مورد عکسبرداری قرار گرفت. محصول PCR جهت تعیین توالی به شرکت ژن فناوران ارسال گردید.

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2026-11-23]

[DOR: 20.1001.1.23222751.1392.2.4.5.5]

پس از تعیین توالی ژنی ناحیه مورد نظر، توالی ژنی حاصل با انجام عملیات BLAST با توالی ژن‌های ثبت شده در بانک‌های جهانی ژن مقایسه و درصد تشابه ژنی نمونه مورد نظر با نمونه‌های موجود در بانک ژن تعیین گردید.
برای تعیین میزان کل اسیدهای چرب، ۱/۵ میلی لیتر از نمونه در دور rpm ۱۰۰۰۰ 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. در دستگاه پرس، قرص مخصوص تهیه گردید. به کمک دستگاه FTIR (مارک Ray Leight مدل ۵۱۰) میزان کلی اسید چرب در سیانوباکتری مورد ارزیابی قرار گرفت (Pittman *et al*., 2010).
به منظور بررسی پروفایل اسید چرب، ۰/۰۲۵ گرم ماده خشک را داخل ویال ۲ میلی لیتر ریخته و به آن ۵۰۰ ماکرولیتر از محلول متانول اسیدی اضافه شد. سپس در ویال ها را با پارافیلم به دقت پوشانده تا از تبخیر متانول جلوگیری گردد. ویال ها به مدت ۲۰ ثانیه ورتکس شد، به مدت ۲ ساعت در دمای $80^{\circ}C$ و دور rpm ۷۵۰ داخل ترموسیکلر و سپس ۵ دقیقه در دمای اتاق سرد شد. در مرحله بعد ۳۰۰ ماکرولیتر از محلول سدیم کلراید ٪ ۰/۹ و ۱۵۰ ماکرولیتر هگزان اضافه و به مدت ۲۰ ثانیه ورتکس شدند. ۵ دقیقه در دمای $25^{\circ}C$ دور rpm ۳۰۰۰ سانتریفیوژ کرده تا دو فاز تشکیل گردد. از فاز رویی هگزان یک ماکرولیتر به دستگاه گاز کروماتوگرافی (ساخت کمپانی Varian مدل ۴۰۰۰) با دتکتور FID و ستون CBP1-M25-025 تزریق شد (Lu *et al*., 2011).
اطلاعات به دست آمده توسط نرم‌افزارهایی مانند Excel، SPSS 17 برای تجزیه و تحلیل نتایج مورفولوژی و پایگاه اطلاعاتی NCBI برای تجزیه و تحلیل نتایج مولکولی مورد استفاده قرار گرفت. آنالیزهای آماری بر اساس سه تکرار در هر آزمون و آنالیز واریانس یکطرفه ANOVA و طرح Tukey انجام گرفت.

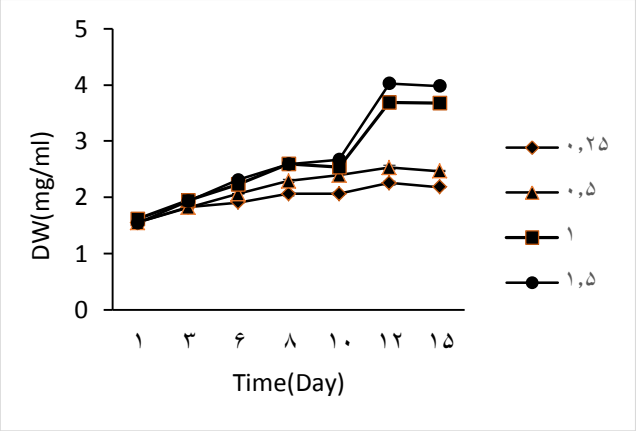
نتایج

تکنیک‌های مولکولی نیز برای شناسایی سویه *Synechococcus* sp. ISC106 استفاده شد. آنالیزهای فیلوژنتیک بر اساس توالی ژن 16S rRNA برای سویه *Synechococcus* sp. ISC106 انجام شد. توالی ها با نماینده‌ای از سیانوباکتری‌های تک سلولی موجود در GenBank مقایسه شد (NCBI). توالی های 16S rRNA با گونه‌های *Synechococcus* موجود در پایگاه داده ها ترکیب شدند. در توالی های ژن 16S rRNA ٪۹۷ شباهت به *Synechococcus* مشاهده شد. توالی های نوکلئوتیدی شرح داده شده در این بررسی به NCBI تحت شماره الحاقی KF724939 ارائه شد.

در این پژوهش به منظور بررسی میزان رشد سیانوباکتری در تیمارهای مختلف نیتروژن و pH از اندازه گیری وزن خشک استفاده شده است. به این منظور وزن خشک سیانوباکتری ها در تیمارهای مختلف اندازه گیری شد.

شکل ۱ مقایسه وزن خشک *Synechococcus* sp. ISC106 در غلظت‌های مختلف $NaNO_3$ در پایان ۱۵ روز دوره انکوباسیون را نشان می دهد. همانطور که مشاهده می گردد نمودار رشدی این میکروجلبک به صورت لگاریتمی بوده و بیشترین رشد آن در روزهای هشتم تا دوازدهم اتفاق میافتد و بعد از آن رشد میکروجلبک به دلیل کاهش مواد مغذی و همچنین بالارفتن غلظت محیط کشت و عدم نفوذ نور در آن کند شده و در روزهای دوازدهم به بعد شیب خط تقریبا افقی شده و از روز پانزدهم رشد متوقف میشود. از روی نمودار میتوان متوجه شد که با کاهش غلظت نیتروژن در محیط کشت میزان رشد سیانوباکتری نیز کاهش می یابد. ماکزیمم وزن خشک جلبک در غلظت (g/L) ۱/۵ نیتروژن در روز ۱۲ تلقیح به میزان mg mL^{-1} ۴/۰۲۶، در حالی که کمترین وزن خشک در غلظت (g/L) ۰/۲۵ نیتروژن mg mL^{-1} ۲/۲۵۳ بوده است که این اختلاف بین تیمارها معنی دار بوده است ($p<0.05$).

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2026-11-23]
[DOR: 20.1001.1.23222751.1392.2.4.5.5]



شکل۱. مقایسه وزن خشک سیانوباکتری *Synechococcus* sp. ISC106 در غلظت های مختلف $NaNO_3$ (g/L)

جدول ۱، نتایج حاصل از اندازه‌گیری محتوای کلروفیل را در غلظت‌های مختلف نیتروژن نشان می دهد. بیشترین میزان کلروفیل ۱/۰۷۸ $\mu g\ mL^{-1}$ در غلظت $NaNO_3$ ۰/۲۵ (g/L) مشاهده شد. با توجه به نتایج آنالیز آماری اختلاف معنی داری بین مقدار کلروفیل تیمارهای مختلف بغیر از تیمارهای(g/L) ۰/۵ و ۱/۵ $NaNO_3$ مشاهده گردید. همچنین این جدول مقادیر رنگیزه‌های فیکوبیلی پروتئینی را در غلظت‌های مختلف نیتروژن نشان می دهد. بیشترین میزان رنگیزه فیکواریترین در غلظت $NaNO_3$ ۰/۵ (g/L) به میزان ۴/۱۶۰ $\mu g\ mL^{-1}$ مشاهده شد که با غلظت $NaNO_3$ ۰/۲۵ (g/L) اختلاف معنی داری نداشت. رنگیزه فیکوسیانین و آلوفیکوسیانین با کاهش رشد افزایش یافته و به میزان ۲۰/۱۷۳ $\mu g\ mL^{-1}$ و ۵/۵۷۹ در غلظت (g/L) $NaNO_3$ ۰/۲۵ اندازه گیری شد. میزان کل فیکوبیلی پروتئین ها در تیمار $NaNO_3$ ۰/۲۵ (g/L) نسبت به سایر تیمارها بیشتر ارزیابی گردید. همانطور که در جدول ۱ ملاحظه می گردد، این اختلاف در بین تیمارها معنی دار بود.

جدول۱. میزان رنگیزه های فتوسنتزی در غلظت های مختلف نیتروژن در سیانوباکتری *Synechococcus* sp. ISC106

NaNO3	کلروفیل	فیکواریترین	فیکوسیانین	آلوفیکوسیانین	فیکوبیلی پروتئین کل
(g/L)			µg/mL		
۰/۲۵	۱/۰۷۸±۰/۱۰ ^{a}	۳/۲۷۷±۰/۸۲ ^{a}	۲۰/۱۷۳±۳/۳۷ ^{a}	۵/۵۷۹±۰/۷۴ ^{a}	۲۹/۰۲۸±۴/۰۵ ^{a}
۰/۵	۰/۷۷۷±۰/۰۴ ^{b}	۴/۱۶۰±۰/۵۸ ^{a}	۹/۸۵۲±۱/۰۹ ^{b}	۴/۳۰۰±۰/۹۱ ^{b}	۱۸/۳۱۱±۱/۱۵ ^{b}
۱	۰/۴۹۱±۰/۱۸ ^{c}	۱/۱۹۹±۰/۲۶ ^{b}	۴/۹۳۲±۱/۱۳ ^{c}	۱/۹۸۰±۰/۱۴ ^{c}	۸/۱۱۲±۱/۱۲ ^{c}
۱/۵	۰/۷۱۵±۰/۲۰ ^{b}	۱/۱۷۰±۰/۲۳ ^{b}	۷/۰۶۴±۱/۷۵ ^{bc}	۱/۶۸۴±۰/۴۵ ^{c}	۹/۹۱۸±۰/۹۴ ^{c}

حروف یکسان نشان دهنده ی عدم تفاوت معنی دار است. داده ها X ±SE را نشان می دهند.

همانطور که در جدول ۲ مشاهده می گردد با افزایش غلظت نیتروژن میزان تکثیر افزایش یافته و زمان تقسیم سلولی کاهش می یابد، به طوریکه در غلظت $NaNO_3$ ۱/۵ (g/L) زمان تقسیم ۳/۵ ساعت محاسبه گردید.

در این مطالعه محتوی لیپید سلول‌های سیانوباکتری هنگامیکه غلظت $NaNO_3$ اولیه به بالای (g/L) ۱/۵رسید کاهش یافت. بیشترین میزان لیپید در محیط کشت در غلظت $NaNO_3$ ۰/۲۵ (g/L) برای سیانوباکتری *Synechococcus* sp. ISC106 به دست آمده است.

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2026-11-23]

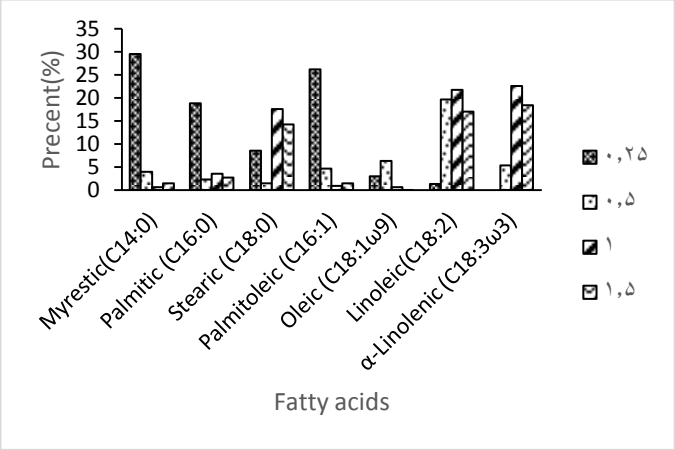
[DOR: 20.1001.1.23222751.1392.2.4.5.5]

جدول۲. کینتیک رشد و میزان تولید لیپید در غلظت های مختلف نیتروژن در سیانوباکتری *Synechococcus* sp. ISC106

$NaNO_3$ (g/L)	۰/۲۵	۰/۵	۱	۱/۵
ثابت ویژه رشد (d^{-1})	۰/۰۴۴	۰/۰۴۰	۰/۰۶۸	۰/۱۹۹
زمان مضاعف شدن (h)	۱۵/۷۲۱	۱۷/۲۷۹	۱۰/۱۲۰	۳/۴۸۱
میزان لیپید(% dw)	۳۱/۴۰۰	۲۶/۶۲۲	۲۵/۵۴۰	۲۰/۴۴۵

در پروفایل اسیدهای چرب سیانوباکتری در تیمارهای مختلف نیتروژن، اسید چرب میرستیک به میزان ۲۹/۶۰ درصد در غلظت (g/L) ۰/۲۵نیترات سدیم نسبت به سایر اسیدهای چرب بیشترین میزان را به خود اختصاص داد (شکل ۲). همانطور که ملاحظه می گردد با افزایش غلظت نیتروژن اسیدهای چرب اشباع کاهش و اسیدهای چرب غیر اشباع افزایش می یابند. به طوریکه در غلظت‌های (g/L) ۱ و ۱/۵ $NaNO_3$ اسید چرب α- لینولئیک با سه پیوند دوگانه به ترتیب به میزان ۲۲/۶۴ و ۱۸/۴۷ درصد و در غلظت‌های (g/L) ۰/۲۵ $NaNO_3$ این میزان به صفر رسید (شکل ۲).

بر اساس نتایج بالا بهترین غلظت $NaNO_3$ جهت تولید لیپید در سیانوباکتری *Synechococcus* sp. ISC106 ، غلظت (g/L) ۰/۲۵ انتخاب گردید. سپس میزان رشد و محتوای لیپیدی در تیمارهای مختلف pH در غلظت (g/L) $NaNO_3$۰/۲۵ مورد ارزیابی قرار گرفت.

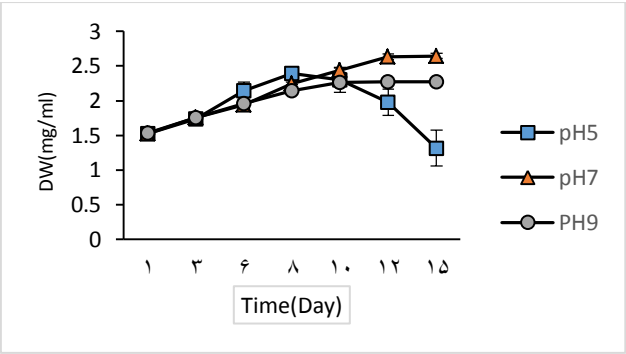


شکل۲ . درصد اسیدهای چرب *Synechococcus* sp. ISC106 در تیمارهای مختلف نیتروژن ((g/L) $NaNO_3$)

بیشترین میزان رشد سیانوباکتری *Synechococcus* sp. ISC106 در روز ۱۵ تیمار pH = ۷، $2/646\ mg\ ml^{-1}$ محاسبه گردید. رشد در pH =۹ کاهش یافت و نمونه سیانوباکتری نسبت به pH اسیدی مقاوم نبوده و از روز ۸ به بعد سلولها از بین رفتند (شکل ۳).

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2026-11-23]

[DOR: 20.1001.1.23222751.1392.2.4.5.5]



شکل۳. مقایسه وزن خشک سیانوباکتری *Synechococcus* sp. ISC106 در تیمارهای مختلف pH

مطابق نتایج در جدول ۳، میزان رنگیزه های فتوسنتزی شامل کلروفیل، فیکوسیانین، فیکو اریترین و آلوفیکوسیانین در pH ۹ افزایش نشان داد. بیشترین میزان مربوط به رنگیزه فیکوسیانین $\mu g\ mL^{-1}$ ۱۴/۵۶۳ به دست آمد.
با افزایش pH میزان رشد کاهش یافته و زمان تقسیم سلولی نیز افزایش می یابد ولی میزان تولید لیپید در حال افزایش می باشد (جدول۴).

جدول۳. میزان رنگیزه های فتوسنتزی در غلظت های مختلف pH در سیانوباکتری *Synechococcus* sp. ISC106 (۳۰± ۱ °C، $NaNO_3$ ۰/۲۵)

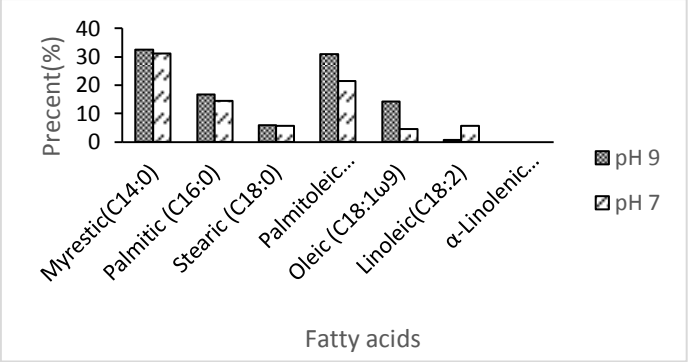
pH	Chl	PE	PC µg/ mL	APC	PBP
۷	۰/۳۲۰±۰/۰۱[b]	۰	۱/۵۷۰±۰/۱۷[b]	۰/۰۸۱±۰/۱۴[b]	۱/۶۵۱±۰/۵۱[a]
۹	۴/۲۸۰±۰/۵۲[a]	۱/۱۲۵±۰/۵۸[a]	۱۴/۵۶۳±۱/۲۵[a]	۳/۹۲۱±۰/۷۵[a]	۱۹/۶۰۹±۰/۳۷[b]

جدول۴. کینتیک رشد و میزان تولید لیپید در pH مختلف در سیانوباکتری *Synechococcus* sp. ISC106

pH	۷	۹
ثابت ویژه رشد (d^{-1})	۰/۰۴۱	۰/۰۲۷
زمان مضاعف شدن (h)	۲۰/۳۸۵	۳۱/۶۷۹
میزان لیپید (% dw)	۳۲/۸۵۰	۳۸/۹۲۳

مطابق شکل ۴ میزان اسیدهای اشباع در pH ۹ افزایش یافت. بالاترین میزان اسید چرب مریستیک اسید (۳۲/۴۶ درصد) و کمترین لینولئیک اسید (۰/۶۴ درصد) مشاهده شد . در هر دو pH ۷ و ۹، α- لینولنیک اسید یافت نشد.

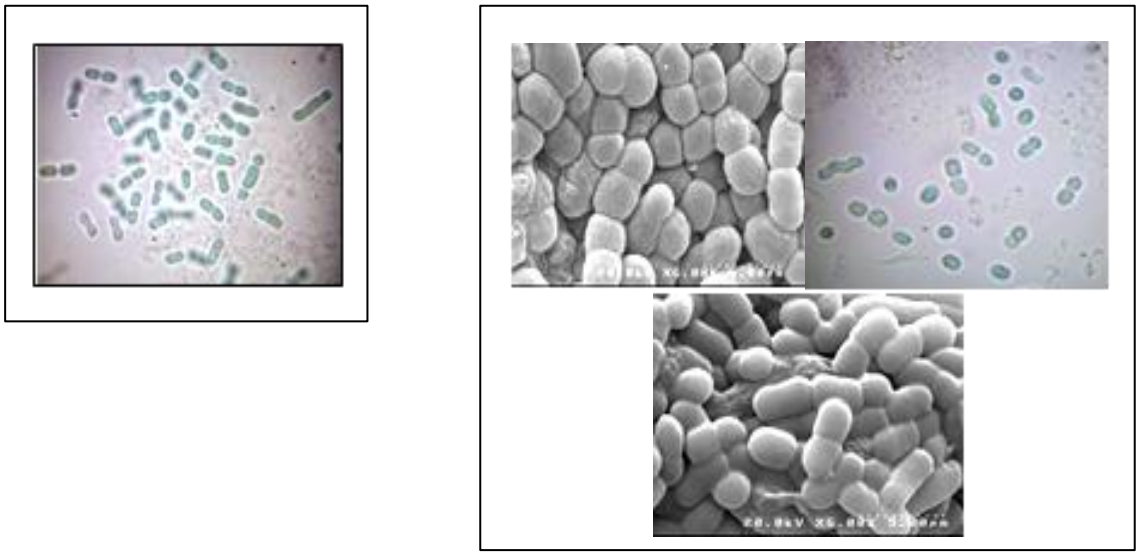
[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2026-11-23]
[DOR: 20.1001.1.23222751.1392.2.4.5.5]



شکل۴ . درصد اسیدهای چرب*Synechococcus* sp. ISC106 در تیمارهای مختلف pH

همانطور که در شکل ۵ مشاهده می‌شود با کاهش غلظت نیتروژن و افزایش pH طول و عرض سلول افزایش یافته و مواد ذخیره ای موجود در آنها افزایش می یابد.

تکنیک میکروسکوپ الکترونی (SEM) نیز برای تعیین تغییرات مورفولوژیک استفاده شد. تصاویر به دست آمده توسط SEM نشان می دهد که طول و عرض سلول‌ها در تیمار ۰/۲۵ گرم بر لیتر $NaNO_3$ و pH ۹ نسبت به نمونه ۱/۵ گرم بر لیتر $NaNO_3$ و۷ pH افزایش یافته و سلولها کاملا به یکدیگر می چسبند (شکل۵).



شکل۵. شکل سلول‌های سیانوباکتری *Synechococcus* sp. ISC106 در غلظت ۱/۵ $NaNO_3$ و۷ pH (سمت چپ) و ۰/۲۵ $NaNO_3$ و ۹ pH (سمت راست) توسط میکروسکوپ نوری و میکروسکوپ الکترونی SEM

بحث و نتیجه گیری

در زمینه بررسی توانایی سیانوباکتری ها برای تولید بیودیزل تحقیقات وسیعی در دنیا در حال انجام می باشد. بهینه سازی شرایط رشد سیانوباکتری‌ها پیچیده بوده و به عوامل مختلفی مرتبط می باشد که هر کدام می توانند بازدارنده یا تحریک کننده باشند که از آن جمله می توان به مواد غذایی، دما، هوادهی، تغییرات گازی، میزان تابش نور، شوری، pH و تراکم سلولی اشاره کرد (Gardner *et al*., 2011).

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2026-11-23]

[DOR: 20.1001.1.23222751.1392.2.4.5.5]

Widjaja و همکاران (۲۰۰۹) نشان دادند که $NaNO_3$ منبع نیتروژنی است که به طور معمول برای تجمع چربی سلولی در سیانوباکتریها مورد استفاده قرار می گیرد.

واکنش سیانو باکتری ها نسبت به کمبود ماده غذایی با جلبک های یوکاریوت متفاوت می باشد. Piorreck و Pohl (۱۹۸۴) گزارش کردند که سوخت و ساز چربی در سیانوباکتری‌های *Anacystis nidulans*، *Microcystis aeruginosa*، *Oscillatoria rubescens* و *Spirulina platensis* به طور قابل توجهی تحت تاثیر کمبود نیتروژن تغییر می یابد.

گرچه کاهش ازت سبب توقف سیکل سلولی و مهار تولید انواع ترکیبات سلولی می شود ولی میزان سنتز لیپید به طرز چشمگیری افزایش یافته که در نهایت باعث تجمع و ذخیره مواد چربی در این سلول‌های بحران زده ناشی از فقر منبع ازت می‌گردد (Darzins *et al*.,2008).

در اواخر سال ۱۹۴۰ کاهش رشد میکروجلبک ها و افزایش میزان تولید لیپید آن در شرایط فقر نیتروژن مورد توجه زیادی قرار گرفت، مشخص شده است که میزان مواد لیپیدی تولید شده در جلبک ها در این شرایط بیش از ٪ ۸۵-۷۵ افزایش می‌یابد. همچنین گزارش شد که میزان مواد لیپیدی در جلبک *prophyridium cruentum* در این شرایط دو برابر می‌شود (Chisti, 2007).

در این مطالعه با کاهش رشد سیانوباکتری *Synechococcus* sp. ISC106 میزان لیپید افزایش یافت که با سایر مطالعات همسو می باشد.

نه تنها فقر منبع ازت سبب افزایش تولید مواد لیپیدی می شود، بلکه سبب تغییر در ترکیبات لیپیدی نیز می گردد. Zhila و همکاران (۲۰۰۸) گزارش دادند که میزان اسید اولئیک (Oleic acid) در جلبک *Botryococcus braunii* در این شرایط به بیش از ٪ ۴/۳۸ – ۴/۲۸ افزایش می یابد اما در میزان لیپید تام و تری آسیل گلیسرول آن هیچ تغییری حاصل نمی شود.

میزان اولئیک اسید *Synechococcus* sp. ISC106 با افزایش pH و کاهش غلظت نیتروژن افزایش یافت و در pH=۹ و ۰/۲۵ گرم بر لیتر نیترات سدیم٪ ۱۴/۱۴ اندازه گیری شد.

هنگامی که تغییرات در ترکیب اسید چرب در گونه یا سویه هایی در پاسخ به کمبود ماده غذایی روی می دهد، سطح اسید چرب C18:2 کاهش می یابد، در حالیکه که اسیدهای چرب C16: 0 و C18:1 افزایش می یابند، شبیه به آنچه در جلبک‌های یوکاریوتی اتفاق می افتد (Olson and Ingram, 1975). در این مطالعه نیز با کاهش غلظت نیتروژن میزان اسیدهای چرب با دو یا سه پیوند دوگانه کاهش یافت و در غلظت ۰/۲۵ گرم بر لیتر نیتریت سدیم اسید چدب با پیوند سه گانه یافت نشد.

در برخی موارد، فقر نیتروژن منجر به کاهش سنتز چربی و اسیدهای چرب در جلبک ها می گردد (Hai *et al*., 2012).

Da Rós و همکاران (۲۰۱۲) در برزیل سیانوباکتری *Microcystis aeruginosa* سویه NPCD-1 را از سیستم تصفیه فاضلاب جدا کردند، در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد و تحت غلظت‌های مختلف نیتروژن ($NaNO_3$) و فسفر (K_2HPO_4/Na_2HPO_4) افزایش تولید لیپید و تنوع اسیدهای چرب را نشان دادند. به طوریکه اسیدهای چرب اشباع ٪۵۰ و پالمیتیک٪ ۲۴/۳۴ و لوریک٪ ۱۳/۲۱ شناسایی شدند. در این مطالعه بیشترین میزان اسیدهای چرب، اشباع و یا با یک پیوند دوگانه اندازه گیری شدند.

روی هم رفته در مباحث اکولوژی و اکوفیزیولوژیکی، اسیدیته خاک و یا آب یک عامل انتخابی برای تغییر جمعیت جلبک قلمداد می‌شود و پاسخ سیانوباکتری‌ها نسبت به تغییرات pH می‌تواند متفاوت باشد. کلروفیتا معمولاً pH پایین و سیانوفیتا pH بالا را می‌پسندند و در کل یک همبستگی مثبت قابل توجه میان سیانوباکتری‌ها و اسیدیته خاک وجود دارد (Stanier *et al*.,1981). در این تحقیق نیز سیانوباکتری *Synechococcus* sp. ISC106 در pH= ۷ بهترین رشد را نشان داد.

برخی سیانوباکتری ها نظیر نمونه‌های Anabaena دارای دامنه وسیعی از بردباری و سازگاری به تغییرات pH هستند که امکان رشد آن را در شرایط مختلف اکولوژیکی فراهم می سازد (Amaro *et al*., 2012). اما سیانوباکتری *Synechococcus* sp. ISC106 نسبت به pH=۵ کاملاً حساس بوده و از روز هشتم رشد آن کاهش یافت و در روز چهاردهم کاملاً متوقف گردید.

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2026-11-23]

[DOR: 20.1001.1.23222751.1392.2.4.5.5]

در تحقیقی Soltani و همکاران (۲۰۰۵) میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی در سیانوباکتری *Fisherella* sp. در سه pH متفاوت ۵، ۷ و ۹ بررسی کردند. آنها دریافتند که میزان فیکو سیانین در۷=pH و فیکو اریترین، آلوفیکوسیانین و کلروفیل در ۹= pH افزایش می یابد. اما در این تحقیق بیشترین میزان رنگیزه های فتوسنتزی در ۹ pH اندازه گیری شد.

در بررسی اثر pH اولیه بر رشد و تجمع چربی سیانوباکتری ها مشخص شده است که ظرفیت چربی توسط مقادیر pH قابل تغییر می‌باشد و مقدار بهینه pH بین ۵/۲ تا ۸/۳ به دست آمده است (Damiani *et al*., 2010, Chinnasamy *et al*., 2010, Samori *et al*.,2010).

در تحقیقی *Synechococcus* sp., *Cyanobacterium aponinum* و *Phormidium* sp. تحت تیمارهای مختلف pH (۹-۶) و غلظت های مختلف $NaNO_3$ قرار گرفتند. مشخص شد که در غلظت (g/L) ۰/۲۵ *Synechococcus* sp. در pH ۷ و *Cyanobacterium aponinum* در pH ۷ و *Phormidium* sp. در۹ pH حداکثر محتوی چربی تولید می گردد. میزان C16 و C18، ٪ ۴۲/۸ و ۴۶/۹ در *Synechococcus* sp.، ٪ ۴۵/۰ و ۶۷/۷ در *C. aponinum* و٪ ۳۸/۲ و ۹۰/۶ در *Phormidium* sp. به دست آمد. اسیدهای چرب اشباع در *Synechococcus* sp. ، *C. aponinum* و *Phormidium* sp. به ترتیب ٪ ۷۴/۵، ۷۷/۹ و ۸۴/۷ ارزیابی شد (Donmez and Karatay, 2011). میزان C16 و C18، *Synechococcus* sp. ISC106 به ترتیب ٪ ۴۷/۵۷ و ۲۰/۶۳ اندازه گیری شد.

مشخص شده است میزان کم نیتروژن در محیط کشت با کاهش رشد و افزایش محتوی چربی رابطه مستقیمی دارد و تحت شرایط رشد خاص، بسیاری از ریز جلبک ها می توانند چربی مناسب برای تبدیل به سوخت های حمل و نقل مایع را تولید نمایند (Ratledge, 2004) که با یافته های ما در این تحقیق همخوانی دارد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله از همکاران در پژوهشکده جهاد دانشگاهی دانشگاه شهید بهشتی که در انجام این پروژه ما را یاری کردند، تشکر و قدردانی می نمایند.

منابع

Amaro, H. M., Macedo, A.C. 2012. Microalgae: An alternative as sustainable source of biofuels? Review. Energy. 44: 158-166.

Andersen, R. A. 2005. Algal culturing techniques. Academic press.

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 Ferna´ndez, F.G., Molina Grima, E. 2002. Recovery of Pure B-phycoerythrin from the Microalga Porphyridum Cruentum. Journal of Biotechnology. 93: 73-85.

Chinnasamy, S., Bhatnagar, A., Hunt, R.W., Das, K.C. 2010. Microalgae cultivation in a wastewater dominated by carpet mill effluents for biofuel applications. Bioresource Technology. 101: 3097–105.

Chisti, Y. 2007. Biodiesel from microalgae. Biotechnology Advances. 25: 294–306.

Da Rósa P.C.M., Silva C.S.P., Silva-Stenicob M.E., Fiore M.F. 2012. Microcystis aeruginosa lipids as feedstock for biodiesel synthesis by enzymatic route. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. 84: 177−182.

Damiani, M.C., Popovich, C.A., Constenla, D., Leonardi, P.I. 2010. Lipid analysis in *Haematococcus pluvialis* to assess its potential use as a biodiesel feedstock. Bioresource Technology. 101: 3801–7.

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.

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2026-11-23]

[DOR: 20.1001.1.23222751.1392.2.4.5.5]

Diestra, E., Esteve, I., Castell, O. and 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. 453-460.

Donmez, G., Karatay, S.E. 2011. Microbial oil production from thermophile cyanobacteria for biodiesel production. Applied Energy. 88: 3632–3635.

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.

Ghasemia, Y., Rasoul Aminia, S., Naserib, A.T., Montazeri Najafabadya, N., Mobashera, M.A., Dabbagha, F. 2012. Microalgae Biofuel Potentials (Review). Applied Biochemistry and Microbiology. 48(2): 126–144.

Greenwell, H.C., Laurens, L.M., 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: 703–726.

Hai, P.D., Thu, N.T., Annachhatre, A.P. 2012. Cultivation of cyanobacteria for extraction of lipids. Biomass and Bioenergy. 44: 142-149.

Harwood, J.L. 1998. Membrane lipids in algae. In lipids in photosynthesis:Structure, Function and Genetics (Siegenthaler, P.A. and Murata, N.). Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers. 53-64.

Jansson, C. 2011. Metabolic Engineering of Cyanobacteria for Direct Conversion of CO_2 to Hydrocarbon Biofuels. Progress in Botany. 73: 81-93.

Jungblut, A.D., Allen, B., 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: 258–269.

Lu, X. 2010. A perspective: Photosynthetic production of fatty acid-based biofuels in genetically engineered cyanobacteria. Biotechnology Advances. 28: 742–746.

Lu, X., Guana, W., Zhao, H., Wanga, C., Yanga, M. and 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.

Morowvat M.H., Rasoul-Amini S., Ghasemi Y. 2010. Chlamydomonas as a 'new" organism for biodiesel production. Bioresource Technology. 101: 2059–2062.

Mutanda, T., Ramesh, D., Karthikeyan, S., Kumari, S., Anandraj, A., Bux, F. 2011. Bioprospecting for hyper-lipid producing microalgal strains for sustainable biofuel production. Bioresource Technology. 102: 57–70.

Najafia, G., Ghobadiana, B., Yusaf, T. 2011. Algae as a sustainable energy source for biofuel production in Iran: A case study. Renewable and Sustainable Energy Reviews. 15: 3870–3876.

Nübel, U., Garcia-Pichel, F., Clavero, E., Muyzer, G. 2000. Matching molecular diversity and ecophysiology of benthic cyanobacteria and diatoms in communities along a salinity gradient. Environmental Microbiology. 2: 217-226.

Olson, G.L., Ingram, L.O. 1975. Effects of temperature and nutritional changes on the fatty acids of microalga. Journal Bacteriology. 124: 373-379.

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: 217-233.

Pittman, K.J., Estrada, B., Sigee, D.C., Dean, a.p. 2010. Using FTIR spectroscopy for rapid determination of lipid accumulation in response to nitrogen limitation in freshwater microalgae. Bioresource Technology. 101: 4499–4507.

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2026-11-23]

[DOR: 20.1001.1.23222751.1392.2.4.5.5]

Quintana, N., Kooy, F.V., Van de Rhee M.D., Voshol, G.P., Verpoorte, R. 2011. Renewable energy from Cyanobacteria: energy production optimization by metabolic pathway engineering. Applied Microbiology and Biotechnology. 91: 471–490.

Ratledge, C. 2004. Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for single cell oil production. Biochemistry. 86: 807–15.

Stanier, R.Y., Waterbury, J.B., Rippka, R. 1981. Isolation and Purification of Cyanobacteria: Some General Principles. The Prokaryotes. 212-220.

Samori, C., Torri, C., Samori, G., Fabbri, D., Galletti, P., Guerrini, F., 2010. Extraction of hydrocarbons from microalga *Botryococcus braunii* with switchable solvents. Bioresource Technology. 101: 3274–9.

Soltani, N., Khavarinejad, R.A., Tabatabaie, M., Shokravi, SH., Valiente, E.F. 2005. Screening of soil cyanobacteria for antimicrobial activity. Pharmaceutical Biology. 43(5): 455-459

Soltani, N., Khavari-Nejad, R., Tabatabaie, M., Shokravi, Sh., Valiente, E.F. 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.

Tabatabaeia, M., Tohidfara, M., Salehi Jouzania, G., Safarnejada, M., Pazoukib, M. 2011. Biodiesel production from genetically engineered microalgae: Future of bioenergy in Iran. Renewable and Sustainable Energy Reviews. 15: 1918–1927.

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.

Zhila, N.O., Kalacheva, G.S., Volova, T.G. 2008. Effect of nitrogen limitation on the growth and lipid composition of the green alga *Botryococcus braunii* Kutz IPPAS H-252. Russian Journal of Plant Physiology. 52(3): 311-319.

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2026-11-23]

[DOR: 20.1001.1.23222751.1392.2.4.5.5]