مجله بوم شناسی آبزیان

Journal homepage: http://jae.hormozgan.ac.ir

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

منصوره پاک نژادی[۱*]، فاطمه ملک احمدی[۲]، ندا سلطانی[۳ و ٤]

[۱] گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهر قدس، تهران

[۲] گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم تحقیقات، تهران

[۳] گروه میکروبیولوژی نفت، پژوهشکده علوم پایه کاربردی، جهاددانشگاهی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران

[٤] پژوهشکده محیط زیست و توسعه پایدار سازمان حفاظت محیط زیست، تهران

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

چکیده

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 معرفی‌شده‌اند. 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 $۳۰^{\circ C}$، نور دائمی و pH=۷ نگهداری شدند. سپس تحت تأثیر مقادیر مختلف دو فاکتور محیطی نیتروژن (۰/۲۵-۱/۵g/L =NaNO3) و pH (۵ تا ۸) تیمار شدند. نتایج نشان داد که میزان رشد و تولید ترکیبات مختلف به‌وسیله اسپیرولینا ماژور، با مقادیر دو فاکتور محیطی ارتباط دارند. غلظت پایین نیتروژن (۰/۲۵ g/L) و ۷/۵ =pH به‌عنوان بهترین شرایط برای افزایش میزان نرخ رشد، فتوسنتز، تولید اسیدهای چرب و سایر پارامترهای فیزیولوژیک ازجمله فیکوبیلی‌پروتئین‌ها 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.

مقدمــه

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

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2026-01-29]

[DOR: 20.1001.1.23222751.1397.8.2.2.6]

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 دریافتند 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 (Tabatabaeia *et al*., 2011; Angermayr *et al*., 2009). 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 زیادتری داشته است (Spolaore *et al*., 2006). البته در ایران سابقه تحقیقات در این زمینه، از چند سال تجاوز نمی کند که از جمله می توان به تحقیقی بر روی شرایط بهینه سازی تولید سوخت بیشتر توسط سیانوباکتری هایی به نام *Synechococcus* sp. ISC106، *Spirulina plantenis* و *Artrospira (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). به‌طورکلی 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 مارپیچ 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 ازجمله کربوهیدرات، چربی و پروتئین استفاده کنند (Celekli *et al*., 2009; Darzins *et al*., 2008). 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 می دهند با اینکه اسپیرولینا حاوی ۷-۵ درصد ترکیبات لیپیدی می باشد، کم بودن میزان روغن و بیومس ریزجلبک‌ها یکی از دغدغه‌های اصلی تولید در مقیاس انبوه و صنعتی به شمار می آید. اما امروزه روش‌های کشت انبوه و استخراج فراورده‌های سوختی با شیوه‌های مختلف، سبب رفع این مشکل و توجیه منطقی در بعد صنعتی گردیده است (Otles *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).

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2026-01-29]

[DOR: 20.1001.1.23222751.1397.8.2.2.6]

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 (ریزجلبک‌ها) 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 ($NaNO_3$) 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 $NaNO_3$ بر کیفیت و کمیت بیومس تولیدی درکشت محدود ریز جلبک *اسپیرولینا* مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری و کشت اولیه نمونه‌ها

کشت اولیه نمونه‌های ریزجلبک *اسپیرولینا ماژور* 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 (Zarrok 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 ۲±۲۶ 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 ۱±۳۰ 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 (pH=۷ ، شدت نور ۲۰۰۰ لوکس و دمای ۲±۲۶ درجه سانتی‌گراد)، دانسیته نوری و میزان بیومس اندازه‌گیری شدند. منحنی رشد *اسپیرولینا* طی ۳ بار تکرار در مدت ۱۰ روز با کمک دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۶۸۰ نانومتر و رابطه ذکر شده محاسبه و سپس رسم گردید (Soltani *et al*., 2006):

$$\mu = Ln\,(OD\ t_2) - Ln\,(OD\ t_1) / t_2 - t$$

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2026-01-29]

[DOR: 20.1001.1.23222751.1397.8.2.2.6]

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):

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

سنجش کاروتنوئید

برای اندازه‌گیری میزان کاروتنوئید، از ۱ میلی‌لیتر سوسپانسیون جلبکی که کاملاً با پوتر هموژن 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):

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

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):

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

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

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 ۰/۰۲۵ 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 پارافیلم به دقت پوشانده شدند. پس از ۲۰ ثانیه ورتکس، ویال‌ها داخل دستگاه ترموسایکلر به مدت ۲ ساعت تحت دمای ۸۰°C و دور ۷۵۰ rpm 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 ۳۰۰۰rpm 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

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2026-01-29]

[DOR: 20.1001.1.23222751.1397.8.2.2.6]

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 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. قرص‌های مخصوص در دستگاه پرس تهیه گردید. درنهایت، میزان کلی اسید چرب در سیانوباکتری مورد ارزیابی قرار گرفت (Dean *et al*., 2010).

سنجش فعالیت فتوسنتزی

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

ضریب کالیبراسیون = (۲۵۳/۴) /O_2

میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM)

جهت تهیه عکس با SEM، ابتدا نمونه‌ها به مدت ۴ ساعت در گلوتارالدئید ۲/۵ درصد فیکس و سپس در بافر فسفات (PBS) شستشو داده شدند. نمونه‌ها پس از سانتریفیوژ، در غلظت‌های متوالی الکل (۹۰،۷۰،۵۰،۳۰،۱۰ و ۱۰۰) دهیدراته شدند. درنهایت، تمام نمونه‌ها برروی 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

کلیه 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. درنهایت با کمک نرم‌افزار DOE، نمودارهای مربوطه طراحی و رسم گردید.

نتایــج

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، آلوفیکوسیانین 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 ماژور* 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).

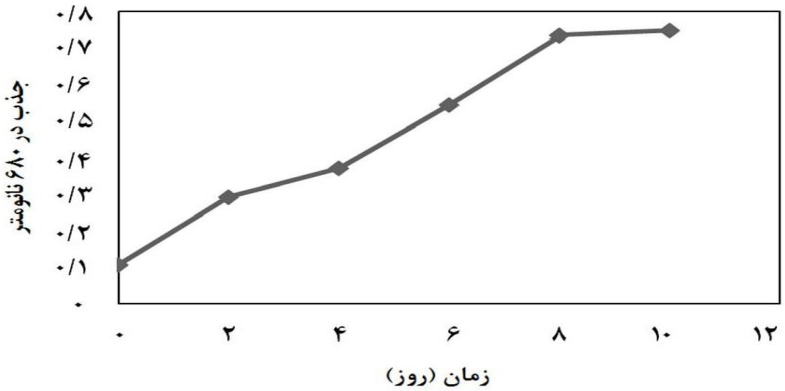
بررسی فاکتورهای pH و نیتروژن بر نرخ رشد و پارامترهای فیزیولوژیک

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

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2026-01-29]

[DOR: 20.1001.1.23222751.1397.8.2.2.6]

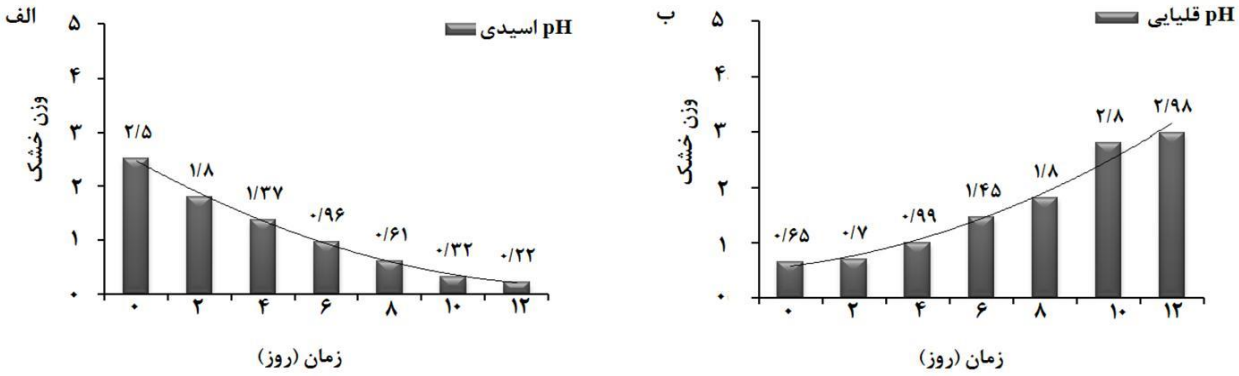
روش طراحی Central Composite استفاده شد. با کمک این روش، محاسبات طرح آماری سطح پاسخ برای بهینه‌سازی شرایط کشت و افزایش نرخ رشد طراحی و بررسی گردید. بر طبق جدول (۱) توسط روش Central Composite، مجموعه‌ای از ۱۳ آزمایش با ۵ تکرار در نقطه مرکزی طراحی شد.



شکل ۱. نمودار منحنی رشد ریز جلبک *Spirulina major* با استفاده از دانسیته نوری (OD680)

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).

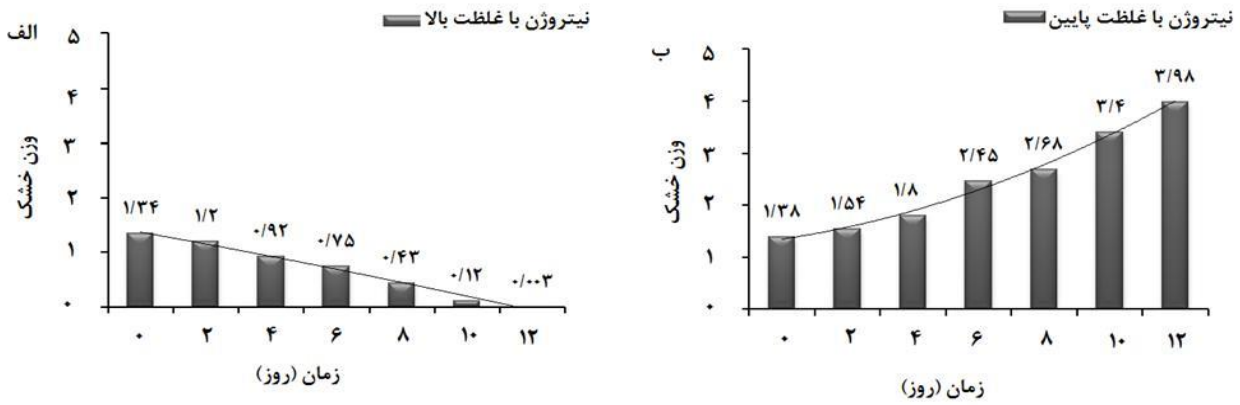


شکل ۲. نمودار تفاوت در وزن خشک (بیومس) جلبک *Spirulina major* در pH های (الف) اسیدی و (ب) قلیایی

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

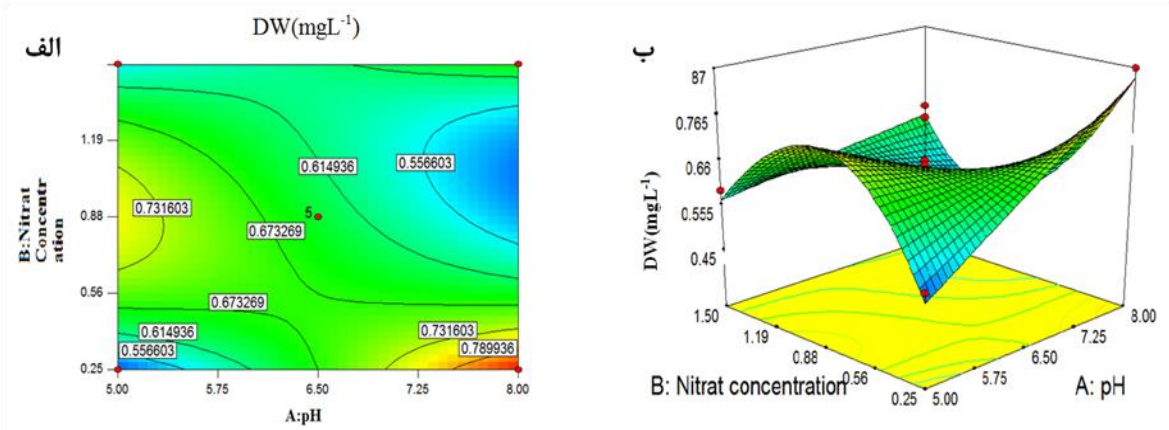
STD	RUN	pH	غلظت نیترات (%)	STD	RUN	pH	غلظت نیترات (%)
۱	۸	۷/۵۶	۰/۴۳	۱۰	۱	۵	۰/۸۸
۷	۵	۵/۴۴	۱/۳۲	۲	۲	۶/۵	۱/۵
۶	۱۰	۶/۵	۰/۲۵	۹	۳	۷/۵۶	۱/۳۲
۴	۱۱	۶/۵	۰/۸۸	۱۳	۴	۶/۵	۰/۸۸
۸	۱۲	۶/۵	۰/۸۸	۷	۵	۵/۴۴	۰/۴۳
۱۱	۱۳	۸	۰/۸۸	۳	۶	۶/۵	۰/۸۸
				۱۲	۷	۶/۵	۰/۸۸

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2026-01-29]
[DOR: 20.1001.1.23222751.1397.8.2.2.6]



شکل ۳. نمودار تفاوت در وزن خشک (بیومس) جلبک *Spirulina major* در غلظت‌های (الف) بالای نیترات و (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 (mg/ml ۳/۹۸) 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 ($P<0.0001$). به‌طوری‌که در محدوده pH=۷/۵ و $NaNO_3$=۰/۲۵ g/L میزان رشد این جلبک به طرز چشمگیری افزایش یافته است. بنابراین محیط کشت دارای شرایط مذکور، به‌عنوان 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 رنگیزه ها (کلروفیل و کاروتنوئید)

همانطورکه در شکل ۵ مشخص شده است، در محدوده pH=۷/۵ و $NaNo_3$=۰/۲۵ 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 ۱/۵ g/L بیشترین میزان را نشان داده است (شکل ۵ و ۶).

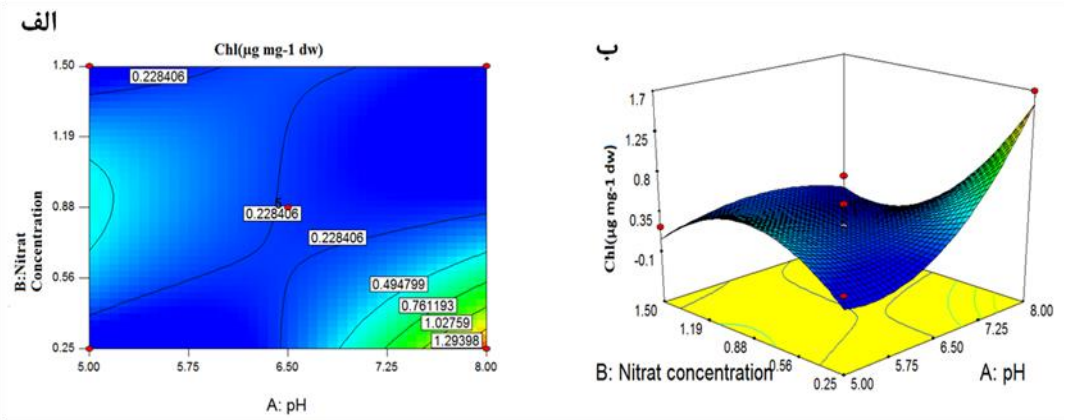
آنالیز نتایج سطح پاسخ بر میزان بیلی پروتئین‌ها

شکل ۷، نتایج آنالیز بر روی رنگیزه‌های بیلی پروتئین (فیکواریترین، آلوفیکوسیانین و فیکوسیانین) جلبک *اسپیرولینا ماژور* را

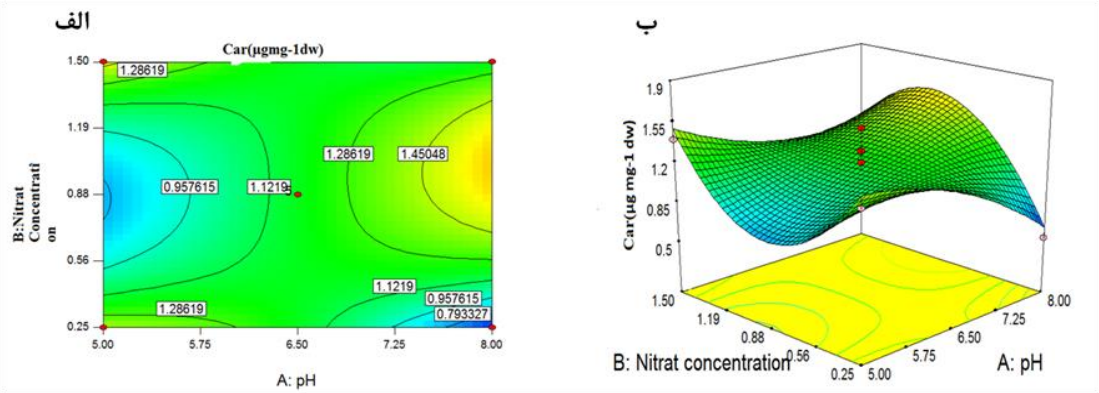
[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2026-01-29]

[DOR: 20.1001.1.23222751.1397.8.2.2.6]

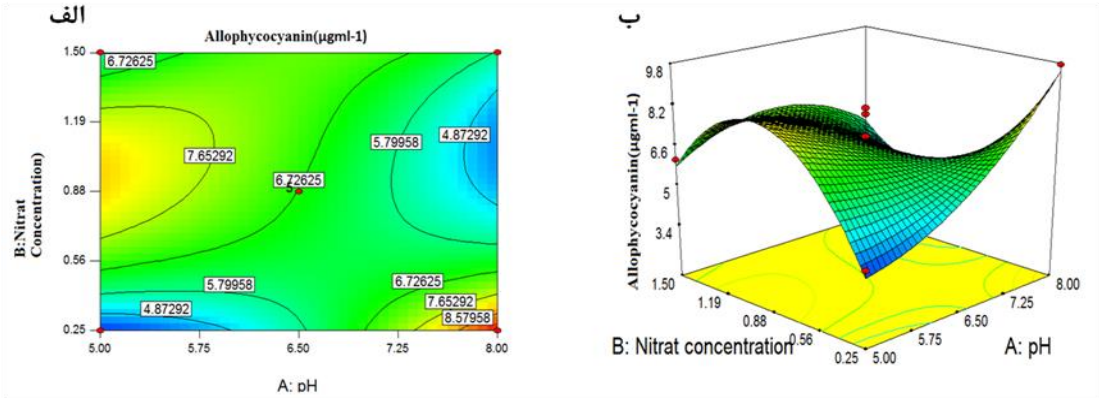
نشان می‌دهد که در تیمارهای بازی و غلظت پایین نیترات سدیم (pH=۷/۵ و $NaNo_3$=۰/۲۵ g/L)، میزان رنگیزه‌های مربوطه افزایش چشم‌گیری نشان دادند (شکل ۷، ۸ و ۹).



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*



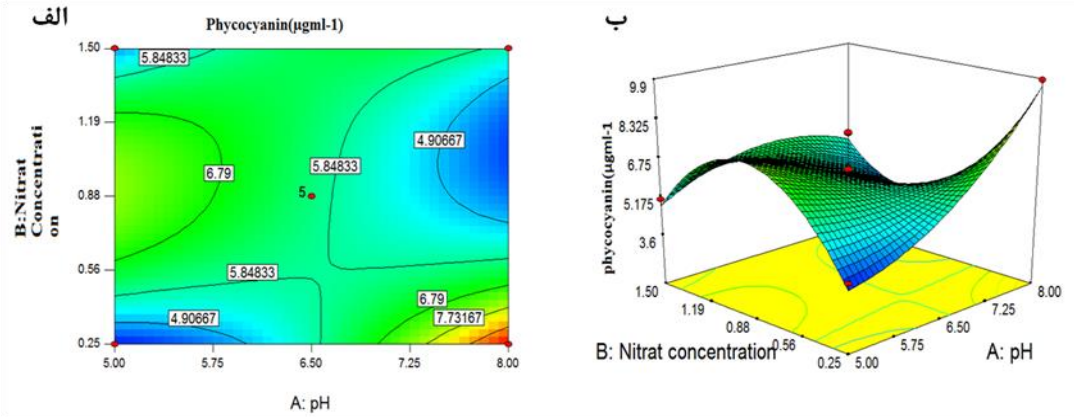
شکل ۷. نمودار کانتور (الف) و نمودار سطح پاسخ (ب) برای تأثیر pH و غلظت نیترات سدیم بر میزان آلوفیکوسیانین در جلبک*Spirulina major*

آنالیز نتایج سطح پاسخ بر میزان فتوسنتز

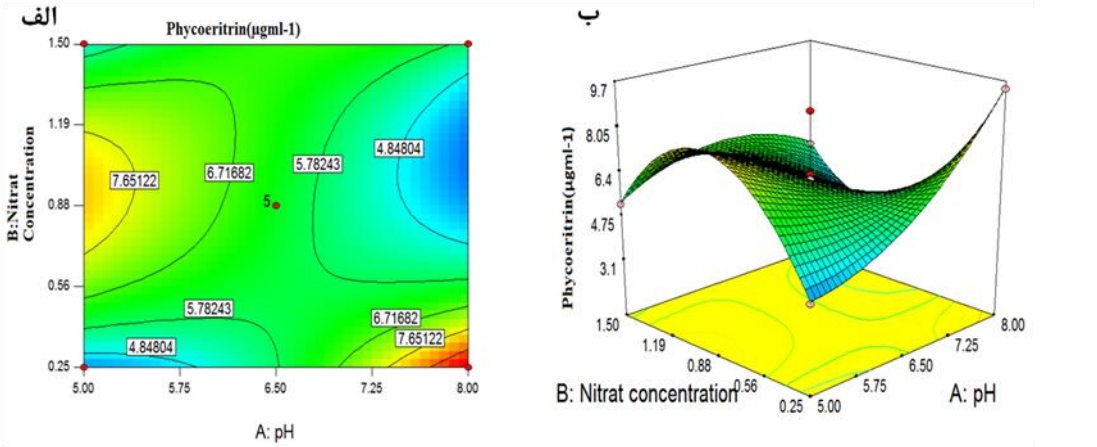
نتایج ما نشان داد که میزان فتوسنتز در محیطی با محتوای Hco_3^- بیشتر، افزایش می‌یابد. بنابراین در چنین محیطی، میزان فتوسنتز *اسپیرولینا ماژور* به دلیل بازی شدن محیط افزایش می‌یابد. به‌طوری‌که بیشترین میزان فتوسنتز در pH=۷/۵ و غلظت نیترات ۰/۲۵g/L قابل تشخیص می‌باشد (شکل ۱۰).

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2026-01-29]

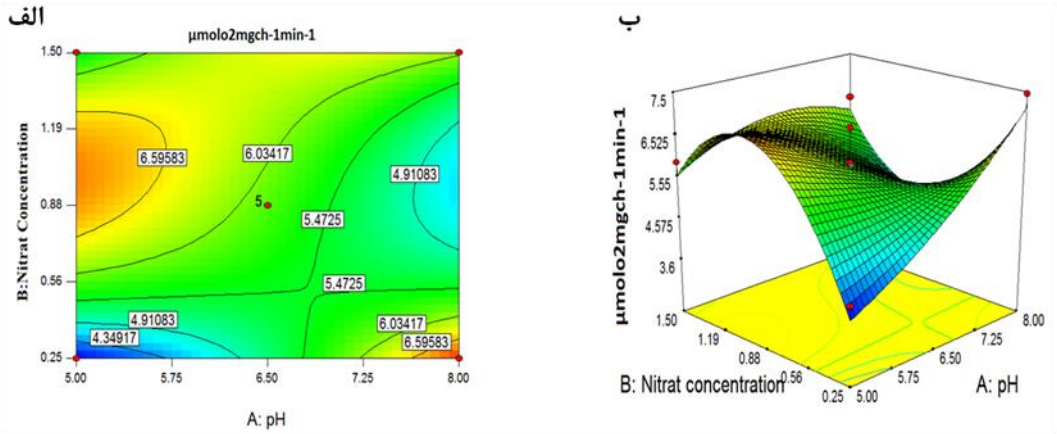
[DOR: 20.1001.1.23222751.1397.8.2.2.6]



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 فیکواریترین در جلبک *Spirulina major*



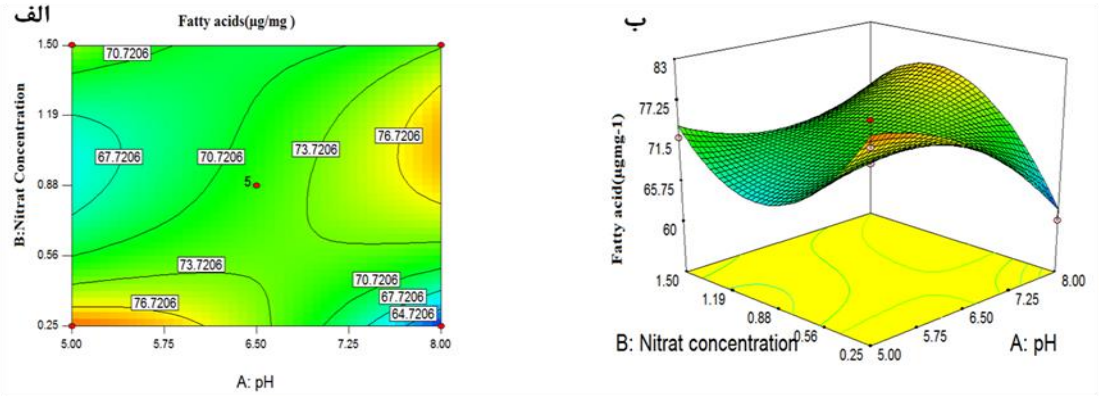
شکل ۱۰. نمودار کانتور (الف) و نمودار سطح پاسخ (ب) برای تأثیر pH و غلظت نیترات سدیم بر میزان فتوسنتز در جلبک *Spirulina major*

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 ماژور* تیمار شده با فاکتورهای تحت بررسی (pH=۷/۵ و $NaNo_3$=۰/۲۵ g/L)، پالمیتولئیک اسید و اولئیک اسید می‌باشد. به‌علاوه، تری آسیل گلیسیرول (TAG) بیش از ۳۵٪ وزن این ریز جلبک را تشکیل می‌دهد و بیشترین سهم ترکیبات لیپیدی در مورد همه تیمارها، مربوط به اسیدهای چرب

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2026-01-29]
[DOR: 20.1001.1.23222751.1397.8.2.2.6]

۱۶ و ۱۸ کربنه است. در این مطالعه هنگامی‌که غلظت نیترات سدیم به بیشتر از g/L ۱/۵ رسید محتوی لیپید سلول‌های سیانوباکتری کاهش یافت درحالی‌که بیشترین میزان لیپید در محیط کشت در غلظت g/L ۰/۲۵ 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 به‌عنوان یک کاندید مناسب برای بیودیزل معرفی می‌گردد.



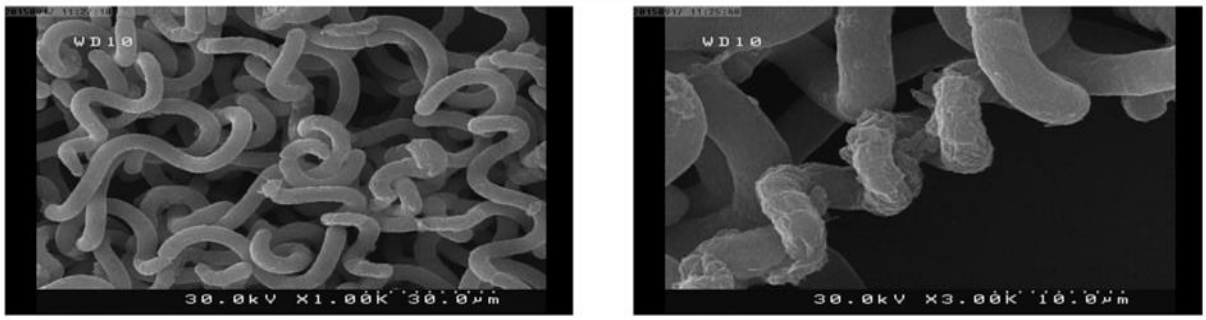
شکل ۱۱. نمودار کانتور (الف) و سطح پاسخ (ب) برای تأثیر pH و غلظت نیترات سدیم بر میزان اسیدهای چرب تولید شده در *Spirulina major*

آنالیز نتایج سطح پاسخ بر میزان طیف‌سنجی FTIR

در این تحقیق، با استفاده از FTIR ساختار اولیه لیپیدها به‌منظور شناسایی گروه‌های عاملی آن‌ها تحت مطالعه قرار گرفتند. گروه‌های عاملی لیپیدی مستخرج از بیومس *اسپیرولینا ماژور* در محدوده cm^{-1}۶۰۰-۴۰۰۰ بررسی شدند. همه نمونه‌ها یک باند ارتعاشی در ناحیه cm^{-1} ۳۰۱۰-۳۰۱۱ 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 cm^{-1} ۲۹۲۲-۲۹۲۴ و cm^{-1} ۲۸۵۲-۲۸۵۴ مشاهده شد که به ترتیب مربوط به کشیدگی متقارن و غیرمتقارن 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 ریزجلبک *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

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2026-01-29]

[DOR: 20.1001.1.23222751.1397.8.2.2.6]

بحث

با توجه به محدودیت منابع انرژی فسیلی و اثرات نامطلوب آن‌ها بر محیط زیست، سوخت‌های با منشأ مواد آلی ازجمله 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 (ازجمله 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 ازجمله استخراج روغن از ریزجلبک‌ها نمایند. نجفی و همکاران از یک ریزجلبک به نام *کلرلا ولگاریس* 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 آسیل 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 طول‌موج ۶۸۰ نانومتر اندازه‌گیری شد و نتایج (بر اساس نرم‌افزار طراحی آزمایش) نشان داد که افزودن $NaNo_3$ در غلظت ۰/۲۵ g/L و pH=۷/۵ 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 *اسپیرولینا 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 ۸۵-۷۵ درصد افزایش می‌یابد و حتی میزان مواد لیپیدی نیز می‌تواند در جلبک *Prophyidium cruentum* دو برابر تولید شود (Chisti, 2007). همچنین در سال ۱۹۸۴ گزارش شد که سوخت و ساز در سیانوباکتری‌های *Anacysti snidulans*، *Microcyxti saeruginosa*، *Oscillatoria rubescens* و *Spirulina platensis* به‌طور قابل‌توجهی تحت تأثیرکمبود نیتروژن تغییر خواهد یافت (Piorreck *et al*., 1984). در تحقیقی دیگر نیز نشان داده شد که کاهش غلظت $NaNO_3$ منجر به افزایش محتوای لیپید در سلول‌های *کلرلا* می‌شود، به‌طوری‌که در پایان زمان کشت، سلول‌هایی که در غلظت کمتری از $NaNO_3$ 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

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2026-01-29]

[DOR: 20.1001.1.23222751.1397.8.2.2.6]

گرچه کاهش ازت سبب توقف سیکل سلولی و مهار تولید انواع ترکیبات سلولی می‌شود ولی میزان سنتز لیپید به طرز چشمگیری افزایش می‌یابد که درنهایت 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، $NaNO_3$ 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 قرارگرفته است.

یکی دیگر از فاکتورهای مؤثر بر رشد فیزیولوژیکی، فعالیت‌های متابولیکی و تولید بیومس در زمان کشت ریزجلبک‌ها ازجمله *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 به‌طوری‌که کلروفیتا معمولاً pH پایین و pH بالا را می‌پسندند (Stanier *et al*., 1977). به‌عنوان مثال، سیانوباکتری به نام Synechoccus elongates نسبت به pH=۵ 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=۵ به میزان زیادی کاهش یافت ولی در pH=۷/۵ 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=۷/۵ 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 (۵،۷ و ۹) را به همراه شدت‌های متفاوت نور (۳ و ۳۰۰ میلی مول فوتون بر متر مربع ثانیه) بر پاسخ‌های فیزیولوژیکی جلبک *Fischerella ambigua* بررسی نمود. نرخ رشد در pH=۹ و pH=۷ یکسان بود، اما رشد در pH=۵ مشاهده نشد (Soltani *et al*., 2006). همچنین Visviki در بررسی خود، رشد *Chlamydomonas applanta* را در محدوده pH=۱/۴-۸/۴ مورد مطالعه قرار داد و بیان کرد که هیچ رشدی در محدوده ۱/۴ تا ۳/۴ وجود نداشت ولی بهینه رشد در pH های بالاتر (pH=۷/۴) مشاهده شد. البته با نگهداری محیط کشت برای بیش از ۵ روز، رشد تصاعدی در ۵/۴ تا ۴/۸ مشاهده شد اما به‌طورکلی حداکثر رشد در pH=۷/۴ 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 تعیین کننده غلظت‌های انواع کربن در آب می‌باشد. pH بالاتر دسترسی به کربن حاصل از CO_2 را محدود می‌کند و این موجب مهار رشد ریز جلبک‌ها می‌گردد. همچنین pH بالاتر تمایل جلبک را به CO_2 آزاد کاهش می‌دهد (Juneja *et al*., 2013; Feifei *et al*., 2013). این موضوع در تحقیق ما نیز ثابت شد زیرا در pH=۷/۵ ، افزایش بیومس و بیشترین میزان تولید C_{16} و C_{18} نسبت به نمونه‌ی شاهد مشاهده گردید.

از پارامترهای فیزیولوژیک دیگری که تحت تأثیر فاکتورهای pH و نیتروژن می‌باشند می‌توان به رنگیزه‌های فتوسنتزی مانند کلروفیل، کاروتنوئید و بیلی‌پروتئین‌ها (فیکواریترین، آلوفیکوسیانین و فیکوسیانین) اشاره نمود. نقش بیلی پروتئین‌ها محافظت از سیستم‌های فتوسنتزی در برابر تنفس نوری است که سبب تخریب فتوسیستم‌ها می‌گردد (Poza-carrion *et al*., 2001). ساختار و عملکرد بیلی پروتئین‌ها 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). بیلی پروتئین‌ها 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 فیکوسیانین، سپس به آلوفیکوسیانین و درنهایت به گیرنده‌های نور با طول موج بالا صورت می‌پذیرد (Soltani *et al*., 2006).

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2026-01-29]

[DOR: 20.1001.1.23222751.1397.8.2.2.6]

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 pH=۷/۵ و $NaNo_3$=۰/۲۵ g/L دارد (به جز کاروتنوئید که در $NaNo_3$=۱/۵ g/L افزایش می‌یابد). این نتیجه با برخی یافته‌های پیشین ازجمله 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 pH=۷-۹ به‌طور مشخص افزایش یابند (Poza-carrion *et al*., 2001). Soltani طی تحقیق خود بر روی میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی در گونه‌های سیانوباکتری *Fisherella* در سه pH متفاوت (۵،۷ و ۹) نشان داد که میزان فیکوسیانین در pH=۷ و فیکواریترین، آلوفیکوسیانین و کلروفیل در pH=۹ 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 pH=۷ بیشترین میزان فیکواریترین و در pH=۱ کمترین میزان آن مشاهده شد. بنابراین میزان فتوسنتز *اسپیرولینا ماژور* در محیط‌های کشت حاوی Hco_3^- زیادتر، به دلیل بازی شدن محیط، افزایش می‌یابد و میزان تثبیت 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 Hco_3- بیشتر و pH=۷/۵ ، میزان فتوسنتز افزایش یافت.

تنش‌های فیزیولوژیکی و غذایی (مانند افزایش نیتروژن) باعث تولید رادیکال‌های آزاد در سلول‌های جلبکی می‌شود، درنتیجه 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 تحریک‌کننده 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 ازجمله *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 ۱۰۰۰-۱۳۰۰cm^{-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 CH_2 و CH_3 را در نواحی cm^{-1} ۲۹۴۵-۳۰۲۵ و یک باند مربوط به C=O استری را در نواحی ۱۶۵۴-۱۷۴۶cm^{-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 ۷۲۰-۷۲۲ cm^{-1} مرتبط با CH_2 می‌باشد (Albuquerque *et al*., 2003). همچنین در بررسی که توسط Kaplan انجام شد وجود باندی را در ناحیه ۱۷۳۷-۱۷۴۱ cm^{-1} (واقع در محدوده ۱۷۳۵-۱۷۵۰ 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 ۱۶۷۰-۱۸۲۰cm^{-1} پیک قابل‌توجهی را مشاهده کردند که نشان‌دهنده حضور گروه‌های کربونیل بود. به‌علاوه در حد فاصل بین ۲۸۵۰-۲۹۳۰cm^{-1} نیز پیک‌های ثبت شده، حضور گروه‌های متیلن را اثبات نمود. تمامی پیک‌های مشاهده شده در نواحی مذکور می‌توانند اثبات کننده نوعی روغن قابل تبدیل به بیودیزل باشند (Lin-vien *et al*., Elumalai *et al*., 2011)

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2026-01-29]

[DOR: 20.1001.1.23222751.1397.8.2.2.6]

;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. بااین‌وجود، 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.

به‌طورکلی 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 ازجمله 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 $NaNo_3$=۰/۲۵g/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 درنتیجه پاسخ سیانوباکتری‌ها نسبت به تغییرات pH می‌تواند متفاوت باشد. این موضوع در تحقیق اخیر نیز به‌وضوح مشخص‌شده است و اسپیرولینا ماژور در pH=۷/۵ 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.

منابــع

Albuquerque, MLS., 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., Khanafer, 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 Ferna´ndez, 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.

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2026-01-29]

[DOR: 20.1001.1.23222751.1397.8.2.2.6]

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 yanobacterial 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., Sigee, 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.

Dejsungkranonta, 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 andSenedesmis 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-continouos cultivation with nitrogen limitation and pH control by Co_2. 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 forchoosing algal species for biodiesel production. Journal of Applied Phycology. 21: 493-507.

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2026-01-29]

[DOR: 20.1001.1.23222751.1397.8.2.2.6]

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 valurs 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_2 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. Bioresourse Technology. 101: 6797-6804.

Juneja, A., Ceballos, R.M., Murthy, G.S. 2013. Effect of environmental factors and nutrient a vailability 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 chromatograghy–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, NB., Fateley, W.G., Grasselil, J.G. 1991. The Handbook ofInfrared and Raman Characteristic Frequencies of Organic Molecules. Academic Press, San Diego New York Boston.

Lu, X., Guana, W., Zhao, H., Wanga, 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., Zamzamian, 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.

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2026-01-29]

[DOR: 20.1001.1.23222751.1397.8.2.2.6]

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., Fernadez-Valiente, E., Fernadez-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.

Ratledge, 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 Reveiw Microbiology. 31: 225-274.

Tabatabaeia, 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.

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2026-01-29]

[DOR: 20.1001.1.23222751.1397.8.2.2.6]