بررسی اثر غلظت‌های مختلف نیترات بر میزان کلروفیل a و چربی جلبک سبز *Chlorella vulgaris*

فرناز رفیعی[۱]
آریا اشجع اردلان[۲]
میترا مسگرها[*۳]
عبدالله اسماعیل زاده[٤]

۱، ۲. دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، استادیار گروه بیولوژی دریا، تهران، ایران
۳. دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، دانشجوی کارشناسی ارشد بیولوژی دریا، تهران، ایران
۴. ایستگاه تحقیقات شیلاتی نرمتنان، بندر لنگه، ایران

[*]مسئول مکاتبات:
mitra.mesgarha@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/۱۰/۱۲
تاریخ پذیرش: ۱۱/ ۱۳۹۱/۳

چکیده

در این تحقیق اثر غلظت‌های مختلف نیترات بر میزان کلروفیل و چربی جلبک *Chlorella vulgaris* در سال ۱۳۹۰ مورد بررسی قرار گرفت. آزمایش با ۳ تیمار شامل غلظت بالا (۲۴/۷۱ میلی‌گرم نیترات در لیتر)، غلظت متوسط (۱۲/۳۵ میلی‌گرم نیترات در لیتر) و غلظت کم نیترات (۶/۱۷ میلی‌گرم نیترات در لیتر) و ۳ تکرار با استفاده از استوک خالص جلبک سبز *Chlorella vulgaris* و محیط کشت F/2 گیلارد (با تغییر غلظت نیترات در تیمارها) در شرایط آزمایشگاهی انجام پذیرفت. پس از گذشت مدت معین، نمونه‌ها برای آنالیز برداشت شدند. نتایج به دست آمده نشان داد که کلروفیل a جلبک در نیترات بالا نسبت به دو غلظت دیگر بیش‌تر و به مقدار ۲۷۸ میلی‌گرم بر لیتر رسید. در پایان آزمایش میزان چربی در محیط کشت با تیمار نیترات بالا، ۵۶/۰۹ درصد بدست آمد که نسبت به دو تیمار دیگر بالاتر بود.

واژگان کلیدی: نیترات، کلروفیل a، چربی، *Chlorella vulgaris*.

مقدمه

جلبک‌های میکروسکوپی قادر به استفاده از انرژی نورانی برای ساختن مواد آلی هستند. در سال‌های اخیر مطالعات زیادی بر روی میزان چربی این جلبک‌ها به عنوان منبع سوخت آلی در بسیاری از مناطق صورت گرفته است. سوخت‌های زیستی به دلیل تجزیه بیولوژیکی و غیرسمی بودن آن‌ها مورد توجه می‌باشند. همچنین دی‌اکسیدکربن و گوگرد به اتمسفر وارد نمی‌کنند و آلودگی گازی کمتری را موجب می‌شوند (Vicente *et al*., 2004).

از سال‌های ۱۹۴۰، کلرلا به دلیل امکان تولید زیاد آن برای تغذیه مورد استفاده بوده است. این جلبک منبع پروتئین، چربی، کربوهیدرات، ویتامین و مواد معدنی می‌باشد (Becker, 2007). بسیاری از میکروجلبک‌ها قادر به تولید مقدار بالایی از چربی بوده که در مطالعات زیادی متابولیسم چربی آن‌ها بررسی شده است (Sheehan *et al*., 1998). این مطالعات نشان دادند که کمیت و کیفیت چربی‌های سلولی تحت شرایط مختلف رشد مانند دما، شدت نور، مواد مغذی، تراکم نیتروژن، فسفر و آهن تغییر می‌کند (Liu *et al*., 2008).

نیترات در باروری گیاهان تاثیر دارد. عناصر کربن، اکسیژن، هیدروژن، نیتروژن، فسفر، پتاسیم، منیزیم، گوگرد و آهن عمده‌ترین عناصر شیمیایی موثر در رشد جلبک کلرلا هستند (Becker, 2007).

کلروفیل مهم‌ترین ماده در عالم گیاهی است. آغاز و یا وجود حیات بدون جذب و تبدیل انرژی نورانی به شیمیایی ممکن نیست. کلروفیل‌هایی که با حلال‌های مختلف از گیاهان استخراج می‌گردند با کلروفیل‌هایی که در کلروپلاست گیاهان دیده می‌شود، تفاوت دارد. پنج نوع کلروفیل در گیاهان شناخته شده و کلروفیل a در تمام گیاهان و جلبک ها وجود دارد (Brown *et al*., 1998).

Archive of SID

www.SID.ir

رشد میکروجلبک‌ها تحت تأثیر میزان کم مواد مغذی معدنی در محیط، می‌تواند محدود شود. بنابراین ترکیب بیوشیمیایی میکروجلبک‌ها می‌تواند توسط این مواد مغذی تحت تأثیر قرار گیرد (Fabregas *et al*.,1998).

اغلب فرض بر این است که نوترینت‌های محدود کننده، نیتروژن و فسفر می‌باشند. این عناصر، تشکیل دهنده درصد بالایی از ترکیبات سلولی بوده و عناصر دیگر همیشه در حد متوسطی هستند. بنابراین به نظر می‌رسد که اضافه کردن عناصر مهم می‌تواند باعث افزایش ظرفیت بسیاری موارد در سلول شود (Mandalam and Palsson, 1998).

مطالعات نشان می‌دهند که در غلظت‌های کم نیتروژن و شدت نور، میزان چربی در سلول افزایش می‌یابد (Tedesco and Duerr,1989; Olguin *et al*., 2001). Sunkenik و همکاران (۱۹۸۹) گزارش کردند که در کشت‌های نیمه‌مداوم و مداوم میکروجلبک‌ها میزان چربی با افزایش نیتروژن افزایش می‌یابد.

تحقیق حاضر با هدف اندازه‌گیری میزان کلروفیل a و چربی جلبک *Chlorella vulgaris* در سه تیمار نیتروژن زیاد، متوسط و کم در شرایط کشت نیمه مداوم مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

بررسی حاضر در سال ۱۳۹۰ با تهیه جلبک سبز *Chlorella vulgaris* از ایستگاه تحقیقاتی نرمتنان شیلاتی بندر لنگه-خلیج فارس انجام شد. این جلبک در محیط کشت F/2 گیلارد (Guillard, 1975) تحت شرایط آزمایشگاهی در دمای ۲۵-۲۳ درجه سانتی‌گراد، میزان شوری ۲۵ قسمت در هزار، شدت نور۴۰ میکرومول فوتون بر متر مکعب/ ثانیه (که توسط دستگاه لوکس‌متر اندازه‌گیری شد)، دوره تاریکی روشنایی ۱۲:۱۲ ساعت و هوادهی مداوم پرورش داده شد. جهت ساخت محلول‌ها از نیترات سدیم (NaNo3) استفاده گردید. تراکم مواد غذایی در سه سطح (No3) ۲۴/۷۱ میلی گرم‌برلیتر (زیاد)، ۱۲/۳۵ میلی گرم‌برلیتر (استاندارد) و ۶/۱۷ میلی‌گرم‌برلیتر (کم) و برای هر تیمار نیترات سه تکرار در نظر گرفته شد (Daume *et al*., 2000).

به منظور انجام کشت انبوه ابتدا استوک خالص جلبک که حاوی ۵۰ سی‌سی جلبک کلرلا بود، در ۵۰۰ سی‌سی محیط کشت استریل شده، قرار داده شد. انتقال جلبک‌ها در فاز رشد سریع انجام گردید. بعد از گذشت ۵ روز از آغاز کشت، این حجم به حدود ۲ برابر یعنی ۱۰۰۰ سی‌سی افزایش داده شد. هر کدام از بطری‌های تیمار نیترات حاوی ۱ لیتر محیط کشت، حجم مورد نظر از نیترات سدیم و ۱۰۰ سی‌سی جلبک خالص کلرلا بود. عمل انتقال جلبک به بطری‌های حاوی محیط کشت استریل شده تماماً در کنار شعله انجام شد. سپس پیپت استریل شده داخل بطری‌ها قرار گرفته و لوله هوا به آنها متصل شد. بعد از بستن درب بطری‌ها، برای جلوگیری از ورود آلودگی کاملاً با پارافیلم پوشانده شد (Ferreira *et al*., 2009).

در سه روز اول، روزانه کشت تراکم جلبک‌ها اندازه‌گیری شد. بدین صورت که روزانه حدود ۶-۵ میلی‌لیتر از محلول جلبکی توسط پیپت پاستور برداشته و توسط میکروسکوپ نوری بر روی لام هموسیتومتر شمارش سلول‌های جلبکی انجام گردید. پس از گذشت ۵ روز و رسیدن جلبک به فاز یکنواختی، روزانه حدود ۲۰ درصد از محیط کشت جلبک با تیمار معلوم جایگزین شده تا غلظت یکنواختی ثابت بماند. در این زمان در سه روز متفاوت (روزهای پنجم، نهم و هفتم) ۲۵۰ سی‌سی از محلول جلبک را به همراه فرمیات آمونیوم ۰/۵ مولار سانتریفیوژ نموده، نمونه بدست آمده به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد در آون قرار گرفته و برای انجام سنجش‌های ترکیبات بیوشیمیایی نگهداری گردید (Seixas *et al*., 2008).

برای تعیین میزان چربی کل نمونه گیاهی یا جانوری از روش Freeman و Lindergan (۱۹۵۷) و Sperry و Brand (۱۹۵۵) استفاده شد. ۰/۰۱گرم از نمونه خشک گیاهی یا جانوری را در یک ویال درپیچ‌دار که در آن ۲/۵ سی‌سی مخلوط کلروفرم-متانول به نسبت ۱:۲ بود، قرار داده شد.

Archive of SID

www.SID.ir

در ویال به آرامی بسته و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد نگه‌داشته، پس از سرد شدن مایع با مخلوط کلروفرم-متانول مجدداً به حجم ۲/۵ سی‌سی رسانیده شد. سر ویال را بسته و آن‌را تکان داده، محلول از کاغذ صافی واتمن شماره ۵۴۱ عبور داده شد. سپس با مخلوط کلروفرم–متانول به نسبت ۱:۲ به ویال جدید تا به حجم ۲ سی‌سی رسانیده شد. بعد از افزودن ۰/۴ سی‌سی آب مقطر، ویال را به مدت ۵ دقیقه تکان داده، سپس در دور ۱۵۰۰ در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شده تا فاز محلول و حلال جدا گردد. فاز محلول بالایی را خارج نموده و حلال در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد تبخیر گردید.

عصاره چربی را با حداقل میزان کلروفرم–متانول از ویال به یک شیشه ساعت که قبلاً توزین شده منتقل و حلال در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد تبخیر گردید.

پس از تبخیر، مجدداً شیشه ساعت توزین گردید. وزن اولیه شیشه ساعت را از وزن نهایی کم نموده تا وزن چربی بدست آید.

با استفاده از فرمول زیر میزان درصد چربی نمونه محاسبه گردید (Freeman and Lindergan,1957):

$$\text{درصد میزان چربی} = \frac{\text{وزن چربی (بر حسب میلی‌گرم)} \times ۳/۲}{\text{وزن خشک (بر حسب میلی گرم)}}$$

برای اندازه‌گیری میزان کلروفیل a از روش Lorenzen (۱۹۶۷) استفاده شد. در این روش مقدار ۵۰ میلی‌لیتر از جلبک سبز را با گذراندن از کاغذ صافی SAVTOVIUS در استوانه مدرج قرار داده و از دستگاه میلیپور مجهز به یک ارلن عبور داده شد.

پس از اتمام عمل صاف کردن، صافی‌های حاوی جلبک را درون لوله آزمایش گذاشته و ۱۰ سی‌سی استون ۹۰ درصد به آن اضافه گردید. سپس لوله‌ها با فویل پوشانیده و به مدت ۲۴ ساعت در یخچال نگهداری شدند.

پس از خارج کردن لوله‌ها از یخچال، نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۳۰۰۰ سانتریفوژ گردیدند.

در نهایت میزان جذب نمونه را در طول موج‌های ۶۳۰، ۶۴۷ و ۶۶۵ خوانده و توسط فرمول زیر میزان کلروفیل a محاسبه شد:

$$C_a = ۱۱/۸۵ \text{ E } ۶۶۵ - ۱/۵۴ \text{ E } ۶۴۷ - ۰/۰۸ \text{ E } ۶۳۰$$

$$\text{میزان کلروفیل a (میکروگرم/لیتر)} = \frac{(C_a)(v)}{(V)(Z)}$$

v= حجم استون ۹۰ درصد

V= حجم جلبک فیلتر شده

Z=۱

C_a= عدد بدست آمده از فرمول اول

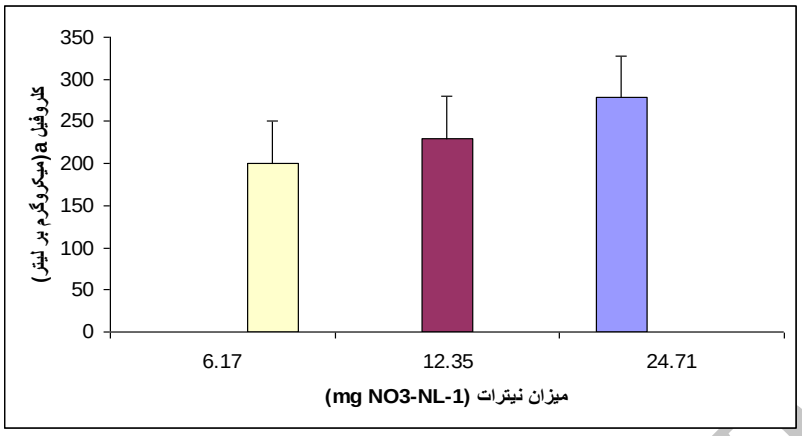
در این بررسی از آزمون تجزیه واریانس یک طرفه، جهت مشخص نمودن تفاوت معنی‌دار بین گروه‌های مختلف از آزمون توکی (Tukey)، جهت تعیین میزان معنی‌دار بودن بین تیمارهای مختلف از نرم‌افزار SPSS.ver10 استفاده و برای ترسیم نمودارها از نرم‌افزار اکسل استفاده شد.

نتایج

طبق بررسی‌های انجام شده اثر غلظت‌های متفاوت نیترات بر میزان کلروفیل a جلبک کلرلا نشان داد که با کاسته شدن از میزان نیترات در دسترس سلول‌های جلبکی، میزان کلروفیل a نیز در حد معنی‌داری کاهش می‌یابد (P<۰/۰۵). به طوری‌که در غلظت بالای نیترات، میزان کلروفیل ۲۷۸ میکروگرم/لیتر، در غلظت استاندارد نیترات حدود ۲۳۰ میکروگرم/لیتر و در غلظت پایین نیترات ۲۰۰ میکروگرم/لیتر اندازگیری شد (شکل ۱).

Archive of SID

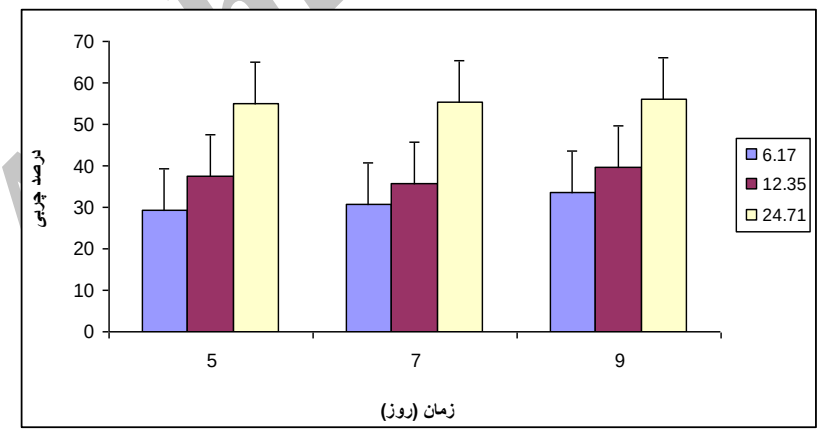
www.SID.ir



شکل ۱: میزان کلروفیل a جلبک کلرلای کشت داده شده در تیمارهای مختلف نیترات در سال ۱۳۹۰

(آنتنک‌ها انحراف معیار را نشان می‌دهد)

نتایج نشان می‌دهد اختلاف معنی‌داری در میزان چربی کلرلا در غلظت‌های مختلف نیترات وجود دارد (P<۰/۰۵). غلظت ۲۴/۷۱ میلی‌گرم بر لیتر میزان بالاتری از درصد چربی را نسبت به دو غلظت دیگر نشان داد. به طور میانگین درصد چربی در غلظت بالای نیترات (۲۴/۷۱ میلی گرم/لیتر) در روز پنجم ۴/۲۰±۵۴/۸۸ و در روز نهم ۲/۵۸±۵۶/۰۹ درصد اندازگیری شد. در غلظت استاندارد (۱۲/۳۵ میلی‌گرم لیتر) میزان چربی از ۳۷/۴۱ در روز پنجم به ۴/۲۳± ۳۹/۷۷ درصد در روز نهم و در غلظت پایین نیترات (۶/۱۷ میلی‌گرم بر لیتر) از ۵/۳۲± ۲۹/۲۷ درصد در روز پنجم به ۱/۲۸± ۳۳/۶۹ درصد در روز نهم رسید (شکل ۲). در تیمارهای مختلف درصد چربی جلبک کلرلا در روزهای آزمایش اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (P<۰/۰۵).



شکل ۲: تغییرات میزان چربی (درصد در وزن خشک جلبک) **جلبک کلرلای کشت داده شده در تیمارهای مختلف نیترات در سال ۱۳۹۰**

(آنتنک‌ها انحراف معیار را نشان می‌دهد)

Archive of SID

www.SID.ir

بحث و نتیجه گیری

در این مطالعه، میزان کلروفیل a و محتوای چربی جلبک *Chlorella vulgaris* در غلظت‌های مختلف نیتروژن بررسی شده است. مطالعات زیادی نشان می‌دهند که میزان نیتروژن بر میزان کلروفیل a تاثیرگذار است. ترکیب بیوشیمیایی میکروجلبک‌ها در بین گونه‌های مختلف متفاوت می‌باشد. منابع مختلف نیتروژن و میزان آنها روی رشد جلبک و ترکیبات بیوشیمیایی آن اثر می‌گذارد (Brown *et al*., 1996).

در این بررسی در بین تیمارها، تفاوت‌هایی از لحاظ رنگ مشاهده شد. در غلظت بالای نیترات، سلول‌های جلبکی به رنگ سبز پر رنگ، در غلظت استاندارد نیترات به رنگ سبز و در غلظت پایین نیترات به رنگ سبز متمایل به زرد دیده شدند. اگر چه در روزهای ابتدایی آغاز کشت تفاوتی در رنگ آن‌ها مشاهده نشد، اما پس از گذشت ۵ روز و با تعویض روزانه ۲۰ درصد از محیط کشت، این تفاوت‌ها به مرور آشکار شد که به دلیل اهمیت نیترات در ساختمان کلروفیل a می‌باشد.

در این بررسی با افزایش میزان نیترات، میزان کلروفیل a نیز افزایش یافته و بالعکس با کاسته شدن از میزان نیترات در دسترس سلول‌های جلبکی، میزان کلروفیل a تا حد معنی‌داری کاهش یافت ($P<۰/۰۵$)، به طوری‌که در غلظت بالای نیترات میزان کلروفیل ۲۷۸ میکروگرم برلیتر، در غلظت استاندارد نیترات حدود ۲۳۰ میکروگرم‌برلیتر و در غلظت پایین نیترات ۲۰۰ میکروگرم برلیتر مشاهده شد.

مطالعات نشان می‌دهند زمانی که کلروفیل a در سلول‌ها کاهش می‌یابد، کاروتن‌ها افزایش یافته و کشت جلبک شروع به زرد شدن می‌کند (Fabregas *et al*., 2003). در تحقیقی بر روی *Chlorella vulgaris* در شرایط پرورش با وجود نیتریت، میزان کلروفیل a، ۴۴۶/۹۷ میکروگرم برلیتر مشاهده شد که بالاترین مقدار کلروفیل در حضور منبع نیتروژن بود. در این مطالعه نبود نیتروژن باعث کاهش کلروفیل a شده است (Mutlu *et al*., 2011). گزارشات بیان می‌کنند که در پرورش کلرلا، در صورت کمبود میزان نیتروژن، مقدار کلروفیل در سلول‌ها کاهش می‌یابد که با نتایج بررسی حاضر مطابقت دارد (Shifrin and Chisholm, 1981).

Dortch و Conway (۱۹۸۴) دریافتند که در زمان محدودیت نیترات، کمپلکس پروتئین-کلروفیل کاهش می‌یابد. این کمپلکس در غشاء تیلاکوئید قرار داشته و انرژی نورانی را به مرکز واکنش فتوسیستم‌های نوری منتقل می‌کند. با ادامه یافتن فتوسنتز در حالی‌که تقسیم سلولی به دلیل کمبود مواد مغذی متوقف شده است، چربی در سلول انباشته می‌شود. تحت شرایط کمبود مواد غذایی، سنتز لیپیدها به سمت ذخیره تری گلیسیریدها و لیپیدهای خنثی پیش می‌رود.

ترکیبات بیوشیمیایی جلبک‌ها از جمله چربی‌ها توسط مواد مغذی در دسترس، تاثیر می‌پذیرند (Fabregas *et al*., 1998). در برخی از گونه‌های جلبکی تجمع چربی‌ها تحت شرایط کمبود نیتروژن افزایش می‌یابند (Shifrin and Chisholm, 1981). بیش‌ترین تراکم چربی *Nannochloropsis salina* تا ۷۰ درصد وزن خشک در شرایط کمبود نیتروژن (در نیتروژن کم، ۳۰۰ تا ۶۰۰ میکرومول بر لیتر) تا ۹ روز به دست آمده است (Shifrin and Chisholm,1981).

Hu و Gao (۲۰۰۶) افزایش تقریباً ۴ برابری میزان چربی *Nannochloropsis sp* را به میزان ۶۲ نسبت به ۱۳ درصد در ۱۵۰ میکرومول نیترات سدیم ($NaNO_3$) نسبت به ۳۰۰۰ میکرومول به‌دست آوردند. در *Chlorella sp* تغییر در میزان نیتروژن در محیط کشت در حد معنی داری میزان اسیدهای چرب اشباع شده و اشباع نشده را تغییر داده است (Pohl and Zurheide, 1979).

Tedesco و Duerr (۱۹۸۹) بیان نمودند که فقدان نیتروژن در محیط کشت *Spirulina platensis* نسبت کلی چربی‌ها را افزایش داده است. Olguin و همکاران در سال ۲۰۰۱ *S.platensis* را در دو محیط کشت شامل محیط کشت زاروک و محیطی که ۱۰ برابر نیتروژن کمتری از محیط زاروک داشته است و شدت‌های

Archive of SID

www.SID.ir

نور ۶۶ و ۱۴۴ میکرومول فوتون بر مترمربع در ثانیه به منظور تعیین میزان چربی رشد دادند. آن‌ها دریافتند که میزان ۲۸/۶ درصد چربی در محیط کشتی که نیتروژن آن ۱۰ برابر کمتر بود و در شدت نور کم به‌دست آمده است. همان‌طور که در پژوهش انجام شده در محیط با تیمار ۶/۱۷ میلی‌گرم نیترات در لیتر که حاوی کمترین میزان نیتروژن در دسترس جلبک‌ها در بین تیمارها بود، کمترین میزان چربی (۳۳/۶۹ درصد) بدست آمد.

در تحقیق دیگری، کاهش در غلظت نیتروژن در محیط کشت *Spirulina platensis* از ۵ تا ۲/۵ گرم در لیتر باعث افزایش در چربی سلول شده و از ۱۳/۶۶ به ۱۷/۰۵ درصد رسیده است (Mutlu *et al*., 2010).

جلبک سبز *Scenedesmus obliguus* و چهار جلبک سبز آبی *Anacystis nidulans*، *Microcystis aeruginosa*، *Osillatoria rubescens* و *S. platensis* در کشت انبوه (Batch) در ۸ لیتر و تحت تراکم‌های مختلف نیتروژن رشد داده شدند که با افزایش میزان نیتروژن کلروفیل a و پروتئین آنها افزایش داشته است. در نیتروژن کم، جلبک سبز تراکم بالایی از چربی (۴۵ درصد) را نشان داده است (Piorreck *et al*., 1984).

Zhilla و همکاران (۲۰۰۵) جلبک *Bortyococcus brauni* را در میزان کم نیتروژن در بیست روز پرورش داده و افزایش ۲۱ درصد چربی را نسبت به تیمار شاهد که نیتروژن بیشتری داشته مشاهده کرده‌اند. در تحقیق دیگری جلبک *Neochloris oleoabundas* در یک سیستم فتوبیورآکتور در محیط کشت با مقدار کم نیتروژن کشت داده شد. در این پژوهش میزان چربی در گروه شاهد ۲۳ درصد بود، در حالی‌که در محیط کشت با کمبود نیتروژن میزان چربی ۳۷ درصد مشاهده شده است (Pruvost *et al*., 2009). این در حالی است که در این بررسی، با کاهش میزان نیترات، میزان چربی نیز کاهش یافت و بالعکس با افزایش نیترات میزان درصد چربی افزایش یافت.

در جلبک *Nannochloropsis sp.* افزایش در مواد مغذی باعث کاهش چربی شده، در حالی‌که در سیستم نیمه مداوم محتوای چربی سلولی در *Nannochloropsis gaditana* با افزایش نیتروژن بالا رفته است که با نتایج به دست آمده در این بررسی مطابقت دارد (Sukenik *et al*., 1989).

در این تحقیق، کشت نیمه مداوم کلرلا باعث افزایش چربی از ۳۳/۶۹ درصد در محیط کشت دارای میزان ۶/۱۷ میلی گرم نیتروژن در لیتر، به ۵۶/۰۹ درصد در محیط کشت دارای میزان ۲۴/۷۱ میلی گرم نیتروژن در لیتر شده است.

Mutlu و همکاران در سال ۲۰۱۱ اثر کمبود نیتروژن و فسفر و افزایش نیتریت را روی چربی *Chlorella vulgaris* آزمایش کردند.

تغییرات چربی به این صورت نشان داده شد:

میزان چربی در محیط کنترل شده ۱۲/۲۹ درصد، برای ۵۰ درصد نیتروژن ۱۷/۵درصد، برای ۱۰۰ درصد نیتروژن ۳۵/۶۵ درصد، برای۵۰ درصد نیتروژن و ۵۰ درصد فسفر ۲۰/۵ درصد، برای ۵۰ درصد فسفر ۱۶/۷درصد و برای اضافه نمودن نیتریت ۱۳/۰۴ درصد بدست آمد. بالاترین چربی در پرورش با ۱۰۰ درصد نیترات و در ۱۸ درصد گرم بر لیتر وزن خشک بدست آمد. بیش‌ترین میزان چربی آن ۶۵ /۳۵ درصد برآورد شد که از چربی به‌دست آمده در این تحقیق (۵۶/۰۹) به مراتب کمتر بوده است.

در یک نتیجه‌گیری کلی می توان بیان کرد که شرایط پرورش به کار رفته در این تحقیق یعنی افزایش میزان نیترات باعث افزایش کلروفیل a و در نتیجه افزایش محصولات متابولیکی شده و می‌تواند میزان چربی جلبک *Chlorella vulgaris* را برای مقاصد سوخت زیستی به درصد قابل قبولی (۵۶/۰۹) افزایش دهد.

سپاسگزاری

بدین وسیله از تمامی کسانی که ما را در انجام تحقیق یاری نمودند، صمیمانه قدردانی می‌گردد.

Archive of SID

www.SID.ir

منابع

Becker, E. W., 2007. Micro-algae as a source of protein. Biotechnology Advances, 25 (2): 207–10.

Brown, M. R., Mc Causland, M. A. and Kovalski, K., 1998. The nutritional value of four Australian microalgal strains fed to Pacific oyster *Crassostrea gigas* spat. Aquaculture, 165:281–293.

Brown, R., Pressly, M., Van Meter, P., and Schuder, T., 1996. Aquasi-experimental validation of transactional strategies instruction with low achieving second grade readers. Journal of Educational Psychology, 88:18-37.

Daume, S., Krsinich, A., Farrell S. and Gervis, M., 2000. Settlement, early growth and survival of *Haliotis rubra* in response to different algal species. appl. Phycol,12: 479–488.

Dortch, Q. and Conway, H. L., 1984. Interactions between nitrate and ammonium uptake: variation with growth rate, nitrogen source and species. Mar. Biol, 79: 151-164.

Fabregas, J., Herrero, C., Cabeza, B. and Abalde, J., 2003. Mass culture and biochemical variability of the marine microalgae *Tetraselmis suecica* Kylin (Butch) with high nutrient concentration. University of Santiago.

Fábregas, J., Otero, A., Morales, E. D., Arredondo-Vega, B. O. and Patiño, M., 1998. Modification of the nutritive value of *Phaeodactylum tricornutum* for *Artemia* sp. in semicontinuous cultures. Aquaculture, vol. 169, PP. 167–176.

Ferreira, M., Coutinho, P., Seixas, P., Fabregas, J. and Otero, A., 2009. Enriching Rotifers with Peremium Microalgae, *Nannochloropsis gaditana*. Mar Biotechnol, vol .11, PP. 585-595.

Freeman, N. K. F. T. and Lindergen, Y. C. N. G., 1957. Serum lipids analysis by chromatography and infrared spectrophotometry. J. Biol, Chem, 227:449-464.

Hu, H. and Gao, K., 2006. Response of growth and fatty acid compositions of *Nannochloropsis* sp to environmental factors under elevated CO_2 concentration. Biotechnol, 28: 987-992.

Liu, Z. Y., Wang, G. C. and Zhou, B. C., 2008. Effect of iron on growth and lipid accumulation in *Chlorella vulgaris*. Bioresour, Technology, 99: 4717- 4722.

Lorenzen, C. J., 1967. Determination of chlorophylls and phaeopigments: spectrophotometric equations. Limnology, Oceanography, 12: 343- 346.

Mutlu, Y. B., Isik, O., Uslu, L., Koç, K. and Durmaz, Y., 2011. The effects of nitrogen and phosphorus deficiencies and nitrite addition on the lipid content of *Chlorella vulgaris* (Chlorophyceae). Afr J, Biotechnology, 10: 453-456.

Olguin, E., Galicia, S., Angulo-Guerrero, O. and Hernndez, E., 2001. The effect of low light flux and nitrogen deficiency on the chemical composition of *Spirulina* sp. (Arthrospira) grown on digested pig waste. Bioresour, Technology, 77: 19-24.

Piorreck, M., Baasch, K. H. and Pohl, P., 1984. Biomass production, total protein, chlorophylls, lipids and fatty acids of freshwater green and blue-green algae under different nitrogen regimes. Phytochemistry, 23(2): 207-216.

Pohl, P. and Zurheide, F., 1979. Fatty acids and lipids in marine algae and the control of their biosynthesis by environmental factors, Marine algae in pharmaceutical science. de Gruyter, Berlin, 433p.

Pruvost, J., Van Vooren, G., Cogne, G. and Legrand, J., 2009. Investigation of biomass and lipids production with *Neochloris oleoabundans* in photobioreactor. Bioresour, Technology, 10(23): 5988-5995.

Seixas, P., Rey-Méndez, M., Valente, L. M. P. and Otero, A., 2008. Producing juvenile Artemia as preys for *Octopus vulgaris* paralarvae with different microalgal species of controlled biochemical composition. Aquaculture, 283: 83–91.

Sheehan, D. V., Lecrubier, Y., Sheehan K. H., Amorim, P., Janavs, J., Weiller, E., Hergueta, T., Baker, R. and Dunbar, G. C., 1998. The Mini-International Neuropsychiatric Interview (M.I.N.I.): the development and validation of a structured diagnostic psychiatric interview for DSM-IV and ICD-10. J. Clin, Psychiatry, 59: 22–33.

Shifrin, N. S. and Chisholm, S. W., 1981. Phytoplankton lipids: interspecific differences andeffects of nitrate, silicate and light dark cycles. Phycology, 17:372-384.

Sperry, W. M. and Brand, F. C., 1955. The determination of total lipids in blood serum. Biol Chemistry, Mar, 213(1):69-76.

Archive of SID

www.SID.ir

Sukenik, A., Carmeli, Y. and Berner, T., 1989. Regulation of fatty acid composition by irradiance level in the *eustigmatophyte Nannochloropsis* sp. Phycology, 25:686–692.

Tedesco, M. and Duerr, E., 1989. Light, temperature and nitrogen starvation effects on the total lipid and fatty acid content and composition of *Spirulina*. Appl, Phycology, 1: 201-209.

V**icente-Agullo, F., Rigas, S., Desbrosses, G., Dolan, L., Hatzopoulos, P. and Grabov, A., 2004.** Potassium carrier TRH1 is required for auxin transport in Arabidopsis roots. Plant J, 40: 523–535.

Zhila, N. O., Kalacheva, G. S. and Volova, T. G., 2005. Influence of nitrogen deficiency on biochemical composition of the green algae *Botryococcus*. Appl, Phycology, 17: 309-315.

Archive of SID

www.SID.ir