Downloaded from jmb.iauahvaz.ac.ir at 12:06 +0430 on Tuesday July 28th 2020

# اثرات هورمون‌های توفوردی (2,4-D) و بنزیل امینو پورین (BAP) و تغییر مواد معدنی بر محتوای لیپید، قند و توده‌های سلولی جلبک *Chlorella sorokiniana*

**آمنه جمشیدی**[1*]

۱. مربی گروه زیست‌شناسی، دانشگاه پیام نور تهران شرق، تهران، ایران

***مسئول مکاتبات**

Ameneh.jamshidi@gmail.com

کد مقاله: ۱۳۹۹۰۱۰۷۹۸

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱۲/۲۲

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۲/۱۱

**این مقاله برگرفته از طرح پژوهشی است.**

## چکیده

گونه‌های جلبک کلر لا از جلبک‌های سبز تک‌سلولی هستند که کاربردهای فراوانی دارند. جلبک کلرلا سوروکینیانا (*Chlorella sorokiniana*) جلبک سبزاست که به شکل تک‌سلول و توده‌ای مشاهده می‌شود. در این تحقیق که در سال ۱۳۹۸ در دانشگاه پیام نور تهران انجام شد، کلرلا سوروکینیانا در محیط کشت پایه بولد اصلاح‌شده با تغییر فیتوهورمون‌ها، توفوردی (۰/۵– ۱ میلی‌گرم در لیتر) همراه بنزیل امینوپورین (۲–۱ میلی‌گرم در لیتر) ومواد‌معدنی (نیترات و فسفات دو برابر) کشت و رشد، محتوای لیپید و قندهای محلول در آب آن اندازه‌گیری شد آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد آنالیز آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS13 و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن تعیین شد. در تیمار توفوردی (۱ میلی‌گرم در لیتر) توأم با بنزیل امینوپورین (۲ میلی‌گرم در لیتر) تعداد سلول‌ها به‌طور معنی‌داری $P\leq$ ۰/۰۵ ($۲۱\times۱۰^{۷}$ سلول در میلی‌لیتر سوسپانسیون جلبک) نسبت به شاهد ($۱۰/۹۸\times۱۰^{۷}$ سلول در میلی‌لیتر سوسپانسیون جلبک) افزایش یافت. بزرگ‌ترین توده‌های سلولی در تیمار توفوردی (۱ میلی‌گرم در لیتر) توأم با بنزیل امینوپورین (۱ میلی‌گرم در لیتر) مشاهده شد. در ۷۵ درصد تیمارهای هورمونی قطر سلول‌ها و در همه‌ی تیمارهای هورمونی محتوای لیپید (۱۶–۱۳/۳ درصد) کاهش معنی‌داری $P\leq$ ۰/۰۵ را نسبت به شاهد (۲۴/۷ درصد) نشان داد. بالاترین درصد لیپید (۳۲/۶۳) در محیط بولد ضمیمه‌شده با دو برابر نیترات و فسفات به دست آمد. محتوای قندهای محلول در هیچ‌یک از تیمارها (۳/۲–۰/۹ میلی‌گرم در گرم جلبک خشک) تغییر معنی‌داری نسبت به شاهد (۲/۱ میلی‌گرم در گرم جلبک خشک) نشان نداد. به‌طورکلی نتایج بررسی حاضر نشان داد ترکیب هورمون‌های توفوردی با بنزیل امینوپورین در این غلظت‌ها سبب افزایش رشد توده‌های سلول‌های جلبک می‌شود ولی محتوای لیپید جلبک را کاهش می‌دهد. از این هورمون‌ها می‌توان فقط برای افزایش بیوماس جلبک استفاده کرد؛ اما افزودن نیترات و فسفات دو برابر سبب افزایش رشد و محتوای لیپید جلبک می‌گردد و این محیط، مناسب‌ترین محیط کشت برای افزایش رشد و محتوای لیپید جلبک *Chlorella sorokiniana* است.

**واژگان کلیدی:** توفوردی، بنزیل امینوپورین، *Chlorella sorokiniana*، قند، لیپید، مواد معدنی.

## مقدمه

کلرلا سوروکینیانا جلبک سبز است که به‌صورت تک‌سلولی و توده سلولی مشاهده می‌شود که در صنعت، مواد غذایی، آرایشی و دارویی مورداستفاده قرار می‌گیرد. کلرلا واجد بالاترین محتوای کلروفیل در طبیعت است و احتمالاً می‌توان از آن محصولات دیگری مانند کاروتنوییدها (بتا کاروتن، لوتئین)، لیپید، ویتامین‌ها و کلروفیل را به دست آورد (Tate *et al.*, 2013; Ambati *et al.*, 2018). روغن ریز جلبک‌ها بسیار بهتر از روغن بهترین محصولات کشاورزی است (Chisti, 2007). میزان تولید روغن در جلبک خیلی بالاتر از سویا، خرما، کرچک و ذرت است. در بعضی گونه‌ها لیپیدها تا ۸۰ درصد وزن خشک را تشکیل می‌دهند (Patil *et al.*, 2008). ریز جلبک‌ها می‌توانند کاملاً جایگزین سوخت‌های فسیلی



www.SID.ir

Downloaded from jmb.iauahvaz.ac.ir at 12:06 +0430 on Tuesday July 28th 2020

شوند (Xiong *et al*., 2009). لیپیدها می‌توانند از منابع تجدید پذیری تولید شوند که سازگاربامحیط‌زیست هستند. چالش‌های زیادی در تولید انبوه ریز جلبک برای سوخت زیستی وجود دارد. گونه‌های سریع الرشد دارای مقادیر کمتری لیپید (۲۰٪ وزن‌تر) هستند، درحالی‌که گونه‌های کند رشد دارای مقادیر بیشتری لیپید (۵۰ – ۴۰ درصد وزن‌تر) هستند (Xiong *et al*., 2009). مقادیر بالای لیپید در شرایط تنش سلول‌ها مثل گرسنگی مواد غذایی ایجاد می‌شود (Nigam *et al*., 2011). از بیوماس جلبک به‌دست‌آمده، می‌توان برای مصارف زیادی استفاده کرد که سوخت زیستی مهم‌ترین آن‌هاست، گاز متان، گاز هیدروژن، اتانول زیستی (بیواتانول) و محصولات جانبی ریز جلبک هستند. اول‌ازهمه، لیپیدها و کربوهیدرات‌های تولیدشده در سلول موردنظر است. لیپیدها برای سوخت زیستی و کربوهیدرات‌ها برای تولید اتانول موردتوجه قرار می‌گیرند ( Tate *et al*., 2013). لیپیدهای موجود در جلبک‌ها استفاده دارویی و غذایی نیز دارند. امگا ۳ و آلفالینولینک اسید موجود در کلرلا به تصفیه خون و کاهش کلسترول خون کمک می‌کند (Sansawa *et al*., 2006).Nigam و همکاران (۲۰۱۱) گزارش کردند که در محیط کشت *Chlorella pyrenoidosa* هر چه غلظت نیترات در محیط کشت کاهش پیدا می‌کرد بیوماس جلبک کاهش، ولی محتوای لیپید جلبک افزایش می‌یافت. بیشترین میزان لیپید ۲۶ درصد بود که در محیط واجد ۰/۰۵ گرم در لیتر نیترات پتاسیم (معادل ۲۵٪ غلظت نیترات پایه) به‌دست‌آمده آمد. بیشترین تجمع لیپید در مرحله ایستای رشد جلبک مشاهده شد. طبق گزارش‌ها، کاهش نیترات از ۹۰ به ۶۰،۴۰ و ۲۰ میلی‌گرم در لیتر سبب کاهش تعداد سلول‌ها و افزایش محتوای لیپید در جلبک *Chlorella vulgaris* گردید (Robles-Heredia *et al*., 2015) در بررسی که روی جلبک *Chlorella minutissima* انجام پذیرفت از مقادیر متفاوتی نیترات و فسفات استفاده شد، بیشترین میزان بیوماس، محتوای لیپید در نیتروژن (نیترات سدیم ۰/۱۲۵ گرم در لیتر) و فسفر (دی پتاسیم فسفات ۷ ۰/۰ گرم در لیتر) به‌دست‌آمده آمد. اثر هم‌افزایی بین نیتروژن و فسفر سبب افزایش رنگیزه‌های فتوسنتزی شد (Arora *et al*., 2016). هورمون‌های گیاهی در جلبک‌ها موجودند و تغییر در غلظت هورمون‌ها، می‌تواند سبب تغییر رشد جلبک گردد (Bajguz and Piotrowska-Niczyporuk, 2013; Stirk *et al*, 2013) برخی فرآیندهای فیزیولوژیک و بیوشیمیایی سلول‌های جلبکی (Tarakhovskaya *et al*., 2007) مثل افزایش ابعاد و تعداد سلول، تغییر محتوای قندها تحت کنترل چنین هورمون‌هایی هستند (Tate *et al*., 2013). گزارش‌های زیادی وجود دارد که فیتوهورمون‌ها سبب تجمع زیست‌توده و متابولیت‌هایی مثل لیپیدها، کربوهیدرات‌ها و محصولات پرارزش می‌شوند (Kozlova *et al*., 2017; Che *et al*., 2017) هورمون‌های گیاهی تولید اسیدهای چرب امگا ۳ را در جلبک *Chlorella sp* القا می‌کنند (Sivaramakrishnan and Incharoensakdi, 2020). توفوردی ماده‌ای است که مثل هورمون اکسین عمل می‌کند و سبب رشد کنترل نشده و درنهایت مرگ گیاهان مستعد می‌شود. توفوردی در سطح مولکولی مثل اکسین عمل می‌کند در غلظت‌های پایین به‌عنوان هورمون و در غلظت‌های بالا به‌عنوان علف‌کش استفاده می‌شود (Song, 2013). بنزیل امینوپورین (BAP) یک هورمون تیپ سیتوکینینی است. Piotrowska و Czerpak (۲۰۰۹) اثر سیتوکینین‌های تیپ آدنین و فنیل اوره در نور و تاریکی بر جلبک *Chlorella vulgaris* بررسی کردند. نتایج تحقیق آن‌ها نشان داد که تیمار کلرلا با سیتوکینین‌های تیپ آدنینی (زآتین، کینتین، بنزیل آدنین) و دی‌فنیل‌اوره اثرات مثبتی بر حیات و افزایش ۱/۵ تا ۲ برابر تعداد سلول داشت. در بین سیتوکینین‌ها تیمار با بنزیل آدنین سبب بیشترین اثر افزایشی شد. Liu و همکاران (۲۰۱۷a) گزارش کردند که کینتین در تنش آمونیوم (محیط واجد ۱ تا۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر آمونیوم) با غلظت ۵۰ میلی‌گرم در لیتر سبب افزایش رشد (بیوماس) *C. Pyrenoidosa*گردید. جمشیدی و همکاران (۱۳۹۶) اثر نیترات و فسفات دو برابر واجد تیامین پیرو فسفات، را بر روی جلبک *Chlorella sorokiniana* بررسی کردند. آنالیز داده‌ها نشان داد که در جلبک‌های رشد یافته در محیط کشت حاوی نیترات و فسفات دو برابر واجد تیامین پیرو فسفات، وزن خشک، تعداد سلول‌ها در یک میلی‌لیتر محیط کشت، محتوای آنتی‌اکسیدان‌ها و پروتئین به‌طور معنی‌داری نسبت به شاهد افزایش یافت. طبق گزارش محققین، وزن خشک جلبک *C. sorokiniana* در همه‌ی تیمارهای توفوردی همراه با بنزیل امینوپورین نسبت شاهد افزایش معنی‌داری را نشان داد (جمشیدی، ۱۳۹۸). برخی محققین از روش دومرحله‌ای برای رشد جلبک و تولید لیپید استفاده کرده‌اند. El Arroussi و همکاران (۲۰۱۵) ابتدا از هورمون توفوردی برای افزایش رشد جلبک



www.SID.ir

Downloaded from jmb.iauahvaz.ac.ir at 12:06 +0430 on Tuesday July 28th 2020

(افزایش ۴۰ درصد بیوماس) استفاده کردند و سپس برای افزایش محتوای لیپید (افزایش۷۰ درصد لیپید) جلبک *Dunaliella tertiolecta* را در تنش نمکی قراردادند. Han و همکاران (۲۰۱۸) مقاله مروری در مورد اثر هورمون‌های گیاهی بر رشد و محتوای متابولیت‌های جلبک‌ها ارائه نموده اند. در مورد اثر هورمون‌های گیاهی بر رشد و محتوای پروتئین و رنگیزه‌های فتوسنتزی جلبک *C. sorokiniana* گزارش‌هایی وجود دارد، اما درباره محتوای لیپید، قند و ابعاد سلول‌های این جلبک در تیمارهای دو هورمونی یا نیترات و فسفات بالا گزارشی نشده است. در این مقاله محتوای لیپید، قند و برخی تغییرات سلولی جلبک *C. sorokiniana* در محیط‌هایی که گزارش‌شده جلبک در آن‌ها سریع رشد می‌کنند، اندازه‌گیری شده و علت رشد سریع در این تیمارها موردبررسی قرارگرفته است.

## مواد و روش‌ها

در این پژوهش که در سال ۱۳۹۸ در دانشگاه پیام نور تهران انجام پذیرفت، جلبک *Chlorella sorokiniana* (IBRC-M 5008) از مرکز ذخایر ژنتیکی و بیولوژیکی ایران و مواد شیمیایی موردنیاز از شرکت مرک تهیه شد. جلبک‌ها در محیط کشت پایه Basal Medium: BBM (Andersen, 2005) باکمی تغییر ($KH_2PO_4$: ۰/۰۷۵ گرم در لیتر) به‌اضافه ۵ گرم در لیتر گلوکزمنوهیدرات با هورمون‌های 2,4-D (۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر) و BAP (۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) یا افزایش دو برابری نیترات و فسفات، با pH= ۶/۸ کشت شد (Bajguz and Piotrowska-Niczyporuk, 2014). ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت در فلاسک‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری ریخته و سپس به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه و فشار ۱ اتمسفر اتوکلاو شد. یک میلی‌لیتر جلبک (۰/۰۲ گرم) در فاز لگاریتمی به ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت تلقیح شد. فلاسک‌ها در اتاق کشت بر روی شیکر انکوباتور (GFL, 3031, Germany) با ۱۲۵ دور در دقیقه در دمای ۱±۲۵ درجه سانتی‌گراد و شرایط نور (لامپ‌های فلوئور سنت، ۵۰ مول بر مترمربع بر ثانیه) و دوره نوری ۱۲ ساعت نور ۱۲ ساعت تاریکی قرار گرفت. فلاسک‌ها به مدت ۷۲ ساعت در این شرایط نگهداری شد و سپس تعداد سلول‌ها و محتوای متابولیت‌های جلبک پس از ۷۲ ساعت کشت اندازه‌گیری شد آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی و با سه تکرار انجام شد. مواد شیمیایی و هورمون‌هایی که به محیط‌های کشت افزوده شد، طبق جدول ۱ است.

**جدول ۱: غلظت هورمون‌ها و مواد معدنی استفاده‌شده در محیط کشت (BBM) جلبک کلرلا سوروکینیانا (*Chlorella sorokiniana*) در سال ۱۳۹۸ در دانشگاه پیام نور تهران.**

| تیمار / محیط | بنزیل امینوپورین (میلی‌گرم در لیتر) | توفوردی (میلی‌گرم در لیتر) | نیترات سدیم (گرم در لیتر) | دی پتاسیم فسفات (گرم در لیتر) | مونو پتاسیم فسفات (گرم در لیتر) |
|---|---|---|---|---|---|
| A | ۱ | ۰/۵ | ۰/۲۵ | ۰/۰۷۵ | ۰/۰۷۵ |
| B | ۲ | ۰/۵ | ۰/۲۵ | ۰/۰۷۵ | ۰/۰۷۵ |
| C | ۱ | ۱ | ۰/۲۵ | ۰/۰۷۵ | ۰/۰۷۵ |
| D | ۲ | ۱ | ۰/۲۵ | ۰/۰۷۵ | ۰/۰۷۵ |
| E | ۰ | ۰ | ۰/۵ | ۰/۱۵ | ۰/۱۵ |
| F(شاهد) | ۰ | ۰ | ۰/۲۵ | ۰/۰۷۵ | ۰/۰۷۵ |

اندازه‌گیری رشد از طریق شمارش تعداد سلول انجام پذیرفت .شمارش سلول‌های جلبک توسط لام نئوبار صورت گرفت (رنجبر اقدم و همکاران، ۱۳۹۱). اندازه‌گیری قطر سلول‌ها توسط لام مدرج و میکروسکوپ دوربین‌دار Olympus صورت گرفت و برای سنجش قطر سلول در هر تیمار، قطر ۲۵ سلول اندازه‌گیری شد. برای سنجش تعداد سلول در هر توده سلولی ۱۰ توده موردبررسی قرار گرفت. اندازه‌گیری محتوای کل لیپیدها به



www.SID.ir

Downloaded from jmb.iauahvaz.ac.ir at 12:06 +0430 on Tuesday July 28th 2020

روش Shu و همکاران (۲۰۱۳) باکمی تغییر، صورت گرفت. به این منظور، ۱۰ میلی‌گرم جلبک خشک با هاون پودر شد و به آن ۱ میلی‌لیتر متانول مطلق و ۰/۵ میلی‌لیتر کلروفرم افزوده شد. سپس ۵ دقیقه سونیکیت شد. بعد ۰/۵ میلی‌لیتر دیگر کلروفرم به آن افزوده شد و یک دقیقه با شیکر تکان داده شد، بعد ۰/۵ میلی‌لیتر آب مقطر به آن افزوده شد و یک دقیقه تکان داده شد، سپس ۴ دقیقه در ۴۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. دولایه جدا شد. لایه رویی با پیپت خارج‌شده و دور ریخته شد. برای بهتر رسوب کردن باقیمانده‌های جلبکی، دوباره در ۴۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. محلول رویی (کلروفرمی)، در ویال‌هایی که قبلاً وزن شده بود ریخته شد. رسوب جلبکی تا دو بار استخراج شد و محلول رویی به محلول‌های کلروفرمی قبلی افزوده شد. ویال‌های حاوی محلول کلروفرمی در آون ۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵۰ دقیقه قرار گرفت پس از خشک شدن، دوباره توزین شد و وزن لیپید کل به دست آمد. برای اندازه‌گیری قندهای محلول در آب، ابتدا ۳۰ میلی‌گرم جلبک خشک وزن شد. با هاون پودر شد به آن ۱۱ میلی‌لیتر آب مقطر افزوده شد به هم زده شد و سپس ۵ دقیقه سونیکیت گردید. مدتی در یخچال نگهداری شد تا قندها در آب حل شوند، سپس در ۴۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. برای اندازه‌گیری قندهای محلول در آب از روش Dubois و همکاران (۱۹۵۶) استفاده شد. به این منظور، ۵۰ میکرو لیتر از محلول رویی حاوی قند برداشته شد به آن ۰/۵ میلی‌لیتر فنل ۵ درصد و ۲/۵ میلی‌لیتر اسیدسولفوریک ٪۹۸ افزوده شد. پس از سرد شدن (حدود ۲۰ دقیقه) جذب آن در ۴۹۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. محتوای قند برحسب میلی‌گرم در هر گرم ماده خشک محاسبه گردید. آنالیز آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS(version13) از مسیر Anova یک‌طرفه انجام گرفت. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن و معنی‌داری در سطح $P\leq ۰/۰۵$ تعیین و شکل‌ها با نرم‌افزار SPSS رسم شد.

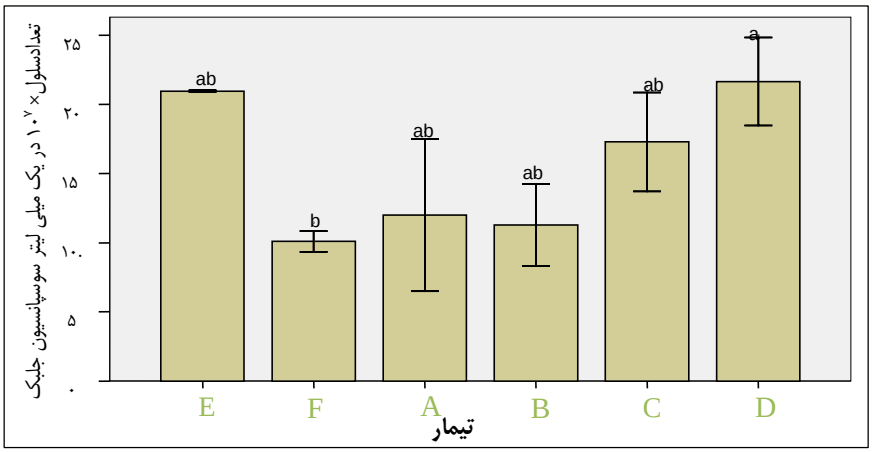
## نتایج

در ٪۷۵ تیمارهای هورمونی و تیمار افزایش نیترات و فسفات تعداد سلول‌ها به‌طور غیر معنی‌دار $P>۰/۰۵$ و در تیمار توفوردی (۱ میلی‌گرم در لیتر) توأم با بنزیل امینوپورین (۲ میلی‌گرم در لیتر) تعداد سلول‌ها به‌طور معنی‌داری $P\leq ۰/۰۵$ نسبت به شاهد افزایش یافت (شکل ۱). توده‌های سلولی نیز در همه تیمارها و شاهد مشاهده شد، ولی در تیمار توفوردی (۱ میلی‌گرم در لیتر)+بنزیل امینوپورین (۱ میلی‌گرم در لیتر) توده‌های سلولی بسیار بزرگی تشکیل شد که با همه‌ی تیمارهای دیگر و شاهد اختلاف معنی‌داری $P\leq ۰/۰۵$ را نشان داد (شکل ۲). قطر سلول‌ها نیز در ٪۷۵ تیمارهای هورمونی کاهش معنی‌داری $P\leq ۰/۰۵$ نسبت به شاهد نشان داد ولی در تیمار، افزایش نیترات و فسفات، افزایش غیر معنی‌داری نسبت به شاهد داشت (شکل ۳). محتوای لیپیدها نیز در تیمارهای هورمونی کاهش معنی‌دار و در تیمار افزایش نیترات و فسفات افزایش معنی‌داری $P\leq ۰/۰۵$ را نسبت به شاهد نشان داد (شکل ۴). محتوای قندهای محلول در آب در تیمارهای هورمونی افزایش غیر معنی‌داری را نسبت به شاهد نشان داد ولی هیچ‌یک از تیمارها اثر معنی‌داری بر محتوای قند نداشت (شکل ۵)



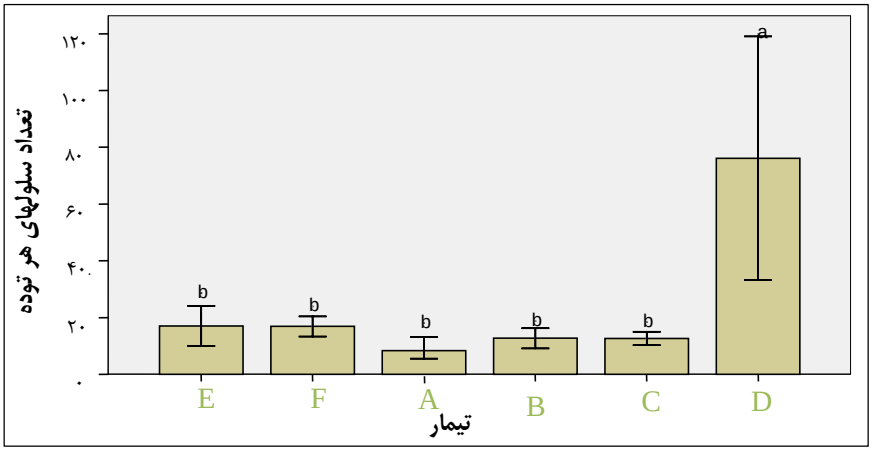
www.SID.ir

Downloaded from jmb.iauahvaz.ac.ir at 12:06 +0430 on Tuesday July 28th 2020




**شکل ۱: بررسی اثر تیمارهای مختلف بر تعداد سلول × $۱۰^{۷}$ موجود در یک میلی‌لیتر سوسپانسیون جلبک کلرلا سوروکینیانا (*Chlorella sorokiniana*) در سال ۱۳۹۸ در دانشگاه پیام نور تهران.**

حروف غیرمشابه نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار است.



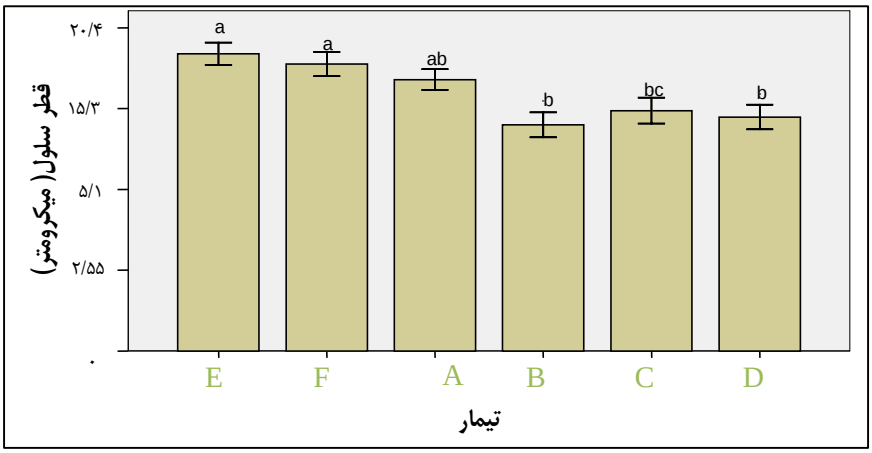

**شکل ۲: بررسی اثر تیمارهای مختلف بر تعداد سلول‌های موجود در توده‌های سلولی جلبک کلرلا سوروکینیانا (*Chlorella sorokiniana*) در سال ۱۳۹۸ در دانشگاه پیام نور تهران.**

حروف غیرمشابه نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار است.



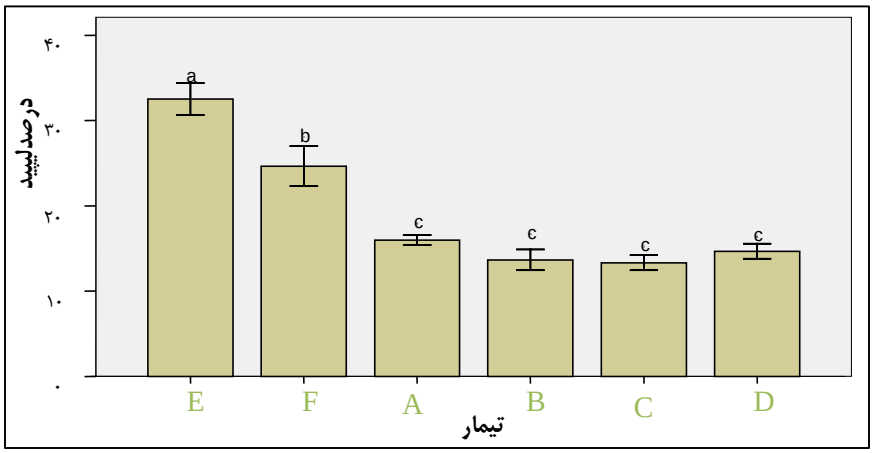
www.SID.ir

Downloaded from jmb.iauahvaz.ac.ir at 12:06 +0430 on Tuesday July 28th 2020




**شکل ۳: بررسی اثر تیمارهای مختلف بر قطر سلول‌های جلبک کلرلا سوروکینیانا (*C. Sorokiniana*) در سال ۱۳۹۸ در دانشگاه پیام نور تهران.**

حروف غیرمشابه نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار است.



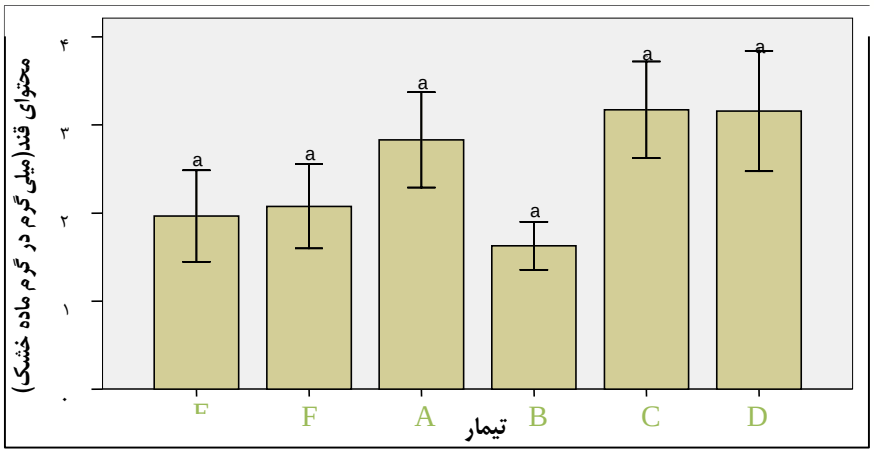

**شکل ٤: بررسی اثر تیمارهای مختلف بر درصد لیپید جلبک کلرلا سوروکینیانا (*Chlorella sorokiniana*) در سال ۱۳۹۸ در دانشگاه پیام نور تهران.**

حروف غیرمشابه نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار است.



www.SID.ir

Downloaded from jmb.iauahvaz.ac.ir at 12:06 +0430 on Tuesday July 28th 2020




**شکل ۵: بررسی اثر تیمارهای مختلف بر محتوای قندهای محلول در آب (میکروگرم در یک گرم جلبک خشک) جلبک کلرلا سوروکینیانا (*C. Sorokiniana*) در سال ۱۳۹۸ در دانشگاه پیام نور تهران.**

حروف غیرمشابه نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار است.

## بحث و نتیجه‌گیری

تغییر محیط کشت سبب تغییر ترکیبات شیمیایی جلبک‌ها می‌شود (Sharma *et al.*, 2012). مواد غذایی به‌ویژه ترکیبات نیتروژنی و فسفری اثر زیادی بر رشد و تولید پروتئین و رنگیزه‌ها در جلبک‌ها دارند (Ribeiro *et al.*, 2013). نیتروژن و فسفر هر دو در ساختار ماکرو مولکول‌های آلی مثل پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک شرکت می‌کنند. افزایش آن‌ها سبب افزایش رشد می‌گردد (Fried *et al.*, 2003). محققین نشان دادند که افزایش نیترات پتاسیم از ۰/۰۵–۰/۴ گرم در لیتر سبب افزایش رشد جلبک *C.pyrenoidosa* شد (Nigam *et al.*,2011). افزایش نیترات و فسفات سبب افزایش رشد جلبک *C. Sorokiniana* گردید (جمشیدی و همکاران، ۱۳۹۷). امونیوم در غلظت‌های بالاتر از ۰/۵ میلی مولار سبب کاهش زمان مضاعف شدن سلول جلبک و تولید بیوماس بیشتر شد (Ortiz-Marquez *et al.*, 2012). در پژوهش حاضر، در محیط کشت حاوی دو برابر نیترات و فسفات تعداد سلول نسبت به شاهد افزایش معنی دارو قطر و تعداد سلول‌های توده سلولی نسبت به شاهد افزایش غیر معنی‌داری رانشان داد، که با نتایج Ortiz-Marquez و همکاران (۲۰۱۲) که افزایش نیتروژن سبب افزایش تقسیم سلولی و رشد می‌شود همخوانی دارد. در این تیمار، محتوای لیپید نسبت به شاهد افزایش معنی‌داری نشان داد که با نظر برخی محققین همخوانی دارد. طبق گزارش An و همکاران (۲۰۲۰) با افزایش نیتروژن به شکلNaNO3 و CH4N2O به محیط کشت *Scenedesmus obliquus* محتوای لیپید افزایش یافت. Liu و همکاران (۲۰۱۷a) گزارش کردند که بالاترین محتوای لیپید در بالاترین غلظت آمونیوم به دست آمد؛ و با نظر برخی محققین همخوانی ندارد. طبق گزارش Wai-Kuan و همکاران (۲۰۱۹) محتوای لیپید در سلول‌های جلبک رشد یافته در محیط محروم از نیتروژن در طی روز دوم و چهارم اختلاف معنی‌داری با جلبک‌های رشد یافته در محیط واجد نیتروژن نداشت. Nigam و همکاران (۲۰۱۱) گزارش کردند که در محیط کشت *Chlorella pyrenoidosa* هر چه غلظت نیترات در محیط کشت کاهش پیدا می‌کرد محتوای لیپید جلبک افزایش می‌یافت. طبق گزارش محققین، کاهش نیترات از ۹۰ به ۶۰، ۴۰ و ۲۰ میلی‌گرم در لیتر سبب کاهش تعداد سلول‌ها و افزایش محتوای لیپید در جلبک *C.vulgaris* گردید (Robles-Heredia *et al.*, 2015). احتمالاً یک از علت‌های متفاوت بودن این نتایج، افزایش همزمان فسفات و نیترات و هم‌افزایی این دو ماده برای افزایش رشد و محتوای لیپید، در پژوهش حاضراست. وجود مکفی این دو ماده که ساختار اصلی ماکرو مولکول‌های



www.SID.ir

Downloaded from jmb.iauahvaz.ac.ir at 12:06 +0430 on Tuesday July 28th 2020

حیاتی را تشکیل می‌دهند، سبب ساخته‌شدن ماکرو مولکول‌های لازم (آنزیم) برای سنتز لیپید و درنتیجه افزایش آن شده است که با نتایج محققین ذیل هم‌خوانی دارد. در بررسی که با *C. minutissima* انجام پذیرفت از مقادیر متفاوتی نیترات و فسفات استفاده شد، مناسب‌ترین محیط برای به دست آوردن بیوماس، محتوای لیپید، رنگیزه‌های فتوسنتزی، کربوهیدرات و پروتئین، محیط حاوی نیتروژن (نیترات سدیم ۰/۱۲۵ گرم در لیتر) و فسفر (دی پتاسیم فسفات ۷۵ ۰/۰ گرم در لیتر) بود. اثر هم‌افزایی بین نیتروژن و فسفر سبب افزایش هم‌زمان، بیوماس، محتوای لیپید، رنگیزه های فتوسنتزی، کربوهیدرات و پروتئین شد (Arora *et al*., 2016). به‌علاوه، در پژوهش کنونی جلبک به‌صورت میکسوتروف کشت‌شده و گلوکزمنوهیدرات به‌عنوان منبع کربن استفاده‌شده، گلوکز در اثر گلیکولیز ایجاد هیدروکسی استن فسفات و پیروات می‌کند. هیدروکسی استن فسفات پیش ماده گلیسرول و پیروات پیش ماده استیل کو آنزیم A است که پیش ماده اسید چرب است. به این طریق واحدهای سازنده لیپید مهیا می‌گردد و درنتیجه، سنتز لیپید افزایش می‌یابد. محققین ذیل نیز نتایج مشابهی به دست آورده‌اند. طبق گزارش محققین جلبک*pyrenoidosa C.* می‌تواند به‌صورت میکسوتروف زندگی کرده مواد آلی را مصرف کند و بیوماس و محتوای لیپید بالاتری ایجاد کند (Cheirsilp and Torpee, 2012; Zhang *et al*., 2014) در بین مواد آلی موادی مثل استیک و گلوکز، مناسب‌ترین منبع کربن برای کشت میکسوتروفی هستند (Rai *et al*., 2013). منبع کربنی داخل سلولی که از تجزیه نشاسته ایجادشده می‌تواند برای سنتز لیپیدها مورداستفاده قرار گیرد و درنتیجه محتوای لیپید افزایش یابد (Dong *et al*., 2020). تیمارهای هورمونی مناسب هم سبب افزایش رشد جلبک می‌شود. یکی از اثرات اکسین‌ها بر جلبک‌ها اثر بر دیواره سلولی، فعال‌سازی پمپ ATPase و طویل شدن سلول است (Stirk *et al*., 2014). اکسین‌های طبیعی و مصنوعی سبب کاهش تجمع رادیکال آزاد اکسیژن می‌گردند که این عمل سبب پیشرفت چرخه سلولی و تمایز دیواره ثانویه سلول می‌شود (Piotrowska-Niczyporuk and Bajguz, 2014). سیتوکینین نیز سبب تحریک تقسیم سلول و فعال‌سازی رشد جلبک می‌شود (Kiseleva *et al*., 2012). اکسین‌ها و سیتوکینین‌ها با افزایش سطح آنتی‌اکسیدان‌های غیر آنزیمی (اسکوربات و گلوتاتیون) به‌طور مؤثری صدمه اکسیداتیو را به تأخیر می‌اندازند. آنزیم‌های تخریب‌کننده گونه‌های اکسیژن فعال (کاتالاز، گلوتاتیون ردوکتاز، اسکوربات پر اکسیداز) را افزایش می‌دهند (Piotrowska-Niczyporuk *et al*., 2018). در پژوهش حاضر نیز در اثر کاربرد غلظت‌های ترکیبی اکسین و سیتوکینین، رشد افزایش‌یافته، علت افزایش رشد، افزایش تقسیم سلولی و افزایش تعداد سلول‌ها و تشکیل بیشتر توده‌های سلولی است؛ که در تیمار توفوردی (میلی‌گرم در لیتر ۱)+بنزیل امینوپورین (۲ میلی‌گرم در لیتر) به‌طور معنی‌داری نسبت به سایر تیمارها و شاهد افزایش می‌یابد. Z. Passamani و همکاران (۲۰۲۰) گزارش کردند استفاده از توفوردی با غلظت ۱۰ میکرومولار و به مدت ۲۱ روز، سبب ایجاد توده‌های سلولی غیر متمایز وعدم تشکیل جنین درکشت بافت نیشکر شد که این واکنش، در اثر افزایش پلی امین‌ها در اثر افزودن توفوردی به محیط کشت بود. طبق نظر محققین، سیتوکینین‌ها سبب تقسیم سلولی می‌شوند درحالی‌که اکسین‌ها سبب افزایش طول سلول می‌شوند. اکسین‌ها فعالیت آنزیم‌های سوپر اکسید دیسموتاز را تحریک می‌کنند که ممکن است در افزایش طول سلول دخیل باشد (Piotrowska-Niczyporuk *et al*. 2018). Liuو همکاران (۲۰۱۷b) گزارش دادند که توفوردی در غلظت‌های ۰/۵، ۱، ۱/۵، ۲ و ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر سبب افزایش رشد (بیوماس) *C. vulgaris* گردید. طبق گزارش Bhuyar و همکاران (۲۰۲۰) توفوردی در غلظت‌های ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر سبب افزایش رشد جلبک *Chlorella sp* شد. نتایج پژوهش حاضر با نتایج محققین مذکور همخوانی دارد در پژوهش کنونی در ۷۵ درصد تیمارهای هورمونی قطر سلول کاهش یافت. طبق نظر محققین کاربرد ۲-۰/۲ میلی‌گرم در لیتر توفوردی در روزهای اول کشت بافت گیاهی، تقسیم سلولی و تعداد سلول افزایش می‌یابد اما میانگین اندازه سلول کاهش می‌یابد محتوای RNA و DNA و سایر مواد لازم برای تقسیم سلولی کاهش می‌یابد در این مرحله سلول‌ها کوچک هستند (Govil *et al*., 2017). که گزارش محققین مشابه نتایج حاضر است. محتوای قندهای محلول در ۷۵ درصد تیمارهای هورمونی نسبت به شاهد افزایش غیر معنی‌داری نشان داد. طبق گزارش محققین سیتوکینین‌ها سبب افزایش محتوای منوساکاریدها می‌شود (Bajguz and Piotrowska-Niczyporuk, 2014). فیتوهورمون‌ها ممکن است، استرس اکسیداتیو جلبک را کاهش دهند و تولید بیوماس و محصولات



www.SID.ir

Downloaded from jmb.iauahvaz.ac.ir at 12:06 +0430 on Tuesday July 28th 2020

ارزشمند مطلوب، جلبک را تنظیم کنند (Yu *et al.*, 2018). کاربرد هورمون‌های گیاهی در محیط کشت جلبک بیوسنتز کربوهیدرات‌ها را افزایش داد (Hunt *et al.*, 2011)؛ که گزارش‌های محققین با نتایج کنونی هم‌خوانی دارد. در پژوهش حاضر، در تیمارهای هورمونی محتوای لیپید جلبک به‌طور معنی‌داری کاهش یافت. طبق گزارش محققین، با کاربردتوفوردی در غلظت‌های ۰/۰۱–۱۰ میلی‌گرم در لیتر بر روی جلبک *Scenedesmus sp.* از غلظت ۰/۰۱ تا ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر، محتوای متیل استر اسیدهای چرب جلبک افزایش یافت و در غلظت‌های بالاتر (۱ میلی‌گرم در لیتر) به‌تدریج تولید لیپید کاهش یافت و سپس (در غلظت ۱۰ میلی‌گرم در لیتر) از تولید آن ممانعت شد. بالاترین محتوای متیل استر اسیدهای چرب در جلبک *Scenedesmus sp. LX1* در غلظت ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر توفوردی مشاهده شد (Dao *et al.*, 2018). در پژوهش حاضر، احتمالاً کاهش لیپید به علت استفاده از غلظت‌های بالای (۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر) توفوردی است. طبق گزارش محققین، توفوردی مانع از جذب پیش سازهای لیپید و دخول آن‌ها در مولکول‌های لیپید و کاهش فعالیت آنزیم فاتی اسید سنتتاز کلروپلاست شد (Rajasekharan and Sastry, 1989). به‌علاوه توفوردی پر اکسید شدن لیپیدها را افزایش داد (Mironenka *et al.*, 2020)، به همین علت در پژوهش حاضر، محتوای لیپید جلبک با استفاده از توفوردی کاهش یافت. به‌طورکلی نتایج بررسی حاضر نشان داد ترکیب هورمون‌های توفوردی با بنزیل امینوپورین در غلظت‌های بررسی‌شده در این پژوهش سبب افزایش تعداد و توده‌های سلول‌های جلبک می‌شود ولی محتوای لیپید جلبک به دلیل اثرات منفی غلظت بالای، توفوردی بر سنتز لیپید و پر اکسید شدن لیپیدها، کاهش می‌یابد. از این غلظت‌های هورمونی فقط می‌توان برای افزایش بیوماس جلبک استفاده کرد و برای افزایش لیپید بهتر است غلظت‌های پایین‌تر (۰/۰۰۱، ۰/۰۱ و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر) توفوردی استفاده شود، اما افزودن نیترات و فسفات دو برابر و وجود گلوکز منو هیدرات در محیط کشت، به دلیل ایجاد ماکرو مولکول‌های حیاتی و پیش سازهای لیپید، سبب افزایش رشد و محتوای لیپید جلبک می‌گردد و این محیط، مناسب‌ترین محیط کشت برای افزایش رشد و محتوای لیپید جلبک *Chlorella sorokiniana* است.

## منابع


**جمشیدی، آ.، ۱۳۹۸.** اثر ترکیبی توفوردی با کینتین، بنزیل امینوپورین و اسید سالیسیلیک بر رشد محتوای متابولیت‌های جلبک *Chlorella sorokiniana*، زیست‌شناسی دریا، جلد ۴۲: صفحات ۵۷–۴۱.

**جمشیدی، آ.، ابراهیمی، م. ع.، رجبیان، ط.، بخشی خانیکی، غ. ر. و مظفری، ش.، ۱۳۹۷.** غنی‌سازی مواد غذایی جلبک کلرلا *Chlorella sorokiniana* Shihira & R. W. Krauss، زیست‌شناسی جانوری تجربی، جلد ۳۸: صفحات ۱۱۳–۱۰۵.

**جمشیدی، آ.، ابراهیمی، م. ع.، رجبیان، ط.، بخشی خانیکی، غ. ر. و مظفری، ش.، ۱۳۹۶.** اثر اکسین‌های مصنوعی و کینتین بر محتوای پروتئین و رنگیزه‌های فتوسنتزی جلبک *Chlorella sorokiniana*، زیست‌شناسی دریا، جلد ۳۶: صفحات ۲۴–۱۵.

**رنجبر اقدم، م.، حجازی، م.، آیین فر، س. و حسین زاده ن.، ۱۳۹۱.** بررسی تأثیر چهار آنتی‌بیوتیک در رشد و کارایی آن‌ها در عاری سازی آلودگی محیط کشت جلبک تک‌سلولی *Dunaliella sp.*، علوم محیطی (ویژه‌نامه اولین کنفرانس ملی جلبک‌شناسی ایران)، جلد ۹: صفحات ۸–۱.

**Ambati, R. R., Gogisetty, D., Aswathanarayana, R. G., Ravi, S., Bikkina, P. N., Bo, L. and Yuepeng, S., 2018.** Industrial potential of carotenoid pigments from microalgae: current trends and future prospects. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 59(12):1880-1902.

**An, M., Gao, L., Zhao, W., Chen, W. and Li, M., 2020.** Effects of Nitrogen Forms and Supply Mode on Lipid Production of Microalga *Scenedesmus obliquus*. Energies, 13: 697-707.

**Andersen, R. A., 2005.** Algal Culturing Techniques. Elsevier Inc, pp.589.

**Arora, N., Patel A., Pruthi, P. A. and Pruthi, V., 2016.** Synergistic dynamics of nitrogen and phosphorous influences lipid productivity in Chlorella minutissima for biodiesel production. Bioresource Technology, 213: 79–87.




www.SID.ir

Downloaded from jmb.iauahvaz.ac.ir at 12:06 +0430 on Tuesday July 28th 2020

**Bajguz, A. and Piotrowska-Niczyporuk, A., 2013.** Synergistic effect of auxins and brassinosteroids on the growth and regulation of metabolite content in the green alga *Chlorella vulgaris* (Trebouxiophyceae). Plant Physiology and Biochemistry, 71:290-297.

**Bajguz, A. and Piotrowska-Niczyporuk, A., 2014.** Interactive effect of brassinosteroids and cytokinins on growth, chlorophyll, mono saccharide, and protein content in the green alga *Chlorella vulgaris* (Trebouxiophyceae). Plant Physiology and Biochemistry. 80:176-83.

**Bhuyar, P., M. Yusoff, M., Ab. Rahim, M. H., Sundararaju, S., Maniam, G. P. and Govindan, N., 2020.** Effect of plant hormones on the production of biomass and lipid extraction for biodiesel production from microalgae *chlorella* sp., Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Science, 9(4): 671-674.

**Che, R., Huang L., Xu, J. W., Zhao P., Li, T., Ma, H. and Yu, X., 2017.** Effect of fulvic acid induction on the physiology, metabolism, and lipid biosynthesis-related gene transcription of Monoraphidium sp. FXY-10. Bioresource Technology, 227: 324–334.

**Cheirsilp, B. and Torpee, S., 2012.** Enhanced growth and lipid production of microalgae under mixotrophic culture condition: effect of light intensity, glucose concentration and fed-batch cultivation. Bioresource Technology, 110: 510-516.

**Chisti, Y., 2007.** Biodiesel from microalgae. Biotechnology Advances, 25(3):294-306.

**Czerpak, R., Dobrzyń, P., Krotke, A. and Kicińska, E., 2002.** The Effect of Auxins and Salicylic Acid on Chlorophyll and Carotenoid Contents in Wolffia Arrhiza (L.) Wimm. (Lemnaceae) Growing on Media of Various Trophicities, Polish Journal of Environmental Studies 11(3): 231-235.

**Dong, L., Li, D. and Li, Ch., 2020.** Characteristics of lipid biosynthesis of *Chlorella pyrenoidosa* under stress conditions. Bioprocess and Biosystems Engineering, 1-10.

**Dao, G. H., Wu, G. X., Wang, X. X., Zhuang, L. L., Zhang, T. Y. and Hu, H. Y., 2018.** Enhanced growth and fatty acid accumulation of microalgae *Scenedesmus sp. LX1* by two types of auxin. Bioresource Technology, 247: 561–567.

**Chisti Y., 2007.** Biodiesel from microalgae. Biotechnology Advances, 25(3):294-306.

**Czerpak, R., Dobrzyń, P., Krotke, A. and Kicińska, E., 2002.** The Effect of Auxins and Salicylic Acid on Chlorophyll and Carotenoid Contents in Wolffia Arrhiza (L.) Wimm. (Lemnaceae) Growing on Media of Various Trophicities, Polish Journal of Environmental Studies 11(3): 231-235.

**Dong, L., Li, D. and Li, Ch., 2020.** Characteristics of lipid biosynthesis of *Chlorella pyrenoidosa* under stress conditions. Bioprocess and Biosystems Engineering, 1-10.

**Dao, G. H., Wu, G. X., Wang, X. X., Zhuang, L. L., Zhang, T. Y. and Hu, H. Y., 2018.** Enhanced growth and fatty acid accumulation of microalgae *Scenedesmus sp. LX1* by two types of auxin. Bioresource Technology 247, 561–567.

**DuBois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. and Smith, F., 1956.** Colorimetric Method for determination of sugars and related substances, Analytical Chemistry , 28( 3): 350-356

**El Arroussi, H., Benhima, R., Bennis, I., El Mernissi, N. and Wahby, I., 2015.** Improvement of the potential of *Dunaliella tertiolecta* as a source of biodiesel by auxin treatment coupled to salt stress. Renewable Energy, 77: 15–19

Fried, S., Mackie, B. and Nothwehr, E., 2003. Nitrate and phosphate levels positively affect the growth of algae species found in Perry Pond, Tillers. 4: 21-24

**Gao Z., Meng C., Zhang X., Xu D., Miao X., Wang, Y., Yang L., Lv, H., Chen, L. and Ye, N., 2012.** Induction of salicylic acid (SA) on transcriptional expression of eight carotenoid genes and astaxanthin accumulation in Haematococcus pluvialis. Enzyme and Microbial Technology. 51(4):225-30.

**Govil, C. M., Aggarwal, A. and Sharma, J., 2017.** Plant Bioecnology and Genetic Engineering. PHI Learning Pvt. Ltd, pp. 456.

**Han, X., Zeng, H., Bartocci, P., Fantozzi, F. and Yan, Y., 2018.** Phytohormones and effects on growth and metabolites of microalgae: A Review, Fermentation, 25(4):1-15.



www.SID.ir

Downloaded from jmb.iauahvaz.ac.ir at 12:06 +0430 on Tuesday July 28th 2020

**Hunt, R. W., Chinnasamy, S. and Das, K. C., 2011.** The Effect of Naphthalene-Acetic Acid on biomass productivity and chlorophyll content of green algae, Coccolithophore, Diatom, and Cyanobacterium cultures, Applied Biochemistry and Biotechnology, 164(10): 1350-1365.

**Kiseleva, A. A., Tarachovskaya, E. R. and Shishova, M. F., 2012.** Biosynthesis of Phytohormones in algae, Russian Journal of Plant Physiology, 59 (5): 595-610.

**Kozlova, T. A., Hardy, B. P., Krishna, P. and Levin, D. B., 2017.** Effect of phytohormones on growth and accumulation of pigments and fatty acids in the microalgae *Scenedesmus quadricauda.* Algal Resarch, 27: 325–334.

**Liu, T., Liu, F., Wang, C., Wang, Z. and Li, Y., 2017b.** lipid accumulation in *Chlorella vulgaris* by supplementation of synthetic phytohormone analogs. Bioresource Technology, (232): 44-52.

**Liu, J., Qiu, W., Song Y, Peng, H. and Zhao, Y., 2017a.** The growth and lipid productivity of *Chlorella pyrenoidosa* enhanced by plant hormones under ammonium stress, Environmental Progress & Sustainable Energy, 0 (0) :1-7.

**Mironenka, J., Różalska, S., Soboń, A. and Bernat, P., 2020.** Lipids, proteins and extracellular metabolites of Trichoderma harzianum modifications caused by 2,4-dichlorophenoxyacetic acid as a plant growth stimulator. Ecotoxicology and Environmental Safety, 194:110383.

**Nigam, S., Prakash Rai, M. and Sharma, R., 2011.** Effect of Nitrogen on Growth and Lipid Content of *Chlorella pyrenoidosa*, American Journal of Biochemistry and Biotechnology 7 (3): 124-129

**Ortiz-Marquez, J. C. F., Do Nascimento M., Dublan M. and Curatti, L., 2012.** Association with an ammonium excreting bacterium allows diazotrophic culture of oilrich eukaryotic microalgae, Applied and Environmental Microbiology, 78: 2345–2352.

**Passamani, L. Z., Reis, R. S, Vale, E. M., R. Sousa, K. R., Aragão, V. P. M., Santa-Catarina, C. and Silveira, V., 2020.** Long-term culture with 2,4-dichlorophenoxyacetic acid affects embryogenic competence in sugarcane callus via changes in starch, polyamine and protein profiles.Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 140: 415-429.

**Patil, V., Tran, K. and Giselrod, H., 2008.** Towards sustainable production of biofuels from microalgae, International Journal of Molecular Sciences. 9: 1188-1195.

**Piotrowska, A. and Czerpak, R., 2009.** Cellular response of light/dark-grown green alga *Chlorella vulgaris* Beijerinck (Chlorophyceae) to exogenous adenine and phenylurea-type cytokinins. Acta Physiologiae Plantarum, 31(3): 573-585.

**Piotrowska-Niczyporuk, A. and Bajguz, A., 2014.** The effect of natural and synthetic auxins on the growth, metabolite content and antioxidant response of green alga *Chlorella vulgaris* (Trebouxiophycea), Plant Growth Regulator, 73:57–66.

**Piotrowska-Niczyporuk, A., Bajguz A., Kotowska, U., Bralska, M. and Talarek-Karwel, M., 2018.** Growth, Metabolite Profile, Oxidative Status, and Phytohormone Levels in the Green Alga *Acutodesmus obliquus* Exposed to Eexogenous auxins and cytokinins. Journal of Plant Growt Regulation (37):1159-1174.

**Rai, M. P., Nigam, S. and Sharma, R., 2013.** Response of growth and fatty acid compositions of *Chlorella pyrenoidosa* under mixotrophic cultivation with acetate and glycerol for bioenergy application. Biomass Bioenergy, 58: 251-257.

**Ribeiro, A., Tesima K., Souza J. and Yokoya, N., 2013.** Effects of nitrogen and phosphorus availabilities on growth, pigment, and protein contents in *Hypnea cervicornis* J. Agardh (Gigartinales, Rhodophyta). Journal of Applied Phycology. 25(4): 1151-1157.

**Robles-Heredia, J. C., Sacramento-Rivero, J. C., Canedo-López, Y., Ruiz-Marín, A. and Vilchiz-Bravo, L. E., 2015.** Amulti stage gradual nitrogen reduction strategy for increased lipid productivity and nitrogen removal in wastewater using *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus obliquus.* Brazilian Journal of Chemical Engineering, 32(2): 335 – 345.



www.SID.ir

Downloaded from jmb.iauahvaz.ac.ir at 12:06 +0430 on Tuesday July 28th 2020

**Sansawa, H., Takahashi, M., Tsuchikura, S. and Endo, H., 2006.** Effect of chlorella and its fractions on blood pressure, cerebral stroke lesions, and life-span in stroke-prone spontaneously hypertensive rats.: Journal of Nutritional Science and Vitaminology, 52(6):457-66.

**Sharma, R., Singh, G. P. and Sharma, V. K., 2012.** Effects of culture conditions on growth and biochemical profile of *Chlorella vulgaris*. Journal of Plant Pathology and Microbiology, 3 (5) 1000131.

**Shu, Ch. H., Chen, K. Y., Liao, W. H. and Huang, H. Ch., 2013.** Enhancing high quality oil accumulation and carbon dioxide fixation by a mixed culture of *Chlorella* sp. and *Saccharomyces* cerevisiae. Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers : 936–942.

**Sivaramakrishnan, R. and Incharoensakdi, A., 2020.** Plant hormone induced enrichment of *Chlorella* sp. omega-3 fatty acids, Biotechnology for Biofuels, 13: 7-17.

**Song, Y., 2013.** Insight into the mode of action of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) as an herbicide, Journal of Integrative Plant Biology, 56(2): 75-83.

**Stirk, W. A., Bálint P., Tarkowská, D., Novák, O., Maróti, G., Ljung, K., Turečková, V., Strand, M., Stirk, W. A., Bálint, P., Tarkowská, D., Novák, O., Strnad M., Ördög, V. and Van Staden, J., 2013.** Hormone profiles in microalgae: gibberellins and brasinosteroids. Plant Physiology and Biochemistry, 70:348-53.

**Tarakhovskaya, E. R., Maslov, Y. I. and Shishova, M., 2007.** Phytohormones in algae, Russian Journal of Plant Physiology, 54 (2): 163-170.

**Tate, J. J., Gutierrez-Wing, M. T., Rusch K. A. and Benton, M. G., 2013.** The Effects of plant growth substances and mixed cultures on growth and metabolite production of gGreen algae *Chlorella sp.*: A Review, Journal of Plant Growth Regulators, 32:417–428.

**Wai-Kuan, Y., Phaik-Eem L., Vejeysri, V., Kae-Shin, S., Nazia, A. M., Emienour Muzalina, M., Nik Meriam, N. S., Kan-Ern, L., Brenna, J. T. C. and Siew-Moi Ph., 2019.** Metabolic and physiological regulation of Chlorella sp. (Trebouxiophyceae, Chlorophyta) under nitrogen deprivation. Journal of Oceanology and Limnology, 37 (1): 186-199.

**Xiong, W., Gao, C., Yan, D., Wu, C. and Q. Wu, C., 2009.** Double CO2 fixation in photosynthesis fermentation model enhances algal lipid synthesis for biodiesel production, Bioresource Technology, 101: 2287– 2293.

**Yu, Z., Pei H., Jiang, L., Hou Q., Nie, C. and Zhang, L., 2018.** Phytohormone addition coupled with nitrogen depletion almost tripled the lipid productivities in two alga, Bioresource Technology, 247: 904-91.

**Zhang, W., Zhang P., Sun, H., Chen, M., Lu, S. and Li, P., 2014.** Effects of various organic carbon sources on the growth and biochemical composition of Chlorella pyrenoidosa. Bioresource Technology, 173: 52-58.



www.SID.ir