



## اثر محیط کشت بر روی رشد سلولی، کمیت و کیفیت بیوماس در میکروجلبک نانوکلوپسیس اوکولاتا جهت تولید بیودیزل (سوخت سبز)

نویسندگان: محمد ملکوتیان<sup>۱</sup> بهنام حاتمی<sup>۲</sup> شیدوش دولتشاهی<sup>۳</sup> احمد رجایی زاده<sup>۳</sup>

۱. نویسنده مسئول: استاد مرکز تحقیقات مهندسی بهداشت محیط و گروه بهداشت محیط دانشگاه علوم پزشکی کرمان

شماره تلفن: ۰۳۴۱۳۲۰۵۰۷۴ Email: [m.malakootian@yahoo.com](mailto:m.malakootian@yahoo.com)

۲. کارشناسی ارشد مهندسی بهداشت محیط دانشگاه علوم پزشکی کرمان

۳. مربی، عضو مرکز تحقیقات مهندسی بهداشت محیط و گروه بهداشت محیط دانشگاه علوم پزشکی کرمان

### چکیده

**مقدمه:** نگرانی در مورد بحران انرژی همراه با تغییرات آب و هوایی و افزایش گرمایش جهانی، باعث توجه بیشتر به تولید انرژی بیودیزل از میکروجلبکها شده است. رشد سلولی، تولید بیوماس و تجمع لیپید در میکروجلبک از عوامل تعیین کننده بازدهی اقتصادی بیودیزل بوده و هدف از این مطالعه، بررسی نقش محیط کشت در افزایش بازدهی عوامل مذکور می باشد.

**روش بررسی:** میکروجلبک نانوکلوپسیس اوکولاتا در چهار محیط Sato، F/2، Walne و TMRL کشت داده شد. میزان رشد سلولی به طور روزانه از طریق اندازه گیری دانسیته سلولی با استفاده از اسپکتوفتومتر تعیین گردید. تولید بیوماس و تجمع لیپید در دو فاز رشد لگاریتمی و رشد ثابت میکروجلبک، اندازه گیری و ترکیبات تشکیل دهنده بوسیله گاز کروماتوگرافی تشخیص داده شد. مطابق استاندارد، کیفیت روغن استخراج شده از هر محیط کشت جهت تولید بیودیزل، بوسیله اندیس ید تعیین گردید.

**یافته ها:** نتایج حاصل نشان داد بیشترین میزان رشد سلولی و تولید بیوماس در محیط کشت Walne و به ترتیب برابر  $0.2616 \text{ day}^{-1}$  و  $2.652 \text{ g l}^{-1}$  می باشد. بیشترین درصد تبدیل بیوماس به لیپید نیز در محیط کشت TMRL و برابر  $37/22$  درصد وزن خشک سلولی حاصل شد. بیشترین بازدهی لیپید مربوط به محیط کشت Walne و برابر  $1.057 \text{ g l}^{-1} \text{ day}^{-1}$  بود و بیشترین مقدار اسیدهای چرب غیر اشباع چندگانه (Polyunsaturated Fatty Acids) PUFA در محیط کشت Walne و در مرحله رشد لگاریتمی و برابر  $42/99$  درصد اسید چرب بدست آمد. بیشترین مقدار تری گلیسرید نیز در مرحله رشد ثابت و در محیط کشت sato برابر  $75/25$  درصد اسید چرب بدست آمد.

**نتیجه گیری:** میکروجلبک نانوکلوپسیس اوکولاتا، حداکثر بازدهی جهت مقاصد آبرزی پروری و مصارف انسانی و همچنین تولید بیودیزل را به ترتیب در فاز رشد لگاریتمی و رشد ثابت و در محیط کشت Walne نشان داد.

**واژه های کلیدی:** میکروجلبک، نانوکلوپسیس اوکولاتا، بیودیزل، محیط کشت، بازدهی لیپید

## طلوع بهداشت

### فصلنامه علمی پژوهشی

دانشکده بهداشت یزد

سال دوازدهم

شماره: سوم

پاییز ۱۳۹۲

شماره مسلسل: ۴۰

تاریخ وصول: ۹۲/۴/۲

تاریخ پذیرش: ۹۲/۴/۱۲



## مقدمه

با افزایش جمعیت و مصرف بیش از حد سوخت‌های فسیلی، بحران انرژی به عنوان یکی از چالش‌های عمده پیش روی بشر خود نمائی میکند (۱،۲). استفاده از سوخت‌های فسیلی، افزایش انتشار دی اکسید کربن (۳) و در نتیجه ایجاد پدیده گرمایش جهانی را در پی دارد (۴). از این رو محققان به جستجوی انرژی‌های تجدید پذیر جهت کاهش انتشار گازهای گلخانه‌ای پرداخته‌اند (۵). در این راستا تلاش‌هایی برای کاهش این اثرات از طریق استفاده از میکروجلبک‌ها معطوف شده است (۶-۸). بیودیزل (سوخت سبز) به عنوان یکی از اولویت‌های انرژی تجدید پذیر و غیر سمی، با آلودگی بسیار کم به عنوان جایگزین سوخت‌های فسیلی به شدت مورد توجه قرار گرفته شده است (۹-۱۱). میکروجلبک‌ها ارگانسیم‌های فتوسنتتیک بوده که قادرند به کمک نور خورشید، آب و دی اکسید کربن را به قند و ماکرومولکول‌هایی نظیر لیپید و تری گلیسرید (TAG) تبدیل نموده، علاوه بر کاهش مقدار CO<sub>2</sub> اتمسفر، بعنوان یکی از منابع مهم تولید بیودیزل عمل نمایند (۸،۱۲،۱۳). واکنش روغن میکروجلبک به شکل تری گلیسرید TAG با الکل‌های ساده (که به ترانس استریفیکاسیون trans esterification معروف است) منجر به تشکیل ترکیبات شیمیایی به نام آلکیل استر (alkyl ester) یا بیودیزل می‌شود (۱۴-۱۶). علاوه بر تولید سوخت، میکروجلبک‌ها به علت داشتن محصولات با ارزش غذایی مانند کاروتنوئیدها، اسیدهای چرب، استروئیدها و پلی ساکاریدها در صنایع غذایی و آبرزی پروری نیز اهمیت فراوانی دارند (۱۷). کشت و تکثیر میکروجلبک‌ها دارای کاربردهای

فراوانی از جمله خواص دارویی و تصفیه فاضلاب‌های صنعتی می‌باشد (۱۸).

نانوکلروپسیس اوکولاتا (Nannochloropsis Oculata) میکروجلبک تک سلولی دریایی، متعلق به شاخه جلبک‌های سبز و خانواده استیگموفیسه آ (Eustigmatophyceae) (۲۲-۱۹)، در کنار قابلیت سنتز اسید چرب غیر اشباع چند گانه (PUFA) و کاروتنوئیدها برای مصارف انسانی و آبزیان، قادر است مقدار زیادی لیپید به شکل TAG در سلول‌های خود تجمع نماید (۱۳، ۲۳-۲۶). به کارگیری میکروجلبک‌ها جهت تولید بیودیزل و همچنین غذای زنده آبزیان، نیازمند شناسایی شرایط بهینه کشت می‌باشد که حداکثر تولید بیوماس و لیپید را در سلول میکروجلبک داشته و در نتیجه علاوه بر افزایش بازدهی کل لیپید، از هزینه‌های تولید نیز بکاهد (۱، ۲۷، ۲۸). ترکیب شیمیایی میکروجلبک‌ها تحت تاثیر عوامل مختلفی مانند میزان شوری، دما، pH، مواد مغذی و فاز رشد قرار دارد (۱۳، ۲۵، ۲۹، ۳۰). ترکیب شیمیایی محیط کشت نیز می‌تواند علاوه بر تاثیر بر روی میزان رشد ویژه و حداکثر بیوماس تولیدی میکروجلبک، ترکیب شیمیایی بیوماس و مقدار لیپید آن را نیز تغییر دهد (۷). به عنوان مثال محدودیت مواد مغذی یکی از موثرترین راه‌های افزایش تجمع لیپید در سلول و ذخیره به شکل تری گلیسرید TAGs، همراه با تغییر در ترکیب اسیدهای چرب FA در میکروجلبک‌های تک سلولی می‌باشد (۹، ۱۰). مطالعات متعددی نیز نشان داده‌اند که کمیت و کیفیت لیپید سلولی میکروجلبک می‌تواند در نتیجه تنوع شرایط رشد (دما، شدت نور) یا مشخصات محیط کشت (غلظت نیترژن، فسفات



رشد می نماید (۳۱). با توجه به مطالعه ای که Chen و همکارانش در چین (۱۳) انجام وطی آن اثر دانسیته سلولی را بر روی رشد میکروجلبک و ترکیب لیپید تعیین نمودند، در مطالعه حاضر از میکروجلبک با دانسیته سلولی بالا استفاده شد.

کشت میکروجلبک نانو کلروپسیس اوکولاتا

به منظور تعیین مناسب ترین محیط کشت، آزمایشات در چهار محیط کشت Sato, F/2, Walne و TMRL به صورت جداگانه انجام گردید. جهت تهیه محیط های کشت، از آب دریای شبیه سازی شده که بوسیله حل نمودن نمک دریایی در آب استریل بدست آمد، استفاده شد. در جدول ۱ ترکیب هر محیط کشت از نظر مواد مغذی و غلظت هر عنصر در آن آمده است. در همه محیطهای کشت از ویتامینهای گیلارد استفاده شد. تمامی آزمایشات با سه بار تکرار و در فایکولب مجهز به تنظیم دما و شدت نور و در ارلن مایر ۲ لیتری انجام گردید. با توجه به مطالعه Montoya و همکارانش (۳۱)، دمای محیط کشت ۲۰ درجه سانتیگراد و با توجه به مطالعه Banerjee و همکارانش (۳۴) و Sen و همکارانش (۳۵)، شدت نور  $70 \mu E m^{-2} S^{-1}$  با سیکل روشنایی ۲۴ ساعته در نظر گرفته شد. جهت دستیابی به راندمان بالاتر، با توجه به مطالعه Chiu و همکارانش (۱۴) از جریان هوای حاوی ۲٪ دی اکسید کربن که ابتدا در آب اشباع شده، پس از عبور از فیلتر ۰/۴۵ میکرومتر به منظور هوادهی استفاده شد. جهت جلوگیری از هرگونه آلودگی در تمامی مراحل آزمایش، محیط کشت و ظروف در اتوکلاو و دمای ۱۲۱ درجه سانتیگراد به مدت ۲۰ دقیقه استریل شدند. تلقیح استوک جلبکی به ظروف حاوی محیط کشت نیز در زیر

و آهن ( تغییر نماید(۳۲،۳۱،۱۶). همچنین جهت کشت انبوه میکروجلبک در مقیاس صنعتی، بهینه سازی محیط کشت مناسب از فاکتورهای بسیار مهم می باشد (۶).

گرچه تولید بیوماس توسط نانو کلروپسیس در فتوئوراکتورهای بسته مختلف مورد مطالعه قرار گرفته، اما شرایط بهینه کشت این میکروجلبک هنوز به روشنی مشخص نشده است (۳۲،۲۰،۹). در تحقیقات مربوط به تولید بیودیزل نیز تاکنون محیط کشت مناسبی جهت میکروجلبک نانو کلروپسیس اوکولاتا معرفی نشده است. هدف از این مطالعه، بررسی تاثیر چهار محیط کشت متداول در تحقیقات بیودیزل بر روی میکروجلبک

نانو کلروپسیس اوکولاتا و بدست آوردن شرایط بهینه جهت حداکثر رشد، تولید بیوماس و تجمع لیپید جهت تولید بیودیزل می باشد. در حاشیه ان، لیپید استخراج شده از میکروجلبک در هر محیط کشت از نظر کمیت و کیفیت ترکیبات تشکیل دهنده آنالیز و قابلیت کاربردی آن جهت آبری پروری و مصارف انسانی و همچنین تولید بیودیزل بررسی گردید.

## روش بررسی

پژوهش بنیادی-کاربردی است که در مقیاس آزمایشگاهی، در نیمه اول سال ۹۱ در مرکز تحقیقات مهندسی بهداشت محیط دانشگاه علوم پزشکی کرمان انجام گرفت.

میکروجلبک نانو کلروپسیس اوکولاتا مورد استفاده در این مطالعه، به صورت استوک جلبکی با تراکم بالا ( cell/ml  $10^6 \times 25$  )، از ایستگاه تحقیقاتی ماهیان دریایی بندرامام خمینی، پژوهشکده آبری پروری جنوب کشور تهیه گردید. این میکروجلبک یوکاریوت بوده و به علت ساختار ساده به سرعت



لامپ UV انجام گردید.

جهت تعیین میزان رشد میکروجلبک، به طور روزانه از هر تیمار سه نمونه برداشته و با استفاده از دستگاه اسپکتوفتومتر مدل Shimadzu، دانسیته نوری در ۶۸۰ نانومتر قرائت گردید. نتایج حاصل از شمارش سلولی مستقیم بوسیله لام نئوبار مطابقت داده شد (۱۴). نتایج به صورت انحراف معیار  $\pm$  میانگین گزارش گردید. جهت تعیین وزن خشک بیوماس میکروجلبک، یک گرم بیوماس تر از محیط کشت برداشته و به مدت ۳۰ دقیقه در ۱۵ درجه سانتیگراد با ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید. بیوماس میکروجلبکهای دریایی تحت تاثیر مقدار نمک جذب شده روی سطح سلول و مقدار آب درون سلولی می باشد که در تخمین میزان بیوماس باعث ایجاد خطا می شود. یکی از دلایل تفاوت در میزان وزن خشک سلولی در مقالات مختلف همین موضوع می باشد. بنابراین قبل از آنالیز وزن سنجی، جهت حذف نمکها، سلولهای سانتریفیوژ شده را مجدداً در ۲۰۰ میلی لیتر آمونیوم فرمات (0.5 M, pH 8.0, adjusted with 1M NaOH) حل نموده و مجدداً با شرایط ذکر شده سانتریفیوژ نمودیم (۳۶، ۳۴). سلولهای میکروجلبک پس از سانتریفیوژ، به مدت چهار ساعت در دمای ۱۰۰ درجه خشک شد و وزن آنها بر روی کاغذ صافی از قبل توزین شده، اندازه گیری گردید (۳۶، ۳۴، ۱۳). میزان رشد ویژه میکروجلبک در فاز لگاریتمی از طریق معادله (۱) بدست آمد:

(معادله ۱)

$$\mu = \frac{\ln N_f - \ln N_i}{t_2 - t_1}$$

که در آن  $\mu$  ( $\text{day}^{-1}$ ) میزان رشد ویژه،  $\ln N_f$  و  $\ln N_i$  به ترتیب دانسیته سلولی ( $\frac{\text{cell}}{\text{ml}}$ ) در انتها و ابتدای فاز رشد لگاریتمی و  $t$  زمان (day) می باشد (۳۴، ۱۶، ۱۴، ۱).

استخراج و تعیین مقدار لیپید سلولی و TAG

با توجه با روشهای گوناگونی که جهت استخراج لیپید از سلولهای خشک شده میکروجلبک وجود دارد، در این مطالعه از روش استخراج متانول-کلروفرم (1/2, v/v) استفاده شد (۳۸، ۳۷، ۱۳). جهت حذف بقایای میکروجلبک، لیپید استخراج شده بوسیله فیلتر ۰/۴۵ میکرومتر صاف سازی گردید و پس از دو بار شستشو با حلال متانول و تبخیر سازی کامل، پس از خشک شدن، آنالیز وزن سنجی انجام و به صورت درصد وزن خشک سلولی بیان گردید (۳۱). بازدهی لیپید نیز از طریق معادله (۲) محاسبه گردید (۳۹، ۱۱):

$$P_{\text{Lipid}} (\text{gl}^{-1} \text{day}^{-1}) = \frac{C_f \times DCW_f - C_i \times DCW_i}{\text{Time}} \quad (\text{معادله } 2)$$

که در آن  $C_f$  و  $DCW_f$  به ترتیب مقدار لیپید (g/g) به ازاء بیوماس سلولی و بیوماس تولید شده (g/l) در انتهای فاز رشد ثابت،  $C_i$  و  $DCW_i$  به ترتیب مقدار لیپید (g/g) به ازاء بیوماس سلولی و بیوماس تولید شده (g/l) در ابتدای فاز رشد ثابت و  $T$  زمان بر حسب روز می باشد. پس از تعیین مقدار لیپید، لیپید خشک شده را در ۰/۴ میلی لیتر الکل ایزوپروپیل حل نموده و مقدار TAG در لیپید، طبق روش Li و همکارانش اندازه گیری گردید (۴۰).

آنالیز و تعیین مشخصات اسید چرب

جهت تعیین مشخصات اسید چرب، از روش استرفیکاسیون مستقیم پیشنهاد شده بوسیله Lepage و Roy استفاده شد (۱).



حامل استفاده شد. دما طبق برنامه از ۱۳۰ درجه تا ۱۸۰ درجه سانتیگراد با سرعت ۱۰ درجه در دقیقه افزایش یافت و پس از آن با سرعت ۲ درجه در دقیقه به ۲۱۰ درجه سانتیگراد رسید. دمای اینجکتور و دکتور به ترتیب ۲۲۰ و ۲۵۰ درجه سانتیگراد نگه داشته شد.

تعیین اندیس یدی

طبق استاندارد اروپایی EN14111، کیفیت روغن میکروجلبک بدست آمده جهت تولید بیودیزل، از طریق اندازه گیری ارزش یا اندیس ید Iodine value تعیین گردید (۴).

آنالیز آماری

داده ها با استفاده از آزمون واریانس یکطرفه one-way Anova آنالیز و جهت تعیین تفاوت آماری موجود در بین محیط کشتها از آزمون Tukey با نرم افزار Spss استفاده شد. سطح معناداری نیز ۰/۰۵ در نظر گرفته شد (۲۲، ۲۵).

مخلوطی از ۱۰۰ میلی گرم میکروجلبک لیوفلیزه شده و ۸ میلی لیتر KOH به مدت سه دقیقه بوسیله سونیکاتور به هم زده شد. جهت صابونی شدن، مخلوط حاصل به مدت ۱۵ دقیقه تا دمای ۱۰۰ درجه حرارت داده شد و سپس در دمای اطاق سرد گردید. جهت استریفیکاسیون، ۸ میلی لیتر از اسید هیدروکلریدریک ۰/۷ نرمال در متانول و  $BF_3/CH_3OH$  به نسبت ۱۴٪ (v/v) به مخلوط اضافه شده و مجدداً به مدت ۱۵ دقیقه تا دمای ۱۰۰ درجه حرارت داده شد. پس از سرد شدن در دمای اطاق، جهت جلوگیری از امولسیفیکاسیون، ۲ میلی لیتر محلول اشباع کلرید سدیم به آن اضافه شد. با اضافه نمودن مقداری ان-هگزان، متیل استر اسیدهای چرب FAMES استخراج گردید (p13). FAMES در لایه هگزان بوسیله گاز کروماتوگرافی استاندارد مجهز به ستون کاپیلاری و دکتور یونیزاسیون شعله FID آنالیز گردید. نیتروژن با میزان ۱/۵ میلی لیتر در دقیقه به عنوان گاز

جدول ۱: ترکیب محیط کشتهای مورد استفاده در این مطالعه بر حسب میلی مول در لیتر

محیط کشت				مواد مغذی
TMRL	Sato	F/2	Walne	
-	$5/1784 \times 10^{-4}$	۰/۳۴۵۲	$7/6717 \times 10^{-4}$	Mncl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O
-	$3/3623 \times 10^{-4}$	۰/۰۴۲	۰/۰۸۴	CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O
-	$1/602 \times 10^{-5}$	۰/۰۴	۰/۰۸۰۱	Cuso <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O
$10^{-5}$	$1/8934 \times 10^{-3}$ *	۰/۰۱۹۴	$4/932 \times 10^{-3}$	Fecl <sub>3</sub>
-	۱/۹۹۹۸	-	-	NaHco <sub>3</sub>
-	-	$4/8543 \times 10^{-6}$	$7/2814 \times 10^{-4}$	(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> .4H <sub>2</sub> O
-	$2/2012 \times 10^{-4}$	۰/۰۷۶۵**	۰/۱۵۴	Zncl <sub>2</sub>
۰/۸۸۲۴***	۰/۸۸۲۴	۱/۱۷۶۵	۱/۱۷۶۵	NaNO <sub>3</sub>
-	۰/۰۵۵۶	-	۰/۵۴۳۴	H <sub>3</sub> Bo <sub>3</sub>
-	$8/0593 \times 10^{-3}$	۰/۰۱۱۷	۰/۱۲۰۸	Na <sub>2</sub> EDTA.2H <sub>2</sub> O
۰/۰۱۹۳	۰/۰۱۹۳	۰/۰۳۸۷	۰/۰۷۵۵	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O

\* به صورت Fecl<sub>2</sub> استفاده شد \*\* به صورت  $7H_2OZnso_4$  استفاده شد \*\*\* به صورت KNO<sub>3</sub> استفاده شد

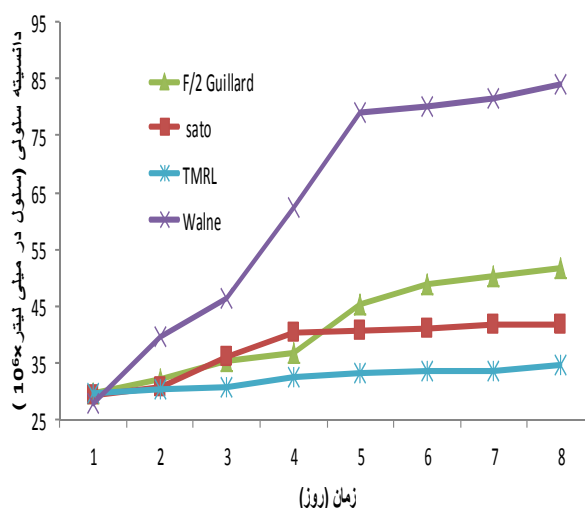


## یافته ها

## اثر محیط کشت بر میزان رشد سلولی میکروجلبک

## نانوکلروپسیس اوکولاتا

در نمودار ۱ میزان رشد سلولی در چهار محیط مختلف کشت نشان داده شده است. بیشترین رشد در محیط Walne بدست آمد. به غیر از محیط کشت TMRL که در آن فاز رشد لگاریتمی مشاهده نشد، در سایر محیط کشتها، میکروجلبک پس از گذراندن فاز تطابق در طی ۲۴ ساعت، وارد فاز رشد لگاریتمی شد. نتایج حاصل از آزمون واریانس یک طرفه نشان می دهد اختلاف بین رشد سلولی در محیط کشتهای مورد استفاده معنادار می باشد ( $F=9/615$ ،  $P<0/05$ ،  $df=3$ ). انجام آزمون Tukey نیز موید اینست که آنها در گروههای همگن واقع نشده اند و محیط کشت Walne اختلاف معناداری با محیط کشت F/2 ( $p=0/008$ )، ساتو ( $p=0/002$ ) و TMRL ( $p=0/000$ ) دارد. بین محیط کشتهای F/2 و TMRL با یکدیگر اختلاف آماری معناداری مشاهده نشد ( $p>0/05$ ).



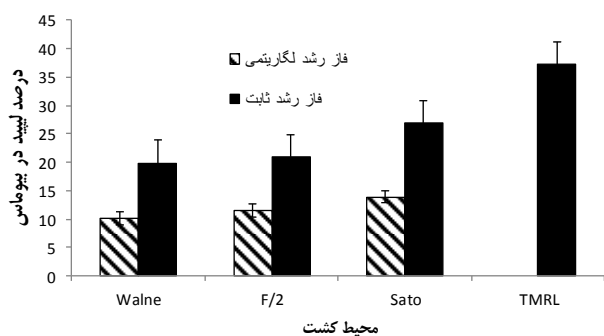
نمودار ۱: رشد میکروجلبک نانوکلروپسیس اوکولاتا در چهار محیط کشت Sato، F/2، Walne و TMRL

## اثر محیط کشت بر بیوماس و لیپید تولیدی میکروجلبک

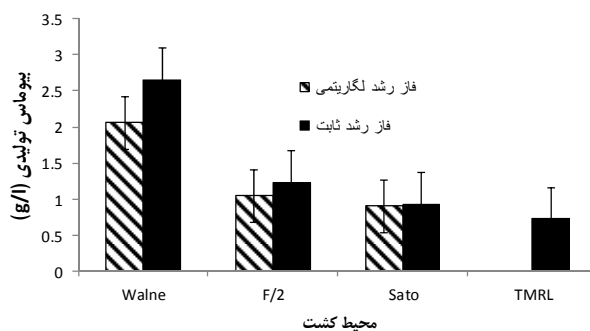
## نانوکلروپسیس اوکولاتا

نتایج حاصل از اثر محیط کشت بر بیوماس تولیدی در دو فاز رشد لگاریتمی و رشد ثابت در نمودار ۲ نشان داده شده است. بیشترین بیوماس تولیدی در محیط کشت Walne مشاهده شد. نتایج حاصل از آزمون واریانس یک طرفه نشان می دهد اختلاف بین بیوماس تولیدی در محیط کشتهای مورد استفاده معنادار می باشد ( $F=10/088$ ،  $P<0/05$ ،  $df=3$ ). انجام آزمون Tukey نیز موید اینست که آنها در گروههای همگن واقع نشده اند و محیط کشت Walne اختلاف معناداری با محیط کشت F/2 ( $p=0/005$ )، ساتو ( $p=0/001$ ) و TMRL ( $p=0/000$ ) دارد. از نظر تولید بیوماس، بین محیط کشتهای F/2، ساتو و TMRL با یکدیگر اختلاف آماری معناداری مشاهده نشد ( $p>0/05$ ). نتایج حاصل از اثر محیط کشت بر تولید لیپید در نمودار ۳ نشان داده شده است. با توجه به این نمودار بیشترین درصد تبدیل بیوماس به لیپید در محیط کشت TMRL و پس از آن به ترتیب در محیط کشت Sato، F/2، و Walne در دو فاز رشد لگاریتمی و رشد ثابت میکروجلبک مشاهده شد. نتایج حاصل از آزمون واریانس یک طرفه نشان می دهد اختلاف بین درصد تبدیل لیپید در محیط کشتهای مورد استفاده معنادار می باشد ( $P<0/05$ ).

انجام آزمون Tukey نشان می دهد اختلاف بین تمامی محیط کشت ها با یکدیگر معنادار بوده ( $p=0/000$ ) و تنها بین محیط کشتهای Walne و F/2 از نظر درصد تبدیل لیپید، اختلاف معناداری مشاهده نگردید ( $p=0/065$ ).



نمودار ۳: لیپید تولیدی توسط نانو کلروپسیس اوکولاتا در فاز رشد لگاریتمی و رشد ثابت در محیط کشت‌های گوناگون (در محیط کشت TMRL، فاز رشد لگاریتمی مشاهده نشد)



نمودار ۲: بیوماس تولیدی توسط نانو کلروپسیس اوکولاتا در فاز رشد لگاریتمی و رشد ثابت در محیط کشت‌های گوناگون (در محیط کشت TMRL، فاز رشد لگاریتمی مشاهده نشد)

جدول ۲: ترکیب اسیدهای چرب تولیدی توسط نانو کلروپسیس اوکولاتا در محیط کشت‌های گوناگون در فاز رشد لگاریتمی و ثابت (درصد)

محیط کشت							نام	اسید چرب
TMRL	Sato		F/2		Walne			
ثابت	ثابت	لگاریتمی	ثابت	لگاریتمی	ثابت	لگاریتمی		
۳/۳	۴/۷۹	۳/۱	۶/۴۵	۳/۱	۵/۵۹	۳/۵	Myristic acid	C14:0
۰/۲	۰/۱۲	۰/۲	۰	۰/۱	۰/۳۴	۰/۲	-	C15:0
۳۴/۳	۳۵/۱۷	۳۰/۵	۳۴/۳۶	۲۹/۹۷	۲۸/۵۷	۲۲/۷۶	Palmitic acid	C16:0
۲۲/۵۶	۲۴/۱۶	۲۰/۱۱	۲۳/۱۹	۱۹/۳	۲۵/۰۴	۱۸/۴۵	Palmitoleic acid	C16:1N-7
۰/۷	۰/۸۹	۱	۰/۸	۰/۸	۰/۷۳	۱/۰۱	Stearic acid	C18:0
۷/۵	۱۱/۰۱	۹/۶	۷/۸۵	۷/۴	۵/۲۴	۶/۳	Oleic acid	C18:1N-9
۱/۲	۱/۱۵	۲/۴	۰/۲۳	۱/۷	۱/۱۲	۳/۱۵	Linoleic acid	C18:2N-6
۰/۱	۰	۰/۱	۰/۰۳	۰/۱	۰	۰/۱	Eicosanoic acid	C20:0
۳/۲۱	۰/۷۶	۲/۹۸	۱/۱	۳/۲۵	۲/۴۶	۳/۷۳	Arachidonic acid	C20:4N-6
۱۷/۳	۱۶/۱۷	۲۴/۲	۱۸/۹۸	۲۷/۶	۲۲/۱۹	۳۶/۱۱	Eicosapentaenoic acid (EPA)	C20:5N-3

در محیط کشت Walne و F/2، به علت وجود مواد مغذی به میزان کافی، فاز رشد لگاریتمی تا روز پنجم کشت ادامه داشته و پس از آن وارد فاز رشد ثابت شده است. اما در محیط کشت Sato، میکروجلبک در روز چهارم به انتهای فاز لگاریتمی رسیده است. در محیط کشت TMRL فاز لگاریتمی بسیار کوتاه و قابل صرف نظر کردن می باشد. بیشترین دانسیته سلولی در

در جدول ۲ نتایج حاصل از تعیین کیفی اسیدهای چرب تولید شده توسط محیط کشت‌های گوناگون و در فاز رشد لگاریتمی و رشد ثابت، بوسیله گاز کروماتوگرافی آمده است.

**بحث**

اثر محیط کشت بر روی میزان رشد سلولی بررسی رشد میکروجلبک در محیط کشت‌های مورد مطالعه نشان می دهد که



مقدار نیتروژن در محیط کشتهای مورد استفاده در این مطالعه نشان می دهد که محیط کشت Walne بر خلاف سایر محیط کشتهای از دو منبع نیتروژنی (نترات سدیم و مولیدات آمونیوم) استفاده می نماید. در این مطالعه نیز مانند مطالعه Nigam و همکارانش (۸) و Durmaz (۲۲) با افزایش میزان نترات در محیط کشت، رشد سلولی نیز افزایش یافت. از دیگر دلایل میزان رشد بالاتر میکروجلبک در محیط کشت Walne، حضور آمونیوم می باشد که از عناصر مورد نیاز میکروجلبکها بوده و مقدار آن در محیط کشت Wlane، ۱۵۰ برابر محیط کشت F/2 می باشد و در سایر محیط کشتهای مشاهده نمی شود. یکی از دلایل رشد کم میکروجلبک در محیط کشت TMRL، عدم وجود آمونیوم می باشد. از طرف دیگر با توجه به نقش فسفات در تولید ATP مورد نیاز جهت فتوسنتز و رشد سریع میکروجلبک (۴۲) مقدار این عنصر در محیط کشت Walne دو برابر محیط کشت F/2 و چهار برابر سایر محیط کشتهای می باشد. مس نیز یکی دیگر از عناصر ضروری میکروجلبکها بوده که مقدار آن در محیط کشت Walne بطور قابل توجهی نسبت به سایر محیطها بیشتر می باشد.

اثر محیط کشت بر روی بیوماس تولیدی

در این مطالعه بیشترین مقدار بیوماس در محیط کشت Walne و در فاز رشد ثابت (برابر ۲/۶۵۲ گرم در لیتر) بدست آمد که به علت غلظت بالای نترات در محیط کشت می باشد (۸، ۲۲). و با نتایج مطالعه ای که Olofsson و همکارانش (۹) بر روی کشت نانوکلوپسیس اوکولاتا در محیط بیرون انجام دادند و به غلظت بیوماس بین ۱/۱ تا ۲/۳۲ گرم در لیتر در طی ۴ فصل سال دست یافتند، مطابقت دارد. Solovchenko و Khozin-

محیط کشت walne، در انتهای فاز رشد ثابت بدست آمده و برابر  $\frac{cell}{ml} \times 10^6$  می باشد که نشان می دهد نتایج مطالعه حاضر از نظر حداکثر دانسیته سلولی پس از فاز رشد ثابت با نتایج مطالعه Palanichamy و Rani در کشور هند (۴۱)، مطابقت دارد. همچنین بررسی میزان رشد ویژه در محیط کشتهای مورد مطالعه نیز نشان می دهد که بیشترین میزان رشد مربوط به محیط کشت Walne و برابر  $0.2616 \text{ day}^{-1}$  بوده و برای محیط کشت F/2 برابر  $0.1066 \text{ day}^{-1}$  و محیط کشت Sato برابر  $0.08 \text{ day}^{-1}$  می باشد. در مطالعه ای که Chiu و همکارانش در تایوان (۱۴) انجام دادند، پس از ۶ تا ۸ روز کشت میکروجلبک نانوکلوپسیس اوکولاتا در محیط F/2، به میزان رشد ویژه برابر  $0.571 \text{ day}^{-1}$  دست یافتند. Banerjee و همکارانش (۳۴) با کشت نانوکلوپسیس اوکولاتا در محیط کشت Walne توانستند به میزان رشد  $0.004 \text{ day}^{-1}$  دست یابند. در مطالعه Huerlimann و همکاران (۱۶) نیز میزان رشد ویژه برای نانوکلوپسیس اسپیروژا در محیط کشت L1، F/2 و K به ترتیب برابر ۰/۴۱، ۰/۳۳،  $0.32 \text{ day}^{-1}$  بدست آمد. تفاوت میزان رشد ویژه در بین مطالعات انجام شده می تواند به علت تفاوت در نوع کشت، شدت نور، محیط کشت قبلی میکروجلبک، نوع فتوبیوراکتور و دمای مورد مطالعه باشد (۱۶، ۲۰). از دلایل تفاوت در میزان رشد سلولی نانوکلوپسیس اوکولاتا در محیط کشتهای مطالعه حاضر، می توان به ترکیب متفاوت هر محیط کشت از نظر مواد مغذی مورد نیاز میکروجلبک اشاره نمود. نیتروژن به عنوان بخشی از پروتئین سلول و مولکولهای کلروفیل بوده و جهت رشد سلول میکروجلبک نیاز می باشد (۲۲). با توجه به جدول ۱، بررسی





در چین (۱۹) و Oliveira و Gouveia در پرتغال (۴) مطابقت دارد.

اثر محیط کشت بر روی بازدهی لیپید میکروجلبک

بازدهی بیوماس، کل محتوای لیپید و بازدهی لیپید پارامترهایی می باشند که امکان سنجی اقتصادی استفاده از میکروجلبک را به عنوان منبع سوخت زیستی تعیین می کنند. همانند مطالعه Hu و Gao (۱۹)، نتایج مطالعه حاضر نیز نشان می دهد که در شرایط استرس مواد مغذی، محتوای لیپید بالا اغلب با کاهش میزان رشد و بیوماس تولیدی میکروجلبک همراه می باشد، بنابراین محتوای لیپید یا مقدار بیوماس به تنهایی، مقیاس مناسبی جهت بازدهی لیپید میکروجلبک نمی باشد و باید با استفاده از معادله ۲ نقش هر دو عامل را در کنار یکدیگر در نظر گرفت. با استفاده از معادله ۲، بیشترین بازدهی لیپید مربوط به محیط کشت Walne و برابر  $0.105 \text{ g l}^{-1} \text{ day}^{-1}$  بوده و برای  $F/2$  برابر  $\text{gl}^{-1}$  Sato  $0.0462 \text{ day}^{-1}$ ،  $0.0417 \text{ g l}^{-1} \text{ day}^{-1}$  و برای  $\text{gl}^{-1} \text{ day}^{-1}$  برابر  $0.023$  می باشد. در مطالعه Oliveira و Gouveia در پرتغال (۴) بازدهی لیپید  $0.09$  گرم در لیتر در روز و در مطالعه Melinda و همکارانش در آفریقای جنوبی (۱۰) بازدهی لیپید برابر  $0.082$  گرم در لیتر در روز بدست آمد که با نتایج این مطالعه مطابقت دارد.

اثر محیط کشت بر ترکیب اسید چرب

اسیدهای چرب غیر اشباع چندگانه (PUFA) عمدتاً شامل ۱۸:۲، ۲۰:۴، ۲۰:۵، ۲۲:۶ به عنوان درصدی از اسید چرب کل TFA بوده که بیشترین مقدار آن در محیط کشتهای  $F/2$ ، Walne، Sato و TMRL و در فاز رشد لگاریتمی به ترتیب برابر  $42/99$ ،  $32/55$ ،  $29/58$  درصد و در فاز رشد ثابت به ترتیب برابر

Goldberg (۲۴) نیز در محیط  $f/2$  پس از ۵ روز کشت نانوکلوپسیس اسپروژا، غلظت بیوماس  $2/2$  گرم در لیتر بدست آوردند که با نتایج این مطالعه مطابقت دارد. Chiu و همکارانش (۱۴) نیز پس از ۶ تا ۸ روز کشت نانوکلوپسیس اوکولاتا در محیط کشت  $F/2$  و استفاده از ۲ درصد دی اکسید کربن، توانستند به بیوماس تولیدی برابر  $1.277$  گرم در لیتر برسند.

اثر محیط کشت بر روی تجمع لیپید سلولی

از عوامل اثر گذار بر تولید لیپید، محیط کشت می باشد. نیتروژن و فسفر معمولترین فاکتورهای محدود کننده ماده غذایی در محیط کشت بوده که منجر به تجمع لیپید می شود. در محیط کشت محدود از نظر نیتروژن، به علت سازش پذیری کم آنزیمهای سنتزکننده لیپید نسبت به آنزیمهای سنتزکننده کربوهیدرات، مقدار لیپید سلولی افزایش می یابد (۲). همچنین کاهش غلظت نترات در محیط کشت، باعث کاهش کلروفیل II شده و بیوسنتز پروتئین را محدود می کند، بنابراین با تغییر محصولات فتوسنتز، نسبت لیپید به پروتئین را افزایش می دهد (۱۸، ۳۱). به همین دلیل مطابق نمودار ۳ بیشترین درصد تبدیل بیوماس به لیپید در محیط کشت TMRL بدست آمد که برابر  $37/22$  درصد وزن خشک سلولی می باشد. همچنین نتایج حاصل از آنالیز لیپید در دو فاز رشد لگاریتمی و رشد ثابت نشان داد تجمع لیپید در سلولهای میکروجلبک با فاز رشد آنها ارتباط مستقیم داشته و رشد از فاز لگاریتمی به فاز رشد ثابت، همراه با افزایش درصد لیپید بوده است. و با نتایج مطالعه Gao و Hu و Cheirsilp و yeessang 2011 در تایلند (۸) و



Walne، Sato، F/2 و TMRL در فاز رشد ثابت به ترتیب برابر ۶۴/۷۸، ۷۱/۸۸، ۷۵/۲۵ و ۶۷/۹۶ درصد اسید چرب می باشد. TAG در برخی گونه ها می تواند به ۴۰ تا ۷۰ درصد وزن کل بیوماس برسد (۲۵). بنابراین از نظر کمیت، محیط کشت Sato بیشترین مقدار TAG را جهت تولید بیودیزل فراهم می نماید. در مطالعه Olofsson و همکارانش (۹) بر روی نانوکلوپسیس اوکولانا، اسیدهای چرب مناسب جهت تولید بیودیزل، اسید مایریستیک (c14:0)، اسید پالمیتیک (c16:0)، اسید پالمیتوئیک (c16:1)، اسید استئاریک (c18:0) و اسید اولئیک (c18:1) معرفی شدند که بیش از ۴۵-۷۸ درصد کل اسیدهای چرب بوده و با نتایج مطالعه حاضر مطابقت دارد. همچنین، نتایج حاصل از این مطالعه با نتایج Durmaz (۲۲) مطابق بوده و نشان می دهد ترکیب شیمیایی سلولهای میکروجلبک در طول فازهای رشد خود متغیر می باشد و از فاز لگاریتمی به رشد ثابت، میزان اسیدهای چرب اشباع، افزایش و برعکس میزان اسیدهای چرب غیر اشباع کاهش یافته است.

اندیس ید

جهت تعیین کیفیت روغن بدست آمده از میکروجلبک، مطابق استاندارد اروپایی EN14111 (۴) از اندیس ید (Iodine value) استفاده شد. مطابق استاندارد اندیس ید بدست آمده از روغن میکروجلبک جهت تعیین کیفیت بیودیزل باید کمتر از ۱۲۰ gI<sub>2</sub>/100 g باشد. در این مطالعه اندیس ید روغن نانوکلوپسیس اوکولانا ۵۴gI<sub>2</sub>/100 g بدست آمد. در مطالعه Gouveia و Oliveira در پرتغال (۴) این عدد برای نانوکلوپسیس اسپروژا برابر ۵۲، برای

۲۵/۷۷، ۲۰/۲۹، ۱۸/۰۸ و ۲۱/۷۱ درصد بدست آمد. بنابراین در صورتی که هدف از رشد میکروجلبک، مصارف انسانی و آبی پرووری باشد، استفاده از محیط کشت Walne و رشد در مرحله لگاریتمی، به طور معناداری بیشترین بازدهی را دارد. همانند نتایج این مطالعه، در مطالعه Fabregas و همکارانش (۴۳) بر روی نانوکلوپسیس اسپروژا، میزان PUFA در اسید چرب ۳۵ درصد بدست آمد.

Eicosapentaenoic acid (EPA) ترکیب مهم دیگر اسید چرب و یک ω-3 PUFA می باشد که حاوی امگا ۳ بوده و نقش مهمی در جلوگیری از بیماری در انسان ایفا می نماید. منبع تجاری کنونی EPA ماهیان دریایی بوده که استفاده از آن دارای محدودیت هایی می باشد (۴۴-۴۶). نتایج حاصل از این مطالعه نشان می دهد که مقدار EPA در همه محیط کشتها، از فاز رشد لگاریتمی به رشد ثابت، کاهش می یابد. بیشترین مقدار EPA در محیط کشت Walne و در فاز لگاریتمی، برابر ۳۶/۱۱ درصد اسید چرب می باشد. در مطالعه Hu و Gao در چین (۴۷) بر روی نانوکلوپسیس اسپروژا، مقدار EPA در کل اسیدهای چرب، ۲۵ درصد بدست آمد. همانند مطالعه ای که Hu و Gao در چین (۱۹) بر روی میکروجلبک Ellipsoidian.Sp انجام دادند، در این مطالعه نیز با افزایش غلظت نترات در محیط کشت، مقدار EPA نیز افزایش یافت.

روغن میکروجلبک به شکل تری گلیسرید قابل تبدیل به بیودیزل می باشد. تری گلیسرید TAG در نانوکلوپسیس شامل اسیدهای چرب اشباع و اسیدهای چرب غیر اشباع تک پیوندی بوده (۲۵) و در واکنش سلول ذخیره می شوند (۹). در مطالعه حاضر مقدار TAG در محیط کشتهای مورد مطالعه



دیگر عوامل موثر میباشد که نانوکلوپسیس اوکولاتا، حداکثر بازدهی جهت مقاصد آبیرووری و مصارف انسانی را در فاز رشد لگاریتمی و جهت تولید بیودیزل در فاز رشد ثابت خود نشان داد. همچنین تعیین ارزش یدی نشان میدهد که روغن حاصل از میکروجلبک در محیط کشت Walne، کیفیت لازم جهت تولید بیودیزل را دارد.

### تشکر و قدردانی

این تحقیق حاصل بخشی از پایان نامه دانشجویی در مقطع کارشناسی ارشد می باشد که زیر نظر مرکز تحقیقات مهندسی بهداشت محیط دانشگاه علوم پزشکی کرمان و با حمایت مالی معاونت تحقیقات و فن اوری این دانشگاه انجام یافته، بدینوسیله از مساعدهای آنان که هموار کننده انجام این پژوهش بوده است، سپاسگزاری مینماید.

Neochlorisoleabundans برابر ۱۰۲، برای Dunaliellatertiolecta برابر ۱۲۰ و برای Scenedesmusobliquus برابر ۶۹ بدست آمد. که نشان می دهد مشخصات روغن نانوکلوپسیس اوکولاتا با روغن نانوکلوپسیس اسپروژا و Scenedesmusobliquus شبیه بوده و جهت تولید بیودیزل مناسب می باشد.

### نتیجه گیری

محدودیت مواد مغذی یکی از فاکتورهای موثر جهت دستیابی به حداکثر بازدهی میکروجلبک جهت تولید بیودیزل، مقاصد آبیرووری و مصارف انسانی میباشد که میتواند در قالب نوع محیط کشت میکروجلبک اعمال گردد. در این مطالعه نانوکلوپسیس اوکولاتا حداکثر بازدهی جهت مقاصد ذکر شده را در محیط کشت Walne نشان داد. فاز رشد میکروجلبک از

### References

- 1-Xin L, Hong-Ying H, Yu-Ping Z. Growth and lipid accumulation properties of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. under different cultivation temperature. *Bioresource Technology*. 2011;102(3):3098-102.
- 2-Rajasri Y, Ramgopal R S, Rao C S. Lipid Accumulation Studies In *Chlorella Pyrenoidosa* Using Customized Photobioreactor- Effect of Nitrogen Source, Light Intensity and Mode of Operation. *International Journal of Engineering Research and Applications*. 2012;2(3):2446-453.
- 3-Xiaodong D, Yajun L, Xiaowen F. Effects of selective medium on lipid accumulation of chlorellas and screening of high lipid mutants through ultraviolet mutagenesis. *African Journal of Agricultural Research* 2011;6(16):3768-774.
- 4-Gouveia L, Oliveira A. Microalgae as a raw material for biofuels production. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 2009;36(2):269-74.
- 5-Wang G, Wang T. Characterization of Lipid Components in Two Microalgae for Biofuel Application. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 2012;89(1):135-143.
- 6-Sankar M, Ramasubramanian V. Biomass production of commercial algae *Chlorella vulgaris* on different culture media. *E Journal of Life Science* 2012;1(1):56-60.



- 7-ánchez S, MartíNez M E, Espinola F. Biomass production and biochemical variability of the marine microalga *Isochrysis galbana* in relation to culture medium. *Biochemical Engineering Journal* 2000;6(1):13-18.
- 8-Nigam S, Monika P R, Rupali S. Effect of Nitrogen on Growth and Lipid Content of *Chlorella pyrenoidosa*. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology* 2011;7(3):124-129.
- 9-Olofsson M, Lamela T, Nilsson E, Bergé J P, Del Pino V, Uronen P. Seasonal Variation of Lipids and Fatty Acids of the Microalgae *Nannochloropsis oculata* Grown in Outdoor Large-Scale Photobioreactors. *Energies* 20-12;5(5):1577-92.
- 10-Griffiths M, Harrison S L. Lipid productivity as a key characteristic for choosing algal species for biodiesel production. *Journal of Applied Phycology* 2009;21(5):493-507.
- 11-Li Y, Horsman M, Wang B, Wu N, Lan C. Effects of nitrogen sources on cell growth and lipid accumulation of green alga *Neochloris oleoabundans*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2008;81(4):629-636.
- 12-Banskota A, Stefanova R, Gallant P, McGinn P. Mono- and digalactosyldiacylglycerols: potent nitric oxide inhibitors from the marine microalga *Nannochloropsis granulata*. *Journal of Applied Phycology*. 2012;1-9.
- 13-Chen Y, Wang J, Liu T, Gao L. Effects of initial population density (IPD) on growth and lipid composition of *Nannochloropsis* sp. *Journal of Applied Phycology*. 2012;24(6):1627-23.
- 14-Chiu S-Y, Kao C-Y, Tsai M-T, Ong S-C, Chen C-H, Lin C-S. Lipid accumulation and CO<sub>2</sub> utilization of *Nannochloropsis oculata* in response to CO<sub>2</sub> aeration. *Bioresource Technology*. 2009;100(2):833-38.
- 15-Karampudi S, Chowdhury K. Effect of Media on Algae Growth for Bio-Fuel Production. *Notulae Scientia Biologicae*. 2011;3(3):33-41.
- 16-Huerlimann R, Rocky D N, Kirsten H. Growth, Lipid Content, Productivity, and Fatty Acid Composition of Tropical Microalgae for Scale-Up Production. *Biotechnology and Bioengineering*. 2010;107(2):245-256.
- 17-Recht L, Zarka A, Boussiba S. Patterns of carbohydrate and fatty acid changes under nitrogen starvation in the microalgae *Haematococcus pluvialis* and *Nannochloropsis* sp. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2012;94(6):1495-1503
- 18-Mandalam, Ramkumar K, Palsson, Bernhard. Elemental balancing of biomass and medium composition enhances growth capacity in high-density *Chlorella vulgaris* cultures. *Biotechnology and Bioengineering*. 1998;59(5):605-11.



- 19-Hu H, Gao K. Response of Growth and Fatty Acid Compositions of *Nannochloropsis* sp. to Environmental Factors Under Elevated CO<sub>2</sub> Concentration. *Biotechnology Letters* 2006;28(13):987-992.
- 20-Spoladore P, Joannis-Cassan C, Duran E, Isambert A. Optimization of *Nannochloropsis oculata* growth using the response surface method. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 2006;81(6):1049-56.
- 21-Sandnes J M, Källqvist T, Wenner D, Gislerød H R. Combined influence of light and temperature on growth rates of *Nannochloropsis oceanica*: linking cellular responses to large-scale biomass production. *Journal of Applied Phycology*. 2005;17(6):515-25.
- 22-Durmaz Y. Vitamin E ( $\alpha$ -tocopherol) production by the marine microalgae *Nannochloropsis oculata* (Eustigmatophyceae) in nitrogen limitation. *Aquaculture* 2007;272(1-4):717-22.
- 23-Zhang J, Liu S, Sun X, Yang G, Zhang X, Gao Z. Fatty Acid Composition Analyses of the DCMU Resistant Mutants of *Nannochloropsis oculata* (Eustigmatophyceae). *Journal of Ocean University of Qingdao*. 2003;12:65-68.
- 24-Solovchenko A, Khozin-Goldberg I, Recht L, Boussiba S. Stress-Induced Changes in Optical Properties, Pigment and Fatty Acid Content of *Nannochloropsis* sp.: Implications for Non-destructive Assay of Total Fatty Acids. *Marine Biotechnology*. 2011;3(3):527-535.
- 25-Pal D, Khozin-Goldberg I, Cohen Z, Boussiba S. The effect of light, salinity, and nitrogen availability on lipid production by *Nannochloropsis* sp. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2011;90(4):1429-1441.
- 26-Solovchenko A E, Khozin-Goldberg I, Didi-Cohen S, Cohen Z, Merzlyak M N. Effects of light intensity and nitrogen starvation on growth, total fatty acids and arachidonic acid in the green microalga *Parietochloris incisa*. *Journal of Applied Phycology*. 2008;20(3):245-251.
- 27-Huang X, Huang Z, Wen W, Yan J. Effects of nitrogen supplementation of the culture medium on the growth, total lipid content and fatty acid profiles of three microalgae (*Tetraselmis subcordiformis*, *Nannochloropsis oculata* and *Pavlova viridis*). *Journal of Applied Phycology*. 2012;1-9.
- 28-Simionato D, Sforza E, Corteggiani Carpinelli E, Bertucco A, Giacometti G M, Morosinotto T. Acclimation of *Nannochloropsis gaditana* to different illumination regimes: Effects on lipids accumulation. *Bioresource Technology*. 2011;102(10):602;6032-6
- 29-Abu-Rezq T, Al-Musallam L, Al-Shimmari J, Dias P. Optimum production conditions for different high-quality marine algae. *Hydrobiologia*. 1999;403(0):97-107.



- 30-Yeesang C, Cheirsilp B. Effect of nitrogen, salt, and iron content in the growth medium and light intensity on lipid production by microalgae isolated from freshwater sources in Thailand. *Bioresource Technology*. 2011;102(3):3034-3040.
- 31-Converti A, Casazza A A, Ortiz E Y, Perego P, Del Borghi M. Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*. 2009;48(6):1146-1151.
- 32-Srinivas R, Ochs C. Effect of UV-A Irradiance on Lipid Accumulation in *Nannochloropsis oculata*. *Photochemistry and Photobiology*. 2012;88(684-689).
- 33-Rocha J M S, Garcia J E C, Henriques M H F. Growth aspects of the marine microalga *Nannochloropsis gaditana*. *Biomolecular Engineering*. 2003;20(4-6):237-242.
- 34-Banerjee S, Hew W E, Khatoon H, Shariff M, Fatimah M. Growth and proximate composition of tropical marine *Chaetoceros calcitrans* and *Nannochloropsis oculata* cultured outdoors and under laboratory conditions. *African Journal of Biotechnology*. 2011;10(8):1375-1383.
- 35-Sen B, Koser M, Alp M, Erbas H. Studies on growth of marine microalgae in batch cultures: III. *Nannochloropsis Oculata* (Eustigmatophyceae). *Asian journal of plant science*. 2005;4(6):642-644.
- 36-Zhu C J, Lee Y K. Determination of biomass dry weight of marine microalgae. *Journal of Applied Phycology*. 1997;9(2):189-194.
- 37-Wan M, Liu P, Xia J, Rosenberg J, Oyler G, Betenbaugh M, Nie Z, and Qiu G. The effect of mixotrophy on microalgal growth, lipid content, and expression levels of three pathway genes in *Chlorella sorokiniana*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2011;91(3):835-844.
- 38-Xin L, Hong-Ying H, Ke G, Ying-Xue S. Effects of different nitrogen and phosphorus concentrations on the growth, nutrient uptake, and lipid accumulation of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. *Bioresource Technology*. 2010;101(14):5494-5500.
- 39-Su C-H, Chien L-J, Gomes J, Lin Y-S, Yu Y-K, Liou J-S, and Syu R-J. Factors affecting lipid accumulation by *Nannochloropsis oculata* in a two-stage cultivation process. *Journal of Applied Phycology*. 2011;23(5):903-908.
- 40-Xin L, Hong-Ying H, Jia Y, Yin-Hu W. Enhancement effect of ethyl-2-methyl acetoacetate on triacylglycerols production by a freshwater microalga, *Scenedesmus* sp. LX1. *Bioresource Technology*. 2010;101(24):9819-9821.



- 41-Palanichamy S,Rani V.Observations on the long term preservation and culture of the marine microalga, *Nannochloropsis oculata*.J. mar. biol. Ass. India,. 2004;46(1):98-103.
- 42-Hu H,Zhou Q.Regulation of inorganic carbon acquisition by nitrogen and phosphorus levels in the *Nannochloropsis* sp.World Journal of Microbiology and Biotechnology. 2010;26(5):957-961.
- 43-Fábregas J, Maseda A, Domínguez A,Otero A.The cell composition of *Nannochloropsis* sp. changes under different irradiances in semicontinuous culture.World Journal of Microbiology and Biotechnology. 2004;20(1):31-35.
- 44-Zittelli G C, Rodolfi L,Tredici M R.Mass cultivation of *Nannochloropsis* sp. in annular reactors.Journal of Applied Phycology. 2003;15(2):107-114.
- 45-Fang X, Wei C, Zhao-Ling C,Fan O.Effectsof organic carbon sources on cell growth and eicosapentaenoic acid content of *Nannochloropsis* sp.Journal of Applied Phycology. 2004;16(6):499-503.
- 46-Xu N, Zhang X, Fan X, Han L,Zeng C.Effects of nitrogen source and concentration on growth rate and fattyacid composition of *Ellipsoidion* sp.(Eustigmatophyta).Journal of Applied Phycology. 2001;13(6):463-469.
- 47-Hu H,Gao K.Optimization of growth and fatty acid composition of a unicellular marine picoplankton, *Nannochloropsis* sp., with enriched carbon sources.Biotechnology Letters. 2003;25(5):421-425.



## Effect of Culture Media on the Cell Growth, Quantity and Quality of Biomass of *Nannochloropsis Oculata* for Biodiesel Production

Malakootian M (Ph.D)<sup>1</sup> Hatami B (MS.c)<sup>2</sup> Dolatshahi SH (MS.c)<sup>3</sup> Rajabizadeh A (MS.c)<sup>3</sup>

1. Corresponding Author: Professor, Environmental Health Engineering Research Center and Department of Environmental Health, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran
2. MSc in Environmental Health Engineering, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran
3. Instructor, Environmental Health Engineering Research Center and Department of Environmental Health, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran

### Abstract

**Background:** Concerns about energy crisis coupled with climate change and increased global warming is drawing more attention to producing biodiesel from microalgae. Cell growth, biomass production and lipid accumulation in microalgae determine economic performance of biodiesel. The aim of this study was to investigate the role of medium to enhance the efficiency factors.

**Methods:** Microalgae were cultured in four culture media of Walne, F/2, Sato and TMRL. Cell growth was determined by spectrophotometry on a daily basis by measuring the cell density. Biomass production and lipid accumulation of microalgae in the logarithmic growth phase and stationary growth measurements and constituents were identified by gas chromatography. Quality of oil extracted from each culture for biodiesel production was determined by iodine values through standards.

**Results:** The results showed the highest rate of cell growth and biomass production in walne culture media to be  $0.2616 \text{ day}^{-1}$  and  $2.652 \text{ gl}^{-1}$  respectively. Most amount of converting biomass into lipids in TMRL culture media equal to 37.22% of the cell dry weight was obtained. Walne culture media is also the most efficient lipid the productivity of which equaled  $0.1057 \text{ gl}^{-1} \text{ day}^{-1}$  and the highest amount of polyunsaturated fatty acids (PUFA) was obtained in Walne culture media in the logarithmic growth phase and equal to 42.99% of the fatty acids. The highest amount of triacylglyceride was obtained in Sato medium in the stationary growth phase and equal to 75.25% of the fatty acids.

**Conclusion:** *Nannochloropsis Oculata* show maximum efficiency for aquaculture purposes and human consumption and biodiesel production, respectively, in the logarithmic growth phase and stationary growth in Walne medium.

**Keywords:** Microalgae, *Nannochloropsis Oculata*, Biodiesel, Medium, Lipid productivity