فیزیولوژی و بیوتکنولوژی آبزیان
سال سوم، شماره اول، بهار ۱۳۹۴

بررسی محتوای لیپید کل در ریزجلبک سبز *Chlorella* sp. تحت تنش فقدان نیتروژن

فاطمه مرادی[۱]، جنت سرمد[۲]*، حسین غفوری[۲]، اکرم سادات نعیمی[۲]

تاریخ دریافت: بهمن ۹۳ تاریخ پذیرش: اردیبهشت ۹۴

چکیده

لیپید ریزجلبک‌ها به‌عنوان یک ماده اولیه برای تولید سوخت‌زیستی مورد استفاده قرار می‌گیرد. محتوای لیپید به گونه ریزجلبک‌ها و شرایط کشت آن‌ها بستگی دارد. در این پژوهش تغییرات محتوای لیپید کل ریزجلبک سبز *Chlorella* sp. تحت تنش فقدان نیتروژن در مدت زمان ۴، ۸ و ۱۲ روز به منظور تولید سوخت‌زیستی مورد بررسی قرار گرفت. ریزجلبک ابتدا در محیط کشت زایندر مثبت کشت داده شد، سپس در زمان نیمه فاز لگاریتمی رشد، زیست‌توده‌ها برداشت و به محیط کشت زایندر منفی منتقل شدند. محتوای لیپید کل پس از استخراج با محلول کلروفرم/ متانول (به نسبت ۲:۱) بر حسب درصد محاسبه شد. تری‌اسیل‌گلیسرول مورد استفاده در تولید سوخت‌زیستی به طور کیفی توسط کروماتوگرافی لایه‌نازک جداسازی شد. نتایج نشان داد که محتوای لیپید کل تحت تنش فقدان نیتروژن در مدت زمان ۴، ۸ و ۱۲ روز در مقایسه با محتوای لیپید کل شاهد به صورت معنی‌داری افزایش یافت ($P\leq ۰/۰۵$)، که این افزایش به طور میانگین نسبت به شاهد ٪۲۳/۴۶ بود. همچنین با توجه به نتیجه کروماتوگرافی لایه‌نازک، تری‌اسیل‌گلیسرول در ریزجلبک‌های تحت تنش تجمع یافت. بر اساس نتایج این مطالعه، تنش فقدان نیتروژن همراه با گذشت زمان می‌تواند باعث افزایش محتوای لیپید کل ریزجلبک سبز *Chlorella* sp. شود.

واژگان کلیدی: *تری‌اسیل‌گلیسرول، سوخت‌زیستی، لیپید، کروماتوگرافی لایه‌نازک*، Chlorella.

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد فیزیولوژی گیاهی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه گیلان، رشت، ایران.
۲- استادیار گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه گیلان، رشت، ایران.
* نویسنده مسئول: sarmad@guilan.ac.ir

مقدمه

سوخت‌زیستی یک سوخت پاک و تجدیدپذیر است که عاری از هر نوع ترکیب آروماتیک و سولفوری است. در سال‌های اخیر به منظور پایین آوردن هزینه تولید سوخت‌زیستی، مطالعات زیادی در زمینه تولید این سوخت از ریزجلبک‌ها در سراسر جهان انجام گرفته است (Mata et al., 2010). تولید سوخت‌زیستی از ریزجلبک‌ها تحت تأثیر دو عامل میزان زیست‌توده و محتوای لیپید ریزجلبک‌ها قرار دارد (Liang et al., 2009). به طور کلی ریزجلبک‌ها تحت شرایط نامساعد و تنش‌زا، تولید محتوای لیپید را افزایش می‌دهند. بنابراین مطالعه فرآیندهای القای تولید لیپید به منظور افزایش تولید و تجمع محتوای لیپید ارزشمند است (Zhang et al., 2013; Kyu Kang et al., 2014). عنصر نیتروژن در ساخت اسیدهای آمینه، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک نقش اساسی دارد. نیتروژن ماده غذایی مهم موثر بر متابولیسم لیپید و همچنین عامل محدودکننده رشد ریزجلبک‌های یوکاریوتی است (Kalpesh et al., 2012). تحت شرایط نامساعد محیطی و استرس، ریزجلبک‌ها مسیر بیوسنتزی لیپید خود را به سمت تشکیل و تجمع لیپید خنثی (تری‌اسیل‌گلیسرول) تغییر می‌دهند. تری‌اسیل‌گلیسرول نقش ساختاری ندارد و به عنوان منبع ذخیره کربن و انرژی در سلول عمل می‌کند (Miao and Wu, 2006; Hu et al., 2008; Li et al., 2008; Li et al., 2012; Zhang et al., 2013). همچنین تری‌اسیل‌گلیسرول برای تولید سوخت‌زیستی استفاده می‌شود (Chisti, 2007; Kim et al., 2013; Olmstead et al., 2013; Martin et al., 2014).

هدف این پژوهش بررسی تاثیر تنش فقدان نیتروژن بر محتوای لیپید کل ریزجلبک سبز *Chlorella* sp. است که در تولید سوخت‌زیستی به کار می‌رود. همچنین در این راستا روند رشد ریزجلبک در زمان تیماردهی مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

تهیه، کشت اولیه و اعمال شرایط تنش فقدان نیتروژن بر ریزجلبک سبز *Chlorella* sp.

ریزجلبک سبز *Chlorella* sp. از موسسه تحقیقات ماهیان خاویاری واقع در استان گیلان تهیه شد. ابتدا محیط کشت مایع زایندر مثبت (حاوی نیتروژن به صورت نمک نیترات سدیم (Na_2NO_3)) تهیه شد و بعد از تنظیم

pH در محدوده ۶/۸ تا ۷ (با کمک pH متر مدل Cyberscan pH 510 Meter، شرکت Eutech Instruments، ساخت سنگاپور)، محیط کشت توسط اتوکلاو در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد استریل شد. سپس ۳۰ میلی‌لیتر از استوک اولیه ریزجلبک که در فاز لگاریتمی قرار داشت تحت شرایط استریل به محیط کشت اضافه شد و در اتاقک کشت با شرایط پایه ۲±۲۵ درجه سانتی‌گراد و شدت نوری ۲۵۰۰ لوکس با دوره نوری ۱۲ ساعت نور و ۱۲ ساعت تاریکی همراه با هوادهی از طریق پمپ هوا قرار گرفت. پس از این که ریزجلبک‌ها به مرحله نیمه فاز لگاریتمی رشد رسیدند، زیست‌توده آن‌ها از طریق سانتریفیوژ کردن نمونه‌ها در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و در دور ۳۰۰۰ rpm برداشت و با آب مقطر شستشو داده شد، نمونه‌های به دست آمده به درون محیط کشت زایندر منفی (فاقد نیتروژن) تحت همان شرایط اولیه کشت، منتقل شدند و به مدت ۴، ۸ و ۱۲ روز در این محیط رشد کردند (Komarek, 1973; Miller et al., 1978).

سنجش رشد روزانه ریزجلبک برحسب وزن خشک

به منظور بررسی روند رشد ریزجلبک برحسب وزن خشک، هر دو روز یک بار جذب نوری ریزجلبک‌های تحت تنش و شاهد، توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (CamSpec M501 Single Beam UV/Visible، ساخت چین)، در طول موج ۷۵۰ nm اندازه‌گیری شد (محسنی، ۱۳۹۲؛ زمانی، ۱۳۹۳). به منظور محاسبه وزن خشک، ابتدا چهار رقت سریالی (۲۵ mL) از سوسپانسیون ریزجلبک که در فاز ثابت رشد قرار داشت، تهیه شد. جذب چهار رقت در طول موج ۷۵۰ nm قرائت شد. سپس زیست‌توده هر چهار رقت به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴۰-۳۰ درجه سانتی‌گراد در آون، خشک شد. نمودار خطی برحسب وزن خشک (DW) و جذب نوری (OD) رسم شد و بر اساس معادله به دست آمده از منحنی استاندارد رشد، وزن خشک ریزجلبک‌های تحت تنش و شاهد محاسبه شد (Leganes et al., 1987).

استخراج و سنجش لیپید کل ریزجلبک سبز *Chlorella* sp.

استخراج لیپید مطابق با روش Bligh و Dyer (۱۹۵۹) انجام شد. بدین صورت که به ۱ گرم زیست‌توده خشک ریزجلبک ۱۰ mL محلول کلروفرم/ متانول (به نسبت ۲:۱) اضافه شد. نمونه‌ها به مدت ۲ دقیقه در دستگاه شیکر (مدل LS-100، شرکت Labtron، ساخت کره جنوبی) و ۸ دقیقه در دستگاه سونیکاتور (Misonix Sonicator 3000، ساخت آمریکا) قرارداده شدند تا دیواره ضخیم ریزجلبک‌ها کاملاً شکسته شود. نمونه‌ها بعد از اضافه کردن ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر، دوباره ۱۰ دقیقه در دستگاه شیکر قرار داده شدند. سپس به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۳۰۰۰ rpm در دمای اتاق سانتریفیوژ شدند تا دو فاز ایجاد شود. فاز آلی حاوی لیپید جدا شد و به باقیمانده ۵ mL کلروفرم خالص اضافه شد. مانند مرحله قبل مراحل استخراج لیپید تکرار شد. فاز آلی جدا شده در یک ویال که از قبل وزن شده بود (W_1) ریخته شد و در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد در آون (HD، ساخت آلمان) قرار داده شد تا حلال تبخیر شود. پس از آن ویال‌ها دوباره وزن شدند (W_2) و میزان لیپید کل با اختلاف بین وزن اولیه و ثانویه (W_2-W_1) برحسب درصد محاسبه شد (Nigam et al., 2011).

جداسازی تری‌اسیل‌گلیسرول با استفاده از کروماتوگرافی لایه‌نازک

مطالعه کیفی لیپید استخراج شده با تکنیک کروماتوگرافی لایه‌نازک و با استفاده از صفحات Silica Gel 60 F254 (شرکت Merck، ساخت آلمان)، مطابق روش Reiser و Somerville (۱۹۹۷) انجام شد. صفحه سیلیکاژل پس از آماده‌سازی و لکه‌گذاری، در محلول هگزان/دی‌اتیل‌اتر (به نسبت ۷/۵:۲/۵) قرار داده شد تا فاز متحرک ترکیبات لیپیدی روی صفحه سیلیکاژل جدا شود، سپس برای آشکار شدن لکه‌ها از پرتو UV استفاده شد.

تجزیه و تحلیل آماری

کلیه آزمایش‌ها در ۳ تکرار انجام شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها با روش آنالیز واریانس یک‌طرفه[1] و پس‌آزمون دانکن در سطح احتمال $P \leq ۰/۰۵$ با نرم‌افزار SPSS Statistics 17.0 صورت گرفت و رسم نمودارها با نرم‌افزار Microsoft Excel 2010 انجام شد.

1- One-Way ANOVA

نتایج

نمودار رشد روزانه بر حسب وزن خشک

باتوجه به شکل ۱، کلیه ریزجلبک‌های تحت تنش فقدان نیتروژن در زمان‌های ۴، ۸ و ۱۲ روز در مرحله لگاریتمی، دارای رشد کم و شیب بسیار ملایمی بودند و در مدت زمان کوتاه‌تری وارد مرحله ایستایی[1] رشد شدند. در حالی که ریزجلبک‌های شاهد در فاز لگاریتمی، رشد خوبی داشتند و دارای شیب زیاد بودند و در مدت زمان بیش‌تری وارد فاز ایستایی رشد شدند.

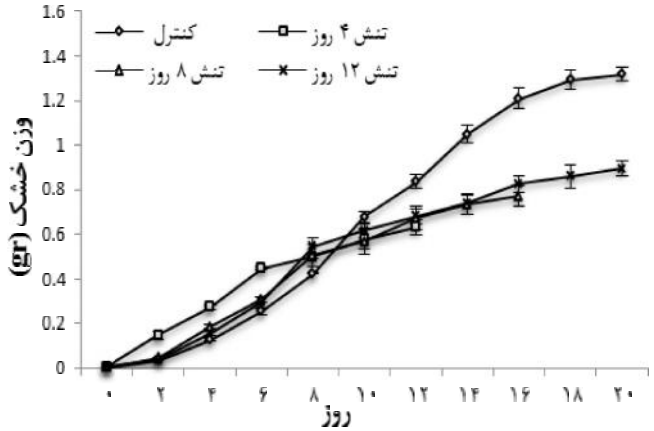
نتایج حاصل از سنجش محتوای لیپید کل

باتوجه به شکل ۲، محتوای لیپید کل در ریزجلبک‌های تحت تنش فقدان نیتروژن در مدت زمان ۸ و ۱۲ روز، نسبت به ریزجلبک‌های موجود در محیط نیتروژن‌دار، به طور معنی‌داری افزایش یافت ($P\leq ۰/۰۵$)، اما در ریزجلبک تحت تنش در مدت زمان ۴ روز اختلاف معناداری مشاهده نشد ($P>۰/۰۵$). با گذشت زمان تنش، محتوای لیپید کل افزایش یافت و بیش‌ترین مقدار در نمونه تحت تنش در زمان ۱۲ روز مشاهده شد. افزایش محتوای لیپید در زمان‌های مختلف به طور میانگین نسبت به شاهد ٪۲۳/۴۶ بود. همچنین بین زمان تنش فقدان نیتروژن و محتوای لیپید کل ریزجلبک سبز *Chlorella* sp. همبستگی مثبتی وجود داشت ($R=۰/۹۹$، $P\leq ۰/۰۵$).

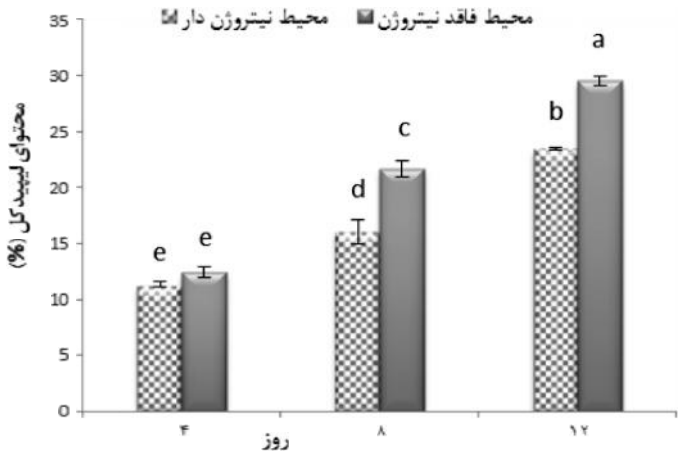
نتایج حاصل از آنالیز کیفی لیپید استخراج شده با استفاده از کروماتوگرافی لایه‌نازک

باتوجه به شکل ۳، در محتوای لیپید ریزجلبک‌های تحت تنش در مدت زمان ۴ روز، تری‌اسیل‌گلیسرول مشاهده نشد. با افزایش زمان تنش تا ۱۲ روز، میزان تجمع تری‌اسیل‌گلیسرول افزایش یافت، به طوری که در مدت زمان ۸ و ۱۲ روز تجمع قابل توجه‌ای از تری‌اسیل‌گلیسرول مشاهده شد. همچنین در محتوای لیپید ریزجلبک‌های موجود در محیط نیتروژن‌دار تری‌اسیل‌گلیسرول مشاهده نشد.

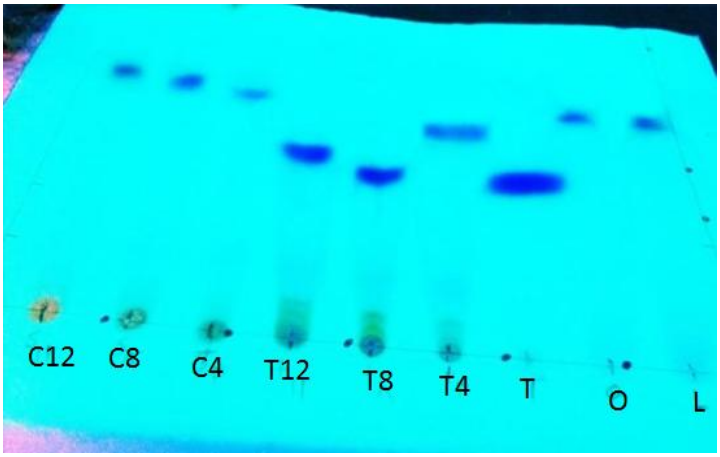
1- Stationary Phase



شکل ۱: منحنی رشد ریزجلبک سبز *Chlorella* sp. بر اساس وزن خشک تحت تنش فقدان نیتروژن در مدت زمان ۴، ۸ و ۱۲ روز، در شرایط پایه اتاقک کشت با دمای ۲± ۲۵ درجه سانتی‌گراد و شدت نوری ۲۵۰۰ لوکس با دوره نوری ۱۲ ساعت نور و ۱۲ ساعت تاریکی در شرایط هوادهی (میانگین ± خطای استاندارد).



شکل ۲: تغییرات محتوای لیپید کل در ریزجلبک سبز *Chlorella* sp. تحت تنش فقدان نیتروژن در مدت زمان ۴، ۸ و ۱۲ روز (میانگین ± خطای استاندارد). حروف متفاوت نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین نمونه‌ها است (P≤۰/۰۵).



شکل ۳: آنالیز کیفی جداسازی تری‌اسیل‌گلیسرول در ریزجلبک سبز *Chlorella* sp. تحت تنش فقدان نیتروژن. T4: تنش به مدت ۴ روز، T8: تنش به مدت ۸ روز، T12: تنش به مدت ۱۲ روز. C4: شاهد در زمان ۴ روز، C8: شاهد در زمان ۸ روز، C12: شاهد در زمان۱۲ روز. L: لینولئیک اسید، O: اولئیک اسید، T: تری‌اسیل‌گلیسرول به عنوان استاندارد.

بحث

تکنیک القای تولید لیپید در ریزجلبک‌ها، به شرایط کشت و سیستم‌های زیستی اعمال شده بستگی دارد (Kalpesh et al., 2012). بنابراین شرایط محیط کشت و ترکیبات آن برای رشد مناسب و رسیدن به بهترین عملکرد تولید لیپید در گونه‌های ریزجلبکی بسیار حائز اهمیت است (Yeh and Chang, 2012).

اثر تنش فقدان نیتروژن بر شاخص رشد

نیتروژن برای فرآیندهای رشد و فتوسنتز مورد نیاز است. نیتروژن بالا در محیط‌کشت سبب افزایش سنتز نشاسته و رشد سلول‌های ریزجلبک می‌شود (Li et al., 2008). طبق نتایج این پژوهش، روند رشد برحسب وزن خشک (شکل ۱) در ریزجلبک‌های *Chlorella* sp. تحت تنش کاهش یافت و در مدت زمان کمتری وارد فاز ایستایی شد. تقسیم سلولی در روزهای اول و پس از حذف نیتروژن از محیط رشد، با استفاده از منابع ذخیره نیتروژن ادامه می‌یابد. نیتروژن عنصر اساسی برای تشکیل پروتئین است، در نتیجه ریزجلبک‌ها با تخریب پروتئین داخل سلولی نیتروژن مورد نیاز برای حفظ عملکردهای متابولیکی خود را تامین

می‌کنند (Spolaore et al., 2006; Gouveia and Oliveira, 2009; Mata et al., 2010). به طور کلی، تنش فقدان نیتروژن سبب کاهش رشد و زیست‌توده در ریزجلبک سبز *Chlorella* sp. شد. Nigam و همکاران (۲۰۱۱)، تاثیر غلظت‌های مختلف نیتروژن را بر رشد ریزجلبک سبز *Chlorella pyrenoidosa* در محیط‌کشت Fogg's بررسی کردند. آن‌ها گزارش دادند که با افزایش غلظت نیتروژن، میزان رشد و زیست‌توده افزایش یافت، اما با کاهش غلظت نیتروژن، رشد و میزان زیست‌توده کاهش پیدا کرد (Nigam et al., 2011). Dhakal و همکاران (۲۰۱۴)، بیان کردند که با کاهش غلظت نیتروژن، در محیط کشت، روند نرخ رشد ریزجلبک *Chlorella vulgaris* کاهش یافت. ترکیان بلداجی و همکاران (۱۳۸۹)، بررسی‌هایی روی ریزجلبک *Chlorella vulgaris* انجام دادند. آن‌ها دریافتند که رشد این ریزجلبک به صورت لگاریتمی بود و بیش‌ترین رشد آن‌ها در روزهای چهارم تا نهم اتفاق افتاد. بعد از آن رشد ریزجلبک به دلیل کاهش مواد غذایی و عدم نفوذ نور کُند شده، بعد از روز دوازدهم شیب خط تقریباً افقی شد و از روز چهاردهم رشد متوقف شد که این امر می‌تواند به دلیل اتمام مواد غذایی و یا کدر شدن در آن باشد. نتایج حاصل از این پژوهش با یافته‌های پژوهشگران مذکور مطابقت دارد.

بررسی تاثیر تنش فقدان نیتروژن بر میزان لیپید کل

غلظت نیتروژن در محیط کشت به عنوان یک عامل موثر بر سنتز لیپید در ریزجلبک‌ها شناخته شده است (Yeh and Chang, 2011; Wan et al., 2013). طبق نتایج این پژوهش، محتوای لیپید کل در ریزجلبک‌های تحت تنش فقدان نیتروژن در مقایسه با محتوای لیپید کل ریزجلبک‌های رشد یافته در حضور نیتروژن به طور معناداری افزایش یافت، که به طور میانگین این افزایش ٪۲۳/۴۶ محتوای لیپید کل نسبت به شاهد بود. همچنین بین زمان تنش فقدان نیتروژن و محتوای لیپید کل ریزجلبک سبز *Chlorella* sp. همبستگی مثبت وجود داشت (R=۰/۹۹، P≤۰/۰۵). Widjaja و همکاران در سال ۲۰۰۹، مطالعه‌ای به‌منظور افزایش تولید لیپید تحت کمبود نیتروژن در ریزجلبک *Chlorella vulgaris* انجام دادند. آن‌ها گزارش کردند که در شرایط کمبود نیتروژن، تجمع بیش‌تری از لیپید در داخل سلول ریزجلبک کلرلا ایجاد

می‌شود (Widjaja et al., 2009). Zhang و همکاران (۲۰۱۳) نیز گزارش دادند که کمبود نیتروژن باعث تجمع لیپید در ریزجلبک سبز *Chlorella sorokiniana* C3 می‌شود. Nigam و همکاران (۲۰۱۱)، تاثیر غلظت‌های مختلف نیتروژن بر محتوای لیپید کل ریزجلبک سبز *Chlorella pyrenoidosa* در محیط کشت Fogg's را بررسی کردند. آن‌ها دریافتند که با کاهش میزان غلظت نیتروژن میزان رشد کاهش، ولی میزان لیپید کل افزایش یافت. شواهد به دست آمده در این پژوهش با گزارش‌های این پژوهشگران مطابقت داشت.

تجزیه و تحلیل کیفی لیپید استخراج شده توسط کروماتوگرافی لایه نازک

با توجه به شکل ۳، در ریزجلبک سبز *Chlorella* sp. با گذشت زمان تنش، مقدار قابل توجهی تری‌اسیل‌گلیسرول تجمع یافت. Zhang و همکاران (۲۰۱۳) مطالعه‌ای را به منظور بررسی اثر کمبود نیتروژن بر تولید لیپید کل در ریزجلبک سبز *Chlorella sorokiniana* C3 انجام دادند. آن‌ها گزارش کردند که تحت تنش کمبود نیتروژن، لیپید خنثی (تری‌اسیل‌گلیسرول) تجمع یافت. در مقابل تحت شرایط حضور نیتروژن، اثری از تری‌اسیل‌گلیسرول مشاهده نشد یا اندک بود (Zhang et al., 2013). نتایج بررسی حاضر نیز مطابق این گزارش بر افزایش مقدار تری‌اسیل‌گلیسرول در محیط رشد فاقد نیتروژن، تاکید دارد.

بر اساس این مطالعه، تنش فقدان نیتروژن منجر به تجمع لیپید کل، عمدتاً به شکل تری‌اسیل‌گلیسرول، در ریزجلبک سبز *Chlorella* sp. شد که می‌تواند به عنوان ماده اولیه در تولید سوخت‌زیستی مورد استفاده قرار گیرد. همچنین با افزایش زمان تنش، میزان تجمع لیپید کل افزایش پیدا کرد، به طوری که بیش‌ترین مقدار لیپید کل در ریزجلبک تحت تنش در زمان ۱۲ روز مشاهده شد و در مقابل میزان رشد و زیست‌توده ریزجلبک کاهش یافت. تولید لیپید از ریزجلبک، درحال‌حاضر به‌دلیل هزینه‌های بالای کشت، برداشت و پردازش زیست‌توده ریزجلبکی اقتصادی نیست. برای غلبه براین محدودیت، انتخاب گونه جلبکی مناسب و امکان تولید بالا شرط اول و ضروری است.

منابع

ترکیان بلداجی م.، نجفی ب. و حجازی م.ا. ۱۳۸۹. تولید بیودیزل از ریزجلبک *Chlorella vulgaris* و تعیین برخی از خواص فیزیکی و شیمیایی آن. مجله علوم پایه دانشگاه آزاد اسلامی، ۲۰(۷۸/۱): ۱۱۰-۹۹.

زمانی م. ۱۳۹۳. مقایسه اثر کادمیم بر جلبک سبز *Chlorella* sp. و سیانوباکتری *Anabaena* sp. پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه گیلان. ۱۰۴ص.

محسنی ن. ۱۳۹۲. بررسی میزان جذب زیستی و اثرات فیزیولوژیک فلز سنگین سرب در جلبک سبز کلرلا. پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه گیلان. ۸۸ص.

Bligh E.G. and Dyer W.J. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. Canadian Journal of Biochemistry Physiology, 37: 911–917.

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

Dhakal N., Lama S., Shrestha A., Timilsina P.M. and Karki T.B. 2014. Comparative study of microalgae samples from Nepal for bio-fuel potentials. Journal of Algal Biomass Utilization, 5(2): 74–81.

Gouveia L. and Oliveira A.C. 2009. Microalgae as a raw material for biofuels efficiency microalgae for biodiesel production. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 36(2): 269–274.

Hu Q., Sommerfeld M., Jarvis E., Ghirardi M., Posewitz M., Seibert M. and Darzins A. 2008. Microalgal triacyglycerols as feedstocks for biofuel production: Perspectives and advances. Plant Journal, 54: 621–639.

Kalpesh K., Sharma K.K., Schuhmann H. and Schenk P.M. 2012. High lipid induction in microalgae for biodiesel production. Journal of Energies, 5: 1532–1553.

Kim S., Kim H., Ko D., Yamaoka Y. and Otsuru M. 2013. Rapid induction of lipid droplets in *Chlamydomonas reinhardtii* and *Chlorella vulgaris* by Brefeldin A. Public Library of Science, 8(12): 1–12 (e81978).

Komarek J. 1973. Culture collections. P: 519–524. In: Carr N.G. and Whitton B.A. (Eds.). The biology of blue-green algae. Blackwell Scientific publication, USA.

Kyu Kang N., Lee B. and Choi G. 2014. Enhancing lipid productivity of *Chlorella vulgaris* using oxidative stress by TiO_2

nanoparticles. Korean Journal of Chemical Engineering, 5: 861-867.

Leganes F., Sanchez Maeso E. and Valiente E.F. 1987. Effect of indoleacetic acid on growth and dinitrogen fixation in cyanobacteria. Journal of Plant Cell Physiology, 28: 529–533.

Li Y., Fei X. and Deng X. 2012. Novel molecular insights into nitrogen starvationinduced triacylglycerols accumulation revealed by differential gene expression analysis in green algae *Micractinium pusillum*. Journal of Biomass and Bioenergy, 42: 199–211.

Li Y., Horsman M., Wang B., Wu N. and Lan C. 2008. Effects of nitrogen sources on cell growth and lipid accumulation of green alga *Neochloris oleoabundans*. Journal of Applied Microbiology and Biotechnology, 81(4): 629–636.

Liang Y.N., Sarkany N. and Cui Y. 2009. Biomass and lipid productivities of *Chlorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions. Journal of Biotechnol, 31: 1043–1049.

Martin G., Hill D., Olmstead I., Bergamin A. and Shears M. 2014. Lipid profile remodeling in response to nitrogen deprivation in the microalgae *Chlorella* sp. (Trebouxiophyceae) and *Nannochloropsis* sp. (Eustigmatophyceae). Public Library of Science, 9(8): 1-10(e103389).

Mata T.M., Martins A.A. and Caetano N.S. 2010. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. Journal of Renew Sustain Energy, 14: 217–232.

Miao X. and Wu Q. 2006. Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil. Journal of Bioresource Technol, 97: 841–846.

Miller D.E., Green J.C. and Shiroyama T. 1978. The *Selenustrum capricornatum* Printz algal assay bottle test: Experimental design, application and interperation protocol. Corvallis Environmetal Research Laboratory, Office of Research and Development, U.S. Environmental Protection Agency, Corvallis, Oregon, 97330. 126P.

Nigam S., Prakash R. and Sharma R. 2011. Effect of nitrogen on growth and lipid content of *Chlorella pyrenoidosa*. American Journal of Biochemistry and Biotechnology, 3: 124–129.

Olmstead I., Kentish S., Scales P. and Martin G. 2013. Low solvent, low temperature method for extracting biodiesel lipids from concentrated microalgal biomass.

Journal of Bioresource Technology, 148: 615–619.

Reiser S. and Somerville C. 1997. Isolation of mutants of *Acinetobacter calcoaceticus* deficient in wax ester synthesis and complementation of one mutation with a gene encoding a fatty acyl coenzyme A reductase. Journal of Bacteriology, 179(9): 2969–2975.

Spolaore P., Joannis-Cassan C., Duran E. and Isambert A. 2006. Commercial applications of microalgae. Journal of Bioscience and Bioengineering, 101: 87–96.

Wan C., Bai F.W. and Zhao X.Q. 2013. Effects of nitrogen concentration and media replacement on cell growth and lipid production of oleaginous marine microalga *Nannochloropsis oceanica* DUT01. Journal of Biochemical Engineering, 78: 32–38.

Widjaja A., Chien C.C. and Ju Y.H. 2009. Study of increasing lipid production from fresh water microalgae *Chlorella vulgaris*. Journal of the taiwan institute of chemical engineers 40(1): 13–20.

Yeh K.L. and Chang J.S. 2011. Nitrogen starvation strategies and photobioreactor design for enhancing lipid content and lipid production of a newly isolated microalga *Chlorella vulgaris* implications for biofuels. Journal of Biotechnology, 31: 146–155.

Yeh K.L. and Chang J.S. 2012. Effects of cultivation conditions and media composition on cell growth and lipid productivity of indigenous microalga *Chlorella vulgaris* ESP-31. Journal of Bioresource Technology, 105 :120–127.

Zhang Y.M., Chen H., He C.L. and Wang Q. 2013. Nitrogen starvation induced oxidative stress in an oil-producing green alga *Chlorella sorokiniana* C3. Public Library of Science, 8(7): 1–12 (e69225).

Aquatic Physiologyand Biotechnology
Vol. 3, No. 1, Spring 2015

Total lipids content in the green microalgae of *Chlorella* sp. under nitrogen starvation stress

Fatemeh Moradi[1], Jannat Sarmad[2]*, Hossein Ghafoori[2], Akram Sadat Naeemi[2]

Received: February 2015 Accepted: April 2015

Abstract

Microalgae lipid is used as a feedstock for biodiesel production. Lipid content is correlated with the microalgae species and growth conditions. In this study, variations in total lipid content in the green microalgae of *Chlorella* sp. under nitrogen starvation stress after 4, 8 and 12 days was examined. Microalgae were cultured in the Zinder-8+N medium. When they reached the semi-logarithmic growth phase, biomass was harvested and transferred to Zinder-8-N medium. The total lipid content was calculated after extraction with a solution of chloroform/methanol (2:1). Triacylglycerol which is used in biodiesel production separated qualitatively using thin layer chromatography. The results showed that the total lipid content under stress condition after 4, 8 and 12 days increased significantly compared to control ($P \leq 0.05$), in average 23.46% more than the control. Also, according to the result of thin layer chromatography, triacylglycerol concentration increased in the microalgae under the stress. In general, nitrogen starvation stress led to increased total lipid content in the green microalgae of *Chlorella* sp.

Key words: *Triacylglycerol, Biodiesel, Lipid, Thin Layer Chromatography,* Chlorella.

1- M.Sc. Student of Plant Physiology, Department of Biology, Faculty of Science, University of Guilan, Rasht, Iran.
2- Assistant Professor in Department of Biology, Faculty of Science, University of Guilan, Rasht, Iran.
*Corresponding Author: sarmad@guilan.ac.ir