

## بررسی اثر دماهای مختلف بر خصوصیات فیزیولوژیکی سیانوباکتری *Synechococcus elongatus* به‌عنوان کاندید تولید بیودیزل

الهه کیائی<sup>۱\*</sup>، ندا سلطانی<sup>۲</sup>، مهناز مظاهری اسدی<sup>۳</sup>، رمضانعلی خاوری‌نژاد<sup>۴</sup>، مهروز دزفولیان<sup>۵</sup>

<sup>۱</sup>دکتری، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، گروه زیست‌شناسی، تهران  
<sup>۲</sup>دانشیار، پژوهشکده علوم پایه کاربردی جهاد دانشگاهی، گروه میکروبیولوژی نفت، تهران  
<sup>۳</sup>دانشیار، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی، گروه بیوتکنولوژی، تهران  
<sup>۴</sup>استاد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، گروه زیست‌شناسی، تهران  
<sup>۵</sup>استادیار، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرج، گروه میکروبیولوژی، کرج

تاریخ دریافت: ۹۲/۸/۱ تاریخ پذیرش: ۹۳/۳/۲۰

### چکیده

یکی از منابع بیولوژیک برای تولید بیودیزل سیانوباکتری‌ها می‌باشند. هدف از این تحقیق مطالعه اثر دما در میزان بقا، رنگیزه‌های فتوسنتزی، محتوای و کیفیت چربی *Synechococcus elongatus* به‌عنوان مواد خام برای تولید بیودیزل بود. در این تحقیق نمونه‌برداری از جزیره خارک انجام شد. بعد از خالص سازی، نمونه در محیط کشت BG11 در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد تحت نور دائمی و pH ۷ نگهداری شدند. شناسایی نمونه با تهیه اسلایدهای نیمه دائمی، کلیدهای شناسایی موجود و روش‌های مولکولی انجام شد. سپس نرخ رشد، میزان رنگیزه کلروفیل، فیکوبیلی پروتئین و میزان فتوسنتز نمونه‌ها، تحت تیمار دماهای ۲۰، ۲۵، ۳۰، ۳۵ و ۴۰ درجه سانتی‌گراد با غلظت‌های ۰/۲۵ درصد  $\text{NaNO}_3$  و pH ۹ اندازه‌گیری شدند. میزان کل اسیدهای چرب با روش گراویمتری محاسبه گردید. پروفایل اسیدهای آمینه با کمک دستگاه HPLC و پروفایل اسیدهای چرب با استفاده از GC سنجیده شد. بررسی اثر فاکتور دما بر روی این سیانوباکتری نشان داد که بهترین شرایط رشد، تولید رنگیزه، اسید چرب و اسید آمینه در غلظت ۰/۲۵ درصد  $\text{NaNO}_3$  و pH ۹ در روز ۱۵ انکوباسیون و دمای ۳۵°C بود. در این شرایط میزان پالمیتیک اسید (۴۲/۷۴ درصد)، استتاریک اسید (۲۹/۵۶ درصد)، پالمیتوئیک اسید (۱۰/۲ درصد)، اولئیک اسید (۶/۷۲ درصد)، لینولئیک اسید (۱/۷۲ درصد)،  $\alpha$ -لینولئیک اسید (۱/۶۳۶ درصد) بود. در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد اسیدهای آمینه آلانین، فنیل آلانین، گلوتامیک اسید، گلوتامین، گلیسین و ایزولوسین بیشترین میزان را به خود اختصاص دادند. نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که *Synechococcus elongatus* در شرایط استرس محیطی قادر است میزان تولید لیپید خود را افزایش دهد.

واژه‌های کلیدی: بیودیزل، تغییرات دمایی، سیانوباکتری، محتوای لیپید.

### مقدمه

تا دانشمندان درصدد تولید سوختی تجدیدپذیر و جایگزین سوخت‌های فسیلی باشند. تولید انرژی پایدار از سیانوباکتری‌ها یا چربی جلبک‌ها می‌تواند راه حل بلند مدتی برای جایگزینی سوخت‌های فسیلی و

گرم شدن تدریجی زمین به‌دلیل استفاده بی‌رویه از سوخت‌های فسیلی، افزایش قیمت، آلودگی‌های زیست محیطی و تولید گازهای گلخانه‌ای سبب شده

\*نویسنده مسئول: elahe\_kiaei81@yahoo.com

چرب غیراشباع و عدم تعادل در غشاء و فرآیندهای غشایی ایجاد می‌گردد ( Enami et al., 1994; Gombos et al., 1992).

از سوی دیگر، در دمای پایین، تغییر غشاء تیلاکوئید از حالت بلور مایع تا ساختار ژل مانند باعث آسیب به دستگاه فتوسنتز می‌گردد. تغییرات دما به علت تغییر در نفوذپذیری و سیالیت غشاء ممکن است به سلول صدمه وارد نماید (Chapman, 1975) تغییر در میزان اسیدهای چرب غیراشباع در سیانوباکتری‌ها یکی از پاسخ‌های مهم به تنش دما می‌باشد (Gombos et al., 1995; Murata and Wada, 1995).

گزارش شده سیانوباکتری‌ها در شرایط استرس دمایی با اضافه یا حذف کردن پیوندهای دوگانه در زنجیره‌های هیدروکربنی تغییر در سیالیت غشا و انتقال مواد را جبران می‌کنند (Chapman, 1975).

به‌عنوان مثال، افزایش پیوند دوگانه زمانی که سیانوباکتری‌ها در دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد قرار می‌گیرند گزارش شده است (Wada et al., 1994). به‌علاوه، سیانوباکتری‌ها فرآیندهای انتقال غشایی، خواص نفوذپذیری، فعالیت آنزیم‌های متصل به غشاء و مکانیسم‌های سیگنالینگ را در پاسخ به تغییرات دمایی تغییر می‌دهند. تغییرات ناشی از درجه حرارت، در تولید زیست توده سیانوباکتری‌ها و همچنین کیفیت و کمیت چربی‌ها برای تولید سوخت‌های زیستی در مقیاس وسیع بسیار مهم می‌باشد (Fabregas et al., 2004).

امکان بهره‌برداری اقتصادی از سوخت‌های زیستی ارتباط مستقیم با نرخ تولید زیست توده و چربی دارد. ویژگی‌های مهم چربی مانند طول زنجیره و وجود پیوند دوگانه در کیفیت محصول و بدنبال آن عملکرد موتور، چگونگی احتراق و انتشار گاز تاثیرگذار است (Benjumea et al., 2011).

نگرانی افزایش گرما کره زمین ارائه نماید (Ragauskas et al., 2006; Rittmann, 2008).

در میان میکروارگانیزم‌های مختلف، سیانوباکتری‌ها پتانسیل بالایی برای تولید زیست توده در مقیاس وسیع با توجه به سرعت نرخ رشد، محتوای چربی بالا، توانایی تغییر ژنتیکی و مقاومت نسبت به طیف گسترده‌ای از شرایط محیطی دارند (Angermayr et al., 2009; Ogawa and Kaplan, 2000; Ohkawa et al., 2003).

با این وجود، کشت در مقیاس وسیع در فضای باز تحت تاثیر دما و شدت نور خورشید می‌باشد. به‌طور خاص، نرخ رشد زیست توده و کمیت و کیفیت چربی‌های آن را می‌توان با تغییر شرایط تحت تاثیر قرار داد (Wada et al., 1994). میزان تابش نور، درجه حرارت محیط، pH محیط کشت، غلظت مواد معدنی و میزان مواد مغذی از مهمترین عوامل موثر بر رشد سیانو باکتری‌ها هستند (Kim et al., 2010).

دما، به ویژه، در یکپارچگی غشاء تیلاکوئید و کیفیت و کمیت اسیدهای چرب متصل به ستون فقرات گلیسرول چربی‌های غشاء و فرآیندهای غشایی تاثیر می‌گذارد (Murata, 1989). به‌طور معمول، اثر درجه حرارت بر رشد سیانوباکتری‌ها به فعالیت فتوسیستم II مرتبط می‌باشد. بسیاری از عوامل محدودکننده سرعت فتوسنتز از جمله حامل الکترون، پلاستوکینون و مولکول‌های چربی مربوط به آن به شدت به دما حساس می‌باشند (Bjorkman, 1980; Hirano et al., 1981; Wada and Murata, 1990; Berry and Santoli, 1980). در درجه حرارت بالاتر از ۴۰ درجه سانتی‌گراد اغلب مهار فعالیت مرکز واکنش فتوسیستم II و غیرفعال کردن قابلیت تصاعد اکسیژن از PS II (یعنی، تفکیک یون  $Mn^{2+}$  از مرکز فتوکاتالستی) مشاهده می‌شود، که منجر به تولید بیش از حد انواع رادیکال اکسیژن و بدنبال آن پراکسیداسیون اسیدهای

به منظور شناسایی مولکولی نمونه مورد نظر، ابتدا DNA از نمونه تازه با استفاده از کیت استخراج DNA ژنومی شرکت فرمتاز (K0512) استخراج شد (Nübel et al., 2000). تکثیر ژن 16S rRNA به وسیله PCR در نمونه ذکر شده برای اولین بار و با استفاده از دو گروه پرایمر رفتی (5'-AGA GTT TGA TCC PA (5'-AAG GAG TGG CTC AG-3') و برگشتی (GTG ATC CAG CCG CA-3') صورت گرفت. برای نشان دادن DNA از ژل الکتروفورز افقی ژل آگارز ۱/۲ درصد حاوی رنگ DNA safe stain الکتروفورز گردید و نتیجه الکتروفورز با استفاده از دستگاه Gel Documentation مورد عکسبرداری قرار گرفت. محصول PCR جهت تعیین توالی به شرکت ژن فناوری ارسال گردید. پس از تعیین توالی ژنی ناحیه مورد نظر، توالی ژنی حاصل با انجام عملیات BLAST با توالی ژن‌های ثبت شده در بانک‌های جهانی ژن مقایسه و درصد تشابه ژنی نمونه مورد نظر با نمونه‌های موجود در بانک ژن تعیین گردید.

برای تعیین میزان کل اسیدهای چرب، استخراج لیپید با استفاده از روش (Bligh and Dyer, 1995) انجام گرفت. به منظور بررسی پروفایل اسید چرب، ۰/۲۵ گرم ماده خشک را داخل ویال ۲ میلی لیتر ریخته و به آن ۵۰۰ ماکرولیتر از محلول متانول اسیدی اضافه شد. سپس در ویال‌ها را با پارافیلیم به دقت پوشانده تا از تبخیر متانول جلوگیری گردد. ویال‌ها به مدت ۲۰ ثانیه ورتکس شد، به مدت ۲ ساعت در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد و دور rpm ۷۵۰ داخل ترموسیکلر و سپس ۵ دقیقه در دمای اتاق سرد شد. در مرحله بعد ۳۰۰ ماکرولیتر از محلول سدیم کلراید ۰/۹ درصد و ۱۵۰ ماکرولیتر هگزان اضافه و به مدت ۲۰ ثانیه ورتکس شدند. ۵ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد دور rpm ۳۰۰۰ سانتریفیوژ کرده تا دو فاز تشکیل گردد. از فاز رویی هگزان یک ماکرولیتر به

به‌طورکلی، چربی‌های غیراشباع برای مواد اولیه سوخت مناسب نیستند (Canakci, 2007). این مطالعه با هدف بررسی میزان تولید زیست توده، رنگیزه‌های فتوسنتزی، کیفیت و کمیت تولید لیپید و اسیدهای آمینه سیانوباکتری *Synechococcus elongatus* در پاسخ به تغییرات دمایی انجام گرفت.

## مواد و روش‌ها

سیانوباکتری *Synechococcus elongatus* از سواحل جزیره خارک و جوامع اپی‌لیتیک موجود در این سواحل جمع‌آوری و بعد از انتقال به آزمایشگاه بر روی محیط‌های کشت جامد کشت داده شد. پس از پاساژهای متوالی کلنی‌های خاص مربوط به نمونه جداسازی شده و بر روی پلیت‌های مجزا قرار داده شدند (Andersen, 2005). سپس نمونه‌ها به محیط کشت تخصصی مایع BG11 منتقل شدند. به منظور تیماردهی، بعد از کشت نمونه در محیط BG11 با غلظت ۰/۲۵ نیتروژن و pH 9، نمونه‌ها در داخل دستگاه ژرمیناتور در دماهای مختلف (۲۰، ۲۵، ۳۰، ۳۵ و ۴۰ درجه سانتی‌گراد) قرار گرفتند. نور مورد نظر نور سفید ناشی از لامپ‌های فلورسنت بود.

نرخ رشد طبق روش Soltani و همکاران (۲۰۰۶) اندازه‌گیری شد. برای تعیین غلظت کلروفیل، کلروفیل سلول‌ها با متانول خالص استخراج شده و بعد از ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، توسط روش طیف‌سنجی در طول موج ۶۶۵ nm اندازه‌گیری شدند (Marker, 1972). فیکوبیلی‌پروتئین‌ها بعد از شوک اسمزی استخراج شده و به روش طیف‌سنجی در فاز لگاریتمی در طول موج‌های ۷۵۰، ۶۵۲، ۶۱۵ و ۵۶۲ نانومتر اندازه‌گیری شدند (Bermejo et al., 2002). به منظور اندازه‌گیری فتوسنتز از دستگاه Oxyview استفاده شد.

آنالیزهای آماری بر اساس سه تکرار در هر آزمون و آنالیز واریانس یکطرفه ANOVA و طرح Tukey انجام گرفت.

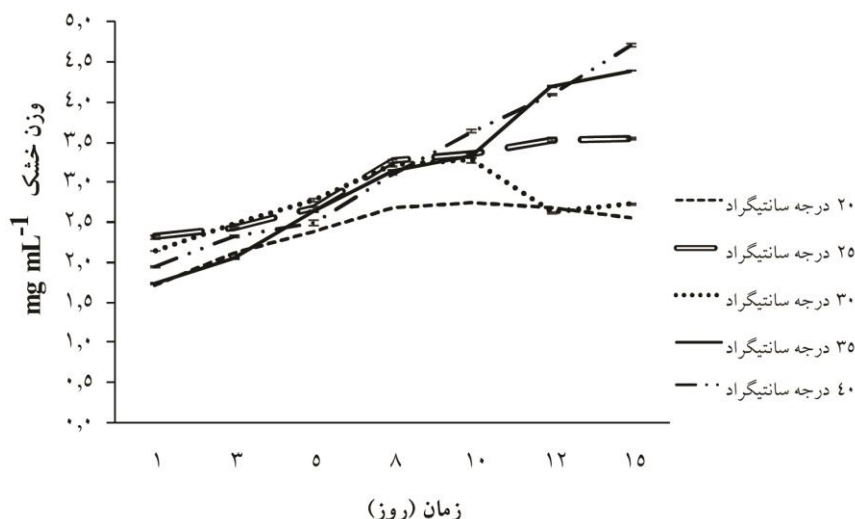
### نتایج

تکنیک‌های مولکولی نیز برای شناسایی سویه *Synechococcus elongatus* استفاده شد. آنالیزهای فیلوژنتیک بر اساس توالی ژن 16S rRNA برای سویه *Synechococcus elongatus* انجام شد. توالی‌ها با نماینده‌ای از سیانوباکتری‌های تک سلولی موجود در GenBank مقایسه شد (NCBI). توالی‌های 16S rRNA با گونه‌های *Synechococcus* موجود در پایگاه داده‌ها ترکیب شدند. در توالی‌های ژن 16S rRNA 97 درصد شباهت به *Synechococcus* مشاهده شد. توالی‌های نوکلئوتیدی شرح داده شده در این بررسی به NCBI تحت شماره الحاقی KF724939 ارائه شد. در این پژوهش به منظور بررسی میزان رشد سیانوباکتری در دماهای مختلف از اندازه‌گیری وزن خشک استفاده شده است. شکل ۱ مقایسه وزن خشک سیانوباکتری *Synechococcus elongatus* در تیمار دماهای مختلف را نشان می‌دهد. پایین‌ترین میزان رشد در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد مشاهده شد. در این دما از روز ۱۰ میزان رشد کاهش یافت. با افزایش دما میزان رشد افزایش یافته به طوری که در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد در پایان روز ۱۵ منحنی روند صعودی خود را طی می‌نماید و به بیشترین میزان رشد  $4.706 \text{ mg mL}^{-1}$  رسید. رشد در ۲۵ و ۳۵ درجه سانتی‌گراد نیز تا روز ۱۵ پس از تلقیح روند صعودی خود را طی نمود، اما در ۳۰ درجه سانتی‌گراد از روز ۱۰ به بعد میزان رشد کاهش یافت.

دستگاه گاز کروماتوگرافی (ساخت کمپانی Varian مدل ۴۰۰۰) با دتکتور FID و ستون CBP1-M25-025 تزریق شد (Lu et al., 2011).

اندازه‌گیری اسیدهای آمینه توسط دستگاه HPLC انجام شد. مقدار ۰/۰۵ گرم ماده خشک فریز درایر شده درون ویال ۱/۵ میلی‌لیتری در پیچ‌دار منتقل شد. بر روی نمونه ۱ میلی‌لیتر اتانول ۸۰ درصد ریخته شد. ویال‌های حاوی نمونه در بن‌ماری شیکردار ۸۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ ساعت قرار گرفت و بعد به مدت ۵ دقیقه در دور ۱۴۰۰۰ g و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شدند. سوپرناتانت به ویال‌های ۲ میلی‌لیتری منتقل شد. به کمک پارافیلیم دهانه ویال را مسدود و چند سوراخ ریز به کمک سوزن ته‌گرد در پارافیلیم ایجاد شد. نمونه‌ها در دستگاه فریزدرایر تا تبخیر کامل محلول موجود در ویال‌ها قرار گرفتند. درون ویال خارج شده از دستگاه فریز درایر ۱ میلی-لیتر آب مقطر دیونیزه ریخته، در ویال را بسته و ورتکس شدند. این محلول به کمک فیلتر ۰/۴۵ میکرومتر صاف شد. درون ویال ۲ میلی‌لیتری جدید ۲۵۰ میکرولیتر از محلول صاف شده، ۲۰۰ میکرولیتر بافر بورات و در نهایت ۱۰۰ میکرولیتر OPA (Phthaldialdehyde) و مقدار ۵۰ میکرولیتر HCl ۰/۵ مولار افزوده شد. ستون HALO C18، دتکتور فلئورسانس (طول موج Excitation: ۳۳۰ نانومتر، طول موج Emission: ۴۵۰ نانومتر)، شدت جریان 1.1 mL/min استفاده گردید (Jones et al., 2012).

اطلاعات بدست آمده توسط نرم‌افزارهایی مانند Excel، SPSS 17 برای تجزیه و تحلیل نتایج فیزیولوژیکی و پایگاه اطلاعاتی NCBI برای تجزیه و تحلیل نتایج مولکولی مورد استفاده قرار گرفت.



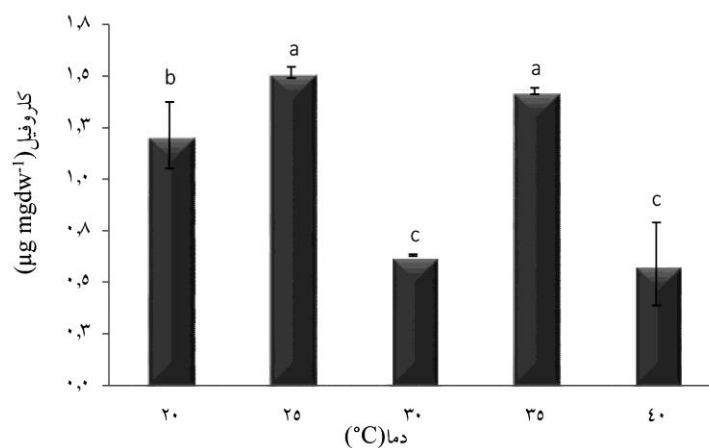
شکل ۱: مقایسه وزن خشک سیانوباکتری *Synechococcus elongatus* در تیمار دماهای مختلف

درجه سانتی‌گراد میزان لیپید نیز افزایش نشان داد. میزان رشد، زمان تقسیم و میزان لیپید در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد کاهش نشان داد.

همانطور که در جدول ۱ مشاهده می‌گردد با افزایش دما میزان تکثیر افزایش یافته و زمان تقسیم سلولی کاهش می‌یابد، به طوری‌که در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد زمان تقسیم ۶/۰۵ ساعت محاسبه گردید. در دمای ۳۵

جدول ۱: کینتیک رشد و میزان تولید لیپید در دماهای مختلف در سیانوباکتری *Synechococcus elongatus*

دما (درجه سانتی‌گراد)	۲۰	۲۵	۳۰	۳۵	۴۰
ثابت ویژه رشد ( $d^{-1}$ )	۰/۰۱۱	۰/۱۰۱	۰/۰۷۴	۰/۱۱۴	۰/۰۷۷
زمان مضاعف شدن (h)	۵۸/۵۸۳	۶/۸۶۱	۹/۲۵۰	۶/۰۵۶	۸/۹۲۶
میزان لیپید (% dw)	۱۰/۱۶۷	۱۱/۹۹۶	۲۲/۲۰۲	۳۴/۷۱۰	۲۰/۴۶۵



شکل ۲: منحنی مقادیر کلروفیل سیانوباکتری *Synechococcus elongatus* در تیمار دما

می‌دهد. بیشترین میزان کلروفیل با میزان  $1/549 \mu g mgdw^{-1}$  در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد مشاهده شده

شکل ۲ مقادیر کلروفیل سیانوباکتری *Synechococcus elongatus* در تیمار دما نشان

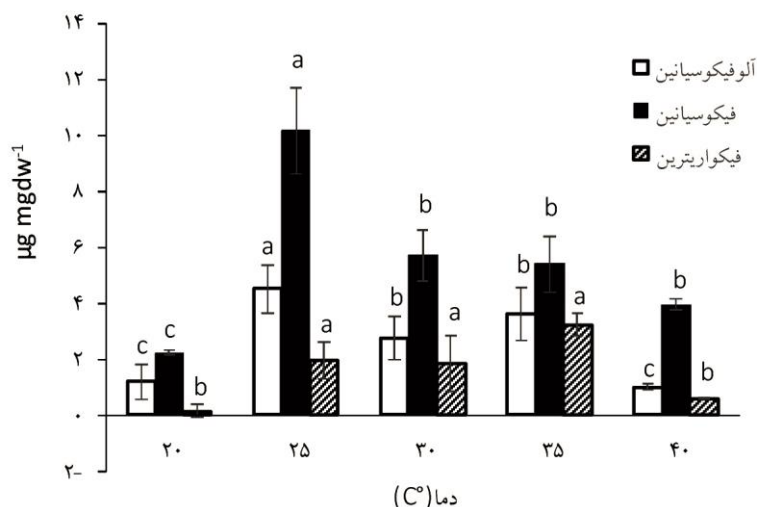
بین تیمارها اختلاف معنی داری وجود داشت ( $P < 0/05$ ).

میزان رنگیزه فیکوسیانین در دمای  $25^{\circ}\text{C}$   $14/539 \text{ mgdw}^{-1}$  بود. با توجه به آنالیز آماری بین میزان رنگیزه فیکوسیانین در دمای  $25^{\circ}\text{C}$  درجه سانتی گراد با سایر دماها اختلاف معنی داری وجود داشت. اختلاف معنی داری در دماهای  $30$ ،  $35$  و  $40$  درجه سانتی گراد مشاهده نشد ( $P < 0/05$ ).

میزان رنگیزه فیکواریترین در دمای  $25^{\circ}\text{C}$   $3/647 \text{ mgdw}^{-1}$  بود. کمترین میزان در دماهای  $20$  و  $40$  درجه سانتی گراد به ترتیب به میزان  $0/149$  و  $0/505$  رسید. با توجه به آنالیز آماری بین دماهای  $25$ ،  $30$  و  $35$  درجه سانتی گراد اختلاف معنی داری وجود نداشت ( $P < 0/05$ ).

است. کمترین میزان کلروفیل در دمای  $30$  و  $40$  درجه سانتی گراد، به ترتیب  $0/630$  و  $0/588 \text{ mgdw}^{-1}$  بود. با توجه به نتایج آنالیز آماری اختلاف معنی داری بین مقدار کلروفیل نمونه در دماهای  $25$  و  $35$  درجه سانتی گراد مشاهده نشد ( $P < 0/05$ ).

شکل ۳ مقادیر رنگیزه آلفیکوسیانین، فیکوسیانین و فیکواریترین سیانوباکتری *Synechococcus elongatus* در تیمار دما نشان می دهد. میزان رنگیزه آلفیکوسیانین در دمای  $25^{\circ}\text{C}$   $5/079 \text{ mgdw}^{-1}$  بود. با افزایش دما میزان رنگیزه آلفیکوسیانین کاهش یافت و در دمای  $40$  درجه سانتی گراد به  $0/862 \text{ mgdw}^{-1}$  رسید. میزان رنگیزه آلفیکوسیانین در دمای  $20$  درجه سانتی گراد کاهش داشت و به میزان  $1/405 \text{ mgdw}^{-1}$  محاسبه شد. با توجه به آنالیز آماری



شکل ۳: منحنی مقادیر رنگیزه‌های فتوسنتزی سیانوباکتری *Synechococcus elongatus* در تیمار دما

فیکوبیلی زوم در سیانوباکتری *Synechococcus elongatus* افزایش داشت. در ارتباط بین I photosystem II و photosystem I در دو دمای  $25$  و  $30$  درجه سانتی گراد تقریباً نتایج مشابهی بدست آمد.

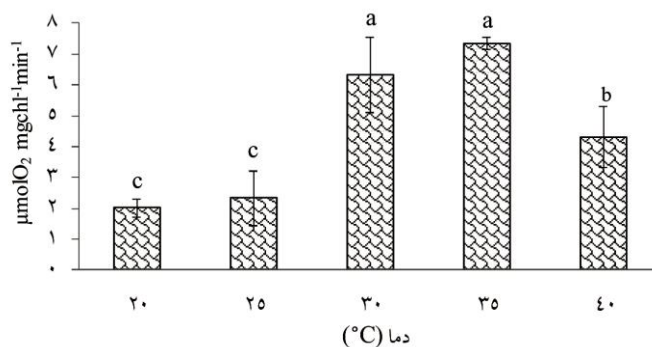
میزان کل فیکوبیلی پروتئین‌ها در  $25^{\circ}\text{C}$   $22/415 \text{ gmgdw}^{-1}$  ارزیابی گردید. اندازه فیکوبیلی photosystem II و photosystem I در رابطه بین در جدول ۲ نشان داده شده است. در دمای  $25$  و  $40$  درجه سانتی گراد اندازه بخش میله‌ای به بخش مرکزی

جدول ۲: اندازه فیکوبیلی زوم و PS II/PS I سیانوباکتری *Synechococcus elongatus* در تیمار دما

دما (°C)	PS II/PS I	اندازه فیکوبیلی زوم
۲۰	۲/۵۳۴±۰/۵۲ <sup>d</sup>	۱/۱۶۳±۰/۱۷ <sup>d</sup>
۲۵	۱۴/۷۳۹±۲/۳۳ <sup>a</sup>	۳/۴۲۱±۰/۱۵ <sup>b</sup>
۳۰	۱۵/۸۹۴±۱/۵۹ <sup>a</sup>	۱/۵۳۷±۰/۲۷ <sup>d</sup>
۳۵	۶/۸۷۵±۰/۵۶ <sup>c</sup>	۲/۴۲۹±۰/۵۸ <sup>c</sup>
۴۰	۸/۶۷۱±۰/۹۶ <sup>b</sup>	۴/۹۱۱±۰/۳۵ <sup>a</sup>

فتوستتزی در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد کاهش داشت. اختلاف معنی‌داری در فعالیت فتوستتزی در دماهای ۲۰ و ۲۵ درجه سانتی‌گراد و همچنین دماهای ۳۰ و ۳۵ درجه سانتی‌گراد وجود نداشت ( $P < 0/05$ ).

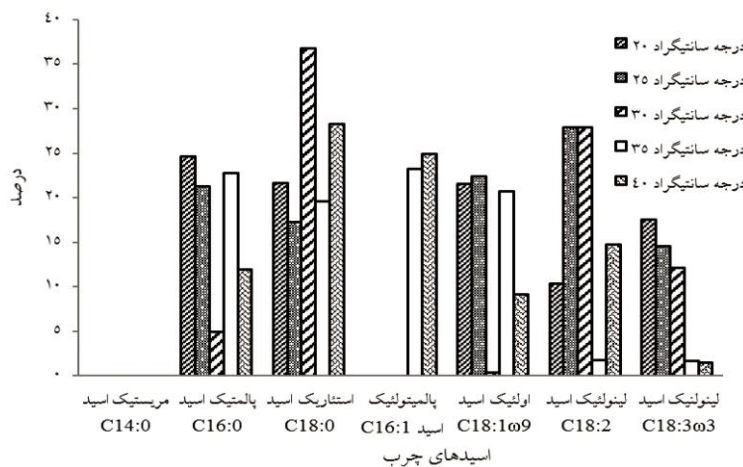
شکل ۴ مقادیر فتوستتز سیانوباکتری *Synechococcus elongatus* در تیمار دما نشان می‌دهد. فعالیت فتوستتزی با افزایش دما افزایش داشت و میزان آن از  $2/018 \mu\text{molO}_2 \text{ mgchl}^{-1}\text{min}^{-1}$  به  $7/332$  در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد رسید. فعالیت



شکل ۴: منحنی مقادیر فتوستتز سیانوباکتری *Synechococcus elongatus* در تیمار دما

شکل ۵ درصد اسیدهای چرب *Synechococcus elongatus* در تیمار دما نشان می‌دهد. بالاترین میزان اسید چرب در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد به ترتیب به میزان ۱۰/۲ و ۲۴/۹۲ درصد مشاهده شد. در هیچ تیمار دمایی میرستیک اسید یافت نشد.

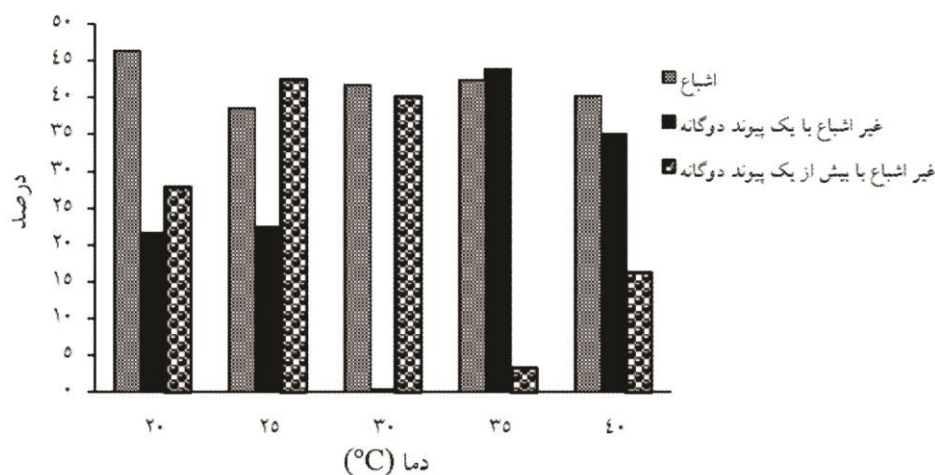
شکل ۵ درصد اسیدهای چرب *Synechococcus elongatus* در تیمار دما نشان می‌دهد. بالاترین میزان اسید چرب در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد مربوط به پالمیتیک اسید (۴۲/۷۴ درصد) و استتاریک اسید



شکل ۵: درصد اسیدهای چرب *Synechococcus elongatus* در تیمار دما

۳۵ درجه سانتی‌گراد مشاهده شد. در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد میزان (C16:0) و (C18:3) کاهش داشت.

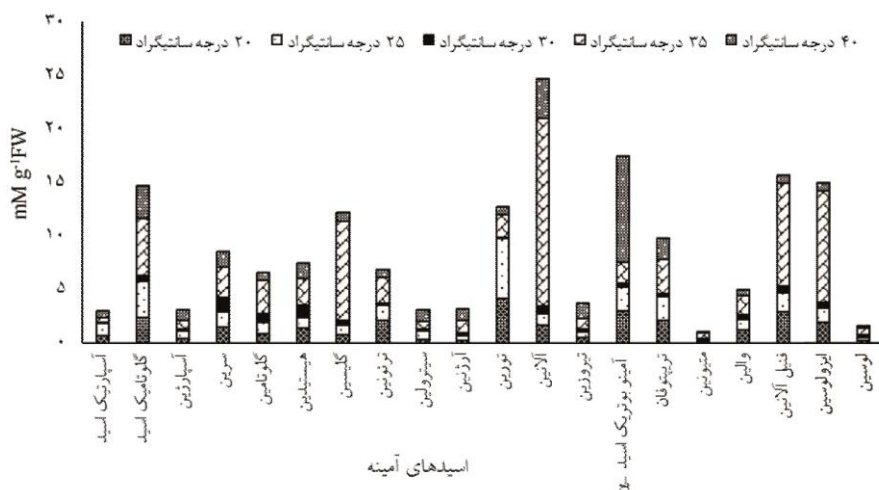
مطابق شکل ۶ در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد اسیدهای چرب با بیش از دو پیوند دوگانه افزایش یافت. بالاترین میزان اسیدهای چرب اشباع در دمای



شکل ۶: منحنی مقایسه میزان اسیدهای چرب اشباع و غیر اشباع با یک یا تعداد بیشتری پیوند دوگانه در تیمار دما

سانتی‌گراد مشاهده شد. در این دما اسیدهای آمینه فنیل آلانین، آلانین، ایزولوسین، گلیسین و گلوتامیک اسید بیشترین میزان را به خود اختصاص دادند.

شکل ۷ پروفایل اسیدهای آمینه سیانوباکتری *Synechococcus elongatus* در تیمار دما نشان می‌دهد. بیشترین میزان اسید آمینه در دمای ۳۵ درجه



شکل ۷: پروفایل اسید آمینه سیانوباکتری *Synechococcus elongatus* در تیمار دما

لیپید سیانوباکتری *Synechococcus elongatus* با افزایش دما افزایش یافت به طوری که بیشترین میزان رشد در ۴۰ درجه سانتی‌گراد و بیشترین میزان تولید لیپید در ۳۵ درجه سانتی‌گراد مشاهده گردید.

عوامل محیطی به منظور خوگیری با محیط موجودات را وادار به تغییر متابولیسم می‌نمایند. خواص فیزیکی و بیولوژیکی غشاء به ترکیب اسید چرب بستگی دارد. در این تحقیق میزان رشد و تولید



سلطانی و همکاران (۱۳۷۲) گزارش کردند که سرعت رشد سیانوباکتری سندسموس در دمای پایین کم می‌باشد. در دمای بهینه رشد آن بین ۲۴ تا ۳۱ درجه سانتی‌گراد سرعت رشد ۱/۲۴ ارزیابی گردید. در این بررسی مشاهده شد که تغییرات دمایی بر محتوای رنگیزه‌های تاثیر می‌گذارد و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد میزان کلروفیل، آلفیکوسیانین، فیکوسیانین و فیکواریترین بیشترین مقدار و به ترتیب به میزان  $1 \text{ mgdw}^{-1}$ ، ۵/۰۷۹، ۱۴/۵۳۹ و ۳/۶۴۷ بدست آمد. این امر با یافته‌های مربوط به Anand و همکاران (۱۹۹۰) سازگار است.

در تحقیقی Aaronson (۱۹۷۳) مشاهده کرد که محتوای چربی جلبک *Ochromonas danica* و *Nannochloropsis salina* با افزایش دما افزایش می‌یابد. در مقابل، تغییر قابل توجهی در محتوای چربی *Chlorella sorokiniana* در دماهای مختلف مشاهده نمی‌شود. دما اثر عمده‌ای بر ترکیب اسید چرب جلبک‌ها دارد. به طور کلی در بسیاری از جلبک‌ها و سیانوباکتری‌ها با کاهش دما اسیدهای چرب غیراشباع افزایش و اسیدهای چرب اشباع کاهش می‌یابند. این باور وجود دارد که توانایی جلبک‌ها برای تغییر خواص فیزیکی و پاسخ‌های حرارتی چربی‌های غشاء، نشان دهنده یک استراتژی برای افزایش سازگاری فیزیولوژیکی در طیف وسیعی از درجه حرارت می‌باشد، اگر چه مکانیسم دقیق آن هنوز ناشناخته است (Renaud et al., 2002).

ترکیب اسید چرب اغلب وابسته به دمای رشد است. در دمای پایین اسیدهای چرب غیر اشباع افزایش یافته و بیوسنتز زنجیره‌های آسیل کوتاه بیشتر می‌شود (Liu et al., 2005). تغییرات در کیفیت چربی، مانند طول زنجیره هیدروکربنی و درجه غیر اشباع، نقش مهمی در تحمل تغییرات درجه حرارت در موجودات فتوتروف بازی می‌کند (Gombos et al.,

1992). تولید زیاد C۱۸:۳ در این تحقیق به نظر می‌رسد یک استراتژی برای غلبه بر درجه حرارت پایین و ناشی از کاهش سیالیت غشا و افزایش دمای فاز انتقال باشد (Chapman, 1975; Wada, et al., 1994). سیانوباکتری *Synechococcus elongatus* قادر است با اضافه کردن پیوندهای دو گانه به اسیدهای چرب و در نتیجه کاهش اسیدهای چرب اشباع در چربی غشای تحمل نسبت به دماهای پایین را افزایش دهد. این نتیجه با تحقیقات Vannela و همکاران (۲۰۱۱) و Murata و Wada (۱۹۹۵) همخوانی دارد. علاوه بر ایجاد تغییر در درجه غیر اشباع سازی، نسبت مولی C۱۶ و C۱۸ در دماهای مختلف تغییر یافته است. همانطور که در شکل ۵ دیده می‌شود، نسبتاً C۱۶ در درجه حرارت بالاتر بیشتر بوده، در حالی که C۱۸ در درجه حرارت پایین تر مهم تر است.

همانطور که مشاهده شد در سیانوباکتری *Synechococcus elongatus* در دمای ۳۵ بیشترین میزان اسیدهای چرب اشباع C۱۶ و C۱۸ یافت شد که طبق گزارش سایر محققان بهترین اسید چرب برای تولید سوخت زیستی ارائه شده است (Canakci, 2007; Benjumea et al., 2011).

در تحقیقی Vannela و همکاران (۲۰۱۱) بیان کردند که سیانوباکتری *Synechocystis* sp. PCC6803 در دماهای بالاتر از ۴۴ درجه سانتی‌گراد و کمتر از ۱۸ درجه سانتی‌گراد میزان رشد بیش از ۶۶ درصد، میزان تولید بیومس بیش از ۷۰ درصد و میزان تولید لیپید ۸۰ درصد کاهش می‌یابد. استرس‌های دمایی درصد اسیدهای چرب بویژه C۱۶:۰ و C۱۸:۳ را دستخوش تغییر می‌سازد. مقدار اسیدهای چرب غیر اشباع ۰/۸۷ در ۳۰ درجه سانتی‌گراد، ۰/۶۲ در ۴۴ درجه سانتی‌گراد و ۱/۲۹ در ۱۸ درجه سانتی‌گراد تغییر می‌یابد. در این بررسی با افزایش دما تا ۴۰ درجه

- (2009). Energy biotechnology with cyanobacteria. *Current Opinion in Biotechnology*. 20(3): 257-263.
- Benjumea, P., Agudelo, J.R. and Agudelo, A.F. (2011).** Effect of the degree of unsaturation of biodiesel fuels on engine performance, combustion characteristics, and emissions. *Energy & Fuels*. 25:77-85.
- Bermejo, R.N.R., Alva' rez-Pez, J.M., Acie'n Fernandez, F.G. and Molina Grima, E. (2002).** Recovery of Pure B-phycoerythrin from the Microalga *Porphyridum Cruentum*. *Journal of Biotechnology*. 93: 73-85.
- Berry, J. and Bjorkman, O. (1980).** Photosynthetic response and adaptation to temperature in higher-plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 31:491-543.
- Bligh, E.G., and Dyer, W.J. (1959).** A rapid method for total lipid extraction and purification. *Canadian Journal Biochemistry and Physiology*. 37:911-917.
- Canakci, M. (2007).** The potential of restaurant waste lipids as biodiesel feedstocks. *Bioresource Technology*. 98(1):183-190.
- Chapman, D. (1975).** Phase-transitions and fluidity characteristics of lipids and cellmembranes. *Quarterly Reviews of Biophysics*. 8 (2):185-235.
- Enami, I., Kitamura, M., Tomo, T., Isokawa, Y., Ohta, H. and Katoh, S. (1994).** Is the primary cause of thermal inactivation of oxygen evolution in spinach PSII membranes release of the extrinsic 33 kDa protein or of Mn? *Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics*. 1186(1-2): 52-58.
- Fabregas, J., Maseda, A., Dominquez, A. and Otero, A. (2004).** The cell composition of *Nannochloropsis* sp. changes under different irradiances in semicontinuous culture. *World Journal Microbiology and Biotechnology*. 20:31-35.
- Gombos, Z., Hideg, E., Zsiros, O., Wada, H. and Murata, N. (1995).** The role of lipid desaturation in protection mechanism against temperature stresses. *Acta Phytopathologica Et Entomologica Hungarica*. 30 (1-2):89-92.
- Gombos, Z., Wada, H. and Murata, N. (1992).** Unsaturation of fatty-acids in membranelipids enhances tolerance of the cyanobacterium *Synechocystis* PCC6803 to lowtemperature photoinhibition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 89(20):9959-9963.
- Hirano, M., Satoh, K. and Katoh, S. (1981).** The effect on photosynthetic electron
- سانتی‌گراد میزان رشد افزایش ولی میزان تولید لیپید کاهش می‌یابد. زمان مضاعف شدن نیز در دماهای بالاتر از ۳۵ درجه سانتی‌گراد و پایین‌تر از ۲۵ درجه سانتی‌گراد افزایش می‌یابد.
- نتیجه‌گیری نهایی**
- دما نقش مهمی در زیست توده و میزان تولید چربی *Synechococcus elongatus* بازی می‌کند. درجه حرارت پایین (۲۰ درجه سانتی‌گراد) نرخ رشد و میزان تولید چربی کاهش می‌یابد. در درجه حرارت ۳۵ درجه سانتی‌گراد میزان رشد و تولید لیپید افزایش محسوسی نشان داد. همچنین در این درجه حرارت میزان اسیدهای چرب اشباع با ۱۶ و ۱۸ کربن که برای تولید سوخت زیستی مناسب می‌باشند افزایش می‌یابد. پیشنهاد می‌گردد تولید سوخت زیستی از این سیانوباکتری در شرایط روباز در مناطق گرم صورت گیرد تا همزمان افزایش زیست توده و محتوای لیپید صورت پذیرد.
- منابع**
- سلطانی، ن. و خاوری‌نژاد، ر.ع. (۱۳۷۲). تاثیر شدت نور بر رشد و فتوسنتز جلبک سبز. پایان‌نامه کارشناسی‌ارشد. دانشگاه تربیت معلم تهران.
- Aaronson, S. (1973).** Effect of incubation temperature on the macromolecular and lipid content of the phytoflagellate *Ochromonas Danica*. *Journal of Phycology*, 9:111-113.
- Anand, N.L., Radha, R.S., Hopper, G.R. and Subramanian, T.D. (1990).** Blue-green algae as biofertilizers: certain view points on the choice of suitable isolates. In: *Perspective in phycology, International symposium of phycology at university of Madras, New Delhi: Today and tomorrow's Publishers*.
- Andersen, R.A. (2005).** *Algal culturing techniques*. 1st Edition. Elsevier Academic press. pp. 165-184.
- Angermayr, S.A., Hellingwerf, K.J., Lindblad, P. and de Mattos, M.J.T.**

- HCO<sub>3</sub> uptake in *Synechocystis* sp. strain PCC6803. *Journal of Bacteriology*. 182 (9):2591-2596.
- Ragauskas, A.J., Williams, C.K., Davison, B.H., Britovsek, G., Cairney, J., Eckert, C.A., Frederick, W.J., Hallett, J.P., Leak, D.J., Liotta, C.L., Mielenz, J.R., Murphy, R., Templer, R. and Tschaplinski, T. (2006).** The path forward for biofuels and biomaterials. *Science*. 311 (5760): 484-489.
- Renaud, S.M., Thinh, L.-V., Lambrinidis, G. and Parry, D.L. (2002).** Effect of temperature on growth, chemical composition and fatty acid composition of tropical Australian microalgae grown in batch cultures. *Aquaculture*. 211:195-214.
- Rittmann, B.E. (2008).** Opportunities for renewable bioenergy using microorganisms. *Biotechnology and Bioengineering*. 100 (2):203-212.
- Soltani, N., Khavari-Nejad, R., Tabatabaie, M., Shokravi, Sh. and Valiente, E.F. (2006).** Variation of Nitrogenase Activity, photosynthesis and pigmentation of cyanobacterium *Fischerella ambigua* strain FS18 under different irradiance and pH. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 22 (6): 571-576.
- Vannela, R., Sheng, J. and Rittmann, B.E., (2011).** Evaluation of methods to extract and quantify lipids from *Synechocystis* PCC6803. *Bioresource Technology*. 102 (2):1697-1703.
- Vannela, R., Sheng, J., Woo Kim, H., Badalamenti, G.P., Zhou, C., Sridharakrishnan, S., Krajmalnik-Brown, R. and Rittmann, B.E. (2011).** Effects of temperature shifts on growth rate and lipid characteristics of *Synechocystis* sp. PCC6803 in a bench-top photobioreactor. *Bioresource Technology*. 102:11218-11225.
- Wada, H., Gombos, Z. and Murata, N. (1994).** Contribution of membrane lipids to the ability of the photosynthetic machinery to tolerate temperature stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 91 (10):4273-4277.
- Wada, H. and Murata, N. (1990).** Temperature-induced changes in the fatty-acid composition of the cyanobacterium, *Synechocystis* PCC6803. *Plant Physiology*. 92 (4):1062-1069.
- transport of temperature-dependent changes in the fluidity of the thylakoid membrane in a thermophilic blue-green-alga. *Biochimica Et Biophysica Acta*. 635 (3):476-487.
- Jones, J., Manning, S., Montoya, M., Keller, K. and Poenie, M. (2012).** Extraction of Algal Lipids and Their Analysis by HPLC and Mass Spectrometry. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 89:1371-1381.
- Kim, H.W., Vannela, R., Zhou, C., Harto, C. and Rittmann, B.E. (2010).** Photoautotrophic nutrient utilization and limitation during semi-continuous growth of *Synechocystis* sp. PCC6803. *Biotechnology and Bioengineering*. 106(4):553-563.
- Liu, X.J., Jiang, Y. and Chen, F. (2005).** Fatty acid profile of the edible filamentous cyanobacterium *Nostoc flagelliforme* at different temperatures and developmental stages in liquid suspension culture. *Process Biochemical*. 40:371-377.
- Lu, X., Guana, W., Zhao, H., Wanga, C., Yanga, M. and Baia, F. (2011).** Quantitative analysis of fatty-acid-based biofuels produced by wild-type and genetically engineered cyanobacteria by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography*, 1218:8289- 8293.
- Marker, A.F.H. (1972).** The use of acetone and methanol in the estimation of chlorophyll in the presence of phaeophytin. *Freshwater Biology*, 2:361-385.
- Murata, N. (1989).** Low-temperature effects on cyanobacterial membranes. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*. 21(1):61-75.
- Murata, N. and Wada, H. (1995).** Acyl-lipid desaturases and their importance in the tolerance and acclimatization to cold of cyanobacteria. *Biochemical Journal*. 308:1-8.
- Nübel, U., Garcia-Pichel, F., Clavero, E. and Muyzer, G. (2000).** Matching molecular diversity and ecophysiology of benthic cyanobacteria and diatoms in communities along a salinity gradient. *Environmental Microbiology*, 2:217-226.
- Ogawa, T. and Kaplan, A. (2003).** Inorganic carbon acquisition systems in cyanobacteria. *Photosynthesis Research*. 77 (2-3):105-115.
- Ohkawa, H., Price, G.D., Badger, M.R. and Ogawa, T. (2000).** Mutation of *ndh* genes leads to inhibition of CO<sub>2</sub> uptake rather than