بررسی تاثیر بی‌کربنات سدیم بر رشد میکروجلبک کلرلا (*Chlorella* sp.) در محیط کشت TMRL

علی گنجیان خناری*[۱]، متین شکوری[۲]، مریم قاسم نژاد[۳]، فاطمه گنجیان خناری[۴]، وحید فارابی[۵]

۱، ۲و۵- پژوهشکده اکولوژی دریای خزر، ساری، ایران، صندوق پستی: ۹۶۱

۲- عضو باشگاه پژوهشگران جوان دانشگاه آزاد اسلامی واحد قائم شهر، ایران، صندوق پستی: ۱۶۳

۱،۳و ۴- گروه پژوهشی شیلات و آلاینده‌های آبی خزر، ساری، ایران، صندوق پستی: ۴۸۱۶۹۶۴۳۶۸

تاریخ دریافت: ۱۵ تیر ۱۳۹۱ تاریخ پذیرش: ۱۴ آبان ۱۳۹۱

چکیده

منبع کربن یک عامل ضروری برای رشد میکروجلبک‌ها محسوب می‌شود، لذا برای افزایش تولید انبوه، تامین کربن یکی از مراحل مهم در رشد میکروجلبک‌ها می‌باشد. در این مطالعه اثر بی‌کربنات سدیم ($NaHCO_3$) بر رشد میکروجلبک کلرلا در محیط کشت TMRL(AG) مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور از چهار غلظت بی‌کربنات سدیم $NaHCO_3$ (۲/۵، ۵ ، ۷/۵ و ۱۰ در میلی‌لیتر) در محیط کشت TMRL(AG) طی ده روز استفاده گردید. نتایج حاصله با غلظت‌های مختلف بی‌کربنات سدیم که به محیط کشت TMRL(AG) اضافه شده نشان داد که تیمار سوم با غلظت ۷/۵ میلی‌لیتر، بیش‌ترین رشد را در روز دهم به میزان ۱۱۹×۱۰^{۶} تعداد سلول در میلی‌لیتر داشت. محاسبه نرخ رشد و ضریب رشد ویژه نشان داد رشد سریع‌تر میکروجلبک کلرلا در محیط کشت تیمار سوم به ترتیب برابر با ۲/۳۰ و ۰/۱۵ بود. با توجه به نتایج به‌دست آمده استفاده از بی‌کربنات سدیم در محیط کشت معمولی و ارزان قیمت TMRL(AG) جهت تولید انبوه میکروجلبک کلرلا و به عنوان محیط کشت اصلاح شده آن توصیه می‌گردد.

کلمات کلیدی: میکروجلبک کلرلا، بی‌کربنات سدیم، TMRL(AG)، *Chlorella* sp.

* عهده دار مکاتبات (✉). aganjian2002@yahoo.com

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

میکروجلبک‌ها اساس زنجیره غذایی را در اکوسیستم‌های آبی تشکیل می‌دهند و در صنایع مختلف کاربرد فراوان دارند و هم‌چنین در آبزی‌پروری نیز به عنوان غذای زنده برای رشد نرم تنان، میگو، ماهیان و زئوپلانکتون‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرند. نقش جلبک ها در تغذیه نرم‌تنان از مواردی است که توسط دانشمندان زیادی بحث وبررسی شده است (حسینی و جلالی، ۱۳۸۸؛ Lopez, 2008). جلبک‌های میکروسکوپی به دلیل دارا بودن مواد مغذی ارزشمند می‌توانند ضمن بهبود کیفیت غذای انسان و دام در ارتقای سلامت آن‌ها نیز نقش موثری داشته باشند، این میکروارگانیسم‌ها دارای میزان بالایی پروتئین بوده و قدرت سنتز همه اسیدهای آمینه ضروری را دارند (Devgoswami, *et al*., 2012). میکروجلبک تک سلولی *Chlorella Vulgaris* ، یکی از قدیمی‌ترین میکروارگانیسم‌ها بر روی کره زمین است که شکل کره‌ای و دیواره سلولی بسیار پایدار دارد و ارزش تغذیه‌ای این میکروجلبک اولین بار در سال ۱۹۵۰ مشخص شد (Morita, *et al*., 1999). تحقیقات نشان داده که *Chlorella Vulgaris* باعث تقویت سیستم ایمنی بدن شده و با استفاده از نتایج امیدوارکننده‌ی آن، در درمان سرطان انسانی مورد بررسی قرار گرفته است (Yasukawa, *et al*., 1996; Janczyk, *et al*., 2007; Justo, *et al*., 2001; Konishi, *et al*., 1985; Konishi, *et al*., 1990; Morimoto, *et al*., 1995; Noda, *et al*., 1996; Singh, *et al*., 1998; Tanaka, *et al*., 1984; Tsuchida, *et al*., 2000). کلرلا به طور خاص از عمل سرکوب سیستم ایمنی ناشی از استرس و تشکیل زخم معده جلوگیری و محافظت می‌کند (Hasegawa, *et al*., 2000; Tanaka, *et al*., 1997).

تغذیه با میکروجلبک‌ها به افراد مسن و یا حیوانات نشان داده که از بیماری‌های فشار خون بالا قلب و یا هیپرلیپیدمی جلوگیری می‌کند (Yasukawa, *et al*., 1996; Janczyk, *et al*., 2007; Okamoto, *et al*., 1978; Sano *et al*., 1987; Sano, *et al*., 1988). اثرات مفید جلبک‌های سبز برای دفع برخی از ترکیبات سمی (حشره‌کش‌ها، سرب و یا دیوکسین) (Morita, *et al*., 1999; Pore, 1984; Queiroz, *et al*., 2003) و یا حفاظت از نفوذ رادیواکتیویته (Vacek, *et al*., 1990) نشان داده شده است. استفاده از پودرکلرلا به عنوان مکمل غذایی (۱٪) در تغذیه مرغ‌های تخم‌گذار باعث افزایش و کیفیت رنگ تخم مرغ ها شده است (Janczyk, *et al*., 2007). میکروجلبک‌ها از منابع مختلف، CO_2 مصرفی خود را تامین می‌کنند: CO_2 از اتمسفر، از دودکش‌های صنعتی، از فرم محلول شده کربنات‌ها ($NaHCO_3$ ، $Na2CO_3$) که می‌توان به‌طور مستقیم برای تغذیه میکروجلبک‌ها استفاده کرد (Wang, *et al*., 2008).

به هرحال بهره وری سوخت وساز و در نتیجه ترکیب میکروجلبک‌ها برای استفاده از CO_2 و بی‌کربنات و کربنات به عنوان منبع کربن می‌تواند از گونه‌ای به گونه دیگر متفاوت باشد (De Morais, *et al*., 2007). تعدادی از گونه های میکروجلبک استفاده از کربنات مانند $NaHCO_3$ و Na_2CO_3 رشد سلولی خوبی داشتند (Merrette, *et al*. , 1996). عوامل اصلی زیست محیطی و ترکیب شیمیایی موثر بر رشد میکروجلبک‌ها شامل نور، مواد غذایی، دما و PH است (Rousch, *et al*., 2003). منبع کربن یک عامل ضروری برای رشد میکروجلبک‌ها محسوب می‌شود (Wen, *et al*., 2003)کربن میکرو جلبک‌ها در شرایط

Archive of SID

www.SID.ir

کشت، CO_2 اتمسفر است که به طور طبیعی در حال حاضر ۳۰۰ پی پی ام است (Devgoswami, *et al*., 2012) لذا برای افزایش محصول در تولید انبوه تامین کربن یکی از مراحل مهم در رشد میکروجلبک‌ها می‌باشد. محیط کشت شرایط مورد نیاز برای رشد طیف وسیعی از جلبک‌ها را تامین می‌کند. محیط کشت‌های مختلف با توجه به گروه‌های مختلف جلبکی و گونه‌های مختلف تهیه می‌گردد و شرایط مورد نیاز جهت رشد آن‌ها متغیر می‌باشد (فلاحی و صلواتیان، ۱۳۸۴). با توجه به این که جلبک‌های مختلف تحت شرایط محیطی متفاوت دارای رشد یکسانی نخواهند بود و با توجه به اهمیت اقتصادی این جلبک‌ها در زمینه‌های غذایی، دارویی، ویتامینی، کود بیولوژیک (کود سبز)، وبیودیزل (سوخت سبز) و غیره، ضرورت رشد سریع‌تر و ارزان‌تر مورد توجه تولیدکنندگان انبوه میکروجلبک می‌باشد، از این‌رو با تغییر بعضی از منابع غذایی می‌توان میزان رشد و تراکم سلولی را به حداکثر مقدار خود به خصوص در مقادیر انبوه رساند. لذا می‌بایست مطالعاتی بر روی تاثیر میزان این عناصر روی واریته‌ها و گونه‌های بومی کشورمان صورت گیرد تا بتوان جهت خودکفایی و رفع مشکلات آبزی‌پروی و هم‌چنین به علت کاربرد بسیار وسیع و ارزش اقتصادی، میکروجلبک‌ها و مصارف آن‌ها در صنایع مختلف دیگر گامی مثبت برداشت. بررسی تنوع گونه‌ای میکروجلبک‌های بومی منطقه و ارزیابی پتانسیل پرورش انبوه ، بررسی ارزش غذایی و یافتن کاربرد آن‌ها در صنایع مختلف می‌تواند بنیادی‌ترین تحقیق در آغاز صنعتی شدن کشت و پرورش و استفاده از میکروجلبک‌ها باشد. بر اساس مطالعات انجام شده منابع آبی داخلی منبع بسیار مهم و سرشار از میکروجلبک‌ها هستند و در دریای خزر بیش از ۳۳۴ گونه از ۸ شاخه فیتوپلانکتون مورد شناسایی قرار گرفته است (Ganjian, *et al*., 2010; Ganjian, *et al*., 2011). هم‌چنین اکوسیستم آب شیرین سرشار از گونه‌های متنوع می‌باشد که می‌توان اقدام به جداسازی، خالص-سازی، تهیه استوک‌های خالص و محیط کشت مناسب و اختصاصی آن‌ها گامی بزرگ برای تجاری‌سازی و استفاده از میکروجلبک‌ها در صنایع مختلف برداشت. هدف از این تحقیق تعیین مناسب‌ترین دوز بی‌کربنات سدیم در محیط کشت TMRL جهت تولید انبوه میکروجلبک کلرلا می‌باشد.

مواد و روش‌ها

پس از ساخت محیط کشت TMRL(AG) ($Fecl_3$) (۱ گرم)، NaH_2Po_4 (۵ گرم) و ازت (۵۰ گرم) ، ۱۰ سی سی استوک خالص شده میکروجلبک سبز *Chlorella* sp.، به ارلن‌های ۲۵۰ سی‌سی تزریق شد و در یک اطاق کشت استریل با دمای ۲±۲۵ درجه سانتی‌گراد و با شدت نور ۳۵۰±۳۵۰۰ لوکس و پریود نوری یا دوره روشنایی (L) وتاریکی (D) توسط تایمر اتوماتیک به‌صورت تناوب (۱۲/۱۲):(L/D) ساعت تنظیم گردید (گنجیان، ۱۳۸۹). هوادهی ارلن ۲۵۰ سی‌سی حاوی میکروجلبک موجود در محیط کشت TMRL(AG) در هر میز با استفاده از دستگاه پمپ آکواریوم انجام شد. بعد از رسیدن به تراکم مورد نظر، ۴ تیمار در غلظت‌های مختلف بی‌کربنات سدیم ($NaHCO_3$) (۲/۵، ۵، ۷/۵ و ۱۰ در میلی‌لیتر) جدول (۱) به آن‌ها افزوده شد. برای هر تیمار، ۳ تکرار در نظر گرفته شد و شمارش تعداد سلول‌های میکرو-

Archive of SID

www.SID.ir

جلبک‌ها ۵ بار در طی ۱۰ روز با میکروسکوپ نوری و لام نئوبارآینه‌ای انجام گردید.

تعداد واقعی سلول‌های جلبک در هر تیمار و در هر روز با استفاده از فرمول زیر به‌دست آمد:

رقت ×۱۰×میلی‌متر مربع/ سلول‌ها= میلی‌متر مکعب/ سلول‌ها

= میلی‌متر مربع/ سلول‌ها

(میلی‌مترمربع) وسعت شمارش شده/میانگین سلول‌های شمارش شده

۱۰۰۰× رقت × ۱۰× ۵ × تعداد نمونه شمارش شده= ML = ۱ سی سی

(گنجیان، ۱۳۸۹).

ضریب رشد ویژه، سلولی میکرو جلبک

برای محاسبه سرعت رشد (ضریب رشدویژه) (μ) Specific Growth Rate (SGR) در روزهای مختلف از فرمول زیر استفاده شد:

$\mu = K' = Ln(m_{t2}/m_{t1})/t_2-t_1;\ t_2>t_1$

m_2 = زی توده درآخرین روز و m_1 = زی توده دراولین روز

t_1= اولین روز و t_2= آخرین روز

درصد رشد سلولی میکرو جلبک

محاسبه درصدی افزایش تعداد سلول‌ها از اولین روز تا آخرین روز با استفاده ازفرمول زیر محاسبه می‌شود.

$k= 3.32 \times 1/t \times (\text{Log } N_t - \text{Log } N_o)$

K = نرخ رشد

N_0 = تعداد سلول‌های اولیه درزمان شروع آزمایش

t = زمان (روزها)

Nt = تعداد سلول‌ها در زمان t

جدول ۱: غلظت میزان مصرف $NaHCO_3$ (بی‌کربنات سدیم) در تیمارهای مختلف

تیمارها	غلظت مصرفی
شاهد	بدون کربنات سدیم
T1	cc ۲/۵
T2	cc ۵
T3	cc ۷/۵
T4	cc ۱۰

شمارش میکروجلبک کلرلا در محیط کشت TMRL(AG) با تیمارهای مختلف

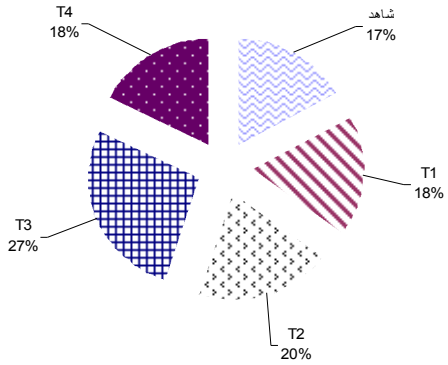
تغییرات میکروجلبک کلرلا در محیط کشت TMRL**(AG)** با غلظت های مختلف بی‌کربنات سدیم طی ۱۰ روز در آزمایشگاه، مورد بررسی قرار گرفت. هر دو روز یک بار شمارش و در مجموع ۵ بار شمارش از نمونه‌ها انجام شد. طرح کلی این تحقیق در قالب طرح کاملاً تصادفی (Completery Randomyzed Design) و کلیه اطلاعات ثبت شده در انتهای آزمایش به وسیله آنالیز واریانس یک طرفه و تست Duncan جهت مقایسه میانگین‌ها مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. کلیه عملیات مربوطه به وسیله نرم افزار SPSS ۱۸ مورد سنجش قرار گرفت.

نتایج

نتایج حاصله در مورد غلظت‌های مختلف بی‌کربنات سدیم که به محیط کشت TMRL**(AG)** اضافه شده: محیط کشت تیمار سوم غلظت ۷/۵ میلی لیتر بیش‌ترین میزان رشد به میزان ۱۱۹×۱۰^۶ تعداد سلول در میلی لیتر را در روز دهم داشته است. با توجه به شکل ۱ بیش‌ترین میزان فراوانی میانگین کل مربوط به تیمار سوم می باشد که بیش‌ترین میزان رشد (۲۷

Archive of SID
www.SID.ir

درصد) میکروجلبک کلرلا در این تیمار مشاهده گردید.



شکل ۱: فراونی میکرو جلبک کلرلا در تیمارهای مختلف

در این آزمایش محاسبه نرخ رشد و ضریب رشد ویژه (μ) نشان دهنده رشد و افزایش سلول‌های میکروجلبک کلرلا در محیط کشت تیمار سوم به ترتیب برابر با ۲/۳۰ و ۰/۱۵ بوده است (جدول ۲).

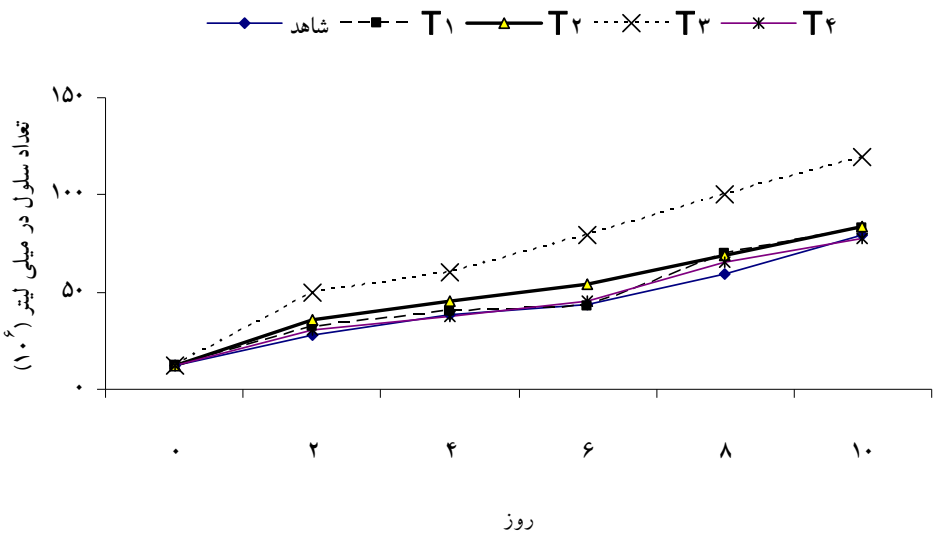
جدول۲: میزان نرخ رشد و ضریب رشد ویژه میکرو جلبک کلرلا در تیمارهای مختلف

تیمارها	نرخ رشد	ضریب رشد ویژه
شاهد	۱/۸۹	۰/۱۳
T1	۱/۹۳	۰/۱۳
T2	۱/۹۴	۰/۱۳
T3	۲/۳۰	۰/۱۵
T4	۱/۸۷	۰/۱۲

در اولین شمارش، تعداد سلول‌ها در محیط کشت شاهد برابر ۲/۱±۲۷ تعداد سلول در میلی‌لیتر ($\times 10^6$) و در محیط کشت تیمار سوم برابر ۲/۸±۵۰ تعداد سلول در میلی‌لیتر ($\times 10^6$) بوده است در حالی که ضریب تغییرات محیط کشت شاهد ۷/۷۱ درصد و در محیط کشت تیمار سوم برابر با ۵/۶۶ درصد بوده که نشان‌دهنده اختلاف شمارش بین تیمارهای محیط کشت شاهد بوده است. در دومین شمارش (روز چهارم) میزان رشد میکروجلبک کلرلا در محیط کشت تیمار سوم نسبت به شاهد به صورت محسوسی بالاتر بوده است. در سومین شمارش (روز ششم) رشد سلول‌های کلرلا محیط کشت تیمار سوم نسبت به محیط کشت شاهد تقریبا دو برابر و به ترتیب ۱/۴±۳۸ و ۲/۱±۶۰ تعداد سلول در میلی‌لیتر ($\times 10^6$) بودند. روند رشد تیمار سوم نسبت به شاهد و تیمارهای دیگر افزایش داشته و در روز دهم بیش‌ترین میزان رشد را نشان داده است. میانگین ضریب تغییرات(C.V) محیط کشت TMRL**(AG)** شاهد در مجموع ۵۲/۴۱ درصد و در محیط کشت تیمار سوم برابر ۵۱/۹۵ درصد به‌دست آمد (جدول ۳ و شکل ۲).

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۲: تراکم (تعداد سلول در میلی‌لیتر $۱۰^{۶}\times$) میکرو جلبک کلرلا در غلظت‌های مختلف بی‌کربنات سدیم

جدول ۳: مقایسه رشد میکرو جلبک کلرلا (تعداد سلول در میلی‌لیتر $۱۰^{۶}\times$) و ضریب تغییرات در تیمارهای مختلف

روزهای	ضریب تغییرات (CV%)					انحراف معیار± میانگین($۱۰^{۶}\times$)				
شمارش	شاهد	T1	T2	T3	T4	شاهد	T1	T2	T3	T4
۱	۱۱/۷۹	۱۱/۷۹	۱۱/۷۹	۱۱/۷۹	۱۱/۷۹	۱۲±۱/۴	۱۲±۱/۴	۱۲±۱/۴	۱۲±۱/۴	۱۲±۱/۴
۲	۷/۷۱	۴/۴۲	۷/۸۶	۵/۶۶	۶/۹۶	۲۷±۲/۱	۳۲±۱/۴	۳۶±۲/۸	۵۰±۲/۸	۳۰±۲/۱
۴	۳/۷۲	۳/۵۴	۷/۷۷	۳/۵۱	۱/۸۹	۳۸±۱/۴	۴۰±۱/۴	۴۵±۳/۵	۶۰±۲/۱	۳۷±۷
۶	۱/۶۳	۶/۵۸	۳/۸۹	۲/۶۷	۴/۶۶	۴۳±۷	۴۳±۲/۸	۵۴±۲/۱	۷۹±۲/۱	۴۵±۲/۱
۸	۱/۱۹	۳/۰۵	۳/۱۰	۳/۵۲	۴/۳۵	۵۹±۷	۶۹±۲/۱	۶۸±۲/۱	۱۰۰±۳/۵	۶۵±۲/۸
۱۰	۲/۶۷	۴/۲۹	۲/۵۴	۱/۷۸	۰/۹۱	۷۹±۲/۱	۸۲±۳/۵	۸۳±۲/۱	۱۱۹±۲/۱	۷۷±۷
کل	۵۲/۴۱	۵۲/۶۴	۴۷/۹۶	۵۱/۹۵	۵۰/۷۱	۴۳/۳±۲/۲	۴۶/۵±۲/۴	۵۰±۲/۳	۷۰±۳/۶	۴۴±۲/۲

بحث

رشد خوب کشت‌های میکروجلبک‌ها به تعادل مناسب بین مواد غذایی اصلی و فرعی بستگی دارد. عدم تعادل این مواد اغلب منجر به توقف رشد کشت می‌شود. تمام شدن مواد غذایی یکی از مهم‌ترین عوامل محدود کننده رشد و کنترل کننده کیفیت غذایی در کشت‌های متراکم است. بسیاری از کودها، حاوی مقادیر ناکافی نیتروژن یا فلزات بی‌ثبات و به ویژه آهن هستند، که می‌تواند موجب کند شدن رشد ریزجلبک‌ها شود. میزان تامین اکسیژن و دی اکسیدکربن می‌تواند درکشت‌های بزرگ متراکم (تولید انبوه در مقیاس صنعتی) یک عامل محدودکننده باشد. میکروجلبک‌ها در طول فتوسنتز دی اکسیدکربن مصرف کرده و اکسیژن آزاد می‌کنند. بهبود جریان آب یا افزودن حساب شده دی اکسید کربن (CO_2) یا بی‌کربنات سدیم ($NaHCO_3$) می‌تواند رشد تصاعدی را

Archive of SID

www.SID.ir

طولانی‌تر کند، اما ایجاد حباب هوا داخل محیط کشتی که حاوی بیش از ۵ درصد دی اکسید کربن است، می‌تواند بازدارنده باشد. دی اکسید کربن و بی‌کربنات سدیم هر دو روی پی اچ کشت اثر می‌گذارند، بنابراین برای حفظ کشت در بهترین شرایط رشد، این موارد باید به طور کامل پایش شود. در کشت های تجاری کنترل شده با تراکم فوق العاده بالا، به منظور افزایش رشد در طول دوره روشنایی دی اکسید کربن اضافه می‌شود (حسینی و جلالی، ۱۳۸۸). پرورش تمام آبزیان به خصوص جلبک‌های دریایی مستلزم وجود اطلاعاتی در رابطه با گونه انتخاب شده، تکنولوژی کشت و پرورش، پاسخ گونه‌های انتخاب شده به بعضی از پارامترهای محیطی و مشخص نمودن بهترین محیط کشت و مواد مغذی برای آن‌هاست. رشد هر میکروجلبک در محیط بسته با افزایش تخلیه مواد مغذی، افزایش pH به وسیله جذب کربن و کاهش Co_2 و افزایش تجمع متابولیت‌های سلولی همراه می باشد (معصومی و همکاران، ۱۳۸۶). همچنین معصومی و همکاران (۱۳۸۶) نشان دادند که افزودن ویتامین‌های گروه B در محیط کشت *Tetraselmis suecia* باعث افزایش نرخ رشد گردیده است. همچنین Mijeong و همکاران (۲۰۰۳) نشان دادندکه *Chlorella Vulgaris* بدون منبع کربن Co_2 و بی‌کربنات رشد خیلی کمی داشته و بعد از اضافه شدن منبع کربن رشد تصاعدی را بعد از روز چهارم داشته است. در این بررسی نرخ رشد و ضریب رشد ویژه میکروجلبک کلرلا در تیمار ۳ به ترتیب ۲/۳۰ و ۰/۱۵ بوده و نسبت به تیمارهای دیگر رشد بیش‌تری را نشان داده است.

در تحقیق انجام شده توسط فلاحی و صلواتیان (۱۳۸۴) در مورد اثر غلظت‌های مختلف عنصر کلسیم بر میزان رشد و زی‌توده جلبک سبز *Chlorella vulgaris* در محیط کشت Zinder و در طی ۵ روز به این نتیجه رسیده‌اند که میزان موثر کلسیم برای حداکثر رشد جلبک *Chlorella vulgaris* ۲/۸ میلی گرم در لیتر بود. در این تحقیق افزایش رشد میکروجلبک کلرلا در تیمار ۳ غلظت ۷/۵ سی سی بی‌کربنات سدیم بوده است. طبق شکل ۲ و جدول۳ در تحقیق حاضر با توجه به افزایش بی‌کربنات سدیم در تیمار ۴ نسبت به تیمارهای دیگر کاهش داشته و نسبت به شاهد رشد خیلی کمی داشته است و نشان دهنده کاهش تعداد سلول میکروجلبک کلرلا با افزایش غلظت بی‌کربنات سدیم و بدین معنی که غلظت بالاتر از ۷/۵ بی‌کربنات سدیم عامل باز دارنده در رشد سلول میکروجلبک کلرلا می‌باشد.

در پژوهشی که حیدری و همکاران (۱۳۹۰) انجام دادند اثرات مختلف نیترات و آمونیوم را در محیط کشت برای رشد جلبک سبز *Scenedesmus quadricauda* بررسی نمودند. پرورش این گونه در محیط کشت BBM در ۷ تیمار (۲/۹، ۱۵، ۵۰، ۲۵، ۷۵، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌مولار نیترات و آمونیوم) در شرایط آزمایشگاهی انجام گردید. بالاترین تراکم سلول جلبکی $۳۲/۵\times۱۰^{۵}$ تعداد سلول در میلی‌لیتر برای نیترات و $۲۵/۲\times۱۰^{۵}$ تعداد سلول در میلی‌لیتر برای آمونیوم بود و بیش‌ترین میزان رشد ویژه ۰/۰۹ در روز برای نیترات و ۰/۰۸ در روز برای آمونیوم از تیمار ۱۵ میلی مولار نیترات و آمونیوم به‌دست آمد. در این بررسی بیش‌ترین رشد کلرلا به میزان ۱۱۹×۱۰^{۶} تعداد سلول در میلی لیتر در تیمار سوم بوده است. و با توجه به شکل ۲ بیش از ۲۷ درصد رشد میکروجلبک کلرلا در تیمار سوم اتفاق افتاد و نشان‌دهنده واکنش مطلوب

Archive of SID
www.SID.ir

میکروجلبک کلرلا در این غلظت می‌باشد، و برای تولید انبوه با اضافه کردن این غلظت می توان زی‌توده بیش‌تری تولید نمود. نظر به اثرات مثبت بی‌کربنات سدیم بر رشد میکروجلبک کلرلا در محیط کشت TMRL**(AG1)** که یک محیط کشت عمومی تغییر یافته و ارزان قیمت می‌باشد، برای تولید انبوه میکرو جلبک کلرلا توصیه می گردد.

سپاسگزاری

در اینجا بر خود لازم می‌دانیم تا از کلیه کسانی که ما را در انجام این تحقیق یاری کرده‌اند سپاسگزاری نماییم.

منابع

۱. حسینی، س.ع.، جلالی، م.ع.، ۱۳۸۸. کاربرد غذای زنده در پرورش آبزیان. دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، تابستان ۱۳۸۸، چاپ اول. ۹۰ص.

۲. حیدری، ص.، هادیان، ا.، محبوبی صوفیانی، ن.، ۱۳۹۰. اثرات سطوح مختلف نیترات و آمونیوم در محیط کشت برای رشد جلبک سبز *Scenedesmus quadricauda*. نشریه شیلات، مجله منابع طبیعی ایران، دوره ۶۴، شماره ۱، صفحات ۲۹ تا ۴۰.

۳. فلاحی، م.، صلواتیان، م.، ۱۳۸۴. بررسی اثر غلظت های مختلف عنصر کلسیم بر میزان رشد و بیوماس جلبک سبز *Chlorella Vulgaris*. مجله علمی شیلات ایران، شماره ۱، صفحات ۷۹-۸۶.

۴. گنجیان، ع.، ۱۳۸۹. دوره آموزشی و کارگاه کشت جلبک. گروه پژوهشی شیلات و آلاینده های آبی خزر. ۳۳ص.

۵. معصومی، س.ز. ، یاوری، و.، کوچنین، پ.، سواری، ا.، ۱۳۸۶. بررسی تاثیر رژیم نوری بر رشد در محیط کشت‌های *Tetraselmis suecica* میکروجلبک ویتامینه و فاقد ویتامین. مجله امور دا م و آبزیان شماره ۷۴ ، بهار ۱۳۸۶.

6. De Morais, M. G., Costa, J. A. V., 2007. Biofixation of carbon dioxide by Spirulina sp. and Scenedesmus obliquus cultivated in a three stage serial tubular photobioreactor. J. Biotechnol, Vol. 129, pp. 439-445.
7. Devgoswami, Ch. R., Kalita, M. C, Talukdar, J., Bora, R., Sharma, P., 2012. Studies on the growth behavior of Chlorella, Haematococcus and Scenedesmus sp. in culture media with different concentrations of sodium bicarbonate and carbon dioxide gas. African Journal of Biotechnology, Vol. 10(61), pp. 13128-13138.
8. Ganjian, A., Wan Maznah, W. O., Yahya, Kh., Najafpour, Sh., Najafpour, Gh. D., Roohi, A., Fazli, H., 2010. Seasonal succession of phytoplankton community structure in the southern part of Caspian Sea. American-Eunrasian J.Agric.& Environ. Sci., Vol. 8 (2), pp. 146-155.
9. Ganjian, A., 2011. Temporal distribution and composition of phytoplankton in the Southern part of Caspian Sea in Iranian waters from 1994-2007. Thesis submitted in fulfillment of the requirement for the degree of Doctor of Philosophy. Universiti sains malaysia.
10. Hasegawa, T., Noda, K., Kumamoto, S., Ando, Y., Yamada, A., Yoshikai, Y., 2000. *Chlorella vulgaris* culture supernatant (CVS) reduces psychological stressinduced apoptosis in thymocytes of mice, Int. Immunopharmacol, Vol. 22,pp. 877-885.
11. Janczyk, P., Franke, H., Souffrant, W. B., 2007. Nutritional value of Chlorella vulgaris: Effects of ultrasonication and electroporation on digestibility in rats. Animal Feed Science and Technology, 132 pp. 163–169.
12. Justo, G. Z., Silva, M. R., Queiroz, M. L. S., 2001.Effects of the green algae *Chlorella vulgaris* on the response of the host hematopoietic system to intraperitoneal Ehrlich ascites tumor transplantation in mice, Immunopharmacol. Immunotoxicol,Vol. 23,pp. 119-132.
13. Konishi, F., Tanaka, K., Himeno, K., Taniguchi, K., Nomoto, K., 1985. Antitumor effect induced by a hot water extract of *Chlorella vulgaris* (CE): resistance to Meth-A tumor growth mediated by CE-induced polymorphonuclear leukocytes, Cancer Immunol. Immunother, Vol. 19, pp. 73-78.
14. Konishi, F., Tanaka, H., Kumamoto, S., Hasegawa, T., Okuda, M., Yano, I., Yoshikai, Y., Nomoto, K., 1990. Enhanced resistance against *Escherichia coli* infection by subcutaneous administration of the hot-water extract of *Chlorella vulgaris* in cyclophosphamide-treated mice, Cancer Immunol.Immunother, Vol. 32, pp. 1-7.

Archive of SID
www.SID.ir

15. Lopez, J. A., Enriquez, F., Pablos, M. N., Huerta, N., Miranda, A., Nieves, M., 2008. Growth and biomass production of cheatoceros mulleri in mass outdoor culture: effect of the hour of the inoculation, size of the inoculums and culture medium.Rev. Invest.Mar, Vol. 29(2), pp. 171-177.
16. Merrett, M. J., Nimer, N. A., Dong, L. F., 1996. The utilization of bicarbonate ions by the marine microalga Nannochloropsis oculata (Droop) Hibberd. Plant Cell Env, Vol, 19. Pp. 478-484.
17. Mijeong, L. J., James, M. G., Jiann, Y .H., 2003. Carbon Dioxide Mitigation by Microalgal Photosynthesis, Bull. Korean Chem. Soc, Vol. 24, No. 12.
18. Morimoto, T., Nagatsu, A., Murakami, N., Sakakibara, J., Tokuda, H., Nishino, H., Iwashima, A., 1995. Anti-tumour-promoting glyceroglycolipids from the green alga *Chlorella vulgaris*, Phytochemistry, Vol. 40, pp. 1433-1437.
19. Morita, K., Matsueda, T., Iida, T., Hasegawa, T., 1999. *Chlorella* accelerates dioxin excretion in rats, J. Nutr, Vol. 129, pp. 1731-1736.
20. Noda, K., Ohno, N., Tanaka, K., Kamiya, N., Okuda, M., Yadomae, T., Nomoto, K., Shoyama, Y., 1996. A water-soluble antitumor glycoprotein from *Chlorellavulgaris*, Planta Med, Vol. 62. pp. 423-426.
21. Okamoto, K., Iizuka, Y., Murakami, T., Miyake, H., Suzuki, T., 1978. Effects of *chlorella* alkali extract on blood pressure in SHR, Jpn. Heart J, Vol. 19 ,pp. 622-623.
22. Pore, R. S., 1984. Detoxification of chlordecone poisoned rats with chlorella and chlorella derived sporopollenin, Drug Chem. Toxicol, Vol. 7, pp. 57-71.
23. Queiroz, M. L. S., Rodrigues, A. P. O., Bincoletto, C., Figueiredo, C. A. V., Malacrida, S., 2003. Protective effects of *Chlorella vulgaris* in lead-exposed mice infected with Listeria monocytogenes, Int. Immunopharmacol, Vol. 3, pp. 889-900.
24. Rousch, J. M., Bingham, S. E., Sommaerfeld, M. R., 2003. Change in fatty acid profiles of thermo-intolerent and thermo tolerant marine diatoms during temperature stress. J. Exp. Mar. Biol. Ecol, Vol. 295, pp. 145-156.
25. Sano, T., Tanaka, Y., 1987. Effect of dried, powdered *Chlorella vulgaris* on experimental atherosclerosis and alimentary hypercholesterolemia in cholesterol-fed rabbits, Artery. 14, pp.76-84.
26. Sano, T., Kumamoto, S., Kamiya, N., Okuda, M., Tanaka, Y., 1988. Effect of lipophilic extract of *Chlorella vulgaris* on alimentary hyperlipidemia in cholesterolfed rats, Artery. 15, pp. 217-224.
27. Singh, A., Singh, S. P., Bamezai, R., 1998. Perinatal influence of *Chlorella vulgaris* (E-25) on hepatic drug metabolizing enzymes and lipid peroxidation, Anticancer Res, Vol. 18, pp. 1509-1514.
28. Tanaka, K., Konishi, F., Himeno, K., Taniguchi, K., Nomoto, K., 1984. Augmentation of antitumor resistance by a strain of unicellular green algae *Chlorellavulgaris*, Cancer Immunol. Immunother, Vol. 17, pp. 90-94.
29. Tanaka, K., Yamada, A., Noda, K., Shoyama, Y., Kubo, C., Nomoto, K., 1997. Oral administration of a unicellular green algae, *Chlorella vulgaris*, prevents stress-induced ulcer, Planta Med, Vol. 63, pp. 465-466.
30. Tsuchida, T., Mashiko, K., Yamada, K., Hiratsuka, H., Shimada, T., Itagaki, Y., Fujinuma, H., Samejima, K., Nakamura, T., Hasegawa, T., Matsubayashi, T., 2003. Clinical Study of gamma-Aminobutyric Acid-rich *Chlorella* for Subjects with High-normal Blood Pressure and Mild Hypertension, J. Jpn. Soc. Nutr. Food Sci, Vol.56, pp. 97-102.
31. Vacek, A., Rotkovska, D., Bartonickova, A., 1990. Radioprotection of hemopoiesis conferred by aqueous extract from chlorococcal algae (Ivastimul) administered to mice before irradiation, Exp. Hematol, Vol. 18, pp. 234-237.
32. Wang, B., Li, Y., Wu, N., Lan, C., 2008. CO2 bio-mitigation using microalgae. Applied Microbiology and Biotechnology, Vol. 79, pp. 707-718.
33. Wen, Z. Y., Chen, F., 2003. Heterotrophic production of eicosapentaenoic acid by microalgae. Biotechnol. Adv, Vol. 21,pp. 273-294.
34. Yasukawa, K., Akihisa, T., Kanno, H., Kaminaga, T., Izumida, M., Sakoh, T., Tamura, T., Takido, M., 1996. Inhibitory effects of sterols isolated from *Chlorella vulgaris* on 12-0-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced inflammation and tumor promotion in mouse skin, Biol. Pharm. Bull, Vol.19, pp. 573-576.

Archive of SID

www.SID.ir