

بررسی تاثیر بی کربنات سدیم بر رشد میکرو جلبک 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، ۲- پژوهشکده اکولوژی دریای خزر، ساری، ایران، صندوق پستی: ۹۶۱

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

۴، ۵- 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 میکرو جلبک‌ها محسوب می‌شود، لذا برای افزایش تولید انبوه، تامین کربن یکی از مراحل مهم در رشد میکرو جلبک‌ها می‌باشد. در این مطالعه اثر بی کربنات سدیم (NaHCO_3) بر رشد میکرو جلبک کلرلا در محیط کشت TMRL(AG) مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور از چهار غلظت بی کربنات سدیم NaHCO_3 (۲/۵، ۵، ۷/۵ و ۱۰ در میلی لیتر) در محیط کشت TMRL(AG) طی ده روز استفاده گردید. نتایج حاصله با غلظت‌های مختلف بی کربنات سدیم که به محیط کشت TMRL(AG) اضافه شده نشان داد که تیمار سوم با غلظت ۷/۵ میلی لیتر، بیشترین رشد را در روز دهم به میزان 119×10^6 تعداد سلول در میلی لیتر داشت. محاسبه نرخ رشد و ضریب رشد ویژه نشان داد رشد سریع‌تر میکرو جلبک کلرلا در محیط کشت تیمار سوم به ترتیب برابر با ۲/۳۰ و ۰/۱۵ بود. با توجه به نتایج به دست آمده استفاده از بی کربنات سدیم در محیط کشت معمولی و ارزان قیمت TMRL(AG) جهت تولید انبوه میکرو جلبک کلرلا و به عنوان محیط کشت اصلاح شده آن توصیه می‌گردد.

کلمات کلیدی: میکرو جلبک کلرلا، بی کربنات سدیم، TMRL(AG)، *Chlorella* sp.

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

مقدمه

میکرو جلبک‌ها اساس زنجیره غذایی را در اکوسیستم‌های آبی تشکیل می‌دهند و در صنایع مختلف کاربرد فراوان دارند و هم‌چنین در آبرزی پروری نیز به عنوان غذای زنده برای رشد نرم تنان، میگو، ماهیان و زئوپلانکتون‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرند. نقش جلبک‌ها در تغذیه نرم تنان از مواردی است که توسط دانشمندان زیادی بحث و بررسی 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). میکرو جلبک 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 میکرو جلبک 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 میکرو جلبک‌ها 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 (حشره کش‌ها، 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 پودر کلرلا به عنوان مکمل غذایی (۱٪) در تغذیه مرغ‌های تخم‌گذار باعث افزایش و کیفیت رنگ تخم مرغ‌ها شده است (Janczyk, et al., 2007). میکرو جلبک‌ها از منابع مختلف، CO_2 مصرفی خود را تامین می‌کنند: CO_2 از اتمسفر، از دودکش‌های صنعتی، از فرم محلول شده کربنات‌ها ($NaHCO_3$ ، Na_2CO_3) که می‌توان به‌طور مستقیم برای تغذیه میکرو جلبک‌ها استفاده کرد (Wang, et al., 2008).

به هر حال بهره‌وری سوخت و ساز و در نتیجه ترکیب میکرو جلبک‌ها 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 گونه‌های میکرو جلبک 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 میکرو جلبک‌ها شامل نور، مواد غذایی، دما و PH است (Rousch, et al., 2003). منبع کربن یک عامل ضروری برای رشد میکرو جلبک‌ها محسوب می‌شود (Wen, et al., 2003) کربن میکرو جلبک‌ها در شرایط

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). هم چنین اکوسیستم آب شیرین سرشار از گونه های متنوع می باشد که می توان اقدام به جداسازی، خالص سازی، تهیه استوک های خالص و محیط کشت مناسب و اختصاصی آن ها گامی بزرگ برای تجاری سازی و استفاده از میکرو جلبک ها در صنایع مختلف برداشت. هدف از این تحقیق تعیین مناسب ترین دوز بی کربنات سدیم در محیط کشت TMRL جهت تولید انبوه میکرو جلبک کلرلا می باشد.

مواد و روش ها

پس از ساخت محیط کشت (AG) TMRL (FeCl_3) (۱ گرم)، NaH_2PO_4 (۵ گرم) و ازت (۵۰ گرم)، ۱۰ سی سی استوک خالص شده میکرو جلبک سبز *Chlorella sp.*، به ارلن های ۲۵۰ سی سی تزریق شد و در یکک اطاق کشت استریل با دمای 25 ± 2 درجه سانتی گراد و با شدت نور 3500 ± 350 لوکس و پریرود نوری یا دوره روشنایی (L) و تاریکی (D) توسط تایمر اتوماتیک به صورت تناوب (۱۲/۱۲): (L/D) ساعت تنظیم گردید (گنجیان، ۱۳۸۹). هوادهی ارلن ۲۵۰ سی سی حاوی میکرو جلبک موجود در محیط کشت (AG) TMRL در هر میز با استفاده از دستگاه پمپ آکواریوم انجام شد. بعد از رسیدن به تراکم مورد نظر، ۴ تیمار در غلظت های مختلف بی کربنات سدیم (NaHCO_3) (۲/۵، ۵، ۷/۵ و ۱۰ در میلی لیتر) جدول (۱) به آن ها افزوده شد. برای هر تیمار، ۳ تکرار در نظر گرفته شد و شمارش تعداد سلول های میکرو-

کشت، CO_2 اتمسفر است که به طور طبیعی در حال حاضر ۳۰۰ پی پی ام است (Devogswami, et al., 2012) لذا برای افزایش محصول در تولید انبوه تامین کربن یکی از مراحل مهم در رشد میکرو جلبک ها می باشد. محیط کشت شرایط مورد نیاز برای رشد طیف وسیعی از جلبک ها را تامین می کند. محیط کشت های مختلف با توجه به گروه های مختلف جلبکی و گونه های مختلف تهیه می گردد و شرایط مورد نیاز جهت رشد آن ها متغیر می باشد (فلاحی و صلواتیان، ۱۳۸۴). با توجه به این که جلبک های مختلف تحت شرایط محیطی متفاوت دارای رشد یکسانی نخواهند بود و با توجه به اهمیت اقتصادی این جلبک ها در زمینه های غذایی، دارویی، ویتامینی، کود بیولوژیک (کود سبز)، و بیودیزل (سوخت سبز) و غیره، ضرورت رشد سریع تر و ارزان تر مورد توجه تولید کنندگان انبوه میکرو جلبک می باشد، از این رو با تغییر بعضی از منابع غذایی می توان میزان رشد و تراکم سلولی را به حداکثر مقدار خود به خصوص در مقادیر انبوه رساند. لذا می بایست مطالعاتی بر روی تاثیر میزان این عناصر روی وارپته ها و گونه های بومی کشورمان صورت گیرد تا بتوان جهت خود کفایی و رفع مشکلات آبی پروی و هم چنین به علت کاربرد بسیار وسیع و ارزش اقتصادی، میکرو جلبک ها و مصارف آن ها در صنایع مختلف دیگر گامی مثبت برداشت. بررسی تنوع گونه ای میکرو جلبک های بومی منطقه و ارزیابی پتانسیل پرورش انبوه، بررسی ارزش غذایی و یافتن کاربرد آن ها در صنایع مختلف می تواند بنیادی ترین تحقیق در آغاز صنعتی شدن کشت و پرورش و استفاده از میکرو جلبک ها باشد. بر اساس مطالعات انجام شده منابع آبی داخلی منبع بسیار مهم و سرشار از میکرو جلبک ها

جدول ۱: غلظت میزان مصرف NaHCO_3 (بی کربنات سدیم)

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

شمارش میکرو جلبک کلرلا در محیط**کشت TMRL(AG) با تیمارهای مختلف**

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

نتایج

نتایج حاصله در مورد غلظت های مختلف بی کربنات سدیم که به محیط کشت TMRL(AG) اضافه شده: محیط کشت تیمار سوم غلظت ۷/۵ میلی لیتر بیش ترین میزان رشد به میزان $10^6 \times 119$ تعداد سلول در میلی لیتر را در روز دهم داشته است. با توجه به شکل ۱ بیش ترین میزان فراوانی میانگین کل مربوط به تیمار سوم می باشد که بیش ترین میزان رشد (۲۷)

جلبک ها ۵ بار در طی ۱۰ روز با میکروسکوپ نوری و لام نئوبار آینه ای انجام گردید.

تعداد واقعی سلول های جلبک در هر تیمار و در هر روز با استفاده از فرمول زیر به دست آمد:

رقت $10 \times 10 \times$ میلی متر مربع / سلول ها = میلی متر مکعب / سلول ها
 = میلی متر مربع / سلول ها
 (میلی متر مربع) وسعت شمارش شده / میانگین سلول های شمارش شده
 $1000 \times$ رقت $5 \times 10 \times$ تعداد نمونه شمارش شده = ML = ۱ سی سی
 (گنجیان، ۱۳۸۹).

ضریب رشد ویژه، سلولی میکرو جلبک

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

$$\mu = K' = \frac{\ln(m_2/m_1)}{t_2 - t_1}; t_2 > t_1$$

m_2 = زی توده در آخرین روز و m_1 = زی توده در اولین روز
 t_1 = اولین روز و t_2 = آخرین روز

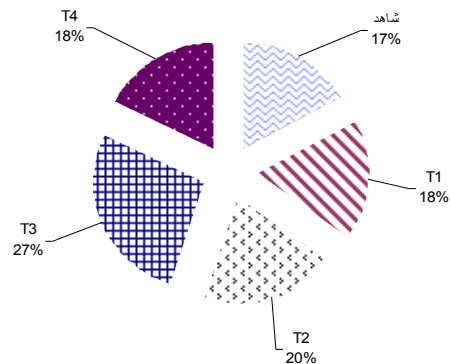
درصد رشد سلولی میکرو جلبک

محاسبه درصدی افزایش تعداد سلول ها از اولین روز تا آخرین روز با استفاده از فرمول زیر محاسبه می شود.

$$k = 3.32 \times 1/t \times (\log N_t - \log N_0)$$

K = نرخ رشد
 N_0 = تعداد سلول های اولیه در زمان شروع آزمایش
 t = زمان (روزها)
 N_t = تعداد سلول ها در زمان t

درصد) میکرو جلبک کلرلا در این تیمار مشاهده گردید.



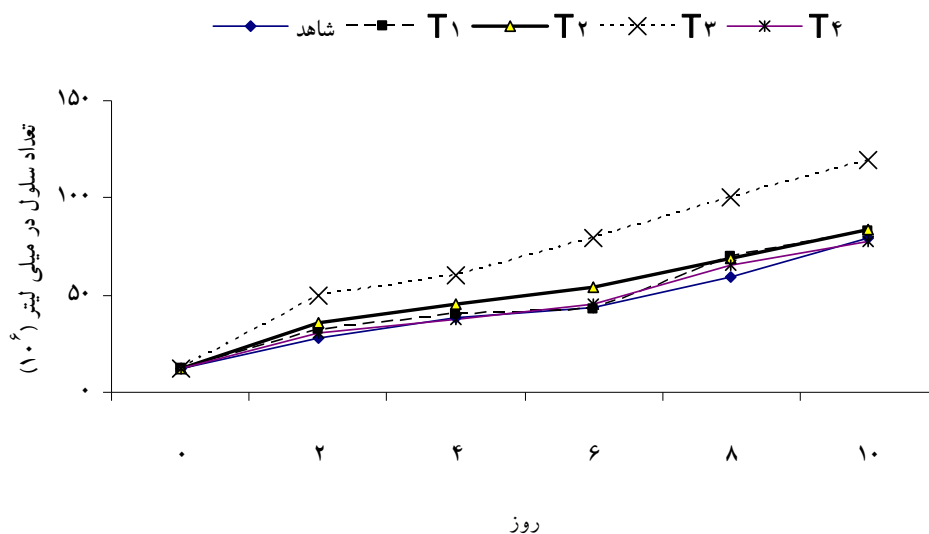
شکل ۱: فراوانی میکرو جلبک کلرلا در تیمارهای مختلف

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

جدول ۲: 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 $27 \pm 2/1$ تعداد سلول در میلی‌لیتر ($\times 10^6$) و در محیط کشت تیمار سوم برابر $50 \pm 2/8$ تعداد سلول در میلی‌لیتر ($\times 10^6$) بوده است در حالی که ضریب تغییرات محیط کشت شاهد $7/71$ درصد و در محیط کشت تیمار سوم برابر با $5/66$ درصد بوده که نشان‌دهنده اختلاف شمارش بین تیمارهای محیط کشت شاهد بوده است. در دومین شمارش (روز چهارم) میزان رشد میکرو جلبک 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 تقریباً دو برابر و به ترتیب $38 \pm 1/4$ و $60 \pm 2/1$ 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 $52/41$ درصد و در محیط کشت تیمار سوم برابر $51/95$ درصد به‌دست آمد (جدول ۳ و شکل ۲).



شکل ۲: تراکم (تعداد سلول در میلی لیتر $\times 10^6$) میکرو جلبک کلرلا در غلظت‌های مختلف پی کربنات سدیم

جدول ۳: مقایسه رشد میکرو جلبک کلرلا (تعداد سلول در میلی لیتر $\times 10^6$) و ضریب تغییرات در تیمارهای مختلف

روزهای شمارش	ضریب تغییرات (CV%)					انحراف معیار $\pm$ میانگین ($\times 10^6$)				
	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 میکرو جلبک‌ها 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 ریز جلبک‌ها شود. میزان تامین اکسیژن و دی اکسید کربن می‌تواند در کشت‌های بزرگ متراکم (تولید انبوه در مقیاس صنعتی) یک عامل محدود کننده باشد. میکرو جلبک‌ها در طول فتوسنتز دی اکسید کربن مصرف کرده و اکسیژن آزاد می‌کنند. بهبود جریان آب یا افزودن حساب شده دی اکسید کربن (CO_2) یا بی کربنات سدیم ($NaHCO_3$) می‌تواند رشد تصاعدی را

طولانی تر کند، اما ایجاد حباب هوا داخل محیط کشتی که حاوی بیش از ۵ درصد دی اکسید کربن است، می تواند بازدارنده باشد. دی اکسید کربن و بی کربنات سدیم هر دو روی پی اچ کشت اثر می گذارند، 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 می شود (حسینی و جلالی، ۱۳۸۸). پرورش تمام آبزیان به خصوص جلبک های دریایی مستلزم وجود اطلاعاتی در رابطه با گونه انتخاب شده، تکنولوژی کشت و پرورش، پاسخ گونه های انتخاب شده به بعضی از پارامترهای محیطی و مشخص نمودن بهترین محیط کشت و مواد مغذی برای آن ها است. رشد هر میکرو جلبک در محیط بسته با افزایش تخلیه مواد مغذی، افزایش pH به وسیله جذب کربن و کاهش CO_2 و افزایش تجمع متابولیت های سلولی همراه می باشد (معصومی و همکاران، ۱۳۸۶). همچنین معصومی و همکاران (۱۳۸۶) نشان دادند که افزودن ویتامین های گروه B در محیط کشت *Tetraselmis suecia* باعث افزایش نرخ رشد گردیده است. همچنین Mijeong و همکاران (۲۰۰۳) نشان دادند که *Chlorella Vulgaris* بدون منبع کربن CO_2 و بی کربنات 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 میکرو جلبک کلرلا در تیمار ۳ به ترتیب ۲/۳۰ و ۰/۱۵ بوده و نسبت به تیمارهای دیگر رشد بیش تری را نشان داده است.

در تحقیق انجام شده توسط فلاحی و صلواتیان (۱۳۸۴) در مورد اثر غلظت های مختلف عنصر کلسیم

بر میزان رشد و زی توده جلبک سبز *Chlorella vulgaris* در محیط کشت Zinder و در طی ۵ روز به این نتیجه رسیده اند که میزان موثر کلسیم برای حداکثر رشد جلبک *Chlorella vulgaris* ۲/۸ میلی گرم در لیتر بود. در این تحقیق افزایش رشد میکرو جلبک کلرلا در تیمار ۳ غلظت ۷/۵ سی سی بی کربنات سدیم بوده است. طبق شکل ۲ و جدول ۳ در تحقیق حاضر با توجه به افزایش بی کربنات 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 میکرو جلبک کلرلا با افزایش غلظت بی کربنات سدیم و بدین معنی که غلظت بالاتر از ۷/۵ بی کربنات سدیم عامل باز دارنده در رشد سلول میکرو جلبک کلرلا می باشد.

در پژوهشی که حیدری و همکاران (۱۳۹۰) انجام دادند اثرات مختلف نیتрат 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 میلی مولار نیترات و آمونیوم) در شرایط آزمایشگاهی انجام گردید. بالاترین تراکم سلول جلبکی $32/5 \times 10^5$ تعداد سلول در میلی لیتر برای نیترات و $25/2 \times 10^5$ تعداد سلول در میلی لیتر برای آمونیوم بود و بیش ترین میزان رشد ویژه ۰/۰۹ در روز برای نیترات و ۰/۰۸ در روز برای آمونیوم از تیمار ۱۵ میلی مولار نیترات و آمونیوم به دست آمد. در این بررسی بیش ترین رشد کلرلا به میزان 119×10^6 تعداد سلول در میلی لیتر در تیمار سوم بوده است. و با توجه به شکل ۲ بیش از ۲۷ درصد رشد میکرو جلبک کلرلا در تیمار سوم اتفاق افتاد و نشان دهنده واکنش مطلوب

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 stress-induced 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.

میکرو جلبک کلرلا در این غلظت می باشد، و برای تولید انبوه با اضافه کردن این غلظت می توان زی توده بیش تری تولید نمود. نظر به اثرات مثبت بی کربنات سدیم بر رشد میکرو جلبک کلرلا در محیط کشت TMRL(AG1) که یک محیط کشت عمومی تغییر یافته و ارزان قیمت می باشد، برای تولید انبوه میکرو جلبک کلرلا توصیه می گردد.

سپاسگزاری

در اینجا بر خود لازم می دانیم تا از کلیه کسانی که ما را در انجام این تحقیق یاری کرده اند سپاسگزاری نماییم.

منابع

۱. حسینی، س.ع.، جلالی، م.ع.، ۱۳۸۸. کاربرد غذای زنده در پرورش آبریان. 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.، یاور، و.، کوچن، پ.، سواری، ا.، ۱۳۸۶. بررسی تاثیر رژیم نوری بر رشد در محیط کشت های *Tetraselmis suecica* میکرو جلبک ویتامینه و فاقد ویتامین. مجله امور دام و آبریان شماره ۷۴، بهار ۱۳۸۶.

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., Rotkowska, 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.