بررسی رشد میکروجلبک *Chlorella* sp. در آب دریا و فاضلاب غیراستریل

شبنم باقری[۱]، سیده زهرا معصومی‌زاده[۲*]

*zmasoomi@yahoo.com

۱-باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، واحد اهواز، دانشگاه آزاد اسلامی، اهواز
۲-گروه شیلات، واحد اهواز، دانشگاه آزاد اسلامی، اهواز، ایران

تاریخ دریافت: تیر ۱۳۹۵ تاریخ پذیرش: اسفند ۱۳۹۵

چکیده

کلرلا از جلبک های سبز و مهم میباشد که به دلیل توان تحمل شرایط نامساعد محیطی در تصفیه فاضلاب از آن استفاده می شود. فاضلاب و پساب به دلیل وجود مواد مغذی می توانند به عنوان یک محیط کشت غنی برای کشت میکروجلبک ها استفاده شوند. از آنجایی که ویتامین‌ها در رشد میکروجلبک ها موثرند، لذا جهت بررسی اثرات ترکیبات ویتامینه (گیلارد، کانوی و ترکیبات گروه B) و نوع آب مورد استفاده در محیط کشت (آب دریا و فاضلاب غیر استریل)، رشد میکروجلبک کلرلا در تیمارهای مختلف ویتامینه و محیط کشت های کانوی و TMRL مورد آزمایش قرار گرفتند. محیط های کشت آب دریا (۵ تیمار) و فاضلاب غیراستریل (۶ تیمار) بودند که هر تیمار دارای ۳ تکرار بوده است. با توجه به بررسی های انجام شده مشخص گردید که در آب دریای استریل شده، رشد کلرلا بین محیط کشت دارای ویتامین (ویتامین‌های گیلارد و ویتامین‌های کانوی) و محیط کشت فاقد ویتامین و همچنین بین محیط کشت کانوی و دیگر تیمارها (محیط کشت TMRL بدون ویتامین و محیط کشت TMRL با ویتامین) اختلاف آماری معنی داری وجود دارد ($p<0/05$)، در حالی که بین تیمارهای محیط کشت TMRL دارای ترکیبات ویتامینه مختلف در آب دریا اختلاف معنی داری وجود ندارند ($p>0/05$). در بین تیمارهای فاضلاب غیراستریل، بین محیط کشت ها اختلاف معنی داری وجود ندارد ($p>0/05$)، یعنی وجود ویتامین ها و همچنین محیط کشت کانوی در محیط غیراستریل باعث افزایش رشد نمی شود.

کلمات کلیدی: کلرلا، آبزی پروری، ویتامین ها، فاضلاب.

---

* نویسنده مسئول

مقدمه

کلرلا یکی از مهمترین ریزجلبک ها است که ساکن آب های شور و شیرین بوده و پراکنش وسیعی داشته و در شرایط سخت نیز مقاوم است (صفری، ۱۳۹۰). کلرلا در آبزی پروری، صنایع دارویی و استخراج مواد موثره نیز مورد استفاده قرار می گیرد (فلاحی و صلواتیان، ۱۳۸۴). افزایش جمعیت و مصرف روز افزون منابع، منجر به تولید ضایعات و پساب بیشتری توسط بشر گردیده است. طوری که پساب ها و چگونگی دفع آن ها از چالش های بشر در عصر جدید می باشد. پسابها به علت مواد تشکیل دهنده آن ها (فضولات انسانی و حیوانی، شوینده ها و ضایعات کشتارگاهی) دارای مقادیر بالایی از مواد مغذی همچون نیتروژن و فسفر می باشند که رهاسازی آن ها در آب های طبیعی می تواند منجر به یوتریفیکاسیون آن ها گردد. لذا تصفیه پساب ها با استفاده از روش های موثر سال هاست که مورد بررسی و پژوهش می باشد. کاربرد ریزجلبک ها برای تصفیه پساب دارای مزایای متعددی است که از آن جمله می توان به عدم ایجاد خطرات زیست محیطی با تکیه بر اصول اکوسیستم های طبیعی، عدم ایجاد آلودگی ثانویه در صورت استفاده از بیومس تولیدی و همچنین توانایی ریزجلبک ها در بازچرخش موثر مواد مغذی موجود در پساب های ثانویه اشاره کرد(Martinez *et al.*, 2000). تصفیه پساب به وسیله کشت های جلبکی علاوه بر اینکه آلودگی اضافی تولید نمی کند، بلکه موجب باز چرخش موثر مواد غذایی شده و ابزاری ارزان و کارآمد برای حذف مواد غذایی و فلزات آلاینده، به خصوص فلزات سنگین می باشد که خود سبب ایجاد ایمنی اکولوژیکی در اکوسیستم های آبی می شود (Tam & Wong, 1986). بسیاری از گونه های جلبکی به آلودگی های موجود در پساب مقاوم هستند، سریعا در محیطی غنی از نیتروژن و فسفر رشد می کنند و با استفاده از این مواد جهت رشد، می توانند موجب حذف نیتروژن و فسفر پساب گردند لذا استفاده از میکروجلبک ها می تواند به عنوان جایگزین فرایند تصفیه ثانویه پساب به منظور حذف مواد مغذی از آن ها بکار گرفته شود. میکروجلبک ها برای انجام فعالیت های خود نیترات و فسفات ها را مصرف کرده و با انجام فرایند فتوسنتز اکسیژن آزاد می کنند. اکسیژن آزاد شده به باکتری های هوازی کمک می کند تا در تجزیه مواد خام فاضلاب ها فعال باشند. فاضلاب ها عمدتا از ضایعات صنعتی و شهری می باشند و دارای ترکیبات آلی و معدنی بسیاری هستند که در آن ها حل شدهاند (افشاری، ۱۳۹۱). El-Sheekh و همکاران (۲۰۰۵) با بررسی رشد گونه *Chlorella* sp. در پساب (فاضلاب پس از تصفیه فیزیکی) نتیجه گرفتند که به تدریج با افزایش زمان و سازگار شدن به شرایط پساب، کلرلا رشد صعودی خود را شروع کرده و در محدوده زمانی روزهای ۱۲-۷ بیشترین رشد خود را نشان داده است. لباب پور (۱۳۹۲) در آزمایشی، کشت ریزجلبک *Chlorella vulgaris* را در فاضلاب شهری برای تولید زیست توده مورد بررسی قرار داد. این آزمایش از ابتدا و انتهای فرایند تصفیه در تصفیه خانه فاضلاب شهری که حاوی مقادیر گوناگونی از مواد غذایی بود کشت داده شد. رشد ریزجلبک به مدت ده روز اندازه گیری شد. بازده زیست توده و حذف همزمان نیتروژن و فسفر از فاضلاب ارزیابی شد و مشخص شد که میزان مواد غذایی موجود در فاضلاب بر رشد ریز جلبک نام برده اثر زیادی داشت. غلظت های زیاد مواد غذایی در ابتدا اثر مهار کنندگی بر رشد ریزجلبک داشته اما پس از مدت زمانی سلول ها به رشد خود در فاضلاب ادامه دادند. برای رشد و تکثیر سریعتر ریزجلبک ها ویتامین هایی به محیط کشت آن ها اضافه می شود. از این ویتامین ها میتوان سیانوکوبالامین، تیامین و بیوتین را نام برد (معصومی زاده، ۱۳۸۳). بدون مصرف کافی از محلول ویتامین ها، بسیاری از گونه های فیتوپلانکتونی رشد نخواهند کرد. بعضی از فیتوپلانکتون ها کاملا به منابع خارجی ویتامین ها وابسته می باشند، در حالی که بقیه قادر به ساختن ویتامین ها هستند. این ویتامین ها به مقدار بسیار کم به عنوان کوآنزیم برای استفاده از ارگانیسم هایی که صرفا رشد اتوتروفیک دارند مورد استفاده قرار می گیرند (رحیمی بشر، ۱۳۷۹). معصومی زاده (۱۳۸۳) اثرات ترکیبات ویتامینه گیلارد و گروه B را در شدت نورهای مختلف بر رشد میکروجلبک *Tetraselmid suisica* بررسی نمود. در شدت نور ۲۵۰۰ lux، ترکیبات ویتامینه گیلارد و گروه B اختلاف آماری معنی داری نداشتند لذا می توان از ترکیب ویتامینه گروه B با هزینه کمتر به جای ترکیب ویتامینه گیلارد با هزینه بیشتر استفاده نمود. فراهم کردن شرایط و محیط غذایی غنی برای رشد سریع میکروجلبک ها از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. با توجه به وجود مواد مغذی در پساب، می توان از آن به عنوان یک محیط کشت ارزان جهت رشد میکروجلبک ها استفاده کرد و علاوه بر نقش عمده میکروجلبک ها در تصفیه فاضلاب شاید بتوان با هزینه کمتر و اضافه نمودن

موادی مانند ویتامینها رشد میکروجلبک ها را افزایش داد. لذا در این تحقیق اثرات ترکیبات ویتامینه در دو محیط کشت غنی کانوی و محیط ساده TMRL در آب دریا و فاضلاب غیر استریل مورد بررسی قرار گرفتند.

مواد و روش ها

در این پژوهش از محیط کشت ساده TMRL استفاده شد. محیط کشت TMRL در دو نوع آب (آب دریای استریل و فاضلاب غیراستریل) و ۳ ترکیب ویتامینه (محلول ویتامینه مورد استفاده در محیط کشت کانوی، گیلارد و محلول ویتامینه گروه B) با سه تکرار در نظر گرفته شد (جدول ۱). ۳ ترکیب ویتامینه بدین شرح می باشد: ۱-ویتامین های مورد استفاده در محیط کشت کانوی (B_1 و B_{12}) ۲-ویتامین های مورد استفاده در محیط کشت گیلارد(B_1 و B_{12} و H) ۳) ویتامین های B complex و B_{12} (۱ ویال B complex و ۱ B12 در ۱ لیتر آب مقطر). ۵۰ cc ریزجلبک به عنوان استوک اولیه در ۴۵۰ cc آب در ظروف ۵۰۰ cc تحت شرایط زیستی یکسان (دمای ۲۵^0C، شوری ۵ ppt، شدت نوری ۲۵۰۰ لوکس، دوره نوری ۱۶ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی) قرار داده شدند. هوادهی با استفاده از پمپ های هواده به صورت شبانه روزی صورت گرفت(معصومی زاده، ۱۳۸۳). شوری آب فاضلاب ۵ ppt توسط دستگاه شوری سنج اندازه گیری شد و با توجه به اینکه شوری استوک کلرلا ۲۵ ppt بود، لذا شوری این جلبک در ۵ مرحله از شوری ۲۵ ppt به ۵ ppt رسانده شد (باقری، ۱۳۹۴). آب فاضلاب تصفیه شده از تصفیه خانه فاضلاب غرب اهواز واقع در چونیبیه تهیه شده و به آزمایشگاه انتقال داده شد. در این آزمایش دو محیط کشت کانوی و TMRL استفاده شد.

جدول ۱: تیمارهای مورد استفاده (V=Vitamin)

Table1: Treatments used (V=Vitamin)

تیمار	آب دریا	فاضلاب غیر استریل
۱	Conway	Conway
۲	TMRL	TMRL
۳	TMRL+V Guillard	TMRL+V Guillard
۴	TMRL+V Conway	TMRL+V Conway
۵	TMRL+V B complex,B_{12}	TMRL+V B complex, B_{12}
۶	-	**فاضلاب بدون محیط کشت و ویتامین**

به طور کلی آب دریا شامل ۵ و فاضلاب غیراستریل شامل ۶ تیمار بود.

مقدار ویتامین های مورد استفاده در استوک محلول اولیه ویتامینهای گیلارد، کانوی و گروه B مطابق جدول ۲ استفاده شد. جهت تهیه محلول ویتامینه گیلارد، از استوک اولیه، ۵ میلی لیتر به یک لیتر آب مقطر اضافهشده، سپس به ۱ لیتر محیط کشت مورد نظر ۱ میلی لیتر از استوک ثانویه گیلارد اضافه می شود (Lavens & Sorgeloose., 1996). در مورد محلول ویتامینه کانوی از استوک محلول ویتامین کانوی به مقدار ۰/۱ میلی لیتر به ۱ لیتر محیط کشت مورد نظر اضافه شد (Gopinathan, 1993). محلول ویتامینه B شامل ۱ آمپول ویتامین B_{12} (۲ میلی لیتر) و ۱ آمپول B complex (۱ میلی لیتر) است که به ۱ لیتر آب مقطر اضافه شد، سپس ۱ میلی لیتر از این استوک ویتامینه به ۱ لیتر محیط کشت مورد نظر اضافه گردید (معصومی زاده، ۱۳۸۳).

جدول ۲: مقادیر انواع ویتامینهای مورد استفاده

Table 2: The values of the types of vitamins used

ویتامین های محیط کشت کانوی		ویتامین های محیط کشت گیلارد		ویتامین های گروه B	
مقدار(میلی گرم)	نوع	مقدار(میلی گرم)	نوع	مقدار(میلی گرم)	نوع
۲۰۰	B_1	۲۰/۰	B_1	۲	B complex
۲۰۰	B_{12}	۰/۱	H	۱	B_{12}
		۰/۱	B_{12}		

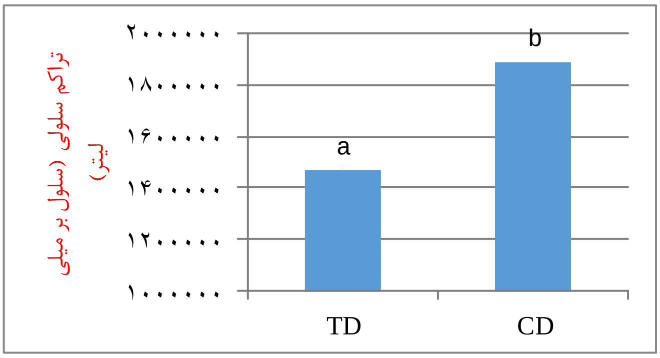
شمارش، میزان رشد و تجزیه و تحلیل آماری: روزانه از تمام تیمارها نمونهبرداری شد و از طریق تعیین افزایش تراک سلولی با استفاده از لام نئوبار با ۳ تکرار شمارش انجام شد. میزان تراکم با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد: (Banerjee *et al*., 2011)

$$\times ۱۰^{۴} \frac{\text{تعداد کل سلول های شمارش شده}}{\text{تعداد بلوک ها}} = \frac{\text{سلول}}{\text{میلی لیتر}}$$

تجزیه و تحلیل داده ها به کمک نرم افزار SPSS19 انجام شد و میانگین تیمارها به کمک آنالیز واریانس یک طرفه (آزمون دنباله ای LSD در One Way ANOVA) با یکدیگر مقایسه شدند که وجود یا عدم وجود اختلاف معنی دار در سطح ۵ درصد تعیین گردید. همچنین در رسم نمودارها و جداول از نرم افزار Excel استفاده گردید.

نتایج

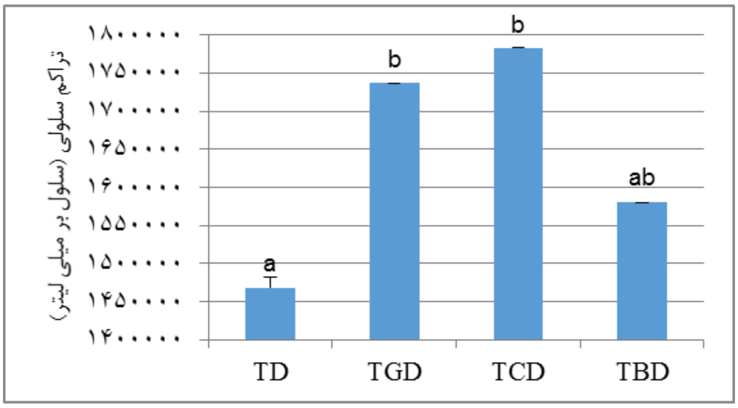
نتایج این تحقیق نشان داد که رشد میکروجلبک کلرلا در محیط کشت کانوی در آب دریا بیشتر از محیط کشت TMRL در آب دریا (تیمار ۱ و ۲ در آب دریا از جدول ۱) بوده است و هر دو تیمار با یکدیگر اختلاف معنی داری داشته اند (نمودار ۱).



نمودار ۱: مقایسه حداکثر رشد ریزجلبک *Chlorella* sp. در محیط کشت TMRL و Conway در آب دریا؛ TD: محیط کشت TMRL در آب دریا (۱۴۶۸۶۶۷ cell/ml)، CD: محیط کشت کانوی در آب دریا (۱۸۸۴۹۳۳ cell/ml)، حروف متفاوت a و b نشان دهنده اختلاف معنی دار است.

Figure 1: Comparison of maximum growth of *Chlorella* sp. in TMRL and Conway culture media in sea water; TD: TMRL culture medium in sea water (1468667 cell/ml), CD: Conway culture medium in sea water (1884933), The different letters a and b represent a significant difference.

مقایسه محیط کشت ها در آب دریا: همانطور که در نمودار ۲ نتایج آزمون LSD نشان داده شده، بین محیط TMRL فاقد ویتامین (TD) و تیمارهای دارای محیط کشت TMRL و ویتامین های گیلارد (TGD)، ویتامینهای کانوی(TCD) و ویتامین‌های گروه B (TBD) اختلاف معنی داری وجود دارد. در حالی که بین محیط کشت های دارای ترکیبات ویتامین های مختلف اختلاف معنی داری وجود ندارد. همچنین رشد در محیط کشت دارای ویتامین های کانوی بیشتر از ۳ تیمار دیگر بوده است.

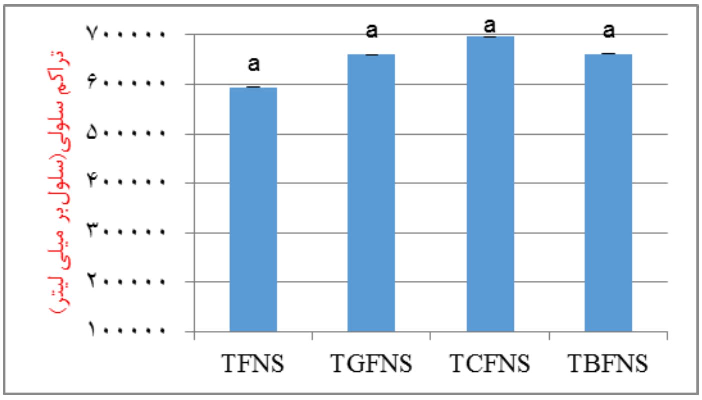


نمودار ۲: مقایسه حداکثر رشد ریزجلبک *Chlorella* sp. در محیط کشت TMRL فاقد ویتامین و دارای ترکیبات ویتامینهای مختلف در آب دریا؛ TD: محیط کشت TMRL فاقد ویتامین (۱۴۶۸۶۶۷ cell/ml)، TGD: محیط کشت TMRL دارای ویتامینهای گیلارد (۱۷۳۶۸۰۰ cell/ml)، TCD: محیط کشت TMRL دارای ویتامینهای کانوی (۱۷۸۳۳۳۳ cell/ml)، TBD : محیط کشت TMRL دارای ویتامینهای گروه B (۱۵۸۰۱۳۳ cell/ml) و آنتنکها در نمودار نشان دهنده انحراف معیار است.

Figure 2: Comparison of maximum growth of *Chlorella* sp. in TMRL of vitamin-free and different multivitamin compounds in sea water; TD: vitamin-free TMRL medium (1468667 cell/ml), TGD: Guillard vitamin TMRL medium (1736800 cell/ml), TCD: Conway vitamin TMRL medium (1783333 cell/ml), TBD: B vitamin group TMRL medium (1580133 cell/ml) and The error bars on the graph represent the standard deviation.

مقایسه محیط کشت ها در آب فاضلاب غیراستریل:

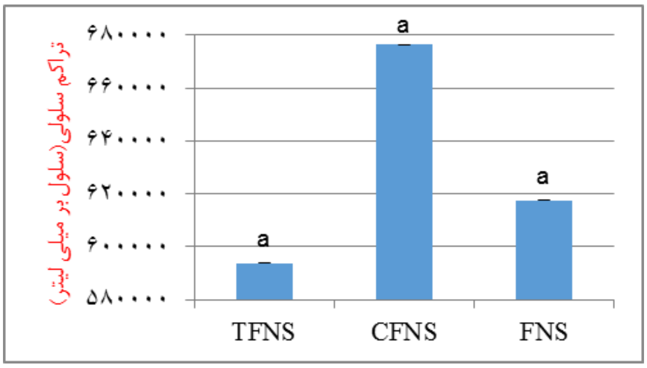
همانطور که در نمودار ۳ نتایج آزمون LSD نشان داده شده بین تمامی محیط کشتها که شامل: محیط کشت TMRL فاقد ویتامین(TFNS)، محیط کشت TMRL دارای ویتامین های گیلارد(TGFNS)، محیط کشت TMRL دارای ویتامین های کانوی(TCFNS) و محیط کشت TMRL دارای ویتامین های گروه B (TBFNS) است اختلاف معنی داری وجود ندارد.



نمودار ۳: مقایسه حداکثر رشد ریزجلبک *Chlorella* sp. در محیط کشت TMRL فاقد ویتامین و دارای ترکیبات ویتامین های مختلف در آب فاضلاب غیراستریل؛ TFNS: محیط کشت فاقد ویتامین (۵۹۳۸۶۶ cell/ml)، TGFNS: محیط کشت دارای ویتامین های گیلارد (۶۶۰۰۰۰ cell/ml)، TCFNS: محیط کشت دارای ویتامین های کانوی (۶۹۶۶۶۶ cell/ml)، TBFNS: محیط کشت دارای ویتامین گروه B (۶۶۱۷۳۳ cell/ml) و آنتنک ها در نمودار نشان دهنده انحراف معیار است.

Figure 3: Comparison of maximum growth of *Chlorella* sp. in TMRL of vitamin-free and different multivitamin compounds in nonsterile wastewater; TFNS: vitamin-free TMRL medium (593866 cell/ml), TGFNS: Guillard vitamin TMRL medium (660000 cell/ml), TCFNS: Conway vitamin TMRL medium (696666 cell/ml), TBFNS: B vitamin group TMRL medium (661733 cell/ml) and The error bars on the graph represent the standard deviation.

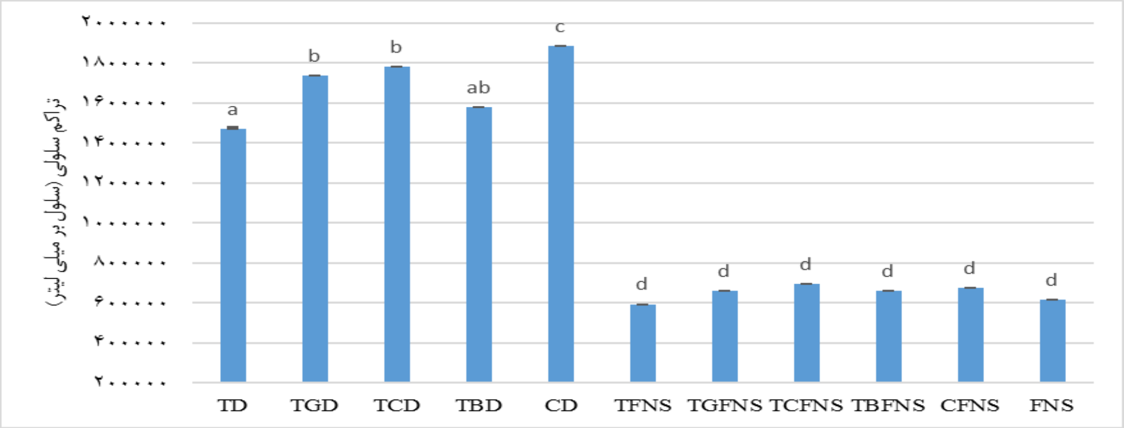
نمودار ۴ نشان می دهد که تیمارها اختلاف معنی داری با یکدیگر ندارند.



نمودار ۴: مقایسه حداکثر رشد ریزجلبک .*Chlorella* sp در تیمارهای مختلف فاضلاب غیر استریل؛ TFNS: فاضلاب غیر استریل محیط کشت TMRL (۵۹۳۸۶۶ cell/ml)، CFNS: فاضلاب غیر استریل دارای محیط کشت Conway (۶۷۶۵۳۳ cell/ml)، FNS: فاضلاب غیراستریل فاقد محیط کشت (۶۱۷۶۰۰ cell/ml) و آنتنک ها در نمودار نشان دهنده انحراف معیار است.

Figure 4: Comparison of maximum microalgae growth *Chlorella* sp. in different treatments of nonsterile wastewater; TFNS: TMRL culture medium nonsterile wastewater (593866 cell/ml), CFNS: Conway culture medium nonsterile wastewater (676533), FNS: nonculture medium nonsterile wastewater (617600 cell/ml) and The error bars on the graph represent the standard deviation.

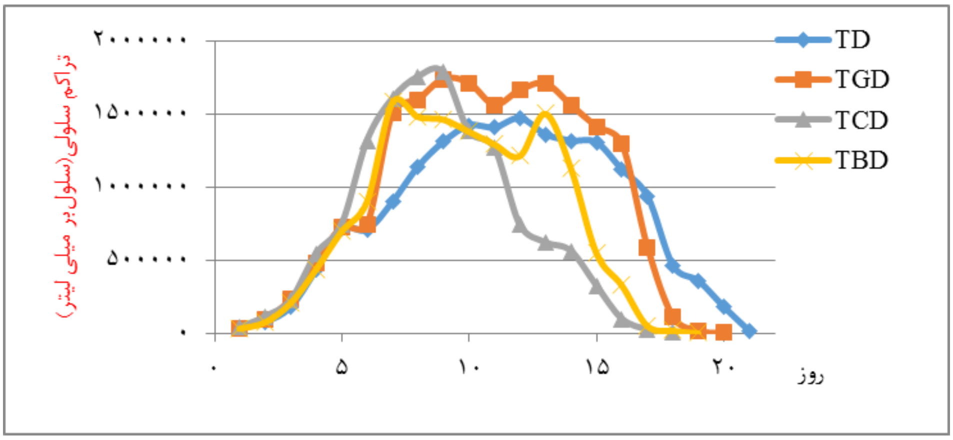
مقایسه محیط کشت ها در آب دریا و فاضلاب غیر استریل: نتایج آزمون LSD در نمودار ۵ نشان می‌دهد که بین کلیه تیمارهای آب دریا و فاضلاب غیراستریل اختلاف معنیداری وجود دارد، در حالی که بین تیمارهای فاضلاب غیراستریل اختلاف معنی داری وجود ندارد. همچنین بین سه تیمار دارای ترکیبات ویتامینه در آب دریا نیز اختلاف معنی‌داری وجود ندارد ولی بین محیط کشت TMRL و کانوی در آب دریا اختلاف معنی‌داری وجود دارد.



نمودار ۵: مقایسه حداکثر رشد ریزجلبک .*Chlorella* sp در آب دریا و فاضلاب غیر استریل؛ تیمارهای آب دریا شامل TD: محیط کشت TMRL، TGD: محیط کشت TMRL دارای ترکیب ویتامینه گیلارد ، TCD: محیط کشت TMRL دارای ترکیب ویتامینه کانوی ، TBD : محیط کشت TMRL دارای ترکیب ویتامین های گروه B، CD: محیط کشت کانوی ، تیمارهای فاضلاب غیر استریل شامل TFNS: محیط کشت TMRL، TGFNS: محیط کشت TMRL دارای ویتامین گیلارد ، TCFNS: محیط کشت TMRL دارای ویتامین کانوی ، CFNS: محیط کشت کانوی ، FNS: فاضلاب غیر استریل و فاقد محیط کشت و آنتنک ها در نمودار نشان دهنده انحراف معیار است.

Figure 5: Comparison of maximum growth of *Chlorella* sp. in sea water and nonsterile wastewater; TD: vitamin-free TMRL medium (1468667 cell/ml), TGD: Guillard vitamin TMRL medium (1736800 cell/ml), TCD: Conway vitamin TMRL medium (1783333 cell/ml), TBD: B vitamin group TMRL medium (1580133 cell/ml); CD: Conway culture medium in sea water (1884933); TFNS: vitamin-free TMRL medium (593866 cell/ml), TGFNS: Guillard vitamin TMRL medium (660000 cell/ml), TCFNS: Conway vitamin TMRL medium (696666 cell/ml), TBFNS: B vitamin group TMRL medium (661733 cell/ml); FNS: nonculture medium nonsterile wastewater (617600 cell/ml) and The error bars on the graph represent the standard deviation.

نمودار ۶ نشان می دهد رشد میکروجلبک کلرلا در محیط کشت دارای ویتامین گیلارد و کانوی تقریبا یکسان است (در نمودار ۲ نیز اختلاف آماری معنی‌داری ندارند) اما در محیط کشت دارای ویتامین گیلارد دیرتر وارد فاز مرگ می شود و ماندگاری در محیط دارای ویتامین‌های گیلارد بیشتر است. همچنین ماندگاری در محیط کشت دارای ویتامین گروه B نیز بیشتر از ویتامین کانوی می باشد. تیمار فاقد ویتامین نسبت به دیگر تیمارهای دارای ترکیبات ویتامینه رشد کمتری داشته است.



نمودار ۶: مقایسه منحنی رشد ریزجلبک *Chlorella* sp. در محیط کشت TMRL فاقد ویتامین و دارای ترکیبات ویتامین های مختلف در آب دریا

Figure 6: Comparison of growth curves of *Chlorella* sp. in TMRL of vitamin-free and different multivitamin compound culture media in sea water

بحث

پساب ها به علت مواد تشکیل دهنده آن (فضولات انسانی و حیوانی، شوینده ها و ضایعات کشتارگاهی) دارای مقادیر زیادی از مواد مغذی همچون نیتروژن و فسفر هستند که جلبک ها میتوانند این ریز مغذی ها را مصرف کرده و رشد خود را افزایش دهند (Mahmut & Sengil, 2003). در این زمینه تحقیقات زیادی توسط محققان انجام گرفته که نشان می دهد سرعت رشد میکروارگانیسم‌ها در محیط های پساب بالا می باشد که علت آن در دسترس بودن مواد مغذی مورد نیاز میکروارگانیسمها است (Azab, 2000; Vasconcelos, 2001). با توجه به عدم وجود آلاینده-های صنعتی و وجود مواد آلی مورد نیاز برای میکروجلبک‌ها (مانند شوینده ها و افزایش مقدار نیترات و فسفات) در فاضلاب خانگی، می‌توان از آن به عنوان محیط کشت مناسبی برای رشد سریع میکروجلبک‌ها استفاده نمود. با وجود مواد مغذی در فاضلاب اثر ویتامین‌ها نیز بر رشد این ریزجلبک در این تحقیق بررسی شده است. ویتامین ها از مواد مورد نیاز برای میکروجلبک‌ها هستند. ویتامین هایی که در آب وجود دارند توانایی جذب شدن توسط سلول های جلبکی را دارند. ویتامین‌های محلول در آب نسبتا پایدار بوده و در نتیجه به مقدار کم مورد نیاز می‌باشند. آن ها باعث کاهش فشار بر جریان بیوسنتز هستند (Settembre *et al*., 2003). برای رشد بسیاری از جلبک های فتوسنتزی که تصور می شود به طور کامل اتوتروف هستند سه ویتامین (B_1، B_{12} و H) ضروری هستند (Murakami *et al*., 2004). نیاز به این سه ویتامین در بسیاری از جلبک ها متفاوت است. نمودار ۲ نشان می‌دهد بین محیط کشت فاقد ویتامین (TD) و محیط کشت های دارای ترکیبات ویتامینه کانوی (TCD) و گیلارد (TGD) اختلاف معنیداری وجود دارد (p<0/05). در حالی که بین هر سه محیط کشت دارای ویتامین از یک‌طرف و همچنین بین محیط کشت دارای ویتامین گروه B و محیط کشت TMRL فاقد ویتامین، اختلاف معنی‌داری وجود ندارد(p>0/05) و محیط کشت TMRL دارای ویتامین کانوی رشد بیشتری نسبت به دیگر تیمارها داشته است. رنجبر و همکاران در سال (۱۳۹۳) نشان دادند که جلبک نانوکلوریسیس در حضور ویتامین ها به خصوص وجود هر سه ویتامین دارای رشد بسیار بالایی می باشد که این امر

احتمالاً به دلیل نقش بیشتر ویتامین بیوتین نسبت به نقش کمتر ویتامین B_{12} در رشد بوده است همچنین آن-ها بیان کردند که امکان دارد باکتری هایی که در کنار جلبک ها هستند تامین کننده ویتامین B_{12} مورد نیاز جلبک باشند که باعث اهمیت کمتر افزودن این ویتامین به محیط کشت می باشد (رنجبر و همکاران، ۱۳۹۳). نتایج این تحقیق نیز نشان داد که بین محیط کشت دارای ویتامین و فاقد ویتامین اختلاف معنی‌داری وجود دارد و ویتامین ها با مقدار بیشتر می توانند باعث افزایش رشد جلبک کلرلا شوند. معصومی زاده و همکاران در سال (۱۳۸۳) نشان دادند که وجود ویتامین تاثیر بسیاری در رشد ریزجلبک تتراسلمیس دارد و در محیط فاقد ویتامین رشد تتراسلمیس بسیار کم شده و بین تیمار دارای ویتامین و فاقد ویتامین اختلاف معنی‌داری وجود دارد که با نتایج تحقیق حاضر مطابقت دارد. در تحقیق حاضر، همانطور که در نمودار ۲ ارائه شده است بین محیط کشت های دارای ترکیبات ویتامینه اختلاف معنی داری وجود ندارد و بالاترین رشد کلرلا در محیط کشت دارای ویتامین کانوی بوده است. همچنین محیط کشت دارای ویتامین‌های گیلارد، ماندگاری بیشتری نسبت به ویتامین‌های کانوی داشته اند زیرا مقدار و تعداد ویتامین‌ها بیشتر از ویتامین های تیمارهای دیگر بوده و تیمار دارای ویتامین های گیلارد دارای هر سه ویتامین بیوتین، تیامین و کوبالامین می‌باشد به همین دلیل دارای رشد و ماندگاری بیشتری (نمودار ۶) نسبت به تیمارهای دارای ترکیبات ویتامینه دیگر است ولی اضافه کردن ویتامینهای گروه B تاثیری بر رشد میکروجلبک در این شرایط نداشته است. مطالعات معصومی زاده و همکاران در سال (۱۳۸۳) بر روی ریزجلبک تتراسلمیس نشان دادند که بین محیط کشت های دارای ترکیبات ویتامینه (شامل ویتامین های گیلارد و ویتامین های گروه B) اختلاف معنی‌داری وجود ندارد و بیان کردند که ویتامین ها دارای اثرات مشابهی بر رشد ریزجلبک تتراسلمیس می‌باشند. آنها استفاده از ویتامینهای گروه B را برای صرفه اقتصادی بهتر پیشنهاد دادند. Li Xin و همکاران در سال (۲۰۱۵) نشان دادند که اضافه کردن مقدار بیشتر ویتامین های تیامین و کوبالامین باعث افزایش رشد جلبک هماتوکوکوس پلوویالیس می‌شود. نتایج آماری در نمودار ۳ نشان می‌دهد که بین تیمارهای دارای ترکیبات ویتامینه و فاقد ویتامین در فاضلاب غیراستریل اختلاف معنی‌داری وجود ندارد. این بدین معنی است که ترکیبات ویتامین های مختلف در محیط غیراستریل تاثیری در افزایش رشد کلرلا نداشته است. در نمودار ۴ نتایج آماری نشان می دهد در فاضلاب غیر استریل اختلاف معنی‌داری بین دو محیط کشت کانوی و TMRL وجود ندارد. این بدین معنی می باشد که محیط کشت کانوی با وجود اینکه دارای مواد غذایی بیشتری است ولی در محیط غیراستریل تاثیری در افزایش رشد کلرلا نداشته است. فاضلاب غیراستریل دارای انواع میکروارگانیسم ها، باکتری‌ها و عوامل آلوده کننده می‌باشد که می توانند باعث کاهش رشد جلبک کلرلا شده باشد. تمامی تیمارهای فاضلاب غیر استریل نسبت به دیگر تیمارهای آب دریا رشد کمتری داشته‌اند. وجود باکتری ها احتمالاً سبب کاهش رشد میکروجلبک کلرلا شده است. ریزجلبک ها می توانند اثرات دیگری بر روی باکتری ها از طریق افزایش pH، افزایش DOC (Dissolved Oxygen Concentration: غلظت اکسیژن محلول) در دمای محیط و ترشح متابولیت های مهار کننده یا فعال کننده داشته باشند. به طور مشابه، بعضی باکتری ها رشد ریزجلبک ها را با تولید متابولیت های خارج سلولی که اثر منفی بر آن ها دارند مهار می کنند (Munoz & Guieysse, 2006). ریزجلبک ها اندازه بزرگتری نسبت به باکتری ها دارند و در نتیجه رشد آن ها کندتر از باکتری ها است. بنابراین حذف مواد آلوده کننده در پساب ها اغلب توسط میزان اکسیژن تولید شده توسط ریزجلبک ها تحت تاثیر قرار می گیرد زیرا به دلیل رشد کندتر ریزجلبک نسبت به باکتری ها اکسیژن تولیدی جواب گوی نیاز جلبک ها نیست که همین امر باعث می شود در پساب غیر استریل که دارای باکتری ها متفاوتی هستند رشد میکروجلبک ها به مقدار قابل ملاحظه ای کاهش بیابند(Munoz & Guieysse, 2006). پساب ها دارای آلاینده‌هایی هستند. ریزجلبک ها نسبت به باکتری های آلاینده حساستر از دیگر میکرواورگانیسم ها هستند و رشد آن ها در حضور ترکیبات آلاینده با تاخیر انجام می گیرد. همچنین فلزات سنگین مهار کننده فعالیت های فتوسنتزی هستند که قادر به ایجاد تغییرات مورفولوژی در شکل و اندازه ریزجلبک ها می باشند به عنوان مثال فرایند تجزیه و تخریب سالیسیلات ها توسط ریزجلبک *Chlorella sorokiniana* در حضور ۲ میلی گرم در لیتر از کاتیون Cu^{2+} به طور کامل مهار می شود. ریزجلبک ها به حضور آلوده کننده‌های آلی نیز حساس هستند. با این حال رشد

ریزجلبک ها توسط ترکیبات و آلوده کننده‌های مختلف و ناشناخته در پساب غیراستریل، مهار شده و یا باعث کاهش رشد آن ها می شود(Munoz & Guieysse, 2006; Hoffman, 1998). به طور کلی نتایج این تحقیق نشان داد که کلرلا در محیط کشت کانوی و در آب دریا بیشترین رشد را داشته است. تیمار فاقد محیط کشت با تیمارهای دارای محیط کشت در فاضلاب غیراستریل نقش مشابهی در رشد کلرلا داشته است. به عبارت دیگر، افزایش مواد مغذی در فاضلاب غیراستریل تاثیری بر رشد نداشته و لذا می توان از فاضلاب به عنوان یک محیط کشت نسبتا غنی برای رشد ریزجلبک ها استفاده کرد. محیط استریل نقش تعیین کننده‌ای در رشد ریزجلبک داشته است. طوری که رشد میکروجلبک در آب دریای استریل بیشتر از محیط کشت غنی کانوی در فاضلاب غیراستریل می باشد که احتمالا به دلیل وجود انواع میکروارگانیسم های آلوده کننده و متابولیت های آنان، رشد ریزجلبک محدودشده است. نتایج نشان دادند که رشد در فاضلاب غیراستریل در محیط کشت های دارای ترکیبات مختلف ویتامین مشابه است. در محیط استریل آب دریا در محیط کشت کانوی بیشترین رشد را داشته و اضافه نمودن ترکیبات مختلف ویتامینه تاثیر مشابهی بر رشد کلرلا داشته است. لذا می‌توان ویتامین‌های گروه B را با هزینه کمتر جایگزین ترکیبات ویتامینه گیلارد و کانوی نمود. در صورتیکه اضافه کردن محیط کشت غنی کانوی و یا ویتامین‌ها تاثیری بر رشد کلرلا نداشته اند. به طور کلی، استریل کردن محیط تاثیر بیشتری بر رشد ریزجلبک داشته است طوریکه می‌تواند مانع از بروز اثر محیط کشت و ویتامین‌ها بر رشد شود. همچنین نتایج این تحقیق نشان داد که رشد در کلیه تیمارهای فاضلاب غیراستریل کمتر از آب دریای استریل شده بوده است لذا از نظراقتصادی رشد این میکروجلبک در آب دریای استریل شده به صرفه تر است.

منابع

افشاری، ع.، ۱۳۹۱. بررسی میزان اسید چرب در چهار گونه ریز جلبک *نانوکلوروپسیس*، *تتراسلمیس*، *کلرلا*، *کیتوسروس* به عنوان سوخت زیستی. پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه واحد علوم و تحقیقات خوزستان.

بونی، ا.دی. ترجمه رحیمی بشر، م.، ۱۳۷۹. فیتوپلانکتون. انتشارات شهر سبز. ۲۱۸صفحه.

باقری، ش.، ۱۳۹۴. بررسی اثر ویتامین ها بر رشد ریزجلبک *Chlorella sp.* پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد اهواز. ۱۵۲صفحه.

رنجبر، ا.، پقه، ا.، کاهکش، ش. و ذبایح نجف آبادی، م.، ۱۳۹۳. بررسی تاثیر وجود ویتامین های تیامین، کوبالامین و بیوتین در محیط کشت های کانوی بر رشد جلبک *Nannochloropsis oculata*. اولین همایش ملی آبزیان و توسعه آبزی پروری دانشگاه آزاد اسلامی واحد اهواز، اهواز.

صفری، ر.، ابطحی، ب. و طیبی، پ.، ۱۳۹۰. بررسی اثرات بازدارندگی عصاره جلبک *Chlorella vulgaris* روی باکتری *Bacillus subtilis* در محیط کشت آزمایشگاهی. مجله علمی پژوهشی علوم و فناوری غذایی، صفحات ۳۳-۲۷.

صلواتیان، س.م.، آذری تاکامی، ق.، کیوان، ا.، وهابزاده، ح. و رجبی نژاد، ر.، ۱۳۸۵. ارزیابی رشد و زیتوده جلبک *Nannochloropsis oculata* در محیط کشتهای مختلف. مجله علوم دریایی ایران، دوره پنجم، شماره۱و۲، صفحات ۵۳-۴۳.

فلاحی، م. و صلواتیان، س.م.، ۱۳۸۴. بررسی اثر غلظت های مختلف عنصر منیزیم بر میزان رشد و بیوماس جلبک سبز *Chlorella vulgaris*. پژوهش و سازندگی در امور دام و آبزیان، شماره۷۲، صفحات ۱۳-۹.

لباب پور، ع.، ۱۳۹۲. کشت ریز جلبک *کلرلا ولگاریس* در فاضلاب شهری برای تولید زیست توده، اولین همایش تخصصی زیست پالایی، تهران، دانشگاه شریف، مرکز همکاریهای فناوری و نوآوری ریاست جمهوری،http://www.civilica.com.

معصومی زاده، س.ز.، ۱۳۸۳. بررسی روند رشد برخی فیتوپلانکتون های بومی استان خوزستان در شرایط آزمایشگاهی. پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشکده علوم دریایی و اقیانوسی، دانشگاه شهید چمران اهواز. سال ۱۳۸۴. صفحات ۴۸-۱۱.

معصومی زاده، س.ز.، یاوری، و. کوچنین، پ. و سواری، ا.، ۱۳۸۶. بررسی تاثیر رژیم نوری بر رشد میکروجلبک *Tetraselmis suecica* در محیط کشت ویتامینه و فاقد ویتامینه. پژوهش و سازندگی در امور دام و آبزیان، شمار۷۴، صفحات ۱۳۹-۱۳۰.

Azab, M.S., 2000. Reuse of wastewater of food industry for the production of fungal biomass and enzymes for the bio treatment of wastewater. Egyptian Journal of Environmental Research, 7: 163-179.

Banerjee, S., Hew, W.E., Khatoon, H. and Shariffi, M., 2011. Growth and proximate composition of tropical marine *Chaetoceros calcitrans* and *Nannochloropsis oculata* cultured outdoors and under laboratory condition. African Journal of Biotechnology, 10(8): 1375-1383.
DOI: 10.5897/AJB10.1748

Gopinathan, C.P., 1993. Hand book on aqua farming live feed. The Marine Products Export Development Authority.61 p.

Hoffman, J.P., 1998. Wastewater treatment with suspended and non-suspended algae. Journal of Phycology, 34(5): 757-763. DOI: 10.1046/j.1529-8817.1998.340757.x

Lavens, P. and Sorgeloos, P., 1996. Manual on production and use of live food for aquaculture. FAO fisheris technical peper No.361, FAO, Rome, Italy. 295 p.

Li Xin, Li., Song, Z.W., Duan, S.S., Luo, K.J., Li, T., Tang E.K. and Wang, Q.X., 2015. Effect of vitamin B_1 and vitamin B_{12} on the Growth and Carotenoid Content of *Haematococcus pluvialis* CH-1. Advance Journal of Food Science and Technology 7(9): 709-711.

Mahmut, O. and Sengil, I.A., 2003. Enhancing phosphate removal from wastewater by using polyelectrolytes and clay injection. Journal of Hazardous Material, 100(1-3): 131- 146.
DOI: 10.1016/S0304-3894(03)00070-0

Martinez, M.E., Sanchez, S., Jimenez, J.M., Yoysfi, F.E. and Munoz, L., 2000. Nitrogen and phosphorus removal from urban wastewater by the microalgae *Scenedesmus obliquus*. Bioresource Technology, 73: 263-272.

Munoz, P., and Guieysse, B., 2006. Algal-bacterial processes for the treatment of hazardous contaminants: a review. Water Research 40: 2799-2815.

Murakami, A., Miyashita, H., Iseki, M., Adachi, K. and Mimuro, M., 2004. Chlorophyll *d* in an epiphytic cyanobacterium of red algae. Science, 303(5664)**:**1633.
DOI: 10.1126/science.1095459

Settembre, E., Begley, T.P. and Ealicak, S.E., 2003. Structural biology of enzymes of the thiamin biosynthesis pathway. Current Opinion Structural Biology, 13: 739-747.

Vasconcelos, V.M. and Pereira, E., 2001. Cyanobacteria diversity and toxicity in wastewater treatment plant (Portugal). Water Research, 35:1354-1357.

Comparative study of the growth of microalgae *Chlorella* sp. in marine water and non-sterile wastewater

Bagheri S.[1]; Masoomizadeh S.Z.[2*]

*zmasoomi@yahoo.com

1-Young Researchers and Elite Club, Ahvaz Branch, Islamic Azad University, Ahvaz
2-Department of Aquaculture, Ahvaz Branch, Islamic Azad University, Ahvaz

Abstract

Chlorella is important green algae that can be used for bioremediation of wastewaters. It can highly tolerate adverse environmental condition. Wastewaters contain high levels of nutrients which can be used as appropriate mediums for algal culture. In this study the effects of using vitamins on the growth of microalgae *Chlorella* sp. were investigated in marine water and wastewater using various mediums including Guillard, Conway, TMRL and B complex medium. Culture mediums with seawater and wastewater had 5 and 6 different treatments, respectively. Each treatment was replicated tree times. According to the investigations it was found that there are significant differences in *Chlorella* growth in sterilized seawater, between the medium with Gillard vitamins and Conway vitamins and medium without vitamin and also between Conway medium and other treatments, including culture mediums containing vitamin compounds and no vitamins, while are not significant between the treatments with vitamin compounds and as well as between B vitamins medium and medium without vitamin in seawater. Significant difference was not found between treatments in non-sterile wastewater (p>0/05). Therefore, adding vitamin compounds or using Conway medium did not lead to a significant increase in the growth of *Chlorella* sp. in non-sterile wastewater.

Keywords: *Chlorella* sp., Aquaculture, Vitamins, Wastewater

*Corresponding author