بررسی روند رشد میکروجلبک سبز *Chlorella vulgaris* در شرایط میکسوتروف و اتوتروف درآزمایشگاه به منظور تولید بیودیزل

فرانک سلطان محمدی و شیلا صفائیان*

گروه بیولوژی دریا، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۰۱/۲۷ تاریخ پذیرش:۱۳۹۴/۰۶/۱۱

چکیده

روغن به دست آمده از میکروجلبک ها به این دلیل که می‌توانند به راحتی به اسیدهای چرب متیل استر یا هیدروکربن‌های بیودیزل تبدیل شوند یکی از منابع مهم انرژی به شمار می‌آیند. هدف از این تحقیق بررسی روند رشد میکروجلبک سبز کلرلا ولگاریس در شرایط آزمایشگاهی میکسوتروف و اتوتروف به منظور یافتن شرایط بهینه در تولید بیودیزیل می‌باشد. جهت بررسی و مقایسه روند رشد سلولی کلرلا ولگاریس مقایسه از محیط‌های TMRL (AG) و TX در چهار تیمار و سه تکرار طی ده کشت روز استفاده شد. درهر تیمار، شمارش کلرلا ولگاریس هر دو روز یکبار و در مجموع ۵ بار شمارش انجام شد. نتایج نشان داد در دهمین روز شمارش سلولی میکروجلبک کلرلا میانگین رشد سلولی (تعداد سلول در میلی لیتر) میکروجلبک کلرلا در محیط‌های کشت مختلف نشان از بیشترین رشد سلولی ۱۰۶×۱۱۸/۱ (تعداد سلول در میلی‌لیتر) در محیط کشت TMRL(AG) در شرایط اتوتروف و $۱۰^{۶}$×۱۱۵/۳ در شرایط میکسوتروف، کمترین تعداد سلولی نیز در محیط کشت TX شرایط میکسوتروف به میزان $۱۰^{۶}$ ×۷۷/۴ (تعداد سلول در میلی‌لیتر) به ثبت رسید. در دهمین روز شمارش، رشد سلولی، بین محیط‌های کشت مختلف دارای اختلاف معنی‌دار بوده است (P<۰/۰۵). همچنین محاسبه نرخ رشد و ضریب رشد ویژه نشان‌دهنده رشد سریع‌تر میکروجلبک کلرلا در محیط کشت TMRL(AG) نسبت به محیط کشت TX می‌باشد. میزان درصد روغن در محیط کشت TMRL(AG) در شرایط میکسوتروف و اتوتروف به ترتیب، ۴/۲۲ و ۱/۲۱ بوده است. با توجه به نتایج به دست آمده برای تولید انبوه میکروجلبک کلرلا و استفاده آن در صنعت بیودیزل محیط کشت TMRL(AG) در شرایط میکسوتروف به دلیل رشد سلولی زیاد، روغن بالاتر و هزینه پایین‌تر توصیه می‌گردد.

واژگان کلیدی: میکروجلبک، *Chlorella vulgaris*، میکسوتروف، اتوتروف، بیودیزل

*نگارنده پاسخگو: shila2462462@yahoo.co.in

مقدمه

میکروجلبک‌ها کارخانه‌های سلولی وابسته به نور هستند که ضمن انجام عمل فتوسنتز، دی‌اکسید کربن را به سوخت‌های زیستی (Biofuels) و سایر ترکیبات ارزشمند تبدیل می‌نمایند. میکروجلبک‌ها اثر فتوسنتزی بالاتر، تولید توده زنده بیشتر و سرعت رشد بسیار بالاتری در مقایسه با کلیه گیاهان مصرف‌کننده دی‌اکسید کربن دارند (Meher *et al*., 2006 ; گنجیان، ۱۳۸۹). ریزجلبک‌ها در تولید طیف گسترده‌ای از متابولیت‌ها مانند پروتئین، چربی، کربوهیدرات، کاروتنوئید و ویتامین‌ها با کاربرد در زمینه‌های سلامتی، غذا و تغذیه، مواد افزودنی، مواد آرایشی، بهداشتی و تولید انرژی مورد استفاده قرار می‌گیرند (Wawrik & Harriman, 2010; Priyadarshani & Rath, 2012). میکروجلبک‌ها قادر به تولید انواع مختلفی از سوخت‌های بیولوژیکی تجدید پذیر مانند متان که از هضم بی‌هوازی بیوماس جلبکی به وجود می‌آید (Spolaore *et al*., 2006) و بیودیزل که از روغن میکروجلبک‌ها مشتق می‌شود، می‌باشند (Sawayama *et al*., 2006; Dunahay *et al*.,1996).

بیودیزل به انواع روغن‌های الکیل استر با رشته‌های طویل گفته می‌شود. در برخی از موارد بیودیزل از لحاظ تکنیکی به ترکیب منوالکیل استر گفته می‌شود (Sawayama *et al*., 2010). بیودیزل را می‌توان از دانه‌ها، گیاهان، باکتری‌ها، قارچ‌ها، جلبک‌ها و روغن‌های حیوانی به دست آورد. از این میان، میکروجلبک‌ها به دلیل سرعت رشد بالا، غیر فصلی بودن تولیدات و همچنین قابل برداشت بودن آنها به طور روزانه، دارای اهمیت بیشتری است (Kapdan & Kargi, 2006). در بین میکروجلبک‌ها، جلبک سبز تک سلولی *Chlorella vulgaris*، دارای زندگی اتوتروفی و میکسوتروفی بوده و از نظر کیفیت و کمیت از بهترین انواع در تولید بیودیزل محسوب می‌شود (Ngangkham *et al*., 2012). این جلبک به راحتی در آزمایشگاه به میزان زیاد قابل تکثیر است و دارای وزن خشک بالا و لیپید بیشتر در مقایسه با سایر موارد است. جلبک کلرلا در شرایط طبیعی در حدود ۳۰ تا ۴۰ درصد وزن خشک، توانایی تولید لیپید دارد (Weibao *et al*., 2011). در سال ۲۰۱۱ Makarevičienė و همکاران دو میکروجلبک سبز *Chlorella* sp. و *Scenedesmus* sp. را از دریاچه‌های لیتوانی جدا سازی نموده و با هدف به دست آوردن شرایط مطلوب برای کشت و افزایش زی‌توده برای تولید سوخت‌های زیستی، مورد بررسی قرار دادند. Ngangkham و همکاران (۲۰۱۲) نشان دادند که جنس کلرلا در هر سه شرایط فتوتروفی، میکسوتروفی و هتروتروفی به طور وسیعی در تولید بیودیزل کاربرد دارد. هدف از تحقیق حاضر بررسی روند رشد میکروجلبک سبز کلرلا در شرایط میکسوتروف و اتوتروف و مقایسه و ارزیابی رشد سلولی میکروجلبک کلرلا در محیط‌های کشت مختلف برای به دست آوردن شرایط بهینه کشت این جلبک در تولید بیودیزل می‌باشد.

مواد و روش‌ها

سلول‌های ذخیره‌ای (استوک خالص) میکروجلبک کلرلا ولگاریس از گروه پژوهشی شیلات و آلاینده‌های آبی خزر (کاسپین) تهیه گردید. در این بررسی، محیط کشت TMRL(AG) شامل NaH_2PO_4 =۵ g ،N =۵۰ g و $FeCl_3$ = ۱ g (گنجیان و همکاران ۱۳۹۱) مورد استفاده قرار گرفت.

محیط کشت TX به ترتیب زیر آماده شد (Liang *et al*., 2009):

$MgSO_4.7H_2O$ = ۰/۰۷۵g
$CaCl_2.2H_2O$ = ۰/۰۷۵g
$NaNO_3$ = ۰/۰۲۵g
$K2HPO_4$ = ۰/۱۷۵ g
$KH_2PO4,0$= ۰/۲۵ g
NaCl = ۰/۰۲۵g
Proteose Pepton (Difco) = ۱g

به هر دو محیط کشت در شرایط میکسوتروف، ۱ گرم گلوکز اضافه شد و کلیه مواد در ۱ لیتر آب حل شده و در دستگاه اتوکلاو به مدت ۱ ساعت و دمای ۱۲۱/۶ درجه سانتی‌گراد استریل شدند (گنجیان، ۱۳۸۹). محیط کشت‌ها به ارلن‌های ۲۵۰ میلی لیتری منتقل شدند و به هر کدام ۱۰ میلی لیتر استوک خالص میکروجلبک سبز *Chlorella* تزریق شد و در اطاق کشت استریل با دمای ۲±۲۷ درجه سانتی‌گراد و با شدت نور ۳۵۰±۳۵۰۰ لوکس قرار داده شدند. برای تیمار دارای محیط کشت میکسوتروف دوره روشنایی (L) و تاریکی (D) ۱۲:۱۲ ساعت و برای تیمار اتوتروف نور به صورت دائم تنظیم گردید. هوادهی ارلن‌ها با استفاده از دستگاه پمپ آکواریوم مرکزی انجام شد. هر تیمار دارای ۳ تکرار بود و کشت به مدت ۱۰ روز ادامه یافت. به منظور تعیین مناسب‌ترین محیط کشت و شرایط رشد سلولی میکروجلبک کلرلا شمارش ۵ بار در طی ۱۰ روز با میکروسکوپ نوری و لام نئوبار آینه‌ای انجام گردید.

ضریب رشد ویژه

برای محاسبه سرعت رشد (ضریب رشد ویژه) (μ) Specific Growth Rate (SGR) در روزهای مختلف از رابطه (۱) استفاده شد:

$$SGR= (lnw2-lnw1)/(t2-t1) \quad (۱)$$

در این رابطه W2= تعداد سلول در آخرین روز، W1= تعداد سلول در اولین روز، T1= اولین روز و T2= آخرین روز می‌باشد.

نرخ رشد

با مشخص شدن مرحله نهایی، نرخ رشد با استفاده از رابطه (۲) محاسبه شد (گنجیان و همکاران، ۱۳۹۱):

$$K=(lnN_t-lnN_0)/t \quad (۲)$$

در این رابطه:

K = نرخ رشد

N_0 = تعداد سلول‌های اولیه در زمان شروع آزمایش

t = زمان (روزها)

N_t = تعداد سلول‌ها در زمان t

شمارش میکروجلبک کلرلا در محیط‌های کشت مختلف

تعداد سلول‌های کلرلا در محیط‌های کشت مختلف طی ۱۰ روز و هر دو روز یک بار و در مجموع ۵ بار شمارش شد. طرح کلی این تحقیق در قالب طرح کاملاً تصادفی (Completery Randomyzed Design) انجام شد و کلیه اطلاعات به وسیله آنالیز واریانس یکطرفه و تست Duncan برای مقایسه میانگین‌ها مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. کلیه عملیات مربوطه به وسیله نرم افزار SPSS ۱۸ مورد سنجش قرار گرفت.

نتایج

شمارش میکروجلبک کلرلا در محیط‌های کشت مختلف

میانگین، انحراف‌معیار، ضریب تغییرات، کمترین و بیشترین تعداد سلول‌های کلرلا در محیط‌های کشت مختلف در طی در جدول (۱) ارائه شده‌است.

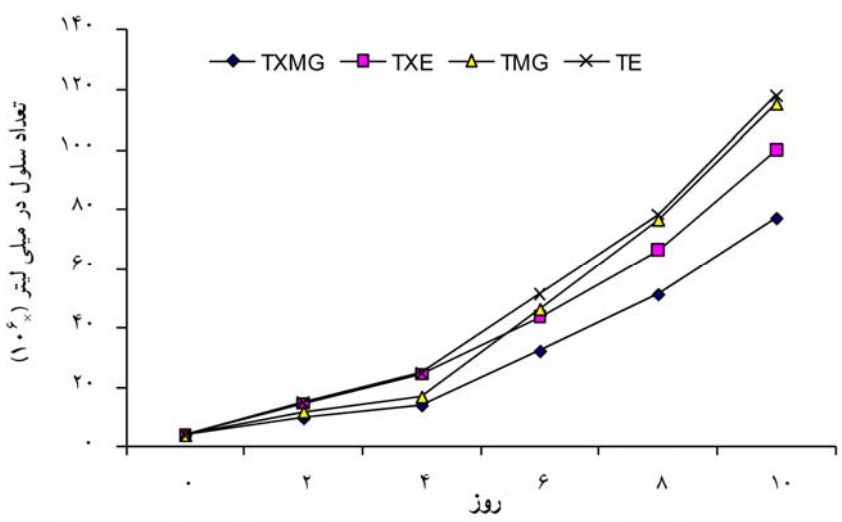
شرایط میکسوترف محیط‌های کشت TX و TMRL(AG)

شرایط میکسوتروف (۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی) با اضافه کردن گلوکز به محیط‌های کشت آماده شد، بر اساس نتایج حاصل از این بررسی بعد از دو روز و در اولین روز شمارش، میانگین رشد سلولی میکروجلبک کلرلا در محیط‌های کشت TXMG و TMRL(AG) به ترتیب $۱۰^۶\times$ ۰/۵۸$\pm۱۰^۶\times$ ۹/۷ و ۱۰۶× ۰/۵۸$\pm۱۰^۶\times$ ۱۱/۸ تعداد سلول در میلی‌لیتر بود و محیط کشت TMRL(AG) بیشترین

رشد سلولی را داشت. ضریب تغییرات در محیط کشت TXMG برابر با ۴/۸ درصد نسبت به محیط کشت TMRL(AG) برابر با ۱۴/۴ درصد، کمترین درصد تغییرات را داشته است (جدول ۱). ضریب تغییرات در دهمین روز شمارش در محیط کشت TXMG برابر با ۰/۱ درصد نسبت به محیط کشت TMRL(AG) برابر با ۰/۶ درصد، کمترین درصد تغییرات را داشته یعنی بین تکرارها اختلاف زیادی وجود نداشته است و ضریب تغییرات در هر دو محیط کشت نسبت به روزهشتم شدیداً کاهش نشان داده است و نشان‌دهنده نزدیک بودن داده (تعداد سلول میکرو جلبک کلرلا) بین تکرارها بوده است (شکل ۱ و جدول ۱).

شرایط اتوتروف محیط‌های کشت TX و TMRL(AG)

شرایط اتوتروف (روشنایی‌کامل) بدون گلوکز در محیط‌های کشت صورت گرفت. در اولین روز شمارش بعد از دو روز رشد سلولی میکروجلبک کلرلا در محیط‌های کشت TX و TMRL(AG) به ترتیب $۱۵/۰ \times ۱۰^{۶} \pm ۰/۳۲ \times ۱۰۶$ و $۱۴/۶ \times ۱۰^{۶} \pm ۰/۲۷ \times ۱۰^{۶}$ تعداد سلول در میلی‌لیتر بوده است. محیط کشت TMRL(AG) بیشترین رشد سلولی را داشته است هر چند اختلاف چندانی از نظر رشد سلولی میکروجلبک کلرلا در دو محیط کشت مختلف مشاهده نگردید (شکل ۱ و جدول ۱). ضریب تغییرات در محیط کشت TX برابر با ۱/۸ درصد نسبت به محیط کشت TMRL(AG) برابر با ۲/۲ درصد، کمترین درصد تغییرات را داشته یعنی بین تکرارها اختلاف زیادی وجود نداشته است (شکل ۱ و جدول ۱). پنجمین شمارش در دهمین روز رشد سلولی میکروجلبک کلرلا در محیط‌های کشت TX و TMRL(AG) نسبت به روز هشتم افزایش رشد سلولی داشت و نشان دهنده ادامه مرحله فاز رشد می‌باشد و به ترتیب $۱۱۸/۱ \times ۱۰^{۶} \pm ۰/۴۰ \times ۱۰^{۶}$ و $۹۹/۸ \times ۱۰۶$ $\times ۱۰^{۶} \pm ۰/۶۰$ تعداد سلول در میلی‌لیتر بوده است. محیط کشت TMRL(AG) بیشترین رشد سلولی نسبت به محیط کشت TX را داشته‌است (شکل ۱ و جدول ۱).



محیط کشت TMRL(AG) میکسوتروف با گلوکز = TMG
محیط کشت TX میکسوتروف با گلوکز = TXMG
محیط کشت TMRL (AG) اتوتروف بدون گلوکز = TE
محیط کشت TX اتوتروف بدون گلوکز = TXE

شکل ۱- منحنی روند تغییرات جمعیت میکروجلبک کلرلا (تعداد سلول در میلی‌لیتر ×۱۰۶) در تیمارهای مختلف در ده روز شمارش

ضریب تغییرات در محیط کشت TX برابر با ۰/۴ درصد نسبت به محیط کشت TMRL(AG) برابر با ۰/۵ درصد، بیشترین درصد تغییرات را داشته و هر دو محیط کشت نسبت به روز هشتم کاهش ضریب تغییرات را داشته‌اند و نشان‌دهنده کاهش تغییرات رشد سلولی در تکرارهای تیمارها در دهمین روز شمارش بوده‌است (شکل ۱ و جدول ۱)

جدول ۱- انحراف معیار± میانگین، بازه (حداقل- حداکثر) و ضریب تغییرات میکروجلبک کلرلا (تعداد سلول در میلی‌لیتر×$۱۰^{۶}$) در تیمارهای مختلف طی ۱۰ روز

محیط‌های کشت / روز	TXMG	TXE	TMG	TE
	±SD میانگین (حداقل- حداکثر)	±SD میانگین (حداقل- حداکثر)	±SD میانگین (حداقل- حداکثر)	±SD میانگین (حداقل- حداکثر)
۲	۹/۷±۰/۶۰ ۱۰-۹	۱۴/۶±۰/۲۷ ۱۵-۱۴	۱۱/۸±۱/۷۰ ۱۷-۱۶	۱۵/۰±۰/۳۲ ۱۵-۱۴
CV%*	۵/۹	۱/۸	۱۴/۴	۲/۲
۴	۱۴/۰± ۰/۰ ۱۴-۱۴	۲۴/۴±۰/۱۸ ۲۵-۲۴	۱۶/۹±۰/۱۸ ۱۷-۱۶	۲۴/۹±۱/۸ ۲۵-۲۴
CV%*	۰/۰	۰/۷	۱/۰	۰/۷
۶	۳۲/۳ ±۱/۴ ۳۳-۳۱	۴۳/۸±۰/۹۹ ۴۴-۴۳	۴۶/۳± ۰/۹۹ ۴۷±۴۵۶	۵۱/۴±۶/۰ ۵۲-۵۱
CV%*	۴/۴	۲/۳	۱/۲	۱/۲
۸	۵۱/۴±۴/۸ ۵۴-۴۸	۶۶/۴±۵/۸ ۷۰-۶۲	۷۶/۵±۳/۲ ۷۸-۷۴	۷۸/۴±۱/۶۰ ۷۹-۷۷
CV%*	۹/۳	۸/۸	۱/٤	۲/۰
۱۰	۷۷/۱±۰/۶۱ ۷۷-۷۷	۹۹/۸±۰/۴۰ ۱۰۰-۹۹	۱۱۵/۳±۰/۷۱ ۱۱۵-۱۱۴	۱۱۸/۱±۰/۶۰ ۱۱۸-۱۱۷
CV%*	۰/۱	۰/۴	۰/۶	۰/۵

محیط کشتTX میکسوتروف با گلوکز = TXMG
محیط کشتTX اتوتروف بدون گلوکز = TXE
محیط کشت TMRL(AG) میکسوتروف با گلوکز = TMG
محیط کشت TMRL (AG) اتوتروف بدون گلوکز = TE

در این آزمایش محاسبه نرخ رشد و ضریب رشد ویژه نشان‌دهنده رشد سریع‌تر میکروجلبک کلرلا در محیط TMRL(AG) در هر دو شرایط میکسوتروف و اتوتروف بوده است (جدول ۲). بین میانگین تراکم سلول‌های میکروجلبک کلرلا در محیط کشت TXMG (محیط کشت میکسوتروف با گلوکز) در ده روز شمارش نشان داده شد، بین تراکم سلولی میکروجلبک کلرلا روز اول و روز دوم شمارش و روزهای ششم، هشتم و دهم اختلاف معنی‌دار در سطح ۹۵ درصد وجود داشته است ($P<۰/۰۵$) ولی در روز دوم و چهارم اختلاف معنی‌دار آماری مشاهده نگردید ($P\geq۰/۰۵$) (شکل ۲).

جدول ۲- میزان نرخ رشد و ضریب رشد ویژه میکروجلبک کلرلا در تیمارهای مختلف

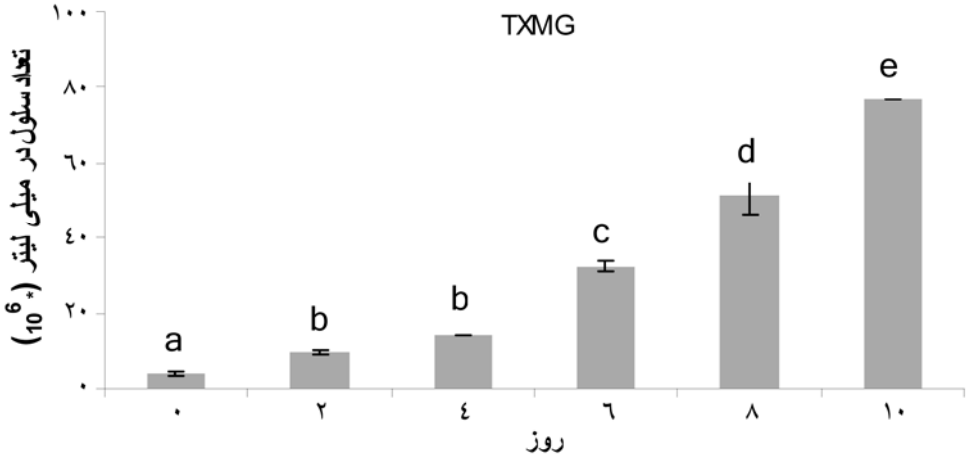
تیمارها	نرخ رشد	ضریب رشد ویژه
TXMG	۰/۳۰	۰/۳۳
TXE	۰/۳۲	۰/۳۶
TMG	۰/۳۴	۰/۳۷
TE	۰/۳۴	۰/۳۸

TXMG = محیط کشت TX میکسوتروف با گلوکز

TXE = محیط کشت TX اتوتروف بدون گلوکز

TMG = محیط کشت TMRL(AG) میکسوتروف با گلوکز

TE = محیط کشت TMRL (AG) اتوتروف بدون گلوکز



TXMG = محیط کشت TX میکسوتروف با گلوکز

TXE = محیط کشت TX اتوتروف بدون گلوکز

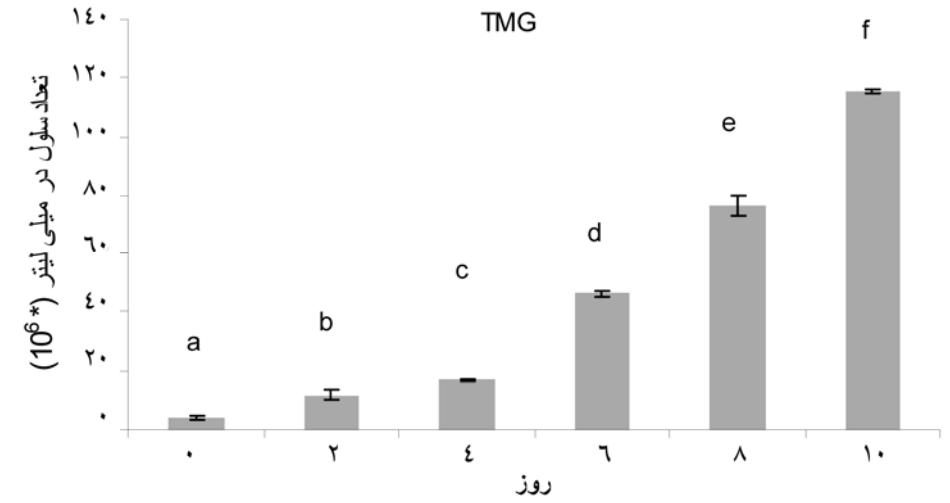
TMG = محیط کشت TMRL(AG) میکسوتروف با گلوکز

TE = محیط کشت TMRL (AG) اتوتروف بدون گلوکز

شکل ۲- مقایسه میانگین شمارش روزانه میکروجلبک کلرلا (تعداد سلول در میلی‌لیتر $\times 10^{6}$) محیط کشت TXMG شرایط میکسوتروف با گلوکز در ده روز شمارش

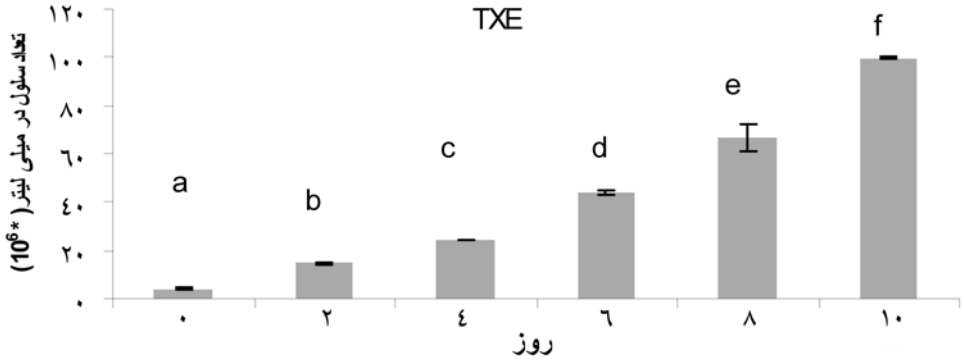
میانگین‌هایی که حروف آنها شبیه هم یا حداقل دارای یک حرف مشترک هستند، فاقد اختلاف معنی‌دارند و آنهایی که فاقد حروف مشترک هستند دارای اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد می‌باشند. بین میانگین تراکم سلول‌های میکروجلبک کلرلا در محیط کشت TMG (محیط کشت میکسوتروف با گلوکز) در ده روز شمارش مشخص گردید که بین تراکم سلولی میکروجلبک کلرلا روزهای مختلف شمارش اختلاف معنی‌دار در سطح ۹۵ درصد وجود داشته است ($P<۰/۰۵$) (شکل ۳).

حروف متفاوت در شکل (۳) نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد هستند.



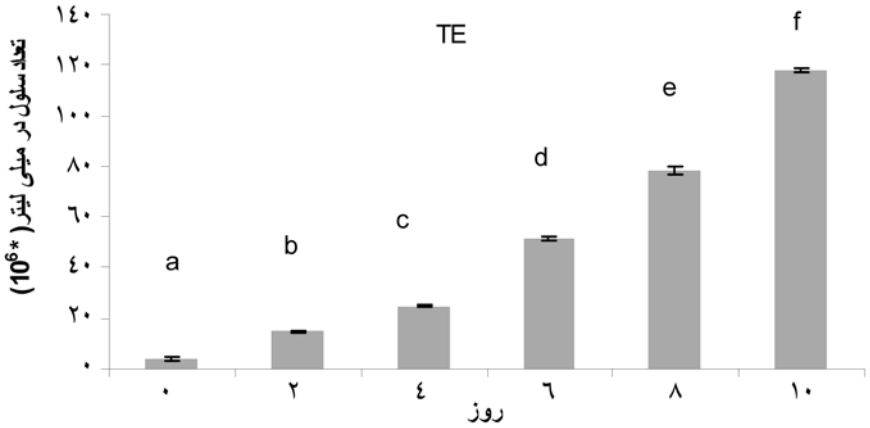
محیط کشت TMRL(AG) میکسوتروف با گلوکز = TMG

شکل ۳- مقایسه میانگین شمارش روزانه میکروجلبک کلرلا (تعداد سلول در میلی‌لیتر $\times ۱۰^{۶}$) محیط کشت TMG شرایط میکسوتروف با گلوکز در ده روز شمارش



شکل ۴- مقایسه میانگین شمارش روزانه میکروجلبک کلرلا (تعداد سلول در میلی‌لیتر $\times ۱۰^{۶}$) محیط کشت TXE شرایط اتوتروف در ده روز شمارش

حروف متفاوت در شکل ۴ نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد هستند. بین میانگین تراکم سلول‌های میکروجلبک کلرلا در محیط کشت TXE (محیط کشت میکسوتروف با گلوکز) در ده روز شمارش نشان داده شد که بین تراکم سلولی میکروجلبک کلرلا روز اول تا شمارش دهم اختلاف معنی‌دار در سطح ۹۵ درصد وجود داشته‌است ($P<۰/۰۵$) (شکل ۴). بین میانگین تراکم سلول‌های میکروجلبک کلرلا در محیط کشت TE در ده روز شمارش نشان داد بین تراکم سلولی میکروجلبک کلرلا روزهای مختلف شمارش اختلاف معنی‌دار در سطح ۹۵ درصد وجود داشته‌است ($P<۰/۰۵$) (شکل ۵).

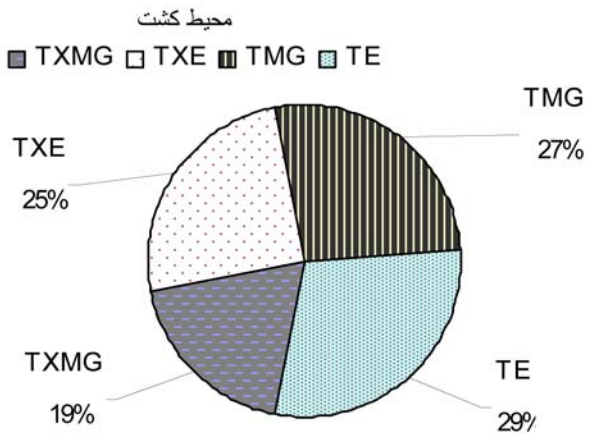


شکل ۵- مقایسه میانگین شمارش روزانه میکروجلبک کلرلا (تعداد سلول در میلی‌لیتر ×۱۰۶) محیط کشت TE شرایط اتوتروف در ده روز شمارش

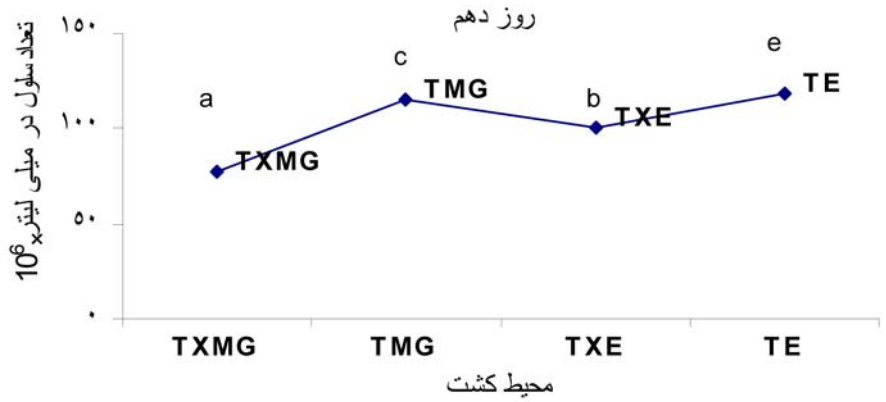
حروف متفاوت در شکل ۴-۵ نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد هستند.

در دهمین روز شمارش میانگین رشد سلولی میکروجلبک کلرلا در محیط‌های کشت مختلف نشان از بیشترین رشد سلولی ۱۰۶ ×۱/۸ تعداد سلول در میلی لیتر در محیط کشت TMRL(AG) در شرایط اتوتروف به دست آمد و کمترین تعداد سلولی در محیط کشت TX شرایط میکسوتروف به میزان $۱۰^{۶}$ ×۴/۷ عدد در میلی‌لیتر بوده و بین محیط کشت TMRL(AG) در شرایط اتوتروف و میکسوتروف اختلاف معنی‌دار از نظر رشد سلولی وجود نداشت درحالیکه دهمین روز شمارش رشد سلولی بین محیط‌های کشت مختلف اختلاف معنی‌دار بود ($P<۰/۰۵$) (شکل ۶).

فراوانی میکروجلبک کلرلا در محیط‌های کشت مختلف نشان داد بیشترین درصد رشد در محیط کشت TMRL(AG) اتوتروف با ۲۹ درصد و کمترین فراوانی با ۱۹ درصد در محیط کشت TXMG (TX میکسوتروف) بوده است (شکل ۷).



شکل ۶- فراوانی میکروجلبک کلرلا در محیط‌های کشت مختلف روز دهم



شکل ۷- تراکم (تعداد سلول در میلی لیتر ×$۱۰^۶$) میکروجلبک کلرلا در محیط‌های کشت مختلف روز دهم

بحث و نتیجه‌گیری

نتایج به دست آمده در تحقیق حاضر نشان داد که کشت میکسوتروفیک کلرلا ولگاریس یک رویکرد عملی برای تجمع لیپید و بیوسنتز کلروفیل وابسته به افزایش محتوای زی‌توده و بهره‌وری حجمی می‌باشد، که در شرایط میکسوتروف و با منابع کربن گلوکز و گلیسرول در ۹۶ ساعت، بیشترین زی‌توده را نسبت به گروه شاهد داشته‌است. در مطالعه حاضر مطابق (شکل ۱ و جدول ۱) شرایط میکسوتروفی (۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی) با اضافه کردن یک گرم در لیتر گلوکز به محیط کشت صورت گرفت. در تحقیق حاضر، در اولین روز شمارش، بعد از دو روز، میانگین رشد سلولی میکرو جلبک کلرلا در محیط‌های کشت TXMG و TMRL(AG) به ترتیب ۱۰۶× ۰/۵۸±$۱۰^۶$× ۹/۷ و ۱۰۶× ۰/۵۸±$۱۰^۶$× ۱۱/۸ تعداد سلول در میلی‌لیتر بوده‌است. بر اساس نتایج محیط کشت TMRL(AG) بیشترین رشد سلولی را داشته است و روند رشد صعودی تا روز دهم محیط کشت TMRL(AG) در مقایسه با محیط کشت TX به ترتیب ۰/۶۱±$۱۰^۶$× ۷۷/۱ و ۱۰۶× ۰/۷۱±$۱۰^۶$× ۱۱۵/۳ سلول در میلی لیتر بوده‌است. بنابر این، بیشترین درصد و میانگین رشد سلولی میکروجلبک کلرلا در محیط کشت TMRL(AG) به دست آمد که منبع ازت آن اوره بوده‌است. این یافته، با نتایج Hsieh و Wu در سال ۲۰۰۹ که با استفاده از اوره در محیط کشت باعث افزایش زی توده و روغن در میکروجلبک‌ها شده بودند و Becker در سال ۱۹۹۴ که اوره را بهترین منبع نیتروژن برای کشت جلبک‌های سبز مخصوصاً میکروجلبک کلرلا معرفی نمود، مطابقت نشان می‌دهد.

از آنجایی که منبع نیتروژن یکی از عناصر ماکروالمنت و مواد مغذی اصلی در رشد میکروجلبک‌ها مخصوصاً در میکروجلبک‌های سبز می‌باشد، در تمام محیط‌های کشت با نسبت‌های مختلف مورد نیاز بوده و به کار برده می‌شود. با منبع نیتروژن به تنهایی نمی‌توان شاهد افزایش تولید بود ولی همراه با مواد مغذی دیگر از جمله فسفر و کلرید آهن، همانند محیط کشت TMRL(AG) که در آن از منبع نیتروژن اوره استفاده شده‌است، می‌توان بیشترین رشد سلولی را حتی بیشتر از محیط کشت استاندارد TMRL به دست آورد. با توجه به ارزان بودن اوره نسبت به منابع دیگر نیتروژن (تجاری)، مناسب‌ترین محیط کشت برای تولید انبوه میکروجلبک های سبز، می‌تواند اوره باشد.

TMRL در پرورش فیتوپلانکتون (میکروجلبک) به کار برده می‌شود و از مواد مغذی مختلفی مانند آهن کلراید، پتاسیم نیترات، سدیم متاسیلیکات و سدیم هیدروژن فسفات تشکیل شده است. اوره ماده‌ای مغذی است بنابر این در محیط کشت TMRL و

TMRL(AG) استفاده شده در تحقیق حاضر، که دارای این ماده مغذی است، تأثیر بیشتری در رشد این گونه میکروجلبک داشته‌است. مطابق نتایج بدست آمده از پژوهش حاضر، گنجیان و همکاران (۱۳۹۱) جلبک سبز کلرلا را در چهار غلظت سدیم بی‌کربنات (۲/۵، ۵، ۷/۵ و ۱۰ در میلی‌لیتر) در محیط کشت TMRL (AG) طی ده روز پرورش دادند و نشان دادند که تیمار سوم با غلظت ۷/۵ میلی لیتر، بیشترین رشد را در روز دهم داشته‌است.

Abreu و همکاران (۲۰۱۲)، پارامترهای رشد و ترکیبات بیوشیمیایی میکروجلبک کلرلا ولگاریس را در شرایط متفاوت میکسوتروفیک مطالعه کرده و با نتایجی که از کشت کنترل شده فتواتوتروفیک به دست آورند مقایسه نمودند. در تحقیق اشاره شده در شرایط میکسوتروفیک، میکروجلبک، نرخ رشد ویژه، غلظت زی‌توده و قابلیت تولید لیپید، نشاسته و پروتئین بالاتری را در مقایسه با شرایط فتواتوتروفیک نشان داده بود. در پژوهش حاضر، نتایج با توجه به محیط‌های کشت TX و TMRL(AG) به کار برده شده در شرایط میکسوتروف و اتوتروف، نشان‌دهنده افزایش رشد سلولی در شرایط اتوتروف می‌باشد، هرچند در شرایط میکسوتروف در محیط کشت TMRL(AG) از نظر رشد سلولی با شرایط اتوتروف نزدیک بوده است. در صورتی‌که در محیط کشت TX در هر دو شرایط رشد سلولی نسبت به محیط کشت TMRL(AG) کمترین رشد سلولی را داشته است.

در مطالعه Makarevičienė و همکاران در سال ۲۰۱۱ که بر روی دو جنس شاخه کلرفیتا (سندسموس و کلرلا) در محیط کشت BG11 غلظت‌های مختلف CO_2 و نیتروژن انجام شده بود، بیشترین رشد و اسیدهای چرب غیراشباع و زی‌توده در غلظت ۲۴ درصد و CO_2 غلظت ۱/۵ گرم $NaNO_3$ در لیتر بوده‌است.

Moon و همکاران (۲۰۱۳) در تحقیقی رشد و تولید لیپید در میکروجلبک *Chlamydomonas reinhardti*i را در شرایط متفاوت فتواتوتروفیک، هتروتروفیک و میکسوتروفیک به منظور تعیین شرایط بهینه برای رشد و تولید بیودیزل و به‌طور خاص رشد سلولی و تولید Fatty Acid Methyl Esters (FAMEs) را مورد بررسی قرار دادند و نشان دادند، هنگامی که *C.reinhardtii* در حضور منابع مختلف کربن آلی (استات، گلوکز، گلیسرول و ساکارز) کشت داده شده بود، بیشترین تولید زی‌توده را با مقدار (۲/۱۵ گرم در لیتر) در پنج روز و تولید FAME (۱۶/۴۱ درصد از زی توده) را در کشت میکسوتروفیک با استات (۱۰ گرم در لیتر) داشته است. همچنین به عنوان جایگزین استات، از اسیدهای چرب فرار VFAs:Volatile Fatty Acids (استیک اسید، پروپیونیک اسید و بوتیریک اسید) که با هزینه‌ای ارزان از تخمیر مواد خوراکی زائد تولید می‌شود، استفاده شد. بیشترین مقدار FAME (۱۹/۰۲ درصد از زی‌توده) و تولید زی‌توده (۲/۰۵ گرم در لیتر) در پنج روز با ۵ گرم در لیتر اسیدهای چرب فرار به دست آمد. این نتیجه اشاره می‌کند که VFAs می‌تواند به عنوان جایگزینی ارزان از منبع کربن برای به حداکثر رساندن تولید لیپید در کشت میکسوتروفیک میکروجلبک *C.reinhardtii* به کار رود.

در تحقیق حاضر، میزان رشد میکرو جلبک کلرلا در دو محیط کشت و دو شرایط رشد مورد ارزیابی قرار گرفت. محیط کشت TMRL(AG) در شرایط میکسوتروف میزان رشد سلولی نزدیک به شرایط اتوتروفیک داشت و اختلاف چندانی بدست نیامد و همچنین با توجه به ارزان بودن محیط کشت TMRL(AG) و شرایط میکسوتروف از نظر مصرف انرژی (استفاده از پریود نوری ۱۲-۱۲) و از آنجایی که برای تولید انبوه میکروجلبک، نیاز به محیط کشت ارزان‌تر مورد توجه می‌باشد، می‌توان نتیجه گرفت برای تولید انبوه میکروجلبک کلرلا به ویژه برای تولید بیودیزل، محیط کشت TMRL(AG) با شرایط میکسوتروف، مقرون به صرفه‌تر می‌باشد. از این‌رو این

محیط کشت با شرایط میکسوتروف پیشنهاد می‌گردد.

سپاسگزاری

در اجرای این تحقیق از همکارهای ارزشمند گروه پژوهشی شیلات و آلاینده‌های آبی خزر (کاسپین) که امکانات لازم را فراهم نمودند، صمیمانه سپاسگزاری می‌گردد.

منابع

گنجیان، ع. ۱۳۸۹. دوره آموزشی و کارگاه کشت جلبک. گروه پژوهشی شیلات و آلاینده‌های آبی خزر. ایران.

گنجیان، ع.، شکوری، م.، قاسم نژاد، م.، گنجیان خناری، ف. و فارابی، و. ۱۳۹۱. بررسی تأثیر بیکربنات سدیم بر رشد میکروجلبک کلرلا *(Chlorella sp.)* در محیط کشت TMRL. *مجله توسعه آبزی پروری*، (۶) ۲:۵۷-۷۵.

Abreu, A., P, Fernandes, B., Vicente, A. A., Teixeira, J. & Dragone, G. 2012. Mixotrophic cultivation of *Chlorella vulgaris* using industrial dairy waste as organic carbon source, *Bioresource Technology*, 118:61–66.

Becker, E. W. 1994. Microalgae: Biotechnology and Microbiology. Cambridge University Press. UK.

Dunahay, T., Jarvis, E., Dais, S. & Roessler, P. 1996. Manipulation of microalgal lipid production using genetic engineering. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 58(1):223-231.

Hsieh, C. H. & Wu, W. T. 2009. Cultivation of microalgae for oil production with a cultivation strategy of urea limitation. *Bioresource Technology*, 100:3921-3926.

Kapdan, I. & Kargi, F. 2006. Bio-hydrogenproduction from waste materials. *Enzyme and microbial Technology*, 38(5):569-582.

Weibao, K., Song, H., Cao,Y., Yang, H., Hua, S. & Xia, C. 2011.The characteristics of biomass production, lipid accumulation and chlorophyll biosynthesis of *Chlorella vulgaris* under mixotrophic cultivation, *African Journal of Biotechnology*, 10(55):11620-11630.

Liang,Y., Sarkanay, N. & Cui,Y. 2009.Biomass and lipid productivity of *Chlorella vulgaris* under autotrophic, hetrotrophic and mixotrophic growth conditions. *Biotechnology Letters*, 31(7): 1043-1049.

Makarevičienė, V, Andrulevičiūtė, V., Skorupskaitė,V. & Kasperovičienė, J. 2011. Cultivation of Microalgae *Chlorella* sp. and *Scenedesmus* sp. as a Potentional Biofuel Feedstock. *Environmental Research, Engineering and Management*, 3 (57):21-27.

Moon, M., Kim, C. W., Park, W. K., Yoo, G., Choi, Y. E. & Yang, J. W. 2013. Mixotrophic growth with acetate or volatile fatty acids maximizes growth and lipid production in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Algal Research*, 2(4):352–357.

Meher, L. C., Vidya Sagar, D. & Naik, S. N. 2006. Technical aspects of biodiesel production by transesterification--a review, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 10(3): 248-268.

Ngangkham, M., Sachitra, K., Ratha, R., Prasanna, A. K. S., Dolly, W. D., Chandragiri, S. & Rachapudi, B. N. P. 2012. Biochemical modulation of growth, lipid quality and productivity in mixotrophic cultures of *Chlorella sorokiniana*. Springer Plus, 1:33.

Sawayama, S., Inoue, S., Dote, Y. & Yokoyamas, Y. 2010. Co2 fixation and oil production through microalgal. *Energy conservation and management*, 36: 729-731.

Priyadarshani, I. & Rath, B. 2012. Commercial and industrial applications of micro algae. *Journal of Algal Biomass Utilization*, 3(4): 89–100.

Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E. & Isambert. A. 2006.Commercial application of microalgae.*Journal of bioscince and bioengineering*,101 (2):87-96.

Wawrik, B. &. Harriman, B.H. 2010. Rapid colorimetric quantification of lipid from algal culture. *Journal Microbial Method*, 80 (3): 262-266.