بررسی میزان رشد و پروفایل اسیدهای چرب ریزجلبک *Chlorella vulgaris* در محیط کشت حاوی فاضلاب شهری

- **جواد قاسم‌زاده***: گروه شیلات، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار، چابهار، ایران
- **فاطمه لواجوبلگوری**: گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران
- **منصور برازپور**: گروه شیلات، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار، چابهار، ایران

تاریخ دریافت: بهمن ۱۳۹۷ تاریخ پذیرش: اردیبهشت ۱۳۹۸

چکیده

این تحقیق به‌منظور تعیین محتوای اسیدهای چرب در ریزجلبک *Chlorella vulgaris* کشت شده در تیمارهای مختلف فاضلاب شهری انجام گردید. چهار تیمار (هر تیمار با ۳ تکرار) با درصدهای مختلف فاضلاب شهری و محیط کشت f/2 تهیه و در شرایط آزمایشگاهی نگه‌داری شدند. جداسازی ریزجلبک در مراحل مختلف آزمایش با استفاده از دستگاه سانتریفوژ انجام گردید. میزان رشد و اسیدهای چرب در همه تیمارها اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد که طی دوره کشت، تیمارهای ۱ و ٤ بیش‌ترین رشد را داشتند. بین همه تیمارها بیش‌ترین مقدار اسیدهای چرب اشباع مربوط به C17:0 (هپتادکانوئیک اسید) و C6:0 (هگزانوئیک اسید) بود و هم‌چنین بیش‌ترین مقدار اسیدهای چرب غیراشباع با یک پیوند دوگانه مربوط به C16:1 (پالمیتولئیک اسید) و C18:1Cis9 (اولئیک اسید) بود. از نظر مقادیر اسیدهای چرب غیراشباع تک پیوندی (MUFA) و چندپیوندی (PUFA) بین تیمارها اختلاف معنی‌دار مشاهده شد (p<۰/۰۵). نتایج آنالیز واریانس یک‌طرفه (One-Way ANOVA) در تاثیر محیط‌های کشت بر مقادیر اسید چرب امگا ۳ و ٦ تفاوت معنی‌داری را بین تیمارها نشان داد (p<۰/۰۵). بیش‌ترین مقدار مربوط به اسید چرب امگا ۳ در تیمار ۲ (۱۸/۲۸ درصد) بود، درصورتی‌که در سایر تیمارها مقدار این اسید کم‌تر از ۲ درصد ثبت گردید. بیش‌ترین مقدار امگا ٦ هم در تیمار ۲ و ٤ با مقدار تقریبی ۱۲ درصد اندازه‌گیری شد. براساس نتایج تحقیق حاضر پیشنهاد می‌شود که از فاضلاب به‌عنوان محیط کشت جایگزین برای تکثیر و پرورش انبوه ریزجلبک *Chlorella vulgaris* به‌عنوان منبعی غنی از امگا ۳ استفاده شود.

کلمات کلیدی: *Chlorella vulgaris*، فاضلاب شهری، رشد، امگا۳ و ۶ اسید چرب

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: jghasemz@gmail.com

مقدمه

تصفیه فاضلاب توسط ریزجلبک‌ها دارای مزایایی همچون باز چرخ مواد مغذی نیتروژن و فسفر و تولید زیست‌توده ارزشمند است که می‌توان از آن برای تولید سوخت‌زیستی و موادغذایی استفاده نمود. علاوه بر این رشد ریزجلبک‌ها در حوضچه‌های تصفیه فاضلاب سبب تصفیه بیولوژیک خواهد شد(Lavajoo و Taherizadeh، ۲۰۱۶؛ Yalcin و همکاران، ۲۰۰۶؛ Voltolinaو همکاران، ۲۰۰۴).رشد،بازدهی، تولید توده‌زیستی و ترکیبات شیمیایی موجود در ریزجلبک‌ها تابعی از شدت نور و طول دوره رشدو مواد مغذی موجود در محیط کشت است (Yoo وهمکاران، ۲۰۱۰). پساب‌ها به‌علت مواد تشکیل‌دهنده آن‌ها (فضولات انسانی و حیوانی،شوینده‌ها و ضایعات کشتارگاهی)دارای‌مقادیر زیادی از مواد مغذی هم‌چون نیتروژن و فسفر هستند که جلبک‌ها می‌توانند این ریزمغذی‌ها را مصرف کرده و رشد خود را افزایش دهند (Mahmut و Sengil، ۲۰۰۳). در این زمینه تحقیقات زیادی توسط محققان‌انجام گرفته که نشان‌دهنده آن است که رشد میکروارگانیسم‌ها به‌خصوص ریزجلبک‌ها در محیط‌های‌حاوی پساب به‌دلیل فراهم‌بودن مواد مغذی مورد نیاز این موجودات، بالامی‌باشد(Vasconcelosو Pereira، ۲۰۰۱). جلبک کلرلا ولگاریس جلبک‌سبزتک‌سلولی است که به‌طور گسترده در آب‌های جهان وجود دارد (Li و همکاران، ۲۰۱۰). این گونه میکرو جلبکی از لحاظ ارزش غذایی بسیار با اهمیت بوده و حاوی مقدار زیادی پروتئین، چربی و ویتامین است و به‌عنوان یکی از بهترین سم‌زداهای طبیعی علیه فلزات سنگین،حشره‌کش‌ها و سـایر سموم می‌باشد (Yang و همکاران، ۲۰۱۱). از طرفی در زنجیره غذایی دریایی، اسیدهای چرب اشباع نشده با زنجیره بلند در درجه اول توسط ریزجلبک‌ها ساخته شده و سپس به سایر موجودات یعنی زئوپلانکتون‌ها (به‌عنوان دومین حلقه موجودات گیاه‌خوار) و سایر حلقه‌های بالاتر ازجمله ماهی‌ها منتقل می‌شود، از این‌رو بر بهبود کیفیت غذایی سطوح بالاتر تغذیه‌ای کاملاً موثر هستند (گرجی‌زاده و همکاران، ۱۳۹۵). اسیدهای چرب یک اسیدکربوکسیلیک با زنجیره آلیفاتیک طولانی است که به‌صورت اشباع‌شده یا اشباع نشده وجود دارد. اسیدهای چرب شامل ۳ نوع می‌باشد، اسیدهای چرب اشباع‌شده (فاقد پیوند دوگانه)، اسیدهای چرب غیراشباع تک پیوندی (یک پیوند دوگانه) و اسیدهای چرب غیراشباع چند پیوندی (چند پیوند دوگانه) (Voet و همکاران، ۲۰۰۶). بدن انسان قادر به تولید برخی از انواع ضروری اسیدهای چرب مثل امگا ۳ و امگا ۶ نیست، لذا باید از طریق ماده غذایی تأمین گردند (Lavajoo و همکاران، ۲۰۱۸). بنابراین، اسیدهای‌چرب امگا ۳ اثرات مهمی بر بیماری‌های قلبی عروقی دارند و از بدن در برابر بروز بیماری‌های قلبی و عروقی به‌علت فعالیت‌های آنتی‌آریتمی، هیپولیپیدمی و آنتی‌ترومبوتیک محافظت می‌کنند (Das و همکاران، ۲۰۱۲). اسیدهای چرب امگا ۳ نقش مهمی در فیزیولوژی جانوران به‌خصوص در دوران جنینی و نوزادی ایفا می‌کنند (Bowen و Clandinin، ۲۰۱۰). این اسیدها برای جلوگیری از بیماری‌های قلبی عروقی و هم‌چنین جلوگیری از لخته شدن خون و کاهش اثرات ناشی از امراض التهابی‌مفید می‌باشند(Otles و Pire، ۲۰۰۱).علاوه‌بر عوارض منفی‌ناشی از کمبود اسیدهای‌چرب امگا۳ به‌عنوان‌اسیدچرب ضروری، نسبت پایین میزان این اسیدهای چرب به‌میزان اسیدهای چرب امگا۶ در رژیم‌غذایی نیزسبب تاثیر منفی بر سلامت مصرف‌کنندگان‌می‌گردد (Galli و Marangoni، ۲۰۰۶). بنابراین معرفی منابع جدید و قابل دسترس‌اسیدهای چرب امگا۳ می‌تواند گامی موثر در بهبود سلامت جامعه باشد. به‌همین دلیل در سال‌های اخیر تحقیقات بسیاری جهت شناسایی و معرفی منابع حاوی اسیدلینولنیک بالا، صورت گرفته است (Goli و همکاران، ۲۰۱۳). سلول‌های جانوری قادر به سنتز تمامی اسیدهای چرب نیستند درحالی‌که سلول‌های گیاهی و از جمله ریزجلبک‌ها قادرند سری کامل انواع اسیدهای چرب غیراشباع را تولید نمایند. مطالعه‌بر روی اسیدهای‌چرب‌موجوددر ریزجلبک‌ها در محیط کشت فاضلاب در سواحل ایرانی خلیج فارس با توجه به پتانسیل بسیار بالای این منطقه جهت بهره‌برداری یا پرورش این جلبک‌ها، کم صورت گرفته است و نیاز به مطالعه بیش‌تر و استفاده ازاین‌منبع با ارزش دارد. هدف از این تحقیق تعیین درصد اسیدهای چرب خصوصاً امگا۳ و امگا۶ در گونه ریزجلبک *Chlorella vulgaris* کشت شده در تیمارهای مختلف از فاضلاب شهری می‌باشد.

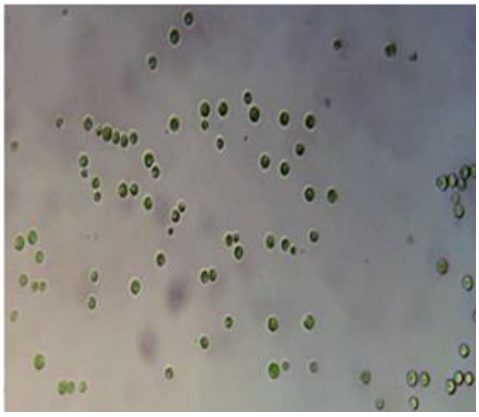
مواد و روش‌ها

کشت جلبک: استوک‌خالص ریزجلبک *Chlorella vulgaris* از پژوهشکده اکولوژی خلیج فارس بندرعباس، ایران تهیه و پرورش و تکثیر این ریزجلبک در ظرف‌های ۵۰۰ میلی‌لیتری و با استفاده از محیط کشت F/2 انجام شد. محیط کشت F/2متشکل از نمک‌های ۱/۷ گرم/لیتر Sodium-bi-carbonate، ۰/۲۴ گرم/لیتر Di-potassium phosphate، ۰/۰۳ گرم/لیتر Calcium chloride، ۰/۰۰۹ گرم/لیتر Boric acid، ۰/۲ گرم/لیتر Ferrous sulphate، ۰/۱۸ گرم/لیتر Magnesium sulphate، ۸/۷ گرم/لیتر Sodium chloride، ۱/۹ گرم/لیتر Manganese chloride، ۰/۰۴ گرم/لیتر Cobalt nitrate، ۰/۳ گرم/لیتر Zinc sulphate، ۰/۰۳ گرم/لیتر Sodium molybdate می‌باشد. آب فاضلاب از منطقه خور گورسوزان بندرعباس جمع‌آوری شد و پس از انتقال به آزمایشگاه تصفیه و استریل شد. غشای فیلتر دارای منافذ ۱۰ میکرون بود و دمای اتوکلاو هم بر روی ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و

برای مدت ۲۰ دقیقه تنظیم‌شد.هوادهی با استفاده از پمپ هوا و به‌طور منظم در تمام طول آزمایش مورد استفاده قرار گرفت، شدت نور ۲۳۰۰ لوکس، دما ۲۵ درجه سانتی‌گراد، دوره تاریکی و روشنایی ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ساعت روشنایی و pH ۷/۵ درنظر گرفته شد (Cho و همکاران، ۲۰۱۵). فاکتورهای محیطی در طی مدت آزمایش کنترل و ثابت نگه‌داشته شدند. در این پژوهش ۴ تیمار و هر تیمار با سه تکرار درمحیط کشت F/2 و محیط کشت فاضلاب شهری با درصدهای مختلف، درنظر گرفته شد (جدول ۱)(شکل ۱).

جدول ۱: رشد ریزجلبک *Chlorella vulgaris* در تیمارهای مختلف محیط کشت F/2 و فاضلاب شهری

تیمار	محیط کشت
۱	محیط کشت F/2 ٪۱۰۰ (آب مقطر استریل شده جهت تهیه محیط کشت F/2)
۲	محیط کشت فاضلاب شهری ٪۱۰۰ (فاضلاب شهری استریل شده بدون محیط کشت F/2)
۳	٪۳۰ محیط کشت F/2 + ٪۷۰ محیط کشت فاضلاب شهری (٪۳۰ محیط کشت F/2+ ٪۷۰ فاضلاب شهری استریل شده)
۴	٪۵۰ محیط کشتF/2 + ٪۵۰ محیط کشت فاضلاب شهری (٪۵۰ محیط کشت F/2+ ٪۵۰ فاضلاب شهری استریل شده)



شکل ۱: *Chlorella vulgaris*

شکل ۲: ریزجلبک کلرلا در روز اول

شکل ۳: ریزجلبک کلرلا در روز هفتم

اندازه‌گیری رشد سلولی: از تمام تیمارها در روز اول، سوم، پنجم و هفتم نمونه‌برداری شد و از طریق تعیین افزایش تراکم سلولی با استفاده از لام نئوبار با ۳ تکرار شمارش انجام شد. میزان تراکم با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید (Banerjee و همکاران، ۲۰۱۱) هم‌چنین برای افزایش دقت کار با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتری در طول موج ۵۴۰ نانومتر هم میزان تراکم سلولی اندازه‌گیری شد، تراکم سلولی اولیه (OD540nm) برای تمامی تیمارها در روز اول ۰/۴ درنظر گرفته شد. مقدار رگرسیون خطی تراکم سلولی (OD) و تراکم سلولی (سلول/میلی‌لیتر) براساس فرمول Y=ax+b محاسبه شد (Rocha و همکاران، ۲۰۰۳).

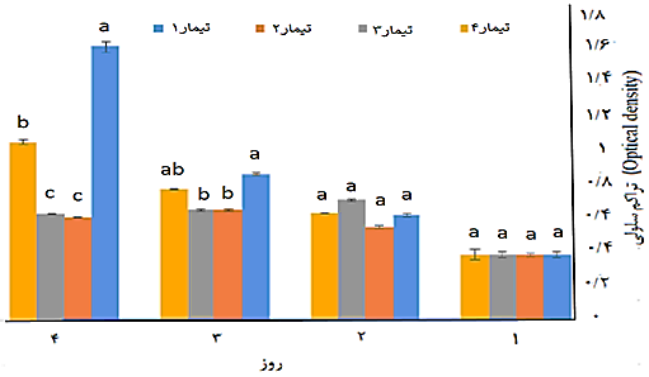
$$\frac{\text{سلول}}{\text{میلی لیتر}} = \frac{\text{تعداد کل سلول های شمارش شده}}{\text{تعداد بلوک ها}} \times ۱۰^{۴}$$

آنالیز اسید چرب: در روز هفتم از دوره کشت، هنگامی‌که منحنی رشد کاهش رشد در دو تیمار ۲ و ۳ را نشان داد (کاهش یا اتمام منبع غذایی موجود در محیط کشت) جمع‌آوری ریزجلبک در تیمارها با استفاده از دستگاه سانتریفوژ با دور ۶۵۰۰ rpm به‌مدت ۱۰ دقیقه انجام گردید. این فرآیند زمانی متوقف شد که از کل هر تیمار حدود ۵ گرم وزن تر حاصل گردید. در مرحله بعدی به‌منظور سنجش پروفیل اسیدهای چرب، به‌ازای هر یک گرم وزن‌تر ریزجلبک خالص، ۱۰ میلی‌لیتر پترولیوم اتر، به آن اضافه گردید (Dieffnbacher و Pocklington، ۱۹۹۲). در گام بعدی جهت آنالیز اسیدچرب، از عصاره به‌دست‌آمده مقدار ۰/۲ میکرولیتر به دستگاه گاز کروماتوگرافی Phillips GC-PU4400 با مشخصات ستون (BPX70, 60m×0.32mm ID, 0.25µm film thickness, SGM, Victoria) تزریق شد. دمای انجکتور و FID به‌ترتیب ۲۴۰ و ۲۸۰ درجه سانتی‌گراد بود (Folch و همکاران، ۱۹۹۹). آزمایش اولیه استخراج چربی و فرآیند استری شدن توسط نگارنده در آزمایشگاه دانشگاه تهران انجام شد. سپس تعیین مقادیر پروفیل اسید چرب توسط کارشناس دستگاه گازکروماتوگرافی آنالیز شد. به‌دلیل بالا بودن هزینه سنجش اسید چرب، فقط دو نمونه (دو تکرار) از هر تیمار سنجش شدند.

تجزیه و تحلیل آماری: نرمال بودن پراکنش تمام داده‌ها با آزمون کولموگروف-اسمیرنوف بررسی شد. داده‌ها با استفاده از تحلیل واریانس یک‌طرفه بررسی شدند و هم‌چنین برای تعیین گروه دارای تفاوت معنی‌دار، از آزمون توکی (Tukey) در سطح ۵ درصد استفاده شد. محاسبه داده‌ها و رسم نمودارها با نرم‌افزار SPSS (نسخه ۲۲) و Excel (نسخه ۲۰۱۳) انجام گردید.

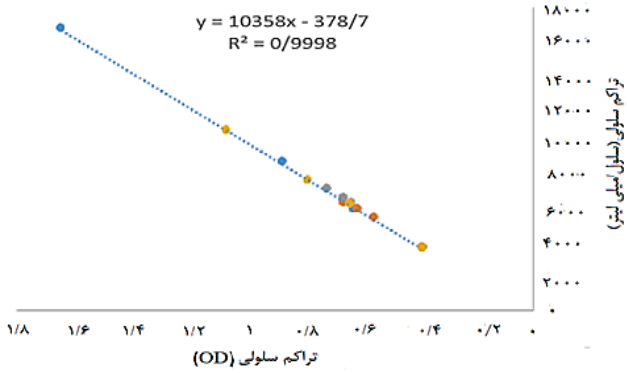
نتایج

با توجه به نتایج شکل ۴ تراکم اولیه سلولی برای تمامی تیمارها ۰/۴ بود. نتایج نشان داد که در تیمار ۱، فاز انطباقی و رشد تدریجی ریزجلبک *C. vulgaris* تا روز سوم از دوره کشت ادامه‌دار است و از روز سوم رشد افزایشی شروع شده است. این افزایش رشد در روز پنجم تا هفتم به‌طور تصاعدی می‌باشد. در تیمار۲، رشد افزایشی این ریزجلبک تا روز پنجم از دوره رشد ادامه‌دار است اما از روز پنجم وارد فاز سوم کاهشی شده است. در تیمار۳، فاز انطباقی و رشد ریزجلبک مورد مطالعه تا روز سوم از دوره رشد ادامه‌دار است اما از روز سوم وارد فاز کاهشی شده است. در تیمار۴، انطباق و رشد ریزجلبک *C. vulgaris* به‌طور یک‌نواخت از روز اول دوره کشت شروع شده و تا روز هفتم کشت با شیب یک‌نواختی ادامه‌دار است. بنابراین با توجه به نتایج مشخص است که، با گذشت زمان، بیش‌ترین مقدار رشد در تیمار ۱ و تیمار ۴ می‌باشد. مقایسه مقادیر رشد ریزجلبک *C. vulgaris* در محیط‌های کشت مختلف فاضلاب‌شهری در طی روزهای مختلف نشان داد که در روزهای پنجم و هفتم از شروع دوره رشد تفاوت معنی‌داری بین تیمارها مشاهده شد ($p<0/05$). شکل ۵، نمودار رگرسیون خطی بین تراکم سلولی (OD) و تراکم سلولی (سلول/میلی‌لیتر) را نشان می‌دهد و در این مطالعه مقدار $R^2=0/99$ می‌باشد.



شکل ۴: نمودار رشد جلبک *Chlorella vulgaris* در تیمارهای مختلف فاضلاب شهری در طی یک هفته

*حروف مختلف a و b نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار است.



شکل ۵: نمودار رگرسیون خطی بین تراکم سلولی (OD) و تراکم سلولی (سلول/میلی لیتر) ریزجلبک *C. vulgaris* کشت شده در تیمارهای مختلف فاضلاب شهری

نتایج آنالیز پروفایل اسیدهای چرب حاصل از ریزجلبک *Chlorella vulgaris* تحت محیط‌های کشت مختلف فاضلاب شهری در جدول ۲ آورده شده است. ترکیب اسیدهای چرب ریزجلبک مورد سنجش قرار گرفته شده نشان داد که بیش‌ترین مقدار اسیدهای چرب اشباع‌شده، C17:0 مربوط به(هپتادکانوئیک‌اسید)و C6:0 (هگزانوئیک اسید) بود. هم‌چنین بیش‌ترین مقدار اسیدهای چرب غیراشباع با یک بند دوگانه مقادیر مربوط به C16:1 (پالمیتولئیک‌اسید) و C18:1Cis9 (اولئیک اسید) اندازه‌گیری و ثبت گردید. در مورد اسیدهای چرب غیراشباع با چند بند دوگانه نیز، C18:2(n-6)C (اسید لینولئیک) و C18:3 n3 (گاما لینولنیک اسید)بیش‌ترین مقدار را بین تیمارها نشان دادند. هم‌چنین تیمارهای ۳ (۷۰٪ محیط کشت فاضلاب+ ۳۰٪ محیط کشت f/2) و ۴ (۵۰٪ محیط کشت فاضلاب + ۵۰٪ محیط کشت f/2) مقادیری از اسیدهای چرب غیراشباع چندپیوندی هم‌چون آراشیدونیک اسید، ایکوزاپنتانوئیک‌اسید و دکوزاهگزانوئیک اسید را نشان دادند. با توجه به داده‌های جدول ۲، درصد اسیدهای چرب تیمارهای مختلف تفاوت معنی‌داری را نشان دادند ($p<0/05$). از بین ۴ تیمار استفاده شده در تحقیق حاضر، بیش‌ترین مقدار از اسیدچرب در تیمار ۱، C6:0 (هگزانوئیک اسید) با مقدار ۵۶/۳ درصد، در تیمار ۲، C17:0(اسید هپتادکانوئیک) با مقدار ۱۸/۹ درصد و C18:3 n3 (گاما لینولنیک اسید) با مقدار ۱۸/۳ درصد، در تیمار۳، C6:0 (هگزانوئیک اسید) با مقدار ۲۴/۴ درصد و C16:1 (پالمیتولئیک اسید) با مقدار ۱۹/۷ درصد، و در تیمار ۴، C17:0 (هپتادکانوئیک اسید) با مقدار ۲۶/۱ و C18:1Cis9 (اولئیک اسید) با مقدار ۳۱/۹۴ اندازه‌گیری و ثبت گردید. همان‌گونه که در جدول۳ مشخص است بیش‌ترین میزان اسیدچرب کل اشباع شده در هر ۴ تیمار مورد آزمایش تقریباً ۵۰ درصد وزنی اسیدهای چرب را تشکیل می‌دهد. هم‌چنین نتایج آنالیز واریانس یک‌طرفه (One-

Way ANOVA) تفاوت معنی‌داری بین تیمارها را نشان نداد (p>۰/۰۵). از نظر مقادیر اسیدهای چرب غیراشباع تک پیوندی (MUFA) و چند پیوندی (PUFA) بین تیمارها اختلاف معنی‌دار مشاهده شد (p<۰/۰۵). نتایج مقایسه‌ای که بین مقدار اسیدهای چرب امگا۳ و امگا۶ در ریزجلبک‌های کشت شده در تیمارهای مختلف انجام گردید بیش‌ترین مقدار را مربوط به اسید چرب امگا۳ در تیمار ۲ نشان داد که به میزان ۱۸/۲۸ درصد اندازه‌گیری و ثبت گردید، درصورتی که در سایر تیمارها کم‌تر از ۲ درصد بود. بیش‌ترین مقدار امگا ۶ هم در تیمار ۲ و ۴ با مقدار تقریبی ۱۲ درصد اندازه‌گیری شد. نتایج آنالیز واریانس یک‌طرفه (One-Way ANOVA) در تاثیر محیط‌های مختلف کشت بر محتوای اسید چرب امگا ۳ و ۶ نیز نشان داد که تفاوت معنی‌داری بین تیمارها وجود داشت (p<۰/۰۵).

جدول ۲: ترکیبات اسید چرب (درصد وزنی از کل اسیدهای چرب) ریز جلبک *Chlorella vulgaris* در محیط‌های کشت مختلف فاضلاب شهری (میانگین ± انحراف معیار)

اسید چرب	نوع اسید چرب	۱۰۰٪ محیط کشت f/2 (کنترل ۱) تیمار ۱	۱۰۰٪ محیط کشت فاضلاب (کنترل ۲) تیمار۲	۷۰٪محیط کشت فاضلاب+ ۳۰٪ محیط کشت f/2، تیمار۳	۵۰٪ محیط کشت فاضلاب+ ۵۰٪ محیط کشت f/2، تیمار۴
C6:0	اشباع	۵۶/۳±۶/۴ a	۸/۷±۰/۰۷ c	۲۴/۴±۱/۶ b	۳/۵±۰/۸ c
C20:0	اشباع	۴/۳±۰/۸۲ b	۳/۴±۰/۲ b	۱۰/۶±۰/۲ a	۲/۳±۰/۱ b
C18:0	اشباع	۰/۴±۰/۲	۱/۱±۰/۰۸	۱/۱± ۰/۰۵	۱/۰۱±۰/۰۴
C17:0	اشباع	۱۰/۲±۰/۶ bc	۱۸/۹±۰/۳ ab	۱۵/۱۵±۰/۴ b	۲۶/۱±۰/۶ a
C16:0	اشباع	–	–	-	۱/۲±۰/۰۱
C15:0	اشباع	۲/۷±۰/۵ b	۶/۹±۰/۱ ab	۳/۴±۰/۲ b	۸/۴±۰/۱ a
C14:0	اشباع	–	–	-	۰/۴±۰/۰۴
C15:1	غیر اشباع تک پیوندی	۱/۱±۰/۵	۰/۵±۰/۱	۵/۵±۰/۰۹	-
C16:1	غیر اشباع تک پیوندی	۶/۲±۰/۰۷ c	۱۱/۰۴±۱/۶ b	۱۹/۷±۰/۸ a	۶/۷±۰/۴ c
C17:1	غیر اشباع تک پیوندی	–	–	–	۰/۱۱±۰/۰۰۷
C18:1Cis9	غیر اشباع تک پیوندی	۷/۲±۰/۴ c	۱۴/۰±۰/۶ b	۱۱/۲±۰/۵ bc	۳۱/۹۴±۰/۴ a
C18:1Cis11	غیر اشباع تک پیوندی	۰/۳±۰/۲	۵/۸±۰/۳	۱/۷±۰/۱	۴/۵±۰/۴
C18:2(n-6)C	غیر اشباع چند پیوندی	۴/۰۲±۰/۳ b	۱۱/۳±۰/۴ a	۲/۹±۰/۰۰۷ b	۱۱/۷±۰/۲ a
C18:3 n3	غیر اشباع چند پیوندی	۷/۴±۰/۴ b	۱۸/۳±۰/۴ a	۰/۶±۰/۰۶ c	۰/۶±۰/۰۳ c
C20:2	غیر اشباع چند پیوندی	–	–	–	۰/۳±۰/۰۴
C20:4 n6 ARA	غیر اشباع چند پیوندی	–	–	۱/۵±۰/۲	۰/۲±۰/۰۰۷
C20:5 n3 EPA	غیر اشباع چند پیوندی	–	–	–	۰/۰۲±۰/۳
C22:4 n6 DTA	غیر اشباع چند پیوندی	–	–	۱/۰±۰/۰۴	–
C22:6 n3 DHA	غیر اشباع چند پیوندی	–	–	۱/۱±۰/۰۴	۰/۰۸±۰/۰۱

زیرخط بیش‌ترین مقدار درصد اسیدهای چرب را نشان می‌دهد. *حروف مختلف a و b (سطر) نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح ۵ درصد است.

جدول۳: درصد کلی نسبت اسیدهای چرب اشباع شده (SFA)، اشباع نشده با یک بند دوگانه (MUFA)، اشباع نشده با چند پیوند دوگانه‌های (PUFA) و نسبت امگا۶ / امگا۳ در ریز جلبک *Chlorella vulgaris* (میانگین ± انحراف معیار)

اسید چرب	۱۰۰٪ محیط کشت f/2 (کنترل ۱)	۱۰۰٪ محیط کشت فاضلاب (کنترل ۲)	۷۰٪محیط کشت فاضلاب+ ۳۰٪ محیط کشت f/2	۵۰٪ محیط کشت فاضلاب+ ۵۰٪ محیط کشت f/2
(ΣSFA) جمع اسید چرب اشباع	۵۴/۵۹±۱/۲ a	۳۹/۰۵±۱/۰۲ a	۴۲/۲۸±۱/۵ a	۴۳/۵۵±۱/۸ a
(Σ MUFA) جمع اسیدچرب غیراشباع تک پیوندی	۳۸/۲±۱/۱ b	۳۱/۳۸±۱/۰۱ b	۴۹/۵۱±۱/۶ a	۴۳/۲۳±۱/۸ a
(Σ PUFA) جمع اسیدچرب غیراشباع چندپیوندی	۷/۲±۰/۲ c	۲۹/۵۶±۰/۸ a	۸/۲۱±۰/۰۴ c	۱۳/۲±۱/۰۸ b
(ΣMUFA + Σ PUFA)	۴۵	۶۰/۹۴	۵۷/۷۲	۵۶/۴۳
(n3/n6) امگا۶/امگا۳	۰/۳۲±۰/۰۳ b	۱/۶۲±۰/۰۰۵ a	۰/۱۲±۰/۰۰۰۷ b	۰/۰۸±۰/۰۰۰۶ b
(امگا۳) n3	۱/۷۶±۰/۰۲ b	۱۸/۲۸±۰/۸ a	۰/۷۷±۰/۰۰۲ b	۱/۰۳±۰/۰۰۲ b
(امگا۶) n6	۵/۴±۰/۳ b	۱۱/۲۸±۰/۹ a	۶/۰۰۵±۰/۳ b	۱۱/۸۵±۰/۹ a

*حروف مختلف a و b (سطر) نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح ۵ درصد است.

بحث

فاضلاب‌های شهری و خانگی به‌دلیل غنی بودن از منابع نوترینت‌ها به‌عنوان محیط کشت مناسبی برای ریزجلبک‌ها محسوب می‌شوند (Sayadi و همکاران، ۲۰۱۱). نتایج تحقیق حاضر نشان دادند که، رشد ریزجلبک کلرلا در تیمارهای مختلف حاوی محیط کشت f/2 و فاضلاب اختلاف معنی‌داری را از روز سوم نشان دادند (P<۰/۰۵). در تیمارهای ۲ و ۳ به‌نظر می‌رسد که میزان رشد از روز پنجم، روند کاهشی داشته است. رشد ریزجلبک‌ها از دیدگاه تراکم سلولی و رشد، دارای سه فاز اصلی است: ۱) فاز انطباق ۲) فاز رشد افزایشی ۳) فاز رشد کاهشی یا توقف (Changfu و همکاران، ۲۰۱۳). از بین تیمارهای این آزمایش رشد تیمار ۱ و تیمار ۴ در طی دوره آزمایش متوقف نشد اما تیمار ۲ و تیمار ۳ در روز ۷ در فاز نزولی بودند به‌طوری که‌اگر زمان آزمایش افزایش می‌یافت وارد فاز مرگ می‌شدند. نتایج محققان نشان دادند که بعد از ۶ روز از دوره رشد، ریزجلبک وارد فاز کاهشی شدند و نرخ رشد به‌دلیل محدودیت‌های فیزیکی یا شیمیایی هم‌چون محتوی مواد مغذی، کاهش اکسیژن یا تغییرات pH کاهش یافت (Salgueiro و همکاران، ۲۰۱۶؛ Becker، ۱۹۹۴). در تحقیقی که Salgueiro و همکاران (۲۰۱۶) بر روی ریزجلبک کلرلا در تیمار پساب درطی ۹ روز دوره کشت انجام‌دادند به‌این نتیجه‌رسیدند که بیش‌ترین میزان رشد در روز ۶ دوره کشت دیده شد و تراکم سلولی مقدار ۱/۸۰ را نشان داد. این مقدار در مقایسه با نتایج مطالعه حاضر (تیمار ۴ و حدود ۱/۰۸) مقدار بیش‌تری می‌باشد. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که‌رشد ریزجلبک کلرلا در غلظت‌های مختلف از پساب مقادیر متفاوتی می‌باشد. در محیط آزمایشگاهی تا زمانی جلبک‌ها در فاز رشد افزایشی هستند که علاوه بر وجود شرایط مطلوب، مواد غذایی کافی و قابل دسترس نیز برای آن‌ها فراهم باشد. باید توجه داشت که رشد خوب ریز جلبک‌ها به تعادل مناسب بین مواد غذایی اصلی و فرعی موجود در محیط زندگی آن‌ها بستگی دارد (Vasconcelos، ۲۰۰۱). عدم تعادل بین مواد غذایی موجود در محیط کشت اغلب منجر به کاهش تدریجی و نهایتاً توقف رشد ریزجلبک‌ها می‌شود که با تمام شدن کامل مواد مغذی و مرگ و میر تمام جمعیت جلبکی و رسوب لاشه‌های آن‌ها آب محیط زندگی و کشت آن‌ها شفاف می‌شود (Changfu و همکاران، ۲۰۱۶). استفاده از تیمار ۴ (محیط کشت ۵۰٪ فاضلاب شهری+ ۵۰٪ F/2) جهت رشد ریزجلبک کلرلا در این تحقیق، مقرون به‌صرفه است، چون ریزجلبک کلرلا جهت رشد از منابع نیترات و فسفات این محیط استفاده کرده و در احیا و تصفیه فاضلاب نیز ایفای نقش می‌کند. نتایج حاصله از تحقیق حاضر نشانگر آن است که تیمار ۴ می‌تواند به‌عنوان بهترین محیط کشت برای ریزجلبک کلرلا محسوب شود.

Sayadi و همکاران (۲۰۱۱) انجام دادند به این نتیجه رسیدند که افزایش رشد ریزجلبک‌ها هم جهت و به موازات افزایش غلظت نیترات و فسفات در محیط کشت است. در تحقیقی که Kshirsagr (۲۰۱۳) با ریزجلبک *Chlorella vulgaris* برای جذب و حذف نیترات موجود در فاضلاب شهری انجام داد نتیجه گرفت که مقدار ۷۸/۱٪ نیترات موجود درمحیط فاضلاب شهری توسط این ریزجلبک حذف شده است. مطالعات انجام شده توسط Tom و Wong (۱۹۹۴) نیز نشان داد که جلبک‌هایی‌نظیر *Chlorella* sp. را می‌توان در غلظت‌های مختلف پساب جهت حذف بخشی از مواد موجود در آن پرورش داد. نتایج تحقیق آن‌ها نشان داد که جلبک *Chlorella* sp. می‌تواند در غلظت بالای آمونیاک به رشد خود ادامه داده و سبب کاهش غلظت مواد ازته خصوصاً آمونیاک موجود در پساب گردد (Tam و Wong، ۱۹۹۴). این محققین هم‌چنین اعلام نمودند که خیلی از گونه‌های جلبکی قادرند در پساب‌ها به‌عنوان یک‌عامل‌موثر و جایگزین در فرایند فرعی تصفیه فاضلاب‌ها به‌منظور کاهش و حذف مواد مغذی با غلظت بالا موثر باشند (Tam و Wong، ۱۹۹۶). ریزجلبک‌هایی که در پساب‌ها رشد می‌کنند می‌توانند به‌عنوان منبع انرژی، به‌عنوان کود، منبع ذخیره مواد مغذی نیترات و فسفات و هم‌چنین به‌عنوان غذا برای جانوران مورداستفاده قرار گیرند. رگرسیون خطی به‌دست‌آمده از شمارش سلولی با لام نئوبار و دستگاه اسپکتروفتومتری با مقدار R^2=۰/۹۹ نشان‌دهنده این است که، استفاده از روش شمارش با دستگاه اسپکتروفتومتری هم می‌تواند به‌عنوان‌راه ساده‌تر و بدون اتلاف زیاد وقت مورد استفاده قرار گیرد. در مطالعه‌ای که Salgueiro و همکاران (۲۰۱۶) بر روی رشد ریزجلبک کلرلا انجام داده و شمارش سلولی براساس هر دو روش صورت گرفت‌مقدار R^2=۰/۹۷ به‌دست آمد. محققان بیان داشتند که، منحنی رشد براساس شمارش سلولی به‌وسیله لام نئوبار قابل اعتمادتر از منحنی‌رشد حاصل از تراکم نوری به‌وسیله‌دستگاه اسپکتروفتومتری است. این به این دلیل است که تراکم نوری برای اندازه‌گیری رشد سلول به‌علت ضریب تداخل احتمالی و کدر بودن محیط و گرایش سلول‌های ریزجلبکی به شکل دانه‌ای یا آگلومریزه تعیین نمی‌شود (Myers و همکاران، ۲۰۱۳). بنابراین‌دقت کار کاهش می‌یابد. اما نتایج تحقیق‌حاضر نشان داد که با وجود همه خطاهایی که ممکن است از طریق‌سنجش با اسپکتروفتومتری اتفاق افتد اما مقدار R^2 مقدار قابل قبول و خوبی را نشان داده است که باز هم‌بستگی به محیط‌های کشت مختلف دارد. گونه ریزجلبک *Chlorella* sp. به‌عنوان منبع غنی از اسیدهای چرب C18:0 و C16:0 شناخته شده است (Cho و همکاران، ۲۰۱۳). در این تحقیق، اسیدهای چرب C6:0، C17:0، C16:1، C18:1cis9 و C18:3n3 بیش‌ترین مقدار اسیدهای چرب بعد از ۷ روز دوره کشت در بین تیمارها را نشان دادند، درحالی‌که،

اسیدهای چرب C16:0، C18:0، C18:0 ، C18:1 و C18:3n6 بیش‌ترین مقدار از اسیدهای چرب بعد از ۷ روز دوره کشت در محیط کشت پساب در مطالعه Bertoldi و همکاران (۲۰۰۶) گزارش شد. رقت‌های مختلف فاضلاب سبب کاهش مواد مغذی مهم می‌شود و کاهش مواد مغذی سبب سنتز ترجیحی چربی و افزایش اسیدهای چرب می‌گردد (Bertoldi و همکاران، ۲۰۰۶؛ Mandalam و Palsson، ۱۹۹۸). در این مطالعه، اسیدهای چرب غیراشباع تک پیوندی (Σ MUFA) در تیمار ۳ و ۴ بیش‌ترین مقدار است. نتایج مطالعه حاضر تاییدکننده مطالعات قبلی است و نشان‌دهنده‌این‌است که‌افزایش‌اسیدهای‌چرب غیراشباع تک‌پیوندی می‌تواند به‌دلیل کاهش غلظت نیتروژن در محیط کشت باشد (He و همکاران، ۲۰۱۳؛ Leonardos و Geider، ۲۰۰۴). فقر مواد مغذی، باعث تحریک تجمع چربی شده و ریزجلبک‌ها از چربی به‌عنوان ذخیره انرژی استفاده می‌کند(Merzlyak و همکاران، ۲۰۰۷). در شرایط کمبود مواد مغذی فسفات، گوگرد و آهن، توقف رشد سلول و جریان متابولیکی در فرایند فتو بیوسنتز هم منجر به بیوسنتز چربی یا اسیدچرب می‌شود و اغلب گزارشات نشان داده است که نیتروژن، به‌عنوان مهم‌ترین فاکتور محدودکننده تغذیه‌ای عمل می‌نماید که این امر باعث تجمع چربی در سلول‌های ریزجلبکی می‌شود (Merzlyak و همکاران، ۲۰۰۷).ریزجلبک *Chlorella* sp. درسراسر جهان به‌عنوان یک غذای سلامتی برای تغذیه انسان و حیوانات (آبزی و خشکی‌زی) استفاده می‌شود. کلرلا قادر است که تعداد زیادی از ترکیباتی هم‌چون پیکوسیانین، کارتنوئید، آنتی‌اکسیدانت و غیره را تولید کند (Hu و همکاران، ۲۰۰۸). بیش‌ترین درصد اسیدچرب امگا۳ آلفا لینولنیک اسید در این مطالعه در تیمار ۲ با مقدار ۱۸/۳ درصد گزارش شد. محققان در مطالعه‌ای که بر روی تاثیر محیط کشت بر روی مقادیر امگا ۳ و امگا ۶ انجام دادند باین نتیجه دست یافتند که بیش‌ترین مقادیر اسیدهای چرب، امگا۳ (آلفا لینولنیک اسید C18:3) با میانگین ۹/۶۶ درصد بوده است (گرجی‌زاده و همکاران، ۱۳۹۵) که در مقایسه با تحقیق حاضر، در حدود ۱به ۳ است. نسبت امگا۶ به امگا۳ در این مطالعه در تیمار ۲ برای کلرلا مقدار ۱/۶۲ درصد در مقایسه با بقیه تیمارها می‌باشد که نشان‌دهنده غنی بودن این ریزجلبک از امگا۳ در تیمار ۲ می‌باشد. در برخی تحقیقات دیگر نیز از میان یوکاریوت‌ها، ریزجلبک *Chlorella minutissima* با نرخ رشد سریع و مقادیر نسبتاً زیادی از PUFA معرفی شده است (Kachroo و همکاران، ۲۰۰۶). گرجی‌زاده و همکاران (۱۳۹۵) در تحقیق خود به‌این نتیجه رسیدند که ریزجلبک کلرلا غنی از امگا۳ با نسبت امگا۶ به امگا۳، ۳/۶۲ به ۹/۶ (یعنی ۱به۳) می‌باشد. از بین تیمارهای آزمایش شده در مطالعه حاضر، مقدار اسیدهای‌چرب غیراشباع ۶۰/۹۴ درصدو اسیدهای چرب اشباع شده ۳۹/۰۵ درصد در تیمار۲ به‌دست آمد که این‌مقدار مشابه مقداری است که‌توسط Chattipوهمکاران (۲۰۱۲) از ریزجلبک کلرلا به‌دست آمده است. Farooq و همکاران (۲۰۱۳) مقادیر تقریبا مشابهی از اسیدهای چرب با مقدار اسیدهای چرب غیراشباع چندپیوندی(۷۷/۸۵٪)و اسیدهای‌چرب‌اشباع شده(۲۱/۵٪) در ریزجلبک کلرلا را گزارش دادند. هم‌چنین تیمار ۲ بهترین محیط کشت برای ریزجلبک *C. vulgaris* از نظر غنای امگا ۳ می‌تواند مطرح شود و تکثیر و پرورش آن به شکل انبوه برای تهیه منبع غنی از امگا۳ پیشنهاد می‌گردد.منبع اصلی اسیدهای چرب ریزجلبک‌ها می‌باشند که از طریق زنجیره غذایی وارد بدن آبزیانی هم‌چون ماهی و میگو می‌شوند و انسان هم با مصرف این آبزیان این اسیدهای چرب را دریافت می‌نماید. پس لزوم جایگزینی ریزجلبک‌ها به‌عنوان منابع اصلی تولیدکننده اسیدهای چرب ضروری PUFA به‌جای ماهیان که به‌صورت واسطه آن را دریافت می‌کنند، در رژیم غذایی انسان کاملاً ضروری به‌نظر می‌رسد و قابل توصیه است.

تشکر و قدردانی

نویسندگان بدین‌وسیله مراتب تشکر و سپاس فراوان خود را از معاونت پژوهشی دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار به‌دلیل حمایت مالی از پایان‌نامه کارشناسی‌ارشد نویسنده سوم ابراز می‌دارند. هم‌چنین از پرسنل محترم آزمایشگاه دانشکده منابع طبیعی دانشگاه تهران (پردیس کرج) که در انجام امور آزمایشگاهی صمیمانه یاری نمودند، تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع

۱. **باقری، ش. و معصومی‌زاده، س.ز.، ۱۳۹۵.** بررسی رشد میکروجلبک *Chlorella sp.* در آب دریا و فاضلاب غیراستریل. مجله علمی شیلات ایران. شماره ۲۶، جلد ۲، صفحات ۱۵۳ تا ۱۶۳.

۲. **گرجی، ه.؛ دوست‌شناس، ب.؛ سخایی‌زاده، ن. ؛ غانمی، ک. و ارچنگی، ب.، ۱۳۹۶.** بررسی پروفایل اسیدهای چرب ریزجلبک‌های *Spirulina* sp. sp.، *Chlorella sp. Chaetoceros* و معرفی آن‌ها به عنوان منابع بالقوه جدید جهت استخراج ۶ و امگا ۳ امگا. دوماهنامه طبّ جنوب. دوره ۱۹، شماره ۲، صفحات ۲۱۲ تا ۲۲۴.

۳. **Banerjee, S.; Hew, W.E.; Shariff, M. and Yusoff, F.M., 2011**.Growth and proximate composition of tropical marine *Chaetoceros calcitrans* and *Nannochloropsis oculata* cultured outdoors and under laboratory conditions. African. Journal of Biotechnology. Vol. 10, pp: 1375-1383.

۴. **Becker, E.W., 1994.** Microalgae: Biotechnology and Microbiology. (New York)

۵. **Bowen, R.A. and Clandinin, M.T., 2010**. Maternal dietary 22:6n-3 is more effective than 18:3n-3 in increasing content in phospholipids of glial dietary protein sources and

risk of coronary heart disease in women. Circulation. Vol. 122, pp 876-883.

۶. **Changfu, W.; Xiaoqing, Y.; Hong, L. and Jun, Y., 2013**. Nitrogen and phosphorus removal from municipal wastewater by the green alga *Chlorella* sp. Journal of Environmental Biology. Vol. 34, pp 421-425.

۷. **Chattip, P.; Prasert, P.; Armando, T.Q.; Montomobu, G. and Artiwan, S., 2012.** Microalgae lipid extraction and evaluation of single step biodiesel production. Engineering Journal. Vol. 16, 5 p.

۸. **Cho, S.; Lee, N. and Park, S., 2013.** Micoalgae cultivation for bioenergy production using wastewaters from mamunicipal waste water treatment plant, as nutritional sources. Bioresour. Technol. Vol. 131, pp: 515-520.

۹. **Cho, D.H.; Ramanan, R.; Heo, J.; kang, Z.; Kim, B.H.; Ahn, C.Y.; Oh, H.N. and Kim, H.S., 2015**. Organic carbon, influent microbial diversity and temperature strongly influence algal diversity and biomass in raceway ponds treating raw municipal wastewater. Bioresour. Technol. Vol. 191, pp: 481-487. doi: 10.1016/j.biortech.2015.02.013.

۱۰. **Das, S.K.; Khan, M.M.R.; Guha, A.K.; Das, A.R. and Mandal, A.B., 2012.** Silver-nano biohybride material: synthesis, characterization and application in water purification. Bioresource Technology. Vol. 124, pp 495-499.

۱۱. **Dieffnbacher, A. and Pocklington, W., 1992.** Standard Methods for the Analysis of Oils, Fats and Derivatives 1St Supplement. 7th Revised and Enlarged Edition. Blackwell Scientific Oxford. Vol. 1, 171 p.

۱۲. **Farooq, A.; Aminu, K. and Abdullah, Y., 2013**. The potential of Chlorella vulgaris for wastewater treatment and biodiesel production. Pakistan Journal of Botany. Vol. 45, pp: 461-465.

۱۳. **Folch, A.; Ayon, A.; Hurtado, O.M.A.; Schmidt, M.A. and Tone, H., 1999.** Molding of deep polydimethylsiloxane microstructures for microfluidics and biological applications. Journal of Biomechanical Engineering. Vol. 121, pp: 28-34.

۱۴. **Galli, C. and Marangoni, F., 2006**. N-3 fatty acids in the Mediterranean diet. Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids. Vol. 75, pp: 129-33.

۱۵. **Goli, S.A.H.; Sahafi, S.M.; Rashidi, B. and Rahimmalek, M., 2013**. Novel oilseed of *Dracocephalum kotschyi* with high n3 to n6 polyunsaturated fatty acid ratio. Industrial Crops and Products. Vol. 43, pp: 188-193.

۱۶. **Gorjizadeh, H.; Sakhaei, N.; Doustshenas, B.; Ghanemi, K. and Archangi, B., 2016**. Fatty acid composition of *Spirulina sp*., *Chlorella sp*. and *Chaetoceros sp*. Microalgae and introduction as potential new sources to extinct omega 3 and omega 6. Iran South Medical Journal. Vol. 19, No. 2, pp: 212-224.

۱۷. **He, P.J.; Mao, B. and Shen, C.M., 2013.** Cultivation of Chlorella vulgaris on waste water containing high level of ammonia for biodiesel production. Bioresour. Technol. Vol. 129, pp: 177-181.

۱۸. **Hu, Q.; Sommerfeld, M.; Jarvis, E. and Ghirardi, M., 2008**. Microalgal triacylglycerols as feed stocks for biofuel productions: perspectives and advances. Blackwell Publishing Ltd, National Renewable Energy Laboratory. Plant. Vol. 5, pp: 621-639.

۱۹. **Kshirsagar, A.D., 2013**. Bioremediation of wastewater by using microalgae: an experimental study. International Journal of Life Science Biotechnology and Pharmacology Research. Vol. 2, No. 3, pp: 339-346.

۲۰. **Kachroo, D.; Singh, J.S.M. and Ramamurthy, V., 2006**. Modulation of unsaturated fatty acids content in algae *Spirulina platensis* and Chlorella minutissima in response to herbicide SAN 9785. Elect J Biotech. Vol. 9, pp: 386-390.

۲۱. **Lavajoo, F.; Amrollahi Biuki, F.; Khanipour, A.; Mirzajani, A. and Akbarzadeh, A., 2018**. An Invasive Shrimp Species, *Machrobrachium nipponense*, in Anzali Wetland Demonstrated a Potential Source for Commercial Fishing, Journal of Aquatic Food Product Technology. Vol. 27, No. 9, pp: 975-985.

۲۲. **Lavajoo, F. and Taherizadeh, M., 2016**. Determination of the growth rates of *Spirolina* and *Chaeatoceros* algae in urban waste sewage and their capability to deplete nitrate and phosphate content in the sewage. Journal of Applied Sciences & Environmental Management. Vol. 20, No. 3, pp: 691-699.

۲۳. **Leonardos, N. and Geider, R.J., 2004.** Responses of elemental and biochemical composition of Chaetoceros muelleri to growth under varying light and nitrate: phosphate supply ratios and their influence on critical N:P. Limnol. Oceanogr. Vol. 49, pp: 2105-2114 .

۲۴. **Li, X.; Hu, H.Y. and Yang, J., 2010**. Lipid accumulation and nutrient removal properties of a newly isolated freshwater microalga, *Scenedesmus* sp. LX1, growing in secondary effluent. New Biotechnology. Vol. 27, No. 1, pp: 59-63.

۲۵. **Mahmut, O. and Sengil, I.A., 2003**. Enhancing phosphate removal from wastewater by using polyelectrolytes and clay injection. Journal of Hazardous Material. Vol. 100, No. 1-3, pp: 131-146.

۲۶. **Mandalam, R.K. and Palsson, B., 1998.** Elemental balancing of biomass and medium composition enhances growth capacity in high-density *Chlorella vulgaris* culture. Biotechnol. Bioeng. Vol. 59, pp: 605-611.

۲۷. **Merzlyak, M.N.; Chivkunova, O.B.; Gorelova, O.A. and Reshetnikova, V., 2007.** Effect of nitrogen starvation on optical properties, pigments, and arachidonic acid content of the unicellular green alga *Parietochloris incisa* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta). Journal of Phycology. Vol. 43, No. 4, pp: 833-843.

۲۸. **Myers, J.A.; Curtis, B.S. and Curtis, W.R., 2013**. Improving accuracy of cell and chromophore concentration measurements using optical density. BMC Biophysics. Vol. 6, 4 p.

۲۹. **Otles, S. and Pire, R., 2001**. Fatty acid composition of *Chlorella* and *Spirulina* microalgae species. J AOAC. Vol. 84, pp: 1708-1714.

۳۰. **Rocha, J.M.S.; Garcia, J.E.C. and Henriques, M.H.F., 2003**. Growth aspects of the marine microalga *Nannochloropsis gaditana*. Biomolecular engineering. Vol. 20, pp: 237-242.

۳۱. **Sayadi, M.H.; Ghatnekar, S.D. and Kavian, M.F., 2011.** Algae a promising alternative for biofuel. Proceedings of the International Academy of Ecology and Environmental Sciences. Vol. 1, No. 2, 112 p.

۳۲. **Salgueiro, J.L.; Perez, L.; Maceiras, R.; Sanchez, A. and Cancela, A., 2016.** Bioremediation of wastewater using Chlorella vulgaris microalgae: phosphorus and organic matter. Int. J. Environ. Res. Vol. 10, No. 3, pp: 465-470.

۳۳. **Tam, N.F.Y. and Wong, Y.S., 1994**. Nutrient and heavy metal retention in mangrove sediment receiving wastewater. Water Science and Technology. Vol. 29, No. 4, pp: 193-200.

۳۴. **Tam, N.F.Y. and Wong, Y.S., 1996.** Effect of ammonia concentrations on growth of *Chlorella vulgaris* and nitrogen removal from media. Bioresource Technology. Vol. 57, No. 1, pp: 45-50.

۳۵. **Voltolina, D.; Gmez-Villa, H. and Correa, G., 2004**. Biomass production and nutrient removal in semicontinuous cultures of *Scenedesmus* sp. (Chlorophyceae) in artificial wastewater, under a simulated day-night cycle. Vie Milieu. Vol. 54, pp: 21-25.

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

۳۷. **Voet, D.; Voet, J.G. and Pratt, C.W., 2006.** Fundamentals of Biochemistry (2nd ed.). John Wiley & Sons. pp: 547-556.

۳۸. **Yalcin, T.; Naz, M. and Turkmen, M., 2006**. Utilization of different nitrogen sources by cultures of *Scenedesmus acuminatus*. Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences. Vol. 6, pp: 123-127.

۳۹. **Yang, J.; Rasa, E. and Tantayotai, P., 2011**. Mathematical model of *Chlorella minutissima* UTEX2341 growth and lipid production under photoheterotrophic fermentation conditions. Bioresource Technol. Vol. 102, pp: 3077-3082.

۴۰. **Yoo, C.; Jun, S.Y. and Lee, J.Y., 2010**. Selection of microalgae for lipid production under high levels carbon dioxide. Bioresource Technology. Vol. 101, pp: 71-74.