

Quantitative and qualitative study of the microalgae growth, *Chlorella vulgaris* in deep aquifer well water of Sistan

Mir F.¹; Mirdar Harijani J.^{1*}; Gharaei A.¹; Rahdari A.²

*Javadmirdar@uoz.ac.ir

1-Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, University of Zabol, Zabol, Iran

2- Department of Aquatic Science, Hamoun International Wetland Institute, Research Institute of Zabol, Zabol, Iran

Received: April 2025

Accepted: June 2025

Published: July 2025



Copyright: © 2025 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Introduction

Microalgae can produce valuable compounds, such as pigments, minerals, amino acids and fatty acids, proteins, and vitamins that can be used in pharmaceutical, health, and food fields, with three economically important genera including *Chlorella*, *Spirulina*, and *Dunaliella* (Priyadarshani and Rath, 2012). Green algae include various forms: filamentous, membranous, unicellular, plate-like, or tubular. *Chlorella* is spherical in shape and have relatively thin walls. Reproduction in *Chlorella* is also very simple and occurs through asexual reproduction (Kerem *et al.*, 2008). *C. vulgaris* can stimulate plant growth in agriculture and suppress the growth of pathogenic microorganisms (Allaguvatova *et al.*, 2019). *Chlorella* is an important species of green algae that is fed to rotifers, various aquatic larvae and some phytophagous fish in fish farming ponds and aquatic ecosystems (Salavatian and Fallahi, 2005). Deep aquifer well water is a source of groundwater that is considered a strategic asset in any country. Deep water, which is located at a depth of 300 to 1200 meters, is not suitable for drinking due to high salinity and dissolved solids, but it is suitable for agricultural activities. These water resources are valuable in countries with arid and desert climates. The first deep water well in Iran was commissioned in 2018 in the Sistan region with the capacity to produce 1,500 m³ of water per day (Khosravanizadeh *et al.*, 2021). This research was conducted considering the closeness of the salinity level of deep water in Well No. 1 of Sistan to the requirements of *C. vulgaris* algae, and can be an introduction to the possibility of further studies on various algae in these waters.

Methodology

The experiment was conducted in the Microalgae Research Laboratory of Zabol Research Institute. The microalgae stock *C. vulgaris* was obtained from the Fars Algae Biological Reserves Development

Company. To achieve the appropriate concentration of microalgae for cultivation, the prepared stock was cultured in 500 ml Erlenmeyer flasks for one week at a salinity of 24.5 parts per thousand (distilled water and Lake Urmia salt) and 1.5 ml of Gaillard culture medium per liter. This experiment was conducted with 5 treatments (treatment 1: 100% culture medium. Treatment 2: 25% deep aquifer well water plus 75% culture medium. Treatment 3: 50% deep aquifer well water plus 50% culture medium. Treatment 4: 75% deep aquifer well water plus 25% culture medium. Treatment 5: 100% deep aquifer well water, and 3 repetitions during the duration of 10 days. It was done at a temperature of 27°C and 3500 lux lighting and continuous aeration in 500 ml containers. pH was measured using a pH meter. To measure the density in different treatments, the number of cells was counted every other day using a Neobar slide and a light microscope (magnification $\times 40$). Algae growth rate in different treatments including specific growth rate (SGR) (percentage per day) and doubling time (DT) (per day) were calculated using the relevant formulas (Hibbered, 1981). Biomass dry weight was calculated using the method of Colusse *et al.* (2020), and chlorophyll a content was calculated using the method of Lim *et al.* in 1991 and the corresponding formula. The collected data were statistically analyzed using SPSS version 22 software. The normality of the data and the homogeneity of variances were checked with Kolmogorov-Smirnov and Levene's tests. One-way ANOVA was used to determine the difference in means. Also, Duncan's test with a level of ($p < 0.05$) was used to compare means.

Results

An examination of the pH changes in the experimental treatments shows that the highest fluctuation of these changes occurred on the first day of the experiment, from pH 8.98 to 10.63 on the fifth day. The initial density in all treatments on the first day of the experimental period was 15×10^4 cells ml^{-1} . *Chlorella* algae showed increasing growth in all treatments until day 5 of the experiment, with the highest density in the fifth treatment being 129.33×10^4 cells ml^{-1} . However, no significant difference was observed between treatments ($p > 0.05$). Also, on the third day of the experiment, the highest specific growth rate (SGR) of *C. vulgaris* algae was related to treatment 1 (100% Gaillard culture medium) and the lowest was on the last day for treatment 4 (75% deep aquifer well water). In addition, the results of this study show that the highest doubling time (DT) is observed in treatment 4 (25% deep aquifer well water) on the last day and the lowest time for treatment 1 (100% Gaillard medium) on the third day. The results of measuring the concentration of chlorophyll a show that the highest and lowest levels of this pigment were observed on the third day of the experiment in treatment 5 (100% deep aquifer well water) and treatment 3 (50% deep aquifer well water), respectively. Also, the results related to the dry weight of this alga indicate that the highest average was recorded on the tenth day (treatment 5) and the lowest for treatment 3 on the third day of the experiment. Also, a significant difference was observed between the treatments only on the third day of the experiment ($p < 0.05$).

Discussion and conclusion

Algae have the ability to utilize waste and can produce valuable materials such as pharmaceuticals, chemicals, and human and animal food through light energy and inexpensive natural materials such as carbon dioxide (De la noue and Pauw, 1988). Therefore, the necessity of cultivating this type of algae in saline water environments is felt, and considering the new water source in the Sistan region, the necessity of faster and cheaper growth in its mass production seems necessary. For this reason, *Chlorella vulgaris* is used in this study to investigate its growth process in the deep aquifer well water of the Sistan region and the Gaillard culture medium. Light, temperature, pH, water quality, aeration rate and the presence of nutrients are considered as factors affecting the production of microalgae (Ayala, 1998). In the present study, the pH fluctuation in Table 2 for treatments containing deep water was in the range of 10-9. pH is one of the most important parameters for algae growth because it can determine the availability of carbon dioxide and nutrients. A study by Habibi et al. in 2011 showed that the highest growth of *Chlorella* was recorded at pH 9.5, although it maintained its growth and survival at higher pH (12). The results of this study showed that the highest growth was in the pH range of 7 to 8, which could be explained by the difference in environmental conditions and the type of algae species. The results of this study showed that the highest density of *C. vulgaris* species was observed in treatment 5 (100% deep aquifer well water) on the fifth day with an average density of 129.33×10^4 cells ml⁻¹. A study by Rahdari *et al.* (2023) investigating the ability to cultivate the microalgae *Dunaliella tertiolecta* in the deep aquifer well waters of Sistan also showed that the highest number of this microalga was 24×10^6 cells ml⁻¹. It seems that factors such as the type of species and the conditions of the microalgae cultivation environment, such as the type of water, the salinity of the water, the culture medium, etc., are effective in the cell density of this alga in various studies. According to the results of this research, it seems that the microalga *C. vulgaris* has the ability to be cultivated in deep water, but further studies are needed to achieve the appropriate combination of this water (deep water) with municipal or distilled water to achieve the desired salinity.

Conflict of Interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

Acknowledgment

This work was financially supported by a grant (UOZ-8746) from the Vice Chancellor for Research Affairs of University of Zabol. We would like to express our gratitude.

مقاله علمی - پژوهشی:

مطالعه کمی و کیفی رشد ریز جلبک *Chlorella vulgaris* در آب چاه ژرف سیستان

فاطمه میر^۱، جواد میردار هریجانی*^۱، احمد قرایی^۱، عبدالعلی راهداری^۲

*Javadmirdar@uoz.ac.ir

۱-گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه زابل، زابل، ایران

۲-گروه علوم آبزیان، پژوهشکده تالاب بین المللی هامون، پژوهشگاه زابل. زابل. ایران

تاریخ چاپ: تیر ۱۴۰۴

تاریخ پذیرش: خرداد ۱۴۰۴

تاریخ دریافت: فروردین ۱۴۰۴

چکیده

در این مطالعه به بررسی کمی و کیفی رشد ریز جلبک *Chlorella vulgaris* در محیط کشت گیلارد و آب ژرف منطقه سیستان پرداخته شده است. این آزمایش با ۵ تیمار (تیمار ۱: ۱۰۰ درصد محیط کشت، تیمار ۲: ۲۵ درصد آب ژرف، تیمار ۳: ۵۰ درصد آب ژرف، تیمار ۴: ۷۵ درصد آب ژرف، تیمار ۵: ۱۰۰ درصد آب ژرف) و ۳ تکرار طی مدت زمان ۱۰ روز در دمای ۲۷ درجه سانتی گراد و روشنایی ۳۵۰۰ لوکس و هوادهی به صورت مداوم در ظرف های ۵۰۰ میلی لیتر انجام شد. نتایج این آزمایش نشان داد، pH در تیمارهای آب ژرف به میزان ۸/۸۹-۱۰/۶۳ بوده است. به علاوه، همه تیمارها نسبت به روز اول آزمایش (تراکم 15×10^4 سلول در میلی لیتر) تا روز ۵ آزمایش از رشد برخوردار بودند و بعد از آن روند رشد آنها نزولی شد. نتایج نشان داد که در بین تیمارها، تیمار ۲ (۲۵ درصد آب ژرف) از کمترین رشد $50/24 \times 10^4$ سلول در میلی لیتر و تیمار ۵ (۱۰۰ درصد آب ژرف) با تراکم $129/33 \times 10^4$ سلول در میلی لیتر نسبت به سایر تیمارها دارای بیشترین رشد بود. بیشترین و کمترین نرخ رشد ویژه (SGR) به ترتیب برای تیمار یک (۱۰۰ درصد محیط کشت) و ۴ (۷۵ درصد آب ژرف) بود. همچنین بیشترین و کمترین زمان دو برابر شدن (DT) به ترتیب مربوط تیمار ۴ (۷۵ درصد آب ژرف) و یک (۱۰۰ درصد محیط کشت) بود. همچنین بیشترین و کمترین بیومس به ترتیب برای تیمار ۵ (۱۰۰ درصد آب ژرف) و ۳ (۵۰ درصد آب ژرف) بود. بیشترین و کمترین میزان کلروفیل a نیز به ترتیب برای تیمار ۵ (۱۰۰ درصد آب ژرف) در روز سوم و تیمار ۳ (۵۰ درصد آب ژرف) در روز آخر بود. بنابراین، طبق نتایج این مطالعه، پرورش ریزجلبک *C. vulgaris* در آب چاه ژرف امکان پذیر است.

لغات کلیدی: *Chlorella vulgaris*، رشد، کلروفیل a، نرخ رشد ویژه، آب ژرف سیستان

*نویسنده مسئول



Copyright: © 202۰ by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

مقدمه

آب ژرف از منابع آبهای زیر زمینی است که در هر کشوری جزو سرمایه‌های استراتژیک به‌شمار می‌آید. آبهای ژرف که در عمق ۱۲۰۰-۳۰۰ متری قرار دارند، به دلیل شوری زیاد و مواد جامد محلول برای شرب مناسب نیستند، ولی برای فعالیت‌های کشاورزی مناسب هستند. این منابع آبی در کشورهایی که اقلیم خشک و بیابانی دارند، با ارزش هستند. زمان ماندگاری آبهای ژرف با افزایش عمق به‌شدت افزایش می‌یابد و ماندگاری در آبخوان‌های ژرف طولانی است که به میلیون‌ها سال می‌رسد (Jasechko et al., 2017). در بعضی از کشورها منابع آب موجود به دلیل بالا بودن سطح منابع آب زیر زمینی (اندونزی و بنگلادش)، در عمق ۱۵۰ متری جزو آب ژرف به حساب می‌آید (Hoqtue and Burgess, 2012). طرح مطالعاتی آب ژرف ایران با همکاری و سرمایه‌گذاری روس‌ها در دو منطقه هزار مسجد خراسان و زابل سیستان و بلوچستان آغاز گردید. در ادامه شرکت‌های دانش بنیان با همکاری معاونت علمی ریاست جمهوری و بر اساس استانداردهای بین المللی، اولین چاه آب ژرف ایران را در سال ۱۳۹۷ و در منطقه سیستان با امکان تولید روزانه ۱۵۰۰ مترمکعب آب به بهره‌برداری رساندند (Khosravanizadeh et al., 2021).

ریز جلبک‌ها می‌توانند ترکیبات با ارزشی مثل رنگدانه، مواد معدنی، اسیدهای آمینه و اسیدهای چرب، پروتئین و ویتامین تولید کنند که از آنها می‌توان در زمینه‌های دارویی، بهداشتی، غذایی استفاده کرد. سه گونه مهم اقتصادی آنها شامل *Chlorella*، *Spirulina* و *Dunaliella* هستند (Priyadarshani and Rath, 2012). جلبک‌های سبز به اشکال مختلف ریشه‌ای، غشایی، تک سلولی، صفحه‌ای یا لوله‌ای دیده می‌شوند. ساختمان سلولی کلروفیتا مانند تمام جلبک‌ها به‌جز سیانوفیتا و پروکلروفیتا، یوکاریوت است (Evans, 1974). این جلبک از رده *Trebouxiophyceae* و راسته *Chlorellales* متعلق به خانواده *Chlorellaceae* و جنس *Chlorella* است (Guzman et al., 2001). جلبک *Chlorella* به شکل کروی بوده و داری دیواره نسبتاً نازک است. همچنین تولید مثل در *Chlorella* بسیار ساده و از طریق تولید مثل غیر جنسی صورت می‌گیرد (Kerem et

2008). تولید مثل *Chlorella* با تشکیل اسپورهای متحرک و غیر متحرک صورت می‌گیرد که اغلب در تمام آبهای شیرین دیده شده است و دارای زندگی همزیست با برخی از پروتوزواهاست. ریز جلبک *Chlorella vulgaris* دارای فعالیت ضد اکسیدانی، ضد باکتریایی، تنظیم کننده سیستم ایمنی و ضد التهابی است. ترکیب میکرو جلبک *C. vulgaris* شامل ۹۰ درصد ماده خشک دارای کلروفیل، پروتئین (۵۷/۶۳ درصد)، چربی (۵/۸۴ درصد)، کربوهیدرات (۲۵-۲۰ درصد)، ویتامین‌های A، تیامین ریبوفلاوین، نیاسین، پیریدوکسین، بیوتین، کوبالامین، C، اسید پانتوتینیک، اسید فولیک، اینوزیتول، چربی‌ها (۱۵-۵ درصد) که ۱۸ درصد اشباع و ۸۲ درصد غیر اشباع، ۱۹ اسید آمینه آنزیم‌های ضد اکسیدانی، آهنی، فسفر، منیزیم، کلسیم، ید، روی، پتاسیم، سولفور، سدیم، کلر، مقادیر کمی منگنز، خاکستر (۴ درصد) و الباف خام (۱۳ درصد) است (Hasegawa et al., 2000). همچنین حاوی کارتنوئید هایی مانند ویتامین A آلفا لیپوئیک، چربی‌های سالم مانند اسید اولئیک و نسبت متعادل اسیدهای چرب امگا-۳ به امگا-۶ و اسیدهای نوکلئیک برای ساخت DNA و RNA است (Zheng, 2012). *C. vulgaris* می‌تواند رشد گیاهان را در کشاورزی تحریک کرده و رشد میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا را سرکوب نماید (Allaguvatova et al., 2019). از *Chlorella* مواد مختلفی به‌دست می‌آید که شامل اسید آمینه، ترپنوئید، فلورانتین، آلکان‌ها، کتون‌های هالوژنه، ترکیبات استروئیدی، سولفیدهای حلقوی، اسیدهای چرب، فنل‌هاست (Uma et al., 2011). همچنین برخی از آنها تأثیر ضد باکتریایی دارند که می‌توان به کلرولین که از *Chlorella* استخراج می‌شود، اشاره نمود (Taskin et al., 2007). خواص ضد باکتریایی آن می‌تواند به علت وجود کارتنوئید ها، پروتئین‌ها، ویتامین‌ها، رنگدانه‌ها و ترکیبات فنلی اندازه‌گیری شده در عصاره آنها باشد (Priya, 2012). *Chlorella* از گونه‌های مهم جلبک سبز است که در استخرهای پرورش ماهی و اکوسیستم‌های آبی مورد تغذیه روتیفر، انواع لارو آبزیان و بعضی ماهیان فیتوفاگ قرار می‌گیرد (Salavatian and Fallahi, 2005). همچنین همبستگی باکتری‌های موجود در لجن فعال شده با جلبک

مواد و روش کار

این آزمایش در آزمایشگاه تحقیقات ریز جلبک‌های پژوهشگاه زابل انجام گردید. استوک ریز جلبک *Chlorella vulgaris* از شرکت توسعه ذخایر زیستی جلبک‌های فارس تهیه شد. برای دستیابی به غلظت مناسب ریز جلبک برای کشت، استوک تهیه شده در ارلن‌های ۵۰۰ میلی‌لیتری به مدت یک هفته با شوری ۲۴/۵ قسمت در هزار (آب مقطر و نمک دریاچه ارومیه) و مقدار ۱/۵ میلی‌لیتر محیط کشت گیلارد به ازای هر لیتر کشت داده شد.

طرح آزمایش

پس از آماده سازی و ضدعفونی کردن وسایل و مواد مورد نیاز، کشت ریز جلبک با ۵ تیمار و سه تکرار (جدول ۱) طی دوره ۱۰ روزه تحت شرایط دمای 27 ± 1 درجه سانتی‌گراد، روشنایی ۳۵۰۰ لوکس (۸ ساعت تاریکی و ۱۶ ساعت روشنایی) و هوادهی به صورت مداوم با شدت جریان دو لیتر در دقیقه انجام شد. ریز جلبک در ظروف ۵۰۰ میلی‌لیتری (۴۵۰ میلی‌لیتر آب ژرف و محیط کشت و ۵۰ میلی‌لیتر استوک جلبک) کشت شد. در این آزمایش شاخص pH به صورت روزانه و شاخص‌های تراکم سلولی، وزن خشک (زی توده) و کلروفیل a به صورت یک روز در میان اندازه‌گیری شد.

C. vulgaris منجر به بهبود قابل‌توجهی در تولید گاز هیدروژن بیوفوتولیتیک (H_2) در مقایسه با استفاده از کشت‌های خالص باکتریایی می‌شود (Javed et al., 2022). تحقیقات نشان می‌دهد که مصرف دارویی *C. vulgaris* باعث تقویت سیستم ایمنی بدن می‌شود و استفاده از آن در درمان برخی بیماری‌ها مناسب است (Janczyk et al., 2007). *Chlorella* در شرایط آزمایشگاهی دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی، ضد التهاب و ضد تومور است که این اثرات به دلیل پروتئین، محتوای ویتامین و مواد شیمیایی آن است (Guzman et al., 2001).

Rahdari و همکاران (۲۰۲۳) و Khosravanizadeh و همکاران (۲۰۲۱) به ترتیب به مطالعه بر ریز جلبک *Dunaliella tertiolecta* و ریز جلبک *Dunaliella salina* در آب ژرف سیستمان پرداختند و شرایط پرورش آنها را در این آب بررسی نمودند. این تحقیق نیز با توجه به نزدیکی میزان شوری آب ژرف چاه شماره یک سیستم با نیازمندی‌های جلبک *C. vulgaris*، انجام شده است و می‌تواند مقدمه‌ای بر امکان مطالعات بیشتر در زمینه جلبک‌های مختلف در این آبها باشد.

جدول ۱: تیمارهای کشت ریز جلبک *Chlorella vulgaris* در مطالعه حاضر

Table 1: The microalga, *Chlorella vulgaris* cultivation treatments in the present study

Treatment(T)	Amount of culture medium
1	100% Culture medium (control)
2	25 %deep aquifer well water + 75% culture medium
3	50 %deep aquifer well water + 50% culture medium
4	75% deep aquifer well water + 25% culture medium
5	100% deep aquifer well water

سنجش میزان تراکم

برای اندازه‌گیری میزان تراکم در تیمارهای مختلف، تعداد سلول‌ها یک روز در میان با استفاده از لام نئوبار و میکروسکوپ نوری (بزرگنمایی ۴۰) (Euromex, GE) (3035, Holland) مجهز به دوربین (Euromex, CMEX, Holland) شمارش شدند. همچنین میزان رشد جلبک در

اندازه‌گیری pH

برای اندازه‌گیری pH ابتدا محیط کشت هر تیمار را هم زده تا به صورت یکنواخت شود. سپس با استفاده از pH متر (pH Meter L2012, Labtron Co., Iran) اندازه آن ثبت گردید.

تیمارهای مختلف با استفاده از فرمول‌های ذیل محاسبه شد (Hibberd, 1981):

$$SGR = \ln C_1 - \ln C_0 / T_1 - T_0$$

C_0 و C_1 : به ترتیب نشان‌دهنده میانگین تراکم جلبک در روز نهایی و ابتدایی (سلول در میلی لیتر)، T_0 و T_1 : به ترتیب روز آخر و روز اول (زمان)

$$DT = \ln 2 / SGR$$

SGR: مقدار رشد ویژه (درصد در روز)، DT: زمان دو برابر شدن (در روز)

وزن خشک زی توده

برای محاسبه وزن خشک لوله‌های آزمایش شیشه‌ای شسته شده و در آون خشک شدند. سپس، لوله‌ها با ترازویی به دقت ۰/۱ میلی گرم وزن شدند. میزان ۱۰ میلی لیتر محیط کشت جلبک با پیپت برداشته و با سرعت ۳۵۰۰ g به مدت ۸ دقیقه سانتریفیوژ شدند. بعد از آن، لایه رویی بیرون ریخته و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۱۱۰ درجه داخل آون قرار داده شدند. بعد از مدت، لوله‌ها مجدداً وزن شدند. مقدار وزن خشک زی توده با کسر وزن اولیه از وزن ثانویه محاسبه شد (Colusse et al., 2020).

اندازه گیری مقدار کلروفیل a

برای استخراج کلروفیل a، مقدار ۵ میلی لیتر نمونه از هر ظرف کشت برداشت و با سرعت ۳۵۰۰ g به مدت ۶ دقیقه سانتریفیوژ شدند. سپس، لایه رویی خارج و ۵ میلی لیتر

استون ۸۰ درصد به آن اضافه شد. جهت در معرض قرار گرفتن همه جلبک‌ها با استون، چند بار لوله‌ها به شدت تکان داده شدند و سپس درون فویل آلومینیوم به مدت ۲۴ ساعت در یخچال نگهداری شدند. بعد از مدت زمان معین شده دوباره سانتریفیوژ شدند و با استفاده از دستگاه اسپکتوفتومتری مقدار جذب هر نمونه در سه طول موج ۶۳۰، ۶۴۷، ۶۷۴ قرائت و غلظت کلروفیل a با رابطه ذیل محاسبه شد (Lim et al., 1991):

$$Chl a = (11.6OD \times 664 + 1.31OD \times 645 - 0.14OD \times 630)$$

OD: میزان جذب خوانده شده به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر

روش تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم افزار SPSS 22.0 استفاده شد. نرمال بودن داده‌ها و همگنی واریانس‌ها با آزمون‌های کولموگروف - اسمیرنوف و لوون بررسی گردید. برای مشخص شدن اختلاف میانگین‌ها از آزمون واریانس یک طرفه استفاده شد. همچنین آزمون دانکن با سطح ۹۵ درصد ($p < 0.05$) برای مقایسه میانگین‌ها استفاده شد.

نتایج

pH

بررسی روند تغییرات pH در تیمارهای آزمایشی نشان می‌دهد که بیشترین میزان نوسان این تغییرات در روز اول آزمایش از pH ۸/۹۸ و تا حدود ۱۰/۶۳ در روز پنجم ادامه داشته است (جدول ۲).

جدول ۲: مقایسه روند تغییرات pH (میانگین $\pm$ SE) طی دوره ۱۰ روزه پرورش جلبک *Chlorella vulgaris* در تیمارهای مختلف
Table 2: Comparison of the trend of pH changes (mean $\pm$ SE) during the 10-day period of growing *Chlorella vulgaris* algae in different treatments

Day	T1	T2	T3	T4	T5
1	0.05 ^a $\pm$ 10.29	0.08 ^b $\pm$ 9.88	0.08 ^b $\pm$ 9.78	0.00 ^c $\pm$ 9	00 ^c 0. $\pm$ 8.98
2	0.04 ^a $\pm$ 10.41	0.05 ^{ab} $\pm$ 10.06	0.24 ^b $\pm$ 9.78	0.1 ^c $\pm$ 9.31	0.09 ^c $\pm$ 9.29
3	0.14 ^a $\pm$ 10.47	0.07 ^{ab} $\pm$ 10.14	0.25 ^{bc} $\pm$ 9.91	0.1 ^d $\pm$ 9.38	0.06 ^{cd} $\pm$ 9.50
4	0.15 ^a $\pm$ 10.36	0.23 ^{ab} $\pm$ 10.03	0.28 ^{ab} $\pm$ 9.87	0.8 ^b $\pm$ 9.64	0.66 ^{ab} $\pm$ 9.73
5	0.14 ^a $\pm$ 10.63	0.13 ^b $\pm$ 10.23	0.09 ^{ab} $\pm$ 10.34	0.12 ^c $\pm$ 9.41	0.04 ^c $\pm$ 9.71
8	0.05 ^{ab} $\pm$ 10.10	0.19 ^b $\pm$ 10.33	0.07 ^a $\pm$ 10.38	0.09 ^{ab} $\pm$ 10.05	0.05 ^b $\pm$ 9.94
9	0.09 ^a $\pm$ 10.38	0.1 ^b $\pm$ 10.12	0.02 ^a $\pm$ 10.45	0.04 ^{ab} $\pm$ 9.73	05 ^b 0. $\pm$ 10.10
10	0.21 $\pm$ 10.14	0.23 $\pm$ 10.13	0.23 $\pm$ 10.13	0.21 $\pm$ 10.14	0.05 $\pm$ 10.05

حروف متفاوت در هر ردیف نشان دهنده اختلاف معنی دار هستند ($p < 0.05$).

Different letters in each row indicate significant differences between groups ($p < 0.05$)

تراکم

صعودی داشته است که بیشترین میزان تراکم در تیمار پنجم $1.04 \times 129/33$ سلول در میلی لیتر شمارش گردید. با وجود این، اختلاف معناداری بین تیمارها مشاهده نشد ($p > 0.05$).

در جدول ۳ میزان تراکم جلبک *Chlorella vulgaris* در تیمارهای مختلف ارائه شده است. تراکم اولیه در تمام تیمارها در روز اول دوره 1.04×15 سلول در میلی لیتر بود. جلبک *Chlorella* تا روز ۵ آزمایش در تمام تیمارها رشد

جدول ۳: میزان تراکم (میانگین $\pm$ SE) جلبک *Chlorella vulgaris* در تیمارهای مختلف طی دوره ۱۰ روزه ($1.04 \times$ سلول در میلی لیتر)

Day	T1	T2	T3	T4	T5
1	0.00 $\pm$ 15	0.00 $\pm$ 15	0.00 $\pm$ 15	0.00 $\pm$ 15	0.00 $\pm$ 15
3	12.03 $\pm$ 86.33	26.71 $\pm$ 76.66	7.79 $\pm$ 64.33	6.06 $\pm$ 58.33	11.85 $\pm$ 66/33
5	10.01 $\pm$ 113	34.74 $\pm$ 33/119	21.42 $\pm$ 99.66	47.15 $\pm$ 106.33	19.54 $\pm$ 33/129
8	27.22 $\pm$ 116	26.52 $\pm$ 62.66	13.10 $\pm$ 64.33	12.09 $\pm$ 66	13.38 $\pm$ 107.66
10	41 $\pm$ 97	2.59 $\pm$ 50.24	25.02 $\pm$ 63	12.49 $\pm$ 55	21.28 $\pm$ 101

یک (۱۰۰ درصد محیط کشت گیلارد) و کمترین آن در روز آخر برای تیمار ۴ (۷۵ درصد آب ژرف) است.

در جدول ۴ میزان نرخ رشد ویژه *C. vulgaris* در تیمارهای مختلف ارائه شده است. نتایج این جدول نشان می‌دهد که در روز سوم آزمایش بیشترین نرخ رشد ویژه مربوط به تیمار

جدول ۴: محاسبه نرخ رشد ویژه (SGR) (میانگین $\pm$ SE) جلبک *Chlorella vulgaris* در تیمارهای مختلف طی دوره ۱۰ روزه (درصد در روز)

Table 4: Calculation of specific growth rate (SGR) (mean $\pm$ SE) of *Chlorella vulgaris* algae in different treatments in a period of 10 days (% per day).

Day	T1	T2	T3	T4	T5
3	0.06 $\pm$ 0.35	0.01 $\pm$ 0.31	0.04 $\pm$ 0.24	0.03 $\pm$ 0.21	0.06 $\pm$ 0.25
5	0.03 $\pm$ 0.24	0.08 $\pm$ 0.26	0.05 $\pm$ 0.21	0.09 $\pm$ 0.23	0.05 $\pm$ 0.29
8	0.04 $\pm$ 0.14	0.04 $\pm$ 0.07	0.01 $\pm$ 0.07	0.02 $\pm$ 0.07	0.02 $\pm$ 0.13
10	0.04 $\pm$ 0.09	0.05 $\pm$ 0.07	0.03 $\pm$ 0.05	0.01 $\pm$ 0.04	0.03 $\pm$ 0.11

درصد محیط کشت گیلارد) در روز سوم مشاهده می‌شود. تنها در روز دهم آزمایش بین تیمارهای مختلف اختلاف معنی داری مشاهده گردید ($p < 0.05$).

در جدول ۵ زمان دو برابر شدن *C. vulgaris* در تیمارهای مختلف ارائه شده است. نتایج این جدول بیانگر این نکته است که بیشترین زمان دو برابر شدن در تیمار ۴ (۲۵ درصد آب ژرف) در روز آخر و کمترین زمان برای تیمار یک (۱۰۰

جدول ۵: زمان دو برابر شدن (روز) جمعیت جلبک *Chlorella vulgaris* در تیمارهای مختلف طی دوره ۱۰ روزه (میانگین $\pm$ SE)

Table 5: Doubling time (mean $\pm$ SE) of *Chlorella vulgaris* algae population in different treatments in a period of 10 days(days)

Day	T1	T2	T3	T4	T5
3	0.4 $\pm$ 2	0.3 $\pm$ 2.2	0.5 $\pm$ 2.9	0.6 $\pm$ 3.3	0.4 $\pm$ 2.8
5	0.5 $\pm$ 2.9	0.4 $\pm$ 2.7	0.6 $\pm$ 3.3	0.5 $\pm$ 3	0.3 $\pm$ 2.4
8	0.9 $\pm$ 5	0.9 $\pm$ 9.9	0.9 $\pm$ 9.9	0.9 $\pm$ 9.9	0.9 $\pm$ 5.3
10	0.9 ^{bc} $\pm$ 7.7	0.9 ^b $\pm$ 9.9	1 ^{ab} $\pm$ 13.9	1.2 ^a $\pm$ 17.3	0.9 ^c $\pm$ 6.3

حروف متفاوت در هر ردیف نشان دهنده اختلاف معنی دار هستند ($p < 0.05$).

Different letters in each row indicate significant differences between groups ($p < 0.05$)

کلروفیل a

بالاترین سطح این رنگیزه در تیمار ۵ (۱۰۰ درصد آب ژرف) و کمترین آن برای تیمار ۳ مشاهده می‌شود. در تمامی روزها بین تیمارها اختلاف معنی‌داری وجود دارد ($p < 0.05$).

در جدول ۶ مقدار کلروفیل a در *C. vulgaris* در تیمارهای مختلف ارائه شده است. نتایج حاصل از اندازه‌گیری میزان کلروفیل a در روز سوم آزمایش نشان می‌دهد که

جدول ۶: مقایسه میزان رنگیزه فتوسنتزی کلروفیل a (میانگین $\pm$ SE) طی ۱۰ روز جلبک *Chlorella vulgaris* در تیمارهای مختلف (میلی گرم بر میلی لیتر)

Table 6: Comparison of the amount of photosynthetic pigment chlorophyll a (mean $\pm$ SE) during 10 days of *Chlorella vulgaris* algae in different treatments (mg/ml)

Day	T1	T2	T3	T4	T5
3	0.2 ^b $\pm$ 0.5	0.3 ^b $\pm$ 0.6	0.2 ^b $\pm$ 0.4	0.5 ^{ab} $\pm$ 1.3	0.8 ^a $\pm$ 2
5	0.5 ^{ab} $\pm$ 1.1	0.6 ^a $\pm$ 1.2	0.4 ^b $\pm$ 0.9	0.6 ^{ab} $\pm$ 1.1	0.6 ^a $\pm$ 1.3
8	0.6 ^a $\pm$ 1.2	0.3 ^b $\pm$ 0.6	0.4 ^b $\pm$ 0.6	0.4 ^b $\pm$ 0.7	0.5 ^a $\pm$ 1.1
10	0.5 ^a $\pm$ 1	0.2 ^b $\pm$ 0.5	0.4 ^b $\pm$ 0.6	0.2 ^b $\pm$ 0.5	0.6 ^a $\pm$ 1

حروف متفاوت در هر ردیف نشان دهنده اختلاف معنی‌دار هستند ($p < 0.05$).

Different letters in each row indicate significant differences between groups ($p < 0.05$)

شده است. همچنین بین تیمارها در روز سوم آزمایش اختلاف معنی‌دار مشاهده می‌شود ($p < 0.05$). در روزهای پنجم، هشتم، دهم آزمایش نیز بین تیمارها اختلاف معنی‌داری مشاهده نشده است ($p > 0.05$).

وزن خشک

در جدول ۷ مقدار بیومس *C. vulgaris* در تیمارهای مختلف ارائه شده است. نتایج این جدول بیانگر این نکته است که بالاترین میانگین وزن خشک در روز دهم (تیمار ۵) و کمترین میزان برای تیمار ۳ در روز سوم آزمایش ثبت

جدول ۷: مقایسه زی توده خشک (میانگین $\pm$ SE) جلبک *Chlorella vulgaris* در تیمارهای مختلف طی ۱۰ روز (گرم در لیتر)

Table 7: Comparison of dry mass (mean $\pm$ SE) of *Chlorella vulgaris* algae in different treatments during 10 days (g/L)

Day	T1	T2	T3	T4	T5
3	0.1 ^{ab} $\pm$ 0.56	0.11 ^{abc} $\pm$ 0.41	0.002 ^{bc} $\pm$ 0.04	0.07 ^a $\pm$ 0.6	0.008 ^c $\pm$ 0.08
5	0.06 $\pm$ 0.6	0.02 $\pm$ 0.5	0.09 $\pm$ 0.6	0.04 $\pm$ 0.4	0.007 $\pm$ 0.03
8	0.03 $\pm$ 0.5	0.09 $\pm$ 0.4	0.09 $\pm$ 0.6	0.04 $\pm$ 0.6	0.009 $\pm$ 0.06
10	0.1 $\pm$ 1.2	0.5 $\pm$ 1.6	0.08 $\pm$ 1.1	0.7 $\pm$ 1.6	0.3 $\pm$ 2.2

حروف متفاوت در هر ردیف نشان دهنده اختلاف معنی‌دار هستند ($p < 0.05$).

Different letters in each row indicate significant differences between groups ($p < 0.05$)

کشت این گونه از جلبک‌ها در محیط‌های آبی شور احساس می‌شود و با توجه به منبع آبی جدید در منطقه سیستان، ضرورت رشد سریع‌تر و ارزان‌تر در تولید انبوه آن لازم است. به همین علت در این مطالعه از جلبک *Chlorella vulgaris* استفاده می‌شود تا بتوان روند رشد آن را در آب ژرف منطقه سیستان و محیط کشت گیلارد مورد بررسی قرار داد.

نور، درجه حرارت، pH، کیفیت آب، میزان هوادهی و وجود ترکیبات مغذی به عنوان عوامل تاثیرگذار بر تولید

بحث

به دلیل کمبود آب شیرین در جهان و وجود منابع آبی غیر قابل شرب فراوان مثل اقیانوس‌ها و آب دریاها راه حلی نیاز است تا بتوان از آب غیر قابل شرب برای تولید غذا استفاده کرد. جلبک‌ها از توانایی استفاده از مواد داخل آب برخوردارند و می‌توانند از طریق انرژی نوری و مواد کم قیمت طبیعی مثل دی اکسید کربن مواد با ارزشی چون مواد دارویی، شیمیایی، غذای انسان و حیوان را تولید کنند (De la noue and Pauw, 1988) بنابراین، ضرورت انجام

بوده است. به علاوه، در مطالعه Khosravanizadeh و همکاران (۲۰۲۱) رشد گونه *Dunaliella salina* در آب ژرف سیستان بررسی شد که نتایج این آزمایش نشان داد، تیمارهای دارای آب ژرف شوری ۲۰ گرم در لیتر دارای رشد صعودی 58×10^6 سلول در میلی لیتر بوده است. به نظر می رسد، عواملی چون نوع گونه و شرایط محیط پرورش ریز جلبک نظیر نوع آب، میزان شوری آب و محیط کشت در میزان تراکم سلولی این جلبک در مطالعات مختلف مؤثر باشد.

با عنایت به تأثیر شوری بر پاسخ های فیزیولوژیک و بیوشیمیایی ریز جلبک ها، از این عامل می توان به عنوان شاخص بسیار مهمی در پرورش ریز جلبک ها یاد نمود (Kirst, 1990). در مطالعه Adenan و همکاران (۲۰۱۳) به بررسی تأثیر دو عامل شوری و دما بر گونه های *Chlorella* sp. و *Chaetoceros calcitrans* برای بهینه سازی تولید زیست توده پرداخته شد. نتایج نشان داد که *C. Calcitrans* در شوری ۳۰ گرم در لیتر و دمای ۳۰ درجه برای شرایط دریایی مناسب است، ولی گونه *Chlorella* در شوری ۲۵ گرم در لیتر و دمای ۲۵ درجه، دارای رشد بهینه است. مشابه با آن تحقیق، در تحقیق حاضر نیز پرورش جلبک در شوری ۲۵ گرم در لیتر انجام شده است. Akbari و Madadkar Haghjou (۲۰۱۷) گونه *Dunaliella salina* را در شوری های یک مولار و دو مولار مورد مطالعه قرار دادند. میزان تراکم در این شوری ها به ترتیب 40×10^6 و 25×10^6 سلول در میلی لیتر به دست آمد. بدین ترتیب، تأثیر شوری های مختلف بر میزان تراکم جلبک مورد سنجش قرار گرفت. Sadeghi و همکاران (۲۰۱۹) تأثیر غلظت های مختلف شوری بر رشد میکرو جلبک *Chlorella* را مورد بررسی قرار دارند. تیمار شوری اعمال شده از نوع کلرور سدیم به میزان ۱۷-۱۷۰ میلی مولار بود و نتایج مطالعه نشان داد که این جلبک از نظر تحمل به شوری مقاوم است، هر چند افزایش میزان شوری موجب کاهش سیستم فتوسنتزی و کاهش رشد شده است.

Rahdari و همکاران (۲۰۲۳) در بررسی قابلیت پرورش ریز جلبک *D. tertiolecta* در آب های ژرف سیستان، بالاترین میزان رشد، بیشترین تولید کلروفیل a و کاروتنوئید، بالاترین سرعت رشد ویژه، کمترین زمان دو برابر شدن و بالاترین

میکرو جلبک ها به حساب می آیند (Ayala, 1998). در مطالعه حاضر، میزان نوسان pH در جدول ۲ برای تیمارهای حاوی آب ژرف در محدوده ۹-۱۰ بوده است. pH به این علت که می تواند دسترسی به دی اکسید کربن و مواد غذایی را تعیین کند، از مهم ترین شاخص های رشد جلبک هاست. مطالعه Habibi و همکاران (۲۰۱۱) نشان داد که بیشترین رشد جلبک *Chlorella* در pH ۹/۵ ثبت شده، هر چند که در pH های بالاتر (۱۲) نیز قدرت رشد و ماندگاری خود را حفظ نموده است. در مطالعه Lababpour و همکاران (۲۰۰۵) بیان می شود که افزایش pH می تواند باعث افزایش کارتنوئید و بیوماس شود که در مطالعه حاضر با افزایش وزن خشک و کلروفیل a همراه شده است. مطالعه Khosravanizadeh و همکاران (۲۰۲۱) بر جلبک *Dunaliella salina* در آب ژرف نشان داد که محدوده نوسان pH در تیمارها ۸-۹ بوده که اعداد ثبت شده به نتایج مطالعه حاضر نزدیک است. Zhu و همکاران (۲۰۰۲) به مطالعه گونه *Mortierella alpine* پرداختند. نتایج این تحقیق نشان داد که بیشترین رشد در محدوده pH ۷-۸ است که علت تفاوت این عامل با پژوهش حاضر می تواند به دلیل شرایط محیطی و نوع گونه جلبک باشد.

نتایج جدول ۳ نشان داد که گونه *C. vulgaris* در تیمار یک (شاهد) تا روز ۸ آزمایش روند تراکم صعودی با میانگین 116×10^4 سلول در میلی لیتر داشته و پس از آن روندی کاهشی پیدا کرده است. همچنین بیشترین تراکم در تیمار ۵ (۱۰۰ درصد آب ژرف) در روز پنجم با تراکم میانگین $129/33 \times 10^4$ سلول در میلی لیتر مشاهده شده است. در مطالعه Rezaei و همکاران (۲۰۱۷) بر میکرو جلبک *Chlorella* با غنی سازی آب دریای خزر در محیط کشت عمومی، بیشترین تراکم سلولی به میزان 830×10^6 سلول در میلی لیتر ثبت شده است. Mohammadkhani و Madadkar Haghjou (۲۰۱۵) به مطالعه بر دو سویه از جلبک *Dunaliella* در غلظت های مختلف نمک پرداختند که بیشترین تراکم 19×10^6 سلول در میلی لیتر در نمک های ۰/۱ و ۰/۵ مولار به دست آمد. مطالعه Rahdari و همکاران (۲۰۲۳) در بررسی قابلیت پرورش ریز جلبک *D. tertiolecta* در آب های ژرف سیستان نیز نشان داد که بیشترین تعداد این ریز جلبک 24×10^6 سلول در میلی لیتر

- Akbari, F. and Madadkar Haghjou, M., 2017.** Improvement of nutritional values of two *Dunaliella* (green microalgae) species, by changing in medium factors. *Journal of Fisheries*, 70(3): 243-261. DOI:10.22059/jfisheries.2018.240113.995
- Allaguvatova, R., Myasina, Y., Zakharenko, V., Gaysina, L., 2019.** A simple method for the cultivation of algae *Chlorella vulgaris* Bejerinck, IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, Volume 390, XVI-th international youth Science and Environmental Baltic Region Countries Forum 7–9 October 2019, Gdansk, Poland. DOI:10.1088/1755-1315/390/1/012020
- Ayala, F., 1998.** Guide *Spirulina* cultivation. Microorganisms in biotechnology at photoautotrophs. Motril, Granada, Spain. pp 3-20.
- Colusse, G.A., Mendes, C.R.B., Duarte, M.E.R., de Carvalho, J.C. and Nosedá, M.D., 2020.** Effects of different culture media on physiological features and laboratory scale production cost of *Dunaliella salina*. *Biotechnology Reports*, 27, p.e00508. DOI:10.1016/j.btre. 2020.e00508
- De la noue, J., Pauw, N., 1988.** The potential of microalgal biotechnology: A review of production and uses of microalgae. *Biotechnology Advances*, 6(4):725-770. DOI:10.1016/0734-9750(88)91921-0
- Evans, L., 1974.** Algal physiology and biochemistry. In: Stewart, W.D.P. (eds) Cytoplasmic organelles in algal physiology and biochemistry. University of California Press, Berkley. USA. pp 86 -123.

میزان تقسیم در تیمار آب ژرف با شوری ۲۰ گرم در لیتر مشاهده شد. این در حالی است که در تحقیق Khosravanizadeh و همکاران (۲۰۲۱) بر رشد گونه *D. salina* در آب ژرف سیستان، بیشترین مقادیر کلروفیل a، تقسیم سلولی و نرخ رشد ویژه و تغییرات pH در تیمار آب شهر با شوری ۳۵ گرم در لیتر به دست آمده و بیشترین بیومس در تیمار آب ژرف تغلیظ شده با شوری ۳۵ گرم در لیتر ثبت شده است. در تحقیق حاضر نیز نتایج نشان داد که در بین تیمارهای مختلف، بیشترین رشد، بیشترین نرخ رشد ویژه (SGR) و بیشترین بیومس در تیمار ۵ (۱۰۰ درصد آب ژرف) به دست آمده است. این در حالی است که بیشترین زمان دو برابر شدن (DT) و بیشترین میزان کلروفیل a نیز برای تیمار ۲ (۲۵ درصد آب ژرف) ثبت شده است. با عنایت به مطالعات مشابه بر امکان سنجی پرورش ریزجلبک‌ها در آب ژرف سیستان، به نظر می‌رسد که نوع گونه جلبک، میزان اختلاط آب ژرف با آب شهر و نوع محیط کشت می‌تواند در ایجاد اختلاف در شاخص‌های اندازه‌گیری شده تأثیرگذار باشد. با توجه به نتایج این تحقیق، به نظر می‌رسد که ریزجلبک *Chlorella vulgaris* از قابلیت پرورش در آب ژرف برخوردار است، اما برای دستیابی به ترکیب مناسب این آب (آب ژرف) با آب شهری یا مقطر تا رسیدن به شوری مورد نظر، نیاز به مطالعات بیشتر است.

تشکر و قدردانی

این تحقیق با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه زابل تحت عنوان پژوهانه شماره (UOZ-8746) انجام شده است. بدین‌وسیله از همکاران دانشگاه زابل صمیمانه تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع

- Adenan, N., Yusoff, F and Shariff, M., 2013.** Effect of salinity and temperature on the growth of diatoms and green algae. *Journal of Fisheries and Aquatic Science*, 8(2):397-404. DOI:10.3923/jfas.2013.397.404

- Guzman, S., Gato, A., and Calleja, J.M., 2001.** Antiinflammatory, analgesic and free radical scavenging activities if the marine microalgae *Chlorella stigmatophora* and *Phaeodactylum tricornutum*. *Phytotherapy Research*, 15(3), 224-230. DOI:10.1002/ptr.715
- Habibi, M., Shokravi, SH., and Habibi, Z., 2011.** Study of combination effects of pH adjusting ability of green algae *Chlorella* Sp. Gah0013 at limited irradiance conditions. *Journal of Plant Environmental Physiology*, 5(4), 57-62. (In Persian)
- Hasegawa, T., Node, K., Kumamoto, S., Ando, Y., Yamada, A., Yoshikai, Y., 2000.** *Chlorella vulgaris* culture supernatant (CVS) reduces psychological stress induced apoptosis in thymocytes of mice. *International Immunopharmacology*, 22:877-885. DOI:10.1016/S0192-0561(00)00049-7
- Hibberd, D., 1981.** Notes on the taxonomy and nomenclature of the algae classes Eustigmatophyceae and Tribophyceae (Synonym *Xanthophyceae*). *Botanical Journal of the Linnean Society*, 82:93-119. DOI:10.1111/j.1095-8339.1981.tb00954.x
- Hoqtue, M. and Burgess, W., 2012.** 14C dating of deep groundwater in the Bengal Aquifer System, Bangladesh: Implications for aquifer anisotropy, recharge sources and sustainability. *Journal of Hydrology*, 444:209-220. DOI:10.1016/j.jhydrol.2012.04.022
- 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*, 132:163-169. DOI:10.1016/j.anifeedsci.2006.03.007
- Jasechko, S., Perrone, D., Befus, K., Cardenas, M., Ferguson, G., Gleeson, T., Luijk, E., McDonnell, J.J., Taylor, R.G., Wada, Y. and Kirchner, J.W., 2017.** Global aquifers dominated by fossil ground waters but wells vulnerable to modern contamination. *Nature Geoscience*, 10(6):425. DOI:10.1038/ngeo2943
- Javed, M. A., Zafar, A. M., and Hassan, A.A., 2022.** Regulate oxygen concentration using a co-culture of activated sludge bacteria and *Chlorella vulgaris* to maximize biophotolytic hydrogen production. *Algal Research*, 63:102649. DOI:10.1016/j.algal.2022.102649.
- Kerem, M., Salman, B., Pasaoglu, H., Bedirli, A., Alper, M., Katircioglu, H., 2008.** Effects of microalgae *chlorella* species crude extracts on intestinal adaptation in experimental short bowel syndrome. *World Journal of Gastroenterology*, 14(28):45120. DOI:10.3748/wjg.14.4512.
- Khosravanizadeh, A., Rahdari, A., Pakzad Toochaei S., 2021.** Evaluation growth, biomass and pigment contents of *Dunaliella salina* cultivated in deep aquifer well waters of Sistan. *Iranian Scientific Fisheries Journal*, 30(6):127-143. DOI:10.22092/ISFJ.2022.126129 (In Persian)
- Kirst, G., 1990.** Salinity tolerance of eukaryotic marine algae. *Annual Review of Plant Biology*, 41: 21– 53. DOI:10.1146/annurev.pp.41.060190.000321
- Lababpour, A., Shimahara, K., Hada, K., Kyoui, Y., Katsuda, T. and Katoh, S., 2005.** Fed-batch culture under illumination with blue light emitting diodes (LEDs) for astaxanthin production by *Haematococcus pluvialis*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 100(3):339-342. DOI:10.1263/jbb.100.339
- Lim, L.C., Fulks, W. and Main, K.L., 1991.** An overview of live feeds production systems in

- Singapore. In: Harvey, B.J. (eds) Rotifers and Microalgae Culture Systems. *Redmund: Argent Laboratories, Singapore*, pp. 203–221.
- Mohammadkhani, R. and Madadkar Haghjou, M., 2015.** Evaluation of growth rate, protein content and some physiological characteristics from two salt water phytoplanktonic species, microalga *Dunaliella*, under different environmental conditions. *Journal of Marine Science and Technology*, 14(2):25-42.
DOI:10.22113/jmst.2015.7392 (In Persian)
- Priya, S., 2012.** Analysis of value-added biochemical compounds and antimicrobial activity of green algae *Chlorella vulgaris*. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 4(5):2577-2579.
- Priyadarshani, I., and Rath, B., 2012.** Commercial and industrial applications of microalgae- A review. *Journal of Algal Biomass Utilization*, 3:89-100.
- Rahdari, A., Khosravanizadeh, A. and Pakzad Toochei, S., 2023.** Investigation of Sistan deep aquifer well water potential for culturing microalga *Dunaliella tertiolecta*. *Aquatic Physiology and Biotechnology*, 11(1):19-40.
DOI:10.22124/japb.2022.21644.1457 (In Persian).
- Rezaei, S., Taghavi, H. and Ganjian, A. 2017.** Studying the growth process of microalgae *Chlorella* using water enrichment of Caspian Sea in general medium. *Journal of Plant Research (Iranian Journal of Biology)*, 30(3):512-520. (In Persian).
- Sadeghi, M., Jorjani, S., Shahbazi, A. and Babaei Ziyarati, K., 2019.** Studying of different salinity concentrations on the growth microalgae "*Chlorella* sp" from rice fields Golestan Province. *Journal of Research in Environmental Health*, 4(4):283-290. DOI:10.22038/jreh.2019.36265.1255 (In Persian)
- Salavatian, M. and Fallahi, M., 2005.** An investigation on the effects of varying calcium concentrations on the growth and biomass of *Chlorella vulgaris*. *Iranian Scientific Fisheries Journal*, 14 (1):79-86. DOI:10.22092/isfj.2017.113818 (In Persian)
- Taskin, E., Ozturk, M., and Kurto, O., 2007.** Antibacterial activities of some marine algae from the Aegean Sea (Turkey). *African Journal of Biotechnology*, 6(24):2746-510. DOI:10.5897/ajb2007.000-2439
- Uma, R., Sivasubramanian, V., Niranja, L., and Devaeaj, S., 2011.** Preliminary phycochemical analysis and in vitro antibacterial screening if green microalgae, *Desmococcus olivaceous*, *Chlorococcum humicola* and *Chlorella vulgaris*. *Journal of Algal Biomass Utilization*, 2(3):74-81.
- Zheng, L., Oh, S.T., Jeon, J.Y., Moon, B.H., Kwon, H.S., Lim, S.U., An, B.K. and Kang, C.W., 2012.** The dietary effects of fermented *Chlorella vulgaris* (CBT) on production performance, liver lipids and intestinal microflora in laying hens. *Asian and Australasian Journal of Animal Science*, 25(2):261-266.
DOI:10.5713/ajas.2011.11273
- Zhu, M., Zhou, P.P., and Yu, L.J., 2002.** Extraction of lipids from *Mortierella alpina* and enrichment of arachidonic acid from the fungal lipids. *Bioresource Technology*, 84:93-95. DOI:10.1016/S0960-8524(02)00028-7