شیلات، مجله منابع طبیعی ایران
دوره ۷۵، شماره ۲، تابستان ۱۴۰۱
صفحات ۱۸۱-۱۶۹

بررسی تراکم، رشد و ترکیب بیوشیمیایی جلبک دریایی *Tetraselmis tetrathele* پرورش یافته با پساب ملاس و دلستر

امیدوار فرهادیان[1]*، الهام نظافتیان[2]، فاطمه شریفی خیرآبادی[3]، فاطمه پیکان حیرتی[4]، فاطمه رستمی[2]

۱. دانشیار گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان، ایران
۲. دانشجوی دکتری، گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان، ایران
۳. کارشناسی ارشد، گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان، ایران
۴. استادیار گروه شیلات، گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان، ایران

تاریخ ارسال: ۱۴۰۰/۰۹/۰۳ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۱/۱۶

چکیده

پساب‌ها دارای مواد مغذی هستند که می‌توانند به عنوان محیط کشت ریزجلبک‌ها استفاده شوند. در این مطالعه تراکم، رشد و ترکیبات بیوشیمیایی (پروتئین، چربی و کربوهیدرات) جلبک *T. tetrathele* پرورش یافته با استفاده از پساب کارخانه ملاس و دلستر و محیط کشت کانوی مورد بررسی قرار گرفت. آزمایش به صورت طرح کاملا تصادفی با تیمارهای؛ کانوی، پساب دلستر و پساب ملاس هر کدام در دو حالت رقیق (۵ میلی‌لیتر به ازای هر لیتر از آب دریا) و غلیظ (۱۰ میلی‌لیتر به ازای هر لیتر از آب دریا)، طی یک دوره ۱۱ روزه انجام شد. بر اساس نتایج، بیشترین تراکم سلولی در تیمار ملاس غلیظ ($۹۶/۷\times۱۰^{۳}$ سلول در هر میلی‌لیتر) و بیشترین میزان رشد ویژه در تیمار کانوی رقیق (۱۵/۵در روز) بدست آمد. همچنین بیشترین میزان پروتئین و چربی (به ترتیب ۳۹/۵۰ درصد و ۸/۱۴ درصد) در تیمار دلستر غلیظ و کمترین میزان این ترکیبات در تیمار کانوی غلیظ (به ترتیب ۱۰/۷۰ درصد و ۲/۹۸ درصد) مشاهده شد. بیشترین میزان کربوهیدرات (۲۸/۹۲ درصد) نیز در تیمار ملاس رقیق به دست آمد. بنابراین با توجه به میزان رشد و ترکیبات بیوشیمیایی بدست آمده از جلبک *T. tetrathele* در این تحقیق، می‌توان نتیجه گرفت که پساب کارخانه‌های دلستر و ملاس می‌توانند به عنوان یک محیط کشت مناسب برای رشد جلبک *T. tetrathele* در نظر گرفته شوند.

واژگان کلیدی: پساب، ترکیب بیوشیمیایی، دلستر و ملاس، رشد، *Tetraselmis tetrathele*.

* نویسنده مسئول: امیدوار فرهادیان
Email: omfarhad@iut.ac.ir

Journal of Fisheries
Vol. 75, No. 2, Summer 2022
pp. 169-181

Density, growth and biochemical composition of *Tetraselmis tetrathele* cultured in molasse and beer wastewater as media

OmidvarFarhadian[1*], Elham Nezafatian[2], Fatemeh Sharifi Kheyrabadi[3], Ftemeh Peykan Heyrati[4], Fatemeh Rostami[2]

1.Associate Professor, Department of Natural Resources, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran.
2. PhD student, Department of Natural Resources, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran.
3. MSc graduate, Department of Natural Resources, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran.
4- Assistant Professor, Department of Natural Resources, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran.

Received: 24-Nov-2021 **Accepted: 05-Feb-2021**

Abstract

Wastewaters contain nutrients that can be used as culture media for microalgae. In this study, density, growth, and biochemical compositions (protein, lipid and carbohydrates) of *Tetraselmis tetrathele* were investigated using mollasse and beer wastewater. A completely randomized experimental design was performed containing treatments; Conway, mollasse, and beer wastewater in two concentrations of diluted (5 ml per liter of culture medium, v/v), and concentrated (10 ml per liter of culture medium, v/v) over a 11-day period. The highest cell density was obtained in the concentrated mollasse treatment (96.7×10^3 cells per ml) and the highest specific growth rate obtained in the dilute Conway treatment (15.5 per day). In addition, the highest amount of protein and lipid (39.5% and 8.1%, respectively) was measured in the concentrated beer treatment and the lowest recorded in the concentrated Conway treatment (10.70% and 2.98%, respectively). The highest amount of carbohydrates (28.92%) was obtained in diluted mollasse treatment. Therefore, based on the results of growth rate and biochemical compositions of *T. tetrathele*, it can be concluded that the beer and mollasse wastes are suitable media for growth of *T. tetrathele.*

Keywords: Wastewater, Biochemical composition, Beer and Mollasse, Growth, *Tetraselmis tetrathele*.

Corresponding author: OmidvarFarhadian Email: omfarhad@iut.ac.ir

۱. مقدمه

جلبک‌ها، تولید کنندگان اولیه غالب در اکثر محیط‌های آبی هستند و قسمت اعظم انرژی را برای بسیاری از شبکه های غذایی آبی فراهم می‌کنند (Farhadian and Jafari, 2015). در سال های اخیر، ریزجلبک‌ها به‌عنوان موجودات فتوسنتزکننده مناسب جهت تهیه زیتوده مورد توجه قرارگرفته‌اند که با تولید ترکیبات زیست‌فعال مانند؛ پروتئین ها، رنگدانه ها (کاروتنوئیدها، فیکوسیانین‌ها، کلروفیل‌ها)، ویتامین‌ها و اسیدهای چرب،کربوهیدرات‌ها، مواد معدنی و انواع ویتامین ها و نیز یون‌های پتاسیم، ید، سدیم و همچنین اسید آلژنیک و برخی از این ترکیبات دارای خواص درمانی چون کاهش کلسترول خون، کاهش فشار خون، جلوگیری از تصلب شرایین، خواص ضد توموری، درمان تیروئید و برطرف نمودن علایم کمبود ویتامین A اند. لذا، کاربردهای متعددی برای مصارف انسانی، صنایع غذایی و دارویی و تولید انرژی دارند (Barsanti and Gualtieri, 2006; Lourenco *et al*., 1997; Anderson, 2005; Richmond, 2003).

جنس *Tetraselmis* از جلبک های سبز متعلق به خانواده‌ی Chlorodendraceae و رده‌ی Chlorodendrales است. جلبک سبز جنس *Tetraselmis* یک فیتوپلانکتون دریایی و متحرک است که حرکت آن با چهار تاژک که از بخش قدامی آن خارج شده است صورت می‌گیرد (Bermudez, 2004). درآبزی‌پروری، این نوع جلبک به طور گسترده به دلیل توانایی رشد در محدوده‌ی وسیعی از شرایط فیزیکی و شیمیایی محیط و تغذیه‌ی آبزیان گیاه‌خواران دریایی قابل استفاده است (Lee *et al*., 2014). جلبک *T. tetrathele* تاژک‌داری بزرگ و شوری‌پسند است و سطوح بالای چربی، اسیدهای آمینه طبیعی و استرول دارد که سبب تحریک تغذیه در موجودات دریایی می‌شود (Ghezelbash *et al*., 2008)، از این‌رو برای کشت و پرورش لارو میگوهای دریایی و خرچنگ و نرم‌تنان کاربرد زیادی دارد (Richmond, 2003). از سوی دیگر، ریز جلبک دریایی *Tetraselmis* و دیگر گونه‌ها به دلیل رشد سریع، محتوای چربی زیاد، تولید انبوه ارزان قیمت، مکانیسم فتوسنتز و پروتئین زیاد به‌عنوان غذای زنده در آبزی‌پروری استفاده دارند و به‌عنوان یک منبع نوید بخش برای استفاده از سوخت های زیستی هستند (Alonso *et al*., 2012; Richmond, 2003).

یکی از مهم‌ترین مشکلات در تولید جلبک‌های میکروسکوپی تامین محیط کشت مناسب است که امروزه از طریق محیط کشت‌های شیمیایی، کودهای شیمیایی، کودهای آلی و پساب‌ها تامین می‌شود (Martinez *et al*., 2000; Oswald and Gotass, 1995). به‌عنوان مثال، پساب‌های شهری منبع غنی از مواد آلی و مغذی بوده که در صورت استفاده می‌توانند باعث تقویت رشد ریزجلبک ها شوند. از این مواد می‌توان به آمونیوم، نیترات و فسفات اشاره کرد (Martinez *et al*., 2000; Oswald and Gotass, 1995).

پساب کارخانه‌های مواد غذایی و کارخانه‌های عمل آوری محصولات مانند کارخانه ملاس و دلستر نیز از جمله پساب‌های قابل استفاده به عنوان محیط‌های کشت جلبکی هستند. ملاسحاصل طباخی یا کریستالیزاسیون تولید شکر از چغندرقند است که ترکیبات آن تابع گونه و نژاد چغندر، شرایط کشت چغندر، وضعیت نگهداری چغندر، منطقه جغرافیایی، چگونگی و نحوه فرآیند در کارخانه است. ملاس را می‌توان برای رشد جلبک‌ها بصورت هتروتروفیک یا میگزوتروفیک استفاده کرد (Becker and Venkataraman, 1979). ملاس دارای ۲۹/۶ در صد ساکارز، ۲۴/۲ در صد گلوکز و ۲۴/۱ در صد فروکتوز و سایر مواد آلی در حدود ۶/۹ درصد است و مقدار زیادی رافینوز دارد. نیتروژن موجود در ملاس بین ۲/۲-۰/۸۲ درصد براورد شده است (Becker and Venkataraman, 1979). پساب صنایع دلستر نیز یکی از آلاینده‌های مهم محیط‌زیست بوده که مهم‌ترین مشخصه فاضلاب این صنایع زیاد بودن pH، مواد معلق و اکسیژن‌خواهی شیمیایی است. دلستر نوعی نوشیدنی گازدار غیرالکلی است که از عصاره جوانه جو بدست می‌آید. دلستر دارای آنزیم‌های گروه هیدرولاز،

قندهای قابل تخمیر دکسترین، ویتامین‌های B_5 (اسید پانتوتنیک)، B_6، بیوتین، پروتئین و سایر املاح با ارزش است (Hasani *et al.*, 2011). مواد آلاینده در پساب کارخانه دلستر از نظر شاخص‌های آلودگی مانند COD، BOD، TSS، فسفات و نیترات بسیار قابل ملاحظه هستند (Hasani *et al.*, 2011). بنابراین از آنجایی‌که فراهم کردن محیط کشت مناسب برای رشد ریزجلبک‌ها اهمیت بسیاری دارد، لذا، در این تحقیق اثر دو نوع پساب کارخانه ملاس و کارخانه دلستر به‌صورت رقیق و غلیظ به عنوان محیط کشت ریزجلبک *T. tetrathele* با تاکید بر تراکم، رشد، زیتوده و ترکیب بیوشیمیایی جلبک دریایی *T. tetrathele* در مقایسه با محیط کشت کانوی بررسی گردید.

۲. مواد و روش‌ها

۲.۱. طراحی آزمایش

آزمایش در ۶ تیمار با سه نوع محیط کشت شامل؛ کانوی، پساب دلستر و پساب ملاس در دو غلظت رقیق (۵ میلی‌لیتر در لیتر) و غلیظ (۱۰ میلی‌لیتر در لیتر)، در قالب طرح کاملا تصادفی با سه تکرار انجام شد. در غلظت های کم (رقیق) مقدار ۵ میلی‌لیتر در لیتر (۰/۵ درصد بطور حجم/حجم) و در غلظت‌های زیاد (غلیظ) مقدار ۱۰ میلی‌لیتر در لیتر (۱ درصد بطور حجم/حجم) به ازای هر لیتر از کشت ریزجلبک *T. tetrathele* استفاده گردید. کشت ریزجلبک با استفاده از ارلن مایرهای شیشه‌ای ۵ لیتری در شرایط آزمایشگاهی در دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد، شوری ۲۵ گرم بر لیتر و pH آغازین ۸ به مدت ۱۱ روز انجام شد. استوک جلبکی به میزان ۵ درصد حجمی (حجم/حجم) اضافه گردید. لوله‌های هوادهی و نور مناسب با استفاده از پمپ‌های هوادهی و لامپ‌های فلورسنت با شدت نور ۸۰-۷۰ میکرومول فوتون بر متر مربع در ثانیه فراهم شدند.

۲.۲. اندازه گیری ویژگی‌های پساب خام

پساب خام از کارخانه دلستر و ملاس واقع در استان چهارمحال و بختیاری جمع آوری و میزان COD، BOD، TSS، فسفات و نیترات هر دو پساب بر اساس روش‌های استاندارد اندازه‌گیری شد (Rice *et al.*, 2017). میزان COD با استفاده از دی کرومات پتاسیم و سولفات نقره و راکتور COD با قرائت مقدار جذب نمونه‌ها در طول موج ۶۰۰ نانومتر تعیین شد. مقدار BOD پنج روزه با اندازه‌گیری مقدار اکسیژن محلول در ابتدا و انتها (روز ۵) برآورد گردید. مقدار کل جامدات معلق (TSS) با استفاده از کاغذ واتمن ۴۲ و قرار گرفتن به مدت یک ساعت در دمای ۱۰۵ درجه سانتی‌گراد و سپس توزین نمونه مورد محاسبه قرار گرفت. اندازه‌گیری کل جامدات محلول (TDS) با استفاده از کاغذ صافی و با توجه به وزن اولیه کاغذ صافی و وزن نهایی پس از خشک شدن در دمای ۱۸۰ درجه سانتی‌گراد بدست آمد. اندازه گیری فسفات با استفاده از اسید سولفوریک و پتاسیم آنتیمونی تارتارات و آمونیوم مولیبدات و آسکوربیک اسید و قرائت نمونه‌ها در طول موج ۸۸۰ نانومتر تعیین شد. اندازه گیری نیتروژن کل نیز بر اساس روش کلدال با استفاده از جیوه و اسید سولفوریک غلیظ انجام شد.

۲.۳. ترکیبات محیط کشت

پرورش ریزجلبک *T. tetrathele* (تیمار۱) در ارلن‌مایرهای پنج لیتری با محیط کشت کانوی (جدول ۱) انجام گردید. برای تهیه محیط کشت از آب دریا (تهیه شده از پژوهشکده خلیج فارس و دریای عمان) با شوری ۳۵ گرم در لیتر استفاده گردید. شوری مورد نیاز برای کشت این ریزجلبک ۲۵ گرم در لیتر بود که با افزودن آب مقطر به آن شوری لازم بدست آمد.

۲.۴. ارزیابی شاخص‌های رشد ریزجلبک

۲.۴.۱. شمارش سلول و میزان رشد ویژه

شمارش جلبک‌ها روزانه با استفاده از لام

همو سیتومتری و روش مارتینز و همکاران در سال ۲۰۰۰ انجام گردید (Martinez *et al*., 2000). در پایان آزمایش زیتوده به دست آمده مورد برداشت قرار گرفت و سپس با ا ستفاده از د ستگاه خ شک‌کن انجمادی خ شک گردید تا زیتوده برای ا ندازه‌گیری های بیوشـــیمیایی فراهم گردد.

میزان رشد ویژه (SGR) با استفاده از رابطه $SGR=(\ln N_2 - \ln N1)/t$ محاســـبه شـــد که در آن N_2 تعداد ســـلول‌های جلبک در انتهای آزمایش، N_1 تعداد سلول‌های جلبک در ابتدای آز مایش و t مدت ز مان انجام آز مایش اســـت (Omori and Ikeda, 1984).

جدول ۱- نمک های به کار رفته و ترکیبات شیمیایی محیط کشت کانوی برای رشد جلبک

Conway medium (Tompkins et al., 1995)	
Nitrate KNO3 (100 g l^{-1})	$Na_2H_2EDTA.2H_2O$ (45 g l^{-1})
Phosphate Na3PO4(20 g l^{-1})	$FeCl_3 \cdot 6H_2O$ (1.3 g l^{-1})
Trace metal	ZnCl2(4.2 g l^{-1})
	$MnCl_2 \cdot 4H_2O$(0.36 g l^{-1})
	$COCl_2 \cdot 6H_2O$(4.0 g l^{-1})
	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$(4.0 g l^{-1})
	$(NH_4)6Mo_7O_24 \cdot 4H_2O$(1.8 g l^{-1})
	H_3BO_3 (33.4 g l^{-1})
Vitamin	Thiamin HCl (200 mg l^{-1})
	Cyanocobalamin (10 mg l^{-1})

۲.۴.۲. ارزیابی زنده‌مانی جلبک‌ها

برای محاســبه زنده‌مانی از روش رنگ آمیزی با دو نوع رنــگ ایــوانــس آبــی ($C_{34}H_{24}N_6Na_4O_{14}S_4$، دارای وزن مولکولی ۹۶۰/۸ گرم) اســـتفاده گردید. میزان یک گرم رنگ در ۲۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل شد تا استوک تهیه گردد. از هر تیمار ۵ میلی‌لیتر نمونه جلبک برداشـــته و به لوله‌های آزمایش انتقال داده شـد. سـپس به هر لوله چند قطره رنگ برای تثبیت کردن نمونه‌ها ا ضافه گردید و پس از تثبیت شدن جهت انجام عملیات شمارش سلولی مورد استفاده قرار گرفت. درصد زنده‌مانی ریزجلبک‌ها بر اساس رابطه زیر محاسبه گردید:

$$\text{زنده‌مانی (بر حسب درصد)} = \frac{\text{سلول‌های زنده}}{\text{کل سلول‌های جلبکی}} \times ۱۰۰$$

۲.۵. اندازه‌گیری ترکیب بیوشیمیایی

ا ندازه‌گیری محتوای پروتئین، چربی و کربوه یدرات براســاس روش Meyer and Walter (1988) انجام شـد. ابتدا مقدار ۱/۵ میلی‌لیتر از عصــاره تهیه شــده ریزجلبک درون لوله‌های آزمایش ریخته شـــد و ســـپس مقدار ۳ میلی‌لیتر از محلول NaOH به آن اضـــافه و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. نمونه‌ها با دور ۵۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه ســـانتریفیوژ شـــدند. در مرحله بعد، ۲ میلی‌لیتر از محلول در لوله آزمایش ریخته شـد و به آن یک میلی‌لیتر محلول رنگ (شـامل ۱۵ گرم NaOH را در ۵۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل کرده و به آن ۱۱۰ میلی‌گرم $CuSO_4$ افزوده شد) اضافه گردید و پس از ۵ دقیقه میزان جذب نور نمو نه ها در طول موج ۳۱۰ نـانـومـتـر بـا دســـتـگـاه اســـپـکـتـروفـتـومـتـر (مدل JENWAY 6400) قرائت شـــد. برای اندازه گیری کربوهیدرات، ابتدا ۰/۵ میلی‌لیتر از عصاره تهیه شده درون لوله آزمایش ریخته شد و ۰/۵ میلی‌لیتر فنول به آن اضافه گردید. سپس ۲/۵ میلی‌لیتر سولفوریک اسید به آن اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه تکان داده شـــد. در نهایت، میزان جذب نور نمونه‌ها در طول موج ۴۹۰ نانومتر با دســـتگاه اسپکتروفتومتر (مدل JENWAY 6400) قرائت شد. برای اندازه گیری محتوای چربی، ابتدا مقدار ۰/۳ میلی‌لیتر از عصاره تهیه شده را درون لوله آزمایش ریخته شد و سپس ۱/۷ میلی‌لیتر سـولفوریک اسـید به آن اضـافه گردید و به مدت ۲۰ دقیقه درون آون در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از سرد شدن نمونه، به خوبی تکان داده

شـد. ۰/۳ میلی‌لیتر از محلول تهیه شـده به لوله آزمایش دیگری انتقال داده شـد و ۳/۴۵ میلی‌لیتر محلول وانیلا به آن اضـافه گردید و به محلول به مدت ۳۰ دقیقه فرصـت داده شـد. در نهایت میزان جذب نور نمونه ها در طول موج ۵۴۶ نانومتر در دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل JENWAY 6400) قرائت شد.

۲.۶. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

آزمایش در قالب یک طرح کاملاً تصادفی انجام شـد. جهت تجزیه و تحلیل‌داده‌ها از تجزیه واریانس یک‌طرفه و مقایسـه میانگین‌ها با اسـتفاده از آزمون دانکن در سـطح خطای ۵ درصـد انجام شـد. از نرم‌افزار آماری SPSS 24 برای انجام آزمون‌های آماری اسـتفاده شـد و نمودارها با استفاده از نرم افزار Excel 2010 رسم گردید.

۳. نتایج

۳.۱. ویژگی‌های پساب دلستر و ملاس

برخی از مهم‌ترین ویژگی‌های پسـاب کارخانه های ملاس و دلستر اندازه‌گیری و نتایج در جدول ۱ آمده است. پسـاب‌ها دارای مقادیر متفاوت عناصـر غذایی برای رشـد جلبک‌ها هسـتند و پسـاب ملاس از نظر مواد غذایی نیتروژن، نیترات، فسـفر، فسـفات، BOD، COD، TSS و TDS دارای ترکیب بهتر و مناسب‌تری در مقایسه با پساب دلستر ارزیابی گردید.

جدول ۲- برخی از مهم‌ترین خصوصیات اندازه‌گیری شده پساب کارخانه دلستر و ملاس استفاده شده در کشت جلبک *T. tetrathele* برحسب میلی‌گرم در لیتر.

شاخص های اندازه گیری شده	پساب خام دلستر	پساب خام ملاس
کل جامدات محلول (TDS)	۰/۰۴۹	۰/۲۷
اکسیژن خواهی شیمیایی (COD)	۲۲۵/۱	۳۱۳/۳
اکسیژن خواهی بیولوژیکی (BOD)	۱۳/۳۳	۴۹۵۱۰/۴
فسفات	۰/۰۶	۱۶
نیترات	۱۷۹۳/۴	۸۸۷۲/۷
pH	۳/۸	۶/۳

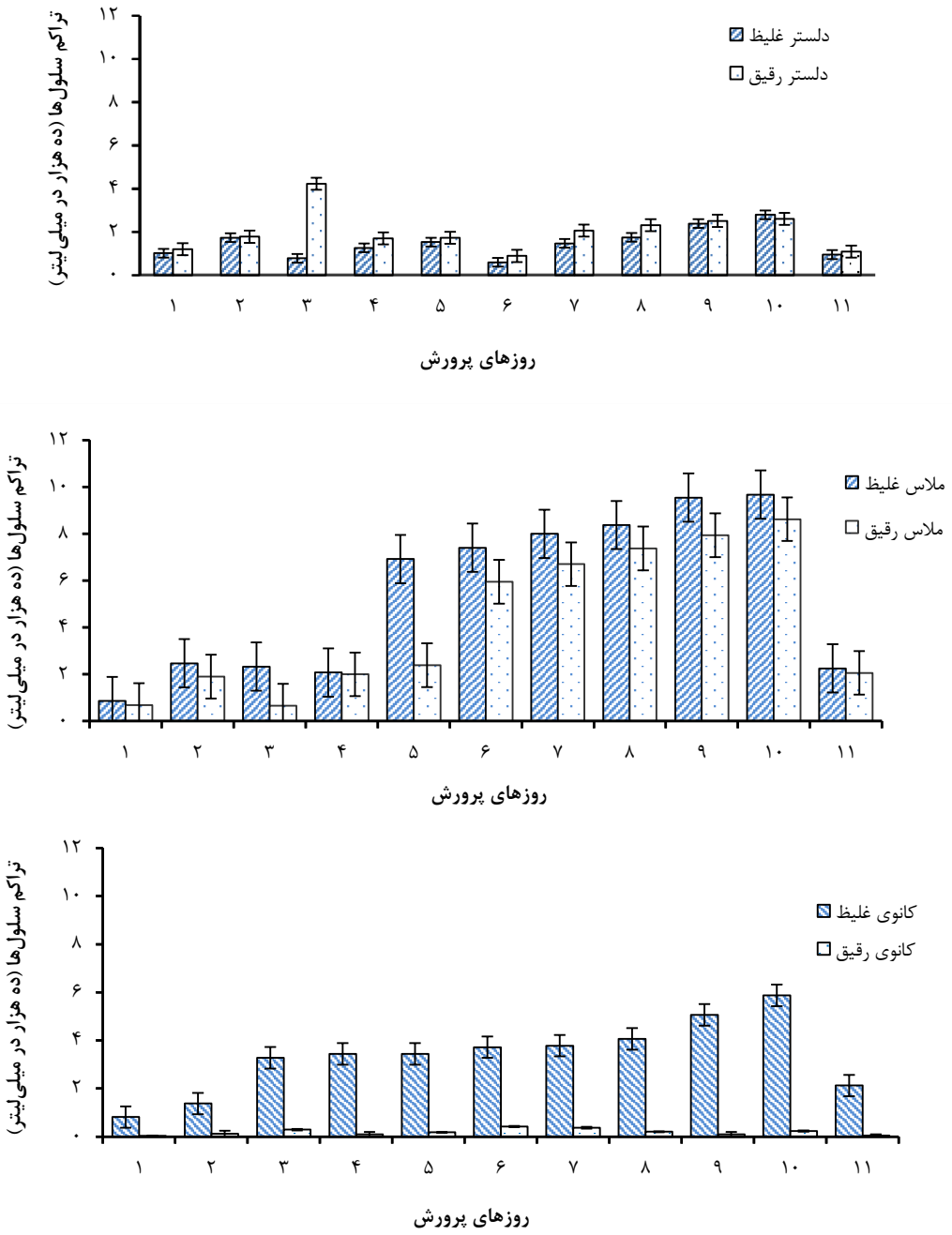
۳.۲. تراکم جلبک در روزهای پرورش

نتایج تیمارهای مختلف از پساب‌های دلستر، ملاس و محیط کشـت کانوی بر جلبک *T. tetrathele* در دوره پرورش در شکل ۱ ارائه شده است. نتایج نشان داد که بطور کلی استفاده از این دو نوع پساب با تولید مناسبی از جلبک همراه اسـت. اما از نظر تراکم سـلول‌های جلبکی تفاوت‌هایی وجود دارد. بیشترین تراکم سلول‌های جلبکی در تیمار ملاس غلیظ $۹/۶۷\times۱۰^{۴}$ سـلول در میلی‌لیتر در روز ۱۰ بدست آمد، در حالی‌که در ریزجلبک پرورش داده شده با کانوی با غلظت کم و زیاد و تیمار دلستر با غلظت کم و زیاد به ترتیب $۴/۱۵\times۱۰^{۴}$ ، $۵/۸۷\times۱۰^{۴}$ ، $۴/۲۳\times۱۰^{۴}$ و $۲/۷۹\times۱۰^{۴}$ سلول در میلی‌لیتر بود.

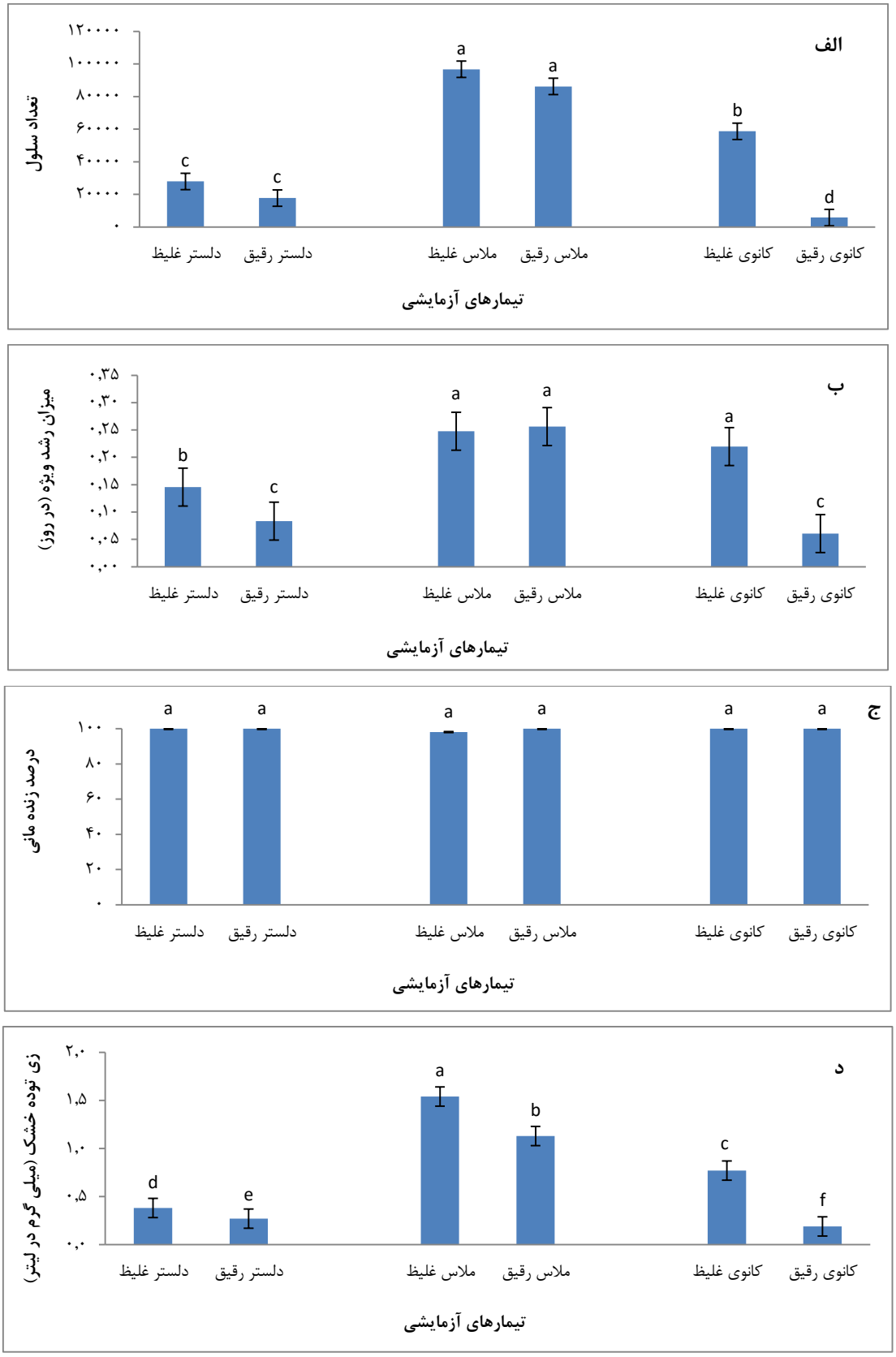
۳.۳. میزان رشـد ویژه، زنده‌مانی و زیتوده ریزجلبک

میانگین تعداد سـلول‌ها، زنده‌مانی و میزان رشـد ویژه در روز۱۱ پرورش جلبک *T. tetrathele* در تیمار های مختلف در شکل ۲ ارائه شده است. نتایج نشان داد که تراکم سـلول جلبـک در ملاس رقیق و غلیظ تفـاوت معنی‌داری با سـایر تیمارها دارند ($P< ۰/۰۵$)، شـکل ۲-الف. میزان رشـد ویژه در تیمار ملاس رقیق و غلیظ به ترتیب ۰/۲۵ و ۰/۲۴ در روز و در تیمار دلسـتر رقیق و غلیظ بترتیب ۰/۰۸ و ۰/۱۴ در روز بود (شـکل ۲-ب). در تیمارهای مختلف از نظر زنده‌مانی سـلولی تفاوت معنی داری مشـاهده نشـد ($P>۰/۰۵$) اما تیمار ملاس غلیظ

کمترین درصد زنده مانی (۹۳/۱۸ درصد) را در بین تیمارها نشان داد (شکل ۲-ج). میانگین میزان زی‌توده خشک جلبک *T. tetrathele* پرورش یافته با محیط کشت‌های مختلف نیز در شکل۳ ارائه شده است. نتایج نشان داد که میزان زیتوده خشک *T. tetrathele* برای تیمار رقیق و غلیظ ملاس بترتیب ۱/۱۳ و ۱/۵۴میلی گرم در لیتر و برای تیمار دلستر رقیق و غلیظ بترتیب ۰/۲۷ و ۰/۳۸ میلی گرم در لیتر بدست آمد (شکل ۲-د).



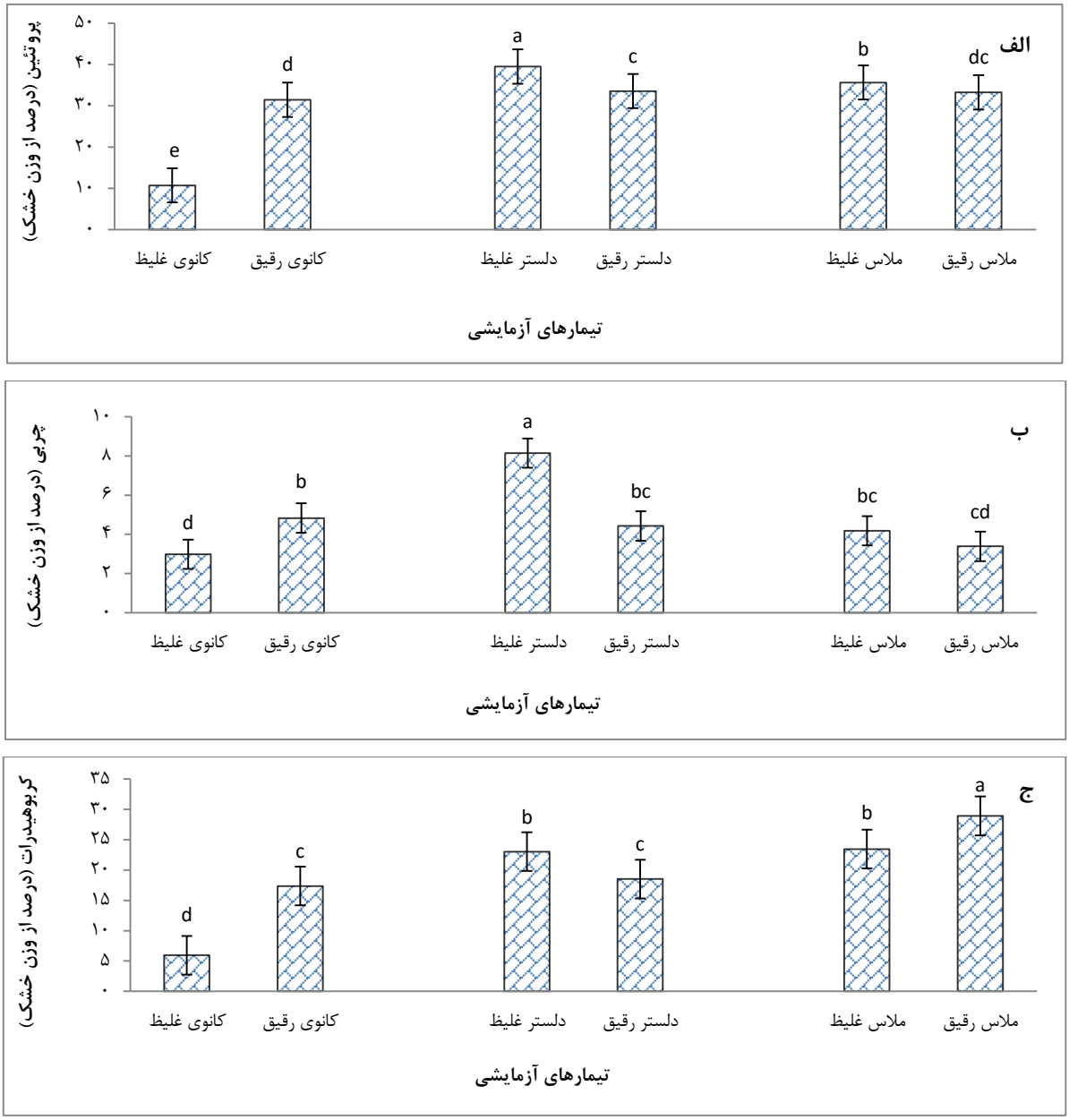
شکل ۱-میانگین تراکم سلول‌ها (± خطای استاندارد) در جلبک *T. Tetrathele* رشد کرده در تیمارهای آزمایشی (پساب دلستر، ملاس و محیط کشت کانوی) در روزهای مختلف کشت.
تیمارهای رقیق و غلیظ بترتیب دارای ۵ و ۱۰ میلی لیتر در لیتر از محیط کشت هستند.



شکل۲. میانگین (± خطای استاندارد) تعداد سلول (الف)، میزان رشد ویژه (ب)، درصد زنده مانی (ج) و زی‌توده خشک(د) جلبک *T. tetrathele* در انتهای دوره‌ی پرورش، در تیمارهای مختلف آزمایشی.تیمارهای رقیق و غلیظ بترتیب دارای ۵ و ۱۰ میلی لیتر در لیتر از محیط کشت هستند. میانگین‌های دارای حداقل یک حروف مشابه از نظر آماری در سطح ۵ درصد اختلاف معنی داری ندارند (P>۰/۰۵).

۳.۴. ترکیب بیوشیمیایی

میزان پروتئین، چربی و کربوهیدرات جلبک *T. tetrathele* پرورش یافته در محیط‌های کشت مختلف در شکل۳ ارائه شده است. براساس نتایج بدست آمده بیشترین میزان پروتئین و چربی بترتیب ۳۹/۵۰ در صد و ۸/۱۴ درصد در تیمار دلستر غلیظ و کمترین میزان این ترکیبات ۱۰/۷ درصد و ۲/۹۸ درصد در تیمار کانوی غلیظ مشاهده شد. همچنین ملاس رقیق بیشترین میزان کربوهیدرات (۲۸/۹۲ درصد) و کانوی غلیظ کمترین میزان کربوهیدرات (۵/۹۵ درصد) را دارا بودند.



شکل ۳. میانگین تغییرات پروتئین (الف)، چربی (ب) وکربوهیدرات (ج) جلبک *T.tetrathele* پرورش یافته در محیط کشت‌های مختلف آزمایشی.
تیمارهای رقیق و غلیظ بترتیب دارای ۵ و ۱۰ میلی لیتر در لیتر از محیط کشت هستند.
میانگین‌های دارای حداقل یک حروف مشابه از نظر آماری در سطح ۵ درصد اختلاف معنی داری ندارند (P>۰/۰۵).

۴. بحث و نتیجه‌گیری نهایی

پساب غنی از نیتروژن و فسفر به همراه دی‌اکسیدکربن و انرژی خورشیدی، فراهم‌کننده شرایط مناسب‌برای رشد و تکثیر ریزجلبک‌ها است که سرانجام منتج به تولید زیتوده مفید جلبکی و کاهش غلظت نیتروژن و فسفر پساب خواهدشد (Shamla *et al.*, 1982). در این مطالعه به نظر می‌رسد که تغییرات حاصله در میزان ترکیبات آلی و معدنی مورد نیاز رشد از عوامل اصلی تاثیرگذار بر نوسانات رشد ریزجلبک تتراسلمیس است. بنابراین می‌توان گفت بیشترین میزان رشد تتراسلمیس در تیمارهای مختلف تا زمانی که مواد قابل دسترس در اختیار آن باشد ادامه می‌یابد. همانطور که در شکل ۱ نشان داده شده است با گذشت زمان و به دلیل کاهش مواد غذایی لازم در محیط کشت در انتهای دوره، تراکم سلول‌های جلبک کاهش قابل توجهی داشت. ریزجلبک‌ها قادر به جذب مواد مغذی از پساب‌ها و تبدیل آن به زیتوه و تولید زیستی هستند که سبب دفع مازاد مواد مغذی در پساب‌ها و بهبود و تصفیه آن‌ها می‌شوند (Heidary *et al.*, 2011).

بر اساس نتایج این مطالعه جلبک سبز *T. tetrathele* در ملاس غلیظ بهتر رشد می‌کند و از بیشترین تراکم سلولی برخوردار است. احتمال می‌رود این مسئله به دلیل غلظت مواد مغذی و منبع کربن موجود در ملاس باشد (Becker and Venkataraman, 1979). نتایج همچنین نشان داد که استفاده از پساب کارخانه ملاس و دلستر در کشت جلبک *T. tetrathele* میزان رشد ویژه سلول‌ها را تحت تاثیر قرار می‌دهد. نتایج مشابهی توسط Shamla و همکاران (۱۹۸۲) نشان داد که در کشت‌های میگزوتروفی با دی‌اکسیدکربن وملاس، تولید زیتوده ریزجلبک *Scenedesmus acutus*، یک روند افزایشی را از۴۶ میلی‌گرم بر لیتر در روز به ۹۸ میلی‌گرم بر لیتر در روز نشان می‌دهد. آن‌ها همچنین بیان کردند که رشد هتروتروفی سبب انباشت کربوهیدرات می‌شود و مقدار پروتئین انباشته شده توسط موجود زنده، وابسته به غلظت‌های ملاس و شرایط کشت می‌باشد. Sayadi و همکاران (۲۰۱۱) به این نتیجه رسیدند که افزایش رشد و تراکم ریزجلبک‌های *Chlorella sorokiniana*، *Euglena viridis* و *Scenedesmus obliquus* هم‌جهت و به موازات افزایش غلظت نیترات و فسفات در محیط کشت است، اما توانایی تکثیر و رشد گونه‌های مختلف جلبک در غلظت های مختلف این مواد مغذی متفاوت است. نتایج مطالعات Swain و همکاران (۲۰۲۰) نشان داد که ریزجلبک *Tetraselmis* sp. قادر به رشد در غلظت‌های مختلف پساب لبنیات است و افزایش زیتوده در غلظت ۷۵ درصد از پساب بهتر از دیگر غلظت‌های پساب است. با این حال مطالعه دیگری نشان داد که *T. suecica* در نسبت‌های مختلف پساب شهری رشد می‌کند، و غلظت درصد از پساب شهری به عنوان غلظت ایده آل برای رشد *T. suecica* به اثبات رسید (Reyimu, 2017). این نتایج نشان می‌دهد پساب‌های مختلف در غلظت‌های متفاوتی می‌توانند بهترین عملکرد را در رشد ریزجلبک داشته باشند.

در مطالعه حاضر بیشترین میزان زیتوده خشک را ملاس غلیظ و کمترین میزان زیتوده خشک را کانوی رقیق داشت. فاکتورهای بسیاری بر افزایش و کاهش زیتوده در جمعیت ریزجلبک ها تأثیرمی‌گذارد. یکی از مهم‌ترین فاکتورها میزان فسفر محیط کشت ریزجلبک‌ها است. ترکیبات شیمیایی محیط کشت جلبک‌ها به خصوص فسفر، نه تنها بر زیتوده و رشد جلبکی بلکه بر اندازه و شکل سلول‌ها، محتوای رنگدانه و ترکیبات بیوشیمیایی آن‌ها نیز مؤثر است. در این رابطه Almomani and Ormeci (۲۰۱۶) هم بیان کردند که افزایش وزن خشک و کاهش سرعت رشد در طول پیشرفت هر آزمایش می‌تواند به دلایل مختلفی از جمله نفوذ نور به محیط کشت، چگالی یا محدودیت کربن غیرآلی و تراکم جلبکی نسبت داده شود. با افزایش مواد مغذی رشد بیشتر ریزجلبک‌ها مورد انتظار است و این امر چگونگی اثر گذاری غلظت محیط کشت بر میزان رشد ویژه و وزن خشک را توجیه می‌کند. Wang و همکاران

(۲۰۱۱) نیز گزارش دادند که بهره‌وری زیتوده ریزجلبک‌ها تحت مدل پرورشی میگزوتروفی در مقایسه با مدل پرورش هتروتروفیک بیشتر است که ممکن است به دلیل افزایش دسترسی به منبع کربن در پرورش میگزوتروفی ناشی از عرضه CO_2 باشد.

در این مطالعه، بیشترین میزان پروتئین و چربی به ترتیب ۳۹/۵۰ درصد و ۸/۱۴ درصددر تیمار دلستر غلیظ و کمترین میزان این ترکیبات در تیمار کانوی غلیظ (به ترتیب ۱۰/۷۰ درصد و ۲/۹۸ درصد) مشاهده شد. بیشترین میزان کربوهیدرات (۲۸/۹۲ درصد) نیز در تیمار ملاس بدست آمد. Tanaka و همکاران در سال ۱۹۸۸دریافتند که وقتی جلبک‌ها تحت شرایط تنش نیتروژن قرار می‌گیرند میزان چربی آن‌ها افزایش می‌یابد، اما گونه‌هایی مانند *T. suecica* با افزایش کربوهیدرات بیش از چربی‌ها، به این شرایط پاسخ می‌دهند (Tanaka *et al.*, 1986). El-Sheekh و همکاران (۲۰۱۴) نیز دو جلبک سبز *Chlorella vulgaris* و *Scenedesmus obliquus* را تحت دو مدل پرورش میگزوتروفی و هتروتروفیک با استفاده از ملاس به‌عنوان منبع کربن پرورش دادند. تحت هر دو مدل، میزان رشد، محتوای کربوهیدرات و پروتئین با افزایش غلظت ملاس افزایش یافت. عواملی مانند رنگدانه و محتوای چربی نیز در پاسخ به افزایش غلظت ملاس در شرایط میگزوتروفی در هر دو جلبک افزایش یافت. افزایش کربوهیدرات در تیمار ملاس می‌تواند با افزایش وزن خشک جلبک ارتباط داشته باشد. Becker and Venkataraman (۱۹۷۹) بیان داشتند که افزایش مقدار کربوهیدرات *Scenedesmus acatus* کشت داده شده با ملاس و CO_2 ممکن است به میزان تقسیم سلولی بیشتر نسبت داده شود. بنابراین رشد هتروتروفی منجر به انباشت کربوهیدرات می‌شود.

در این تحقیق اثر دو نوع پساب کارخانه ملاس و کارخانه دلستر به‌صورت رقیق و غلیظ به عنوان محیط کشت ریزجلبک *T. tetrathele* با تاکید بر تراکم، رشد، زیتوده و ترکیب بیوشیمیایی جلبک دریایی *T. tetrathele* در مقایسه با محیط کشت کانوی بررسی گردید.

به طوری کلی می توان گفت که ریزجلبک *T. tetrathele* توانایی رشد در هر دو نوع پساب دلستر و ملاس را دارد. به عبارتی نیتوان آن را در مدل کشت های میگزوتروفی و هتروتروفی استفاده نمود. ملاس غلیظ منجر به تولید بیشترین تراکم سلولی در مقایسه با سایر تیمارها شد زیرا پساب ملاس از نظر عناصر غذایی نیتروژن، نیترات، فسفر، فسفات دارای ترکیب بهتر و مناسب‌تری در مقایسه با پساب دلستر است. همچنین بیشترین میزان پروتئین (۳۹/۵۰ در صد) و چربی (۸/۱۴ درصد) در تیمار دلستر غلیظ و بیشترین میزان کربوهیدرات (۲۸/۹۲ درصد) با کشت ملاس رقیق حاصل شد.

نتیجه‌گیری نهایی

می‌توان گفت که هر دو نوع پساب ملاس و دلستر عملکرد مناسبی را در تولید زی توده جلبک دریایی *T. tetrathele* و تولید ترکیبات ارزشمند دارند. لذا پیشنهاد می شود که این ترکیبات به عنوان محیط کشت برای تولید سایر ریزجلبک‌ها، به خصوص گونه‌های آب شور، مورد ارزیابی قرار گیرند.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از معاونت پژوهشی و تحصیلات تکمیلی دانشگاه صنعتی اصفهان برای فراهم نمودن شرایط و امکانات لازم برای این تحقیق تشکر می شود. از آقایان دکتر سعید اسدالله و دکترابراهیم متقی نیز کمال تشکر را داریم.

References ۵. منابع

Almomani. F.A., Örmeci B., 2016. Performance of *Chlorella Vulgaris*, *Neochloris oleoabundans*, and mixed indigenous microalgae for treatment of primary effluent, secondary effluent and centrate. *Ecology Engineering* 95, 280-289.

Alonso. M., Lago. F.C., Vieites. J.M., Espiñeira. M., 2012. Molecular characterization of microalgae used in aquaculture with biotechnology potential. *Aquaculture International* 20, 847-857.

Anderson. R.A., 2005. Algal Culturing Techniques. Elsevier Academic Press, New York. 578 pp.

Barsanti. L., Gualtieri. P., 2006. Algae: Anatomy, Biochemistry, and Biotechnology. Boca Raton, FL: CRC Press, Taylor & Francis. Group, Boca Raton, FL, p. 301.

Becker. E.W., Venkataraman. L.V., 1979. A manual on the cultivation and processing of algae as a source of single cell protein. Algae Feed Food, pp: 1-36.

Bermúdez, J., Rosales, N.; Loreto, C.; Briceño, B., Morales, E., 2004. Exopolysaccharide, pigment and protein production by the marine micro alga *Chroomonas* sp. in semi continuous cultures. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 20(-), 179-83.

El-Sheekh. M.M., Bedaiwy. M.Y., Osman. M.E., Ismail. M.M., 2014. Influence of molasses on growth, biochemical composition and ethanol production of the green algae *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus obliquus*. *Journal of Agricultural Engineering & Biotechnology* 2(-), 2-20.

Farhadian. O., Jafari, O., 2015. Effects of hardness of culture medium on purification and colony formation in green algae *Scenedesmus quadricauda*. *Journal of Plant Research* (Iranian Journal of Biology) 28(5), 1066-1076. (In Persian).

Ghezelbash. F., Farboodnia. T., Heidari. R., Agh. N., 2008. Effects of different salinities and luminace on growth rate of the green microalgae *Tetraselmis chuii*. *Research Journal of Biological Sciences*3(-),311-314. (In Persian).

Hassani. A., Salehi. B., Borghei. M., 2011. Evaluation of the performance of nano-filtration and adsorption hybrid phase in reducing the pollution of wastewater with high pollution load. *Journal of Water and Wastewater* 1, 42-48. (In Persian).

Heidary. S., Farhadian. O., Soufiani. N., 2011. Biomass production and removal of ammonia and nitrite from fish farm wastewater by cultivating *Senedesmus quadricada*. *Ecology* 59(-), 15-28. (In Persian).

Lee. S.Y., Kim. S.H., Hyun. S.H., Suh. H.W., Hong. S.J., Cho. B.K., Choi. H.K., 2014. Fatty acids and global metabolites profiling of *Dunaliella tertiolecta* by shifting culture conditions to nitrated efficiency and high light at different growth phases. *Process Biochemistry* 49(-), 996-1004.

Lourenço. S.O., Lanfer Marquez. U.M., Mancini-Filho. J., Barbarino. E., Aidar. E., 1997. Changes in biochemical profile of *Tetraselmis gracilis* I. Comparison of two culture media. *Aquaculture* 148(-), 153-168.

Martinez. M.E., Sanches. S., Jimenes. J.M., Yousfi. F.E., Munoz. L., 2000. Nitrogen and phosphorus removal from urban wastewater by the microalgae *Scenedesmus obliqus*. *Bioresource Technology*73, 263-272.

Meyer. E., Walther. A., 1988.Methods for the estimation of protein, lipid, carbohydrates and chitin levels in freshwater invertebrates. *Arch fur Hydrobiologie*113, 161-177.

Omori. M., Ikeda. T., 1984. Methods in Marine Zooplankton Ecology. John Wiley, New York, 332 pp.

Oswald. W.J., Gotass. H.B., 1995. Photosynthesis in sewage treatment. *Journal of the Sanitary Engineering Division American Society of Civil Engineers*122, 73-105.

Rice. E. W., Bird. R.B., Eaton. A.D., 2017. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 23rd Edition. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation, 724p.

Reyimu, Z., 2017. Batch cultivation of marine microalgae Nannochloropsis oculata and *Tetraselmis suecica* in treated municipal wastewater toward bioethanol production. *Journal of Cleaner Production* 150(-), 40–46.

Richmond. A., 2003. Biological principles of mass cultivation. In: Richmond A (ed) Handbook of microalgal mass culture. Biotechnology &Applied Phycology. Blackwell, Oxford, 566 pp.

Sayadi. M.H., Ghatnekar. S.D., Kavian. M.F., 2011. Algae a promising alternative for biofuel. *Proceedings of the International Academy of Ecology and Environmental Sciences* 1(2), 112- 124.

Shamala. T.R., Drawert. F., Leupold. G., 1982. Studies on *Scenedesmus acutus* growth, I. Effect of autotrophic & mixotrophic conditions on the growth of *Scenedesmus acutus*. *Biotechnology and Bioengineering* 24, 1287-1299.

Swain. P., Tiwari. A., Pandey. A., 2020. Biomass and bioenergy enhanced lipid production in *Tetraselmis* sp. by two stage process optimization using simulated dairy wastewater as feedstock. *Biomass and Bioenergy* 139, 105643.

Tanaka. K., Koga. T., Konishi. F., 1986. Augmentation of host defense by unicellular green alga, *Chlorella vulgaris*, to *Escherichia coli* infection. *Infection and Immunity* 53(-), 267-271.

Tompkins. J., DeVille. M., Day. J., Turner, M., 1995. Culture Collection of Algae and Protozoa: Catalogue of Strains. Titus Wilson and Son Ltd., UK.

Wang. B., Lan. C.Q., 2011. Biomass production and nitrogen and phosphorus removal by the green alga *Neochloris oleoabundans* in simulated wastewater and secondary municipal wastewater effluent. *Bioresource Technology* 102(-), 5639–5644.