



## بررسی تراکم، رشد و ترکیب بیوشیمیایی جلبک دریایی

### *Tetraselmis tetrathele* پرورش یافته با پساب ملاس و دلستر

امیدوار فرهادیان<sup>۱\*</sup>، الهام نظافتیان<sup>۲</sup>، فاطمه شریفی خیرآبادی<sup>۳</sup>، فاطمه پیکان حیرتی<sup>۴</sup>، فاطمه رستمی<sup>۲</sup>

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 پذیرش: ۱۴۰۰/۱۱/۱۶

تاریخ ارسال: ۱۴۰۰/۰۹/۰۳

## 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 کاملاً 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 (۹۶/۷×۱۰<sup>۳</sup> سلول در هر میلی‌لیتر) و بیشترین میزان رشد ویژه در تیمار کانوی رقیق (۱۵/۵ در 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*.



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

**OmidvarFarhadian<sup>1\*</sup>, Elham Nezafatian<sup>2</sup>, Fatemeh Sharifi Kheyraadi<sup>3</sup>,  
Ftemeh Peykan Heyrati<sup>4</sup>, Fatemeh Rostami<sup>2</sup>**

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 molasse and beer wastewater. A completely randomized experimental design was performed containing treatments; Conway, molasse, 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 molasse treatment ( $96.7 \times 10^3$  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 molasse treatment. Therefore, based on the results of growth rate and biochemical compositions of *T. tetrathele*, it can be concluded that the beer and molasse wastes are suitable media for growth of *T. tetrathele*.

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

## ۱. مقدمه

سریع، محتوای چربی زیاد، تولید انبوه ارزان قیمت، مکانیسم فتوسنتز و پروتئین زیاد به عنوان غذای زنده در آبی پروری استفاده دارند و به عنوان یک منبع نوید بخش برای استفاده از سوخت های زیستی هستند (Alonso *et al.*, 2012; Richmond, 2003).

یکی از مهم ترین مشکلات در تولید جلبک های میکروسکوپی تامین محیط کشت مناسب است که امروزه از طریق محیط کشت های شیمیایی، کودهای شیمیایی، کودهای آلی و پساب ها تامین می شود (Martinez *et al.*, 2000; Oswald and Gotass, 1995). به عنوان مثال، پساب های شهری منبع غنی از مواد آلی و مغذی بوده که در صورت استفاده می توانند باعث تقویت رشد ریزجلبک ها شوند. از این مواد می توان به آمونیوم، نترات و فسفات اشاره کرد (Martinez *et al.*, 2000; Oswald and Gotass, 1995).

پساب کارخانه های مواد غذایی و کارخانه های عمل آوری محصولات مانند کارخانه ملاس و دلستر نیز از جمله پساب های قابل استفاده به عنوان محیط های کشت جلبکی هستند. ملاحاصل طبخی یا کریستالیزاسیون تولید شکر از چغندر قند 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 می توان برای رشد جلبک ها بصورت هتروتروفیک یا میگزوتروفیک استفاده کرد (Becker and Venkataraman, 1979). ملاس دارای ۲۹/۶ درصد ساکارز، ۲۴/۲ درصد گلوکز و ۲۴/۱ درصد 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 برآورد شده است (Becker and Venkataraman, 1979). پساب صنایع دلستر نیز یکی از آلاینده های مهم محیط زیست بوده که مهم ترین مشخصه فاضلاب این صنایع زیاد بودن pH، مواد معلق و اکسیژن خواهی شیمیایی است. دلستر نوعی نوشیدنی گازدار غیرالکلی است که از عصاره جوانه جو بدست می آید. دلستر دارای آنزیم های گروه هیدرولاز،

جلبک ها، تولید کنندگان اولیه غالب در اکثر محیط های آبی هستند و قسمت اعظم انرژی را برای بسیاری از شبکه های غذایی آبی فراهم می کنند (Farhadian and Jafari, 2015). در سال های اخیر، ریزجلبک ها به عنوان موجودات فتوسنتز کننده مناسب جهت تهیه زیئوده مورد توجه قرار گرفته اند که با تولید ترکیبات زیست فعال مانند پروتئین ها، رنگدانه ها (کاروتنوئیدها، فیکوسیانین ها، کلروفیل ها)، ویتامین ها و اسیدهای چرب، کربوهیدرات ها، مواد معدنی و انواع ویتامین ها و نیز یون های پتاسیم، ید، سدیم و همچنین اسید آلژینیک 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 علائم 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 سبزی متعلق به خانواده Chlorodendraceae و رده Chlorodendrales است. جلبک سبزی جنس *Tetraselmis* یک فیتوپلانکتون دریایی و متحرک است که حرکت آن با چهار تاژک که از بخش قدامی آن خارج شده است صورت می گیرد (Bermudez, 2004). در آبی پروری، این نوع جلبک به طور گسترده به دلیل توانایی رشد در محدوده وسیعی از شرایط فیزیکی و شیمیایی محیط و تغذیه آبیان گیاه خواران دریایی قابل استفاده است (Lee *et al.*, 2014). جلبک *T. tetraele* تاژک داری بزرگ و شوری پسند است و سطوح بالای چربی، اسیدهای آمینه طبیعی و استرول دارد که سبب تحریک تغذیه در موجودات دریایی می شود (Ghezelbash *et al.*, 2008)، از این رو برای کشت و پرورش لارو میگوهای دریایی و خرچنگ و نرم تنان کاربرد زیادی دارد (Richmond, 2003). از سوی دیگر، ریز جلبک دریایی *Tetraselmis* و دیگر گونه ها به دلیل رشد

## ۲.۲. اندازه گیری ویژگی های پساب خام

پساب خام از کارخانه دلاستر و ملاس واقع در استان چهارمحال و بختیاری جمع آوری و میزان BOD، COD، TSS، فسفات و نترات هر دو پساب بر اساس روش های استاندارد اندازه گیری شد (Rice et al., 2017). میزان COD با استفاده از دی کرومات پتاسیم و سولفات نقره و راکتور COD با قرائت مقدار جذب نمونه ها در طول موج ۶۰۰ نانومتر تعیین شد. مقدار BOD پنج روزه با اندازه گیری 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 سانتی گراد و سپس توزین نمونه مورد محاسبه قرار گرفت. اندازه گیری 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 سانتی گراد بدست آمد. اندازه گیری فسفات با استفاده از اسید سولفوریک و پتاسیم آنتیمونی تارتارات و آمونیوم مولیبدات و آسکوربیک اسید و قرائت نمونه ها 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 ریز جلبک *T. tetrathele* (تیمار ۱) در ارلن مایرهای 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 ریز جلبک ۲۵ گرم در لیتر بود که با افزودن آب مقطر به آن شوری لازم بدست آمد.

## ۲.۴. ارزیابی شاخص های رشد ریز جلبک

### ۲.۴.۱. شمارش سلول و میزان رشد ویژه

شمارش جلبک ها روزانه با استفاده از لام

قندهای قابل تخمیر دکسترین، ویتامین های B<sub>5</sub> (اسید پانتوتنیک)، B<sub>6</sub>، بیوتین، پروتئین و سایر املاح با ارزش است (Hasani et al., 2011). مواد آلاینده در پساب کارخانه دلاستر از نظر شاخص های آلودگی مانند COD، BOD، TSS، فسفات و نترات بسیار قابل ملاحظه هستند (Hasani et al., 2011). بنابراین از آنجایی که فراهم کردن محیط کشت مناسب برای رشد ریز جلبک ها اهمیت بسیاری دارد، لذا، در این تحقیق اثر دو نوع پساب کارخانه ملاس و کارخانه دلاستر به صورت رقیق و غلیظ به عنوان محیط کشت ریز جلبک *T. tetrathele* با تاکید بر تراکم، رشد، زیتوده و ترکیب بیوشیمیایی جلبک در یابی *T. tetrathele* در مقایسه با محیط کشت کانوی بررسی گردید.

## ۲. مواد و روش ها

### ۲.۱. طراحی آزمایش

آزمایش در ۶ تیمار با سه نوع محیط کشت شامل؛ کانوی، پساب دلاستر و پساب ملاس در دو غلظت رقیق (۵ میلی لیتر در لیتر) و غلیظ (۱۰ میلی لیتر در لیتر)، در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. در غلظت های کم (رقیق) مقدار ۵ میلی لیتر در لیتر (۰/۵ درصد بطور حجم/حجم) و در غلظت های زیاد (غلیظ) مقدار ۱۰ میلی لیتر در لیتر (۱ درصد بطور حجم/حجم) به ازای هر لیتر از کشت ریز جلبک *T. tetrathele* استفاده گردید. کشت ریز جلبک با استفاده از ارلن مایرهای شیشه ای ۵ لیتری در شرایط آزمایشگاهی در دمای ۲۲ درجه سانتی گراد، 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. لوله های هوادهی و نور مناسب با استفاده از پمپ های هوادهی و لامپ های فلورسنت با شدت نور ۸۰-۷۰ میکرومول فوتون بر متر مربع در ثانیه فراهم شدند.

میزان رشد ویژه (SGR) با استفاده از رابطه  $SGR = (\ln N_2 - \ln N_1) / t$  محاسبه شد که در آن  $N_2$  تعداد سلول‌های جلبک در انتهای آزمایش،  $N_1$  تعداد سلول‌های جلبک در ابتدای آزمایش و  $t$  مدت زمان انجام آزمایش است (Omori and Ikeda, 1984).

هموسیتومتری 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 استفاده از دستگاه خشک‌کن انجمادی خشک گردید تا زیتوده برای اندازه‌گیری‌های بیوشیمیایی فراهم گردد.

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

Conway medium (Tompkins et al., 1995)	
Nitrate $KNO_3$ ( $100 \text{ g l}^{-1}$ ) Phosphate $Na_3PO_4$ ( $20 \text{ g l}^{-1}$ ) Trace metal	$Na_2H_2EDTA \cdot 2H_2O$ ( $45 \text{ g l}^{-1}$ ) $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ ( $1.3 \text{ g l}^{-1}$ ) $ZnCl_2$ ( $4.2 \text{ g l}^{-1}$ ) $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ ( $0.36 \text{ g l}^{-1}$ ) $COCl_2 \cdot 6H_2O$ ( $4.0 \text{ g l}^{-1}$ ) $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ ( $4.0 \text{ g l}^{-1}$ ) $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$ ( $1.8 \text{ g l}^{-1}$ ) $H_3BO_3$ ( $33.4 \text{ g l}^{-1}$ )
Vitamin	Thiamin HCl ( $200 \text{ mg l}^{-1}$ ) Cyanocobalamin ( $10 \text{ mg l}^{-1}$ )

دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. نمونه‌ها با دور ۵۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. در مرحله بعد، ۲ میلی‌لیتر از محلول در لوله آزمایش ریخته شد و به آن یک میلی‌لیتر محلول رنگ (شامل 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 نمونه‌ها در طول موج ۳۱۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل JENWAY 6400) قرائت شد. برای اندازه‌گیری 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 شد. در نهایت، میزان جذب نور نمونه‌ها در طول موج ۴۹۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل JENWAY 6400) قرائت شد. برای اندازه‌گیری محتوای چربی، ابتدا مقدار ۰/۳ میلی‌لیتر از عصاره تهیه شده را درون لوله آزمایش ریخته شد و سپس ۱/۷ میلی‌لیتر سولفوریک اسید به آن اضافه گردید و به مدت ۲۰ دقیقه درون آن در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از سرد شدن نمونه، به خوبی تکان داده

#### ۲.۴.۲. ارزیابی زنده‌مانی جلبک‌ها

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

$$\text{زنده‌مانی (بر حسب درصد)} = \frac{\text{سلول‌های زنده}}{\text{کل سلول‌های جلبکی}} \times 100$$

#### ۲.۵. اندازه‌گیری ترکیب بیوشیمیایی

اندازه‌گیری محتوای پروتئین، چربی و کربوهیدرات براساس روش Meyer and Walter (1988) انجام شد. ابتدا مقدار ۱/۵ میلی‌لیتر از عصاره تهیه شده ریزجلبک درون لوله‌های آزمایش ریخته شد و سپس مقدار ۳ میلی‌لیتر از محلول NaOH به آن اضافه و به مدت ۲۰

استفاده از نرم افزار Excel 2010 رسم گردید.

### ۳. نتایج

#### ۳.۱. ویژگی های پساب دلستر و ملاس

برخی از مهم ترین ویژگی های پساب کارخانه های ملاس و دلستر اندازه گیری و نتایج در جدول ۱ آمده است. پسابها دارای مقادیر متفاوت عناصر غذایی برای رشد جلبک ها هستند و پساب ملاس از نظر مواد غذایی نیتروژن، نیترات، فسفر، فسفات، BOD، COD، TSS و TDS دارای ترکیب بهتر و مناسب تری در مقایسه با پساب دلستر ارزیابی گردید.

جدول ۲- برخی از مهم ترین خصوصیات اندازه گیری شده پساب کارخانه دلستر و ملاس استفاده شده در کشت جلبک *T. tetrahele* بر حسب میلی گرم در لیتر.

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

#### ۳.۳. میزان رشد ویژه، زنده مانی و زیتوده

##### ریز جلبک

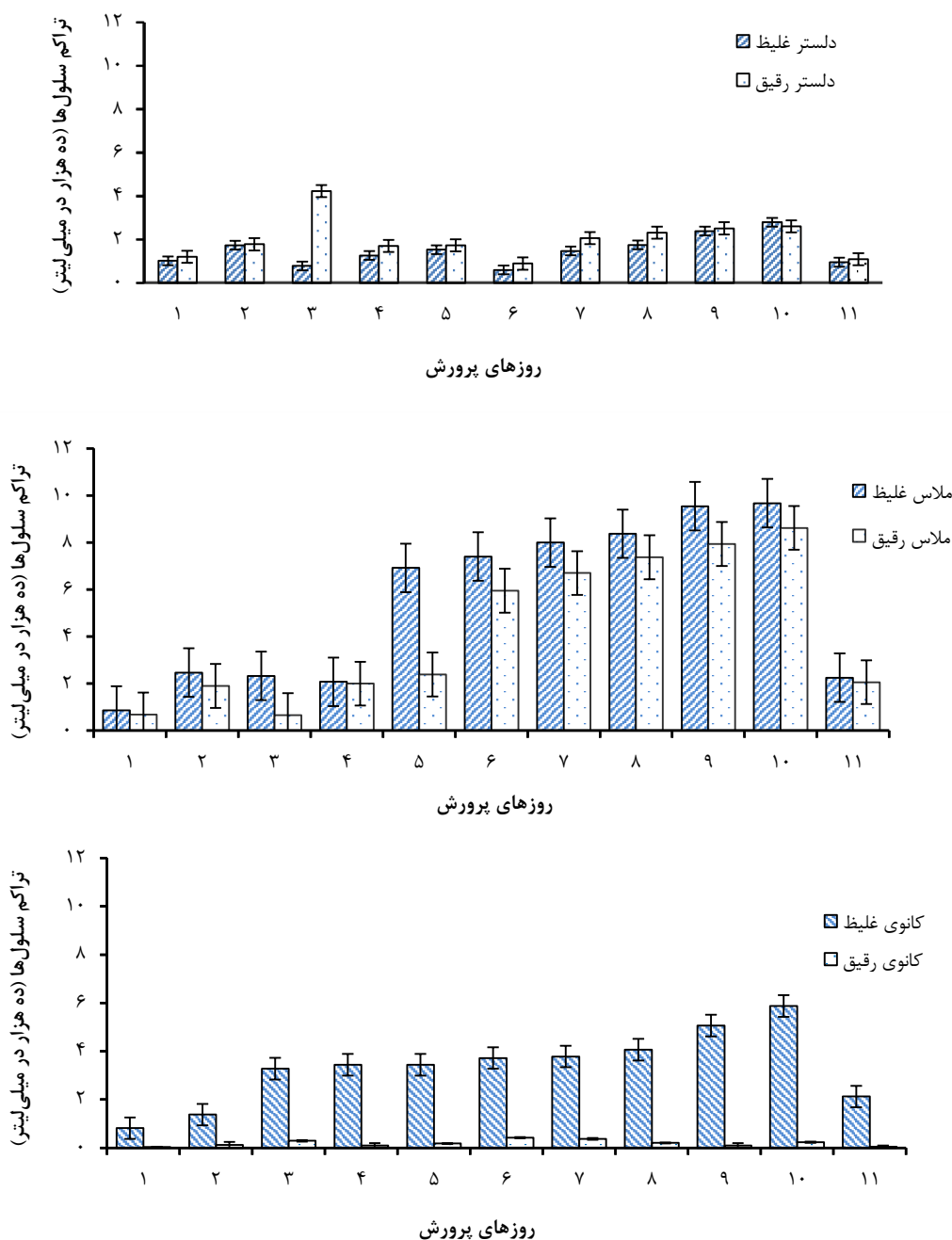
میانگین تعداد سلولها، زنده مانی و میزان رشد ویژه در روز ۱۱ پرورش جلبک *T. tetrahele* در تیمارهای مختلف در شکل ۲ ارائه شده است. نتایج نشان داد که تراکم سلول جلبک در ملاس رقیق و غلیظ تفاوت معنی داری با سایر تیمارها دارند ( $P < 0/05$ )، شکل ۲- الف. میزان رشد ویژه در تیمار ملاس رقیق و غلیظ به ترتیب ۰/۲۵ و ۰/۲۴ در روز و در تیمار دلستر رقیق و غلیظ به ترتیب ۰/۰۸ و ۰/۱۴ در روز بود (شکل ۲-ب). در تیمارهای مختلف از نظر زنده مانی سلولی تفاوت معنی داری مشاهده نشد ( $P > 0/05$ ) اما تیمار ملاس غلیظ

#### ۳.۲. تراکم جلبک در روزهای پرورش

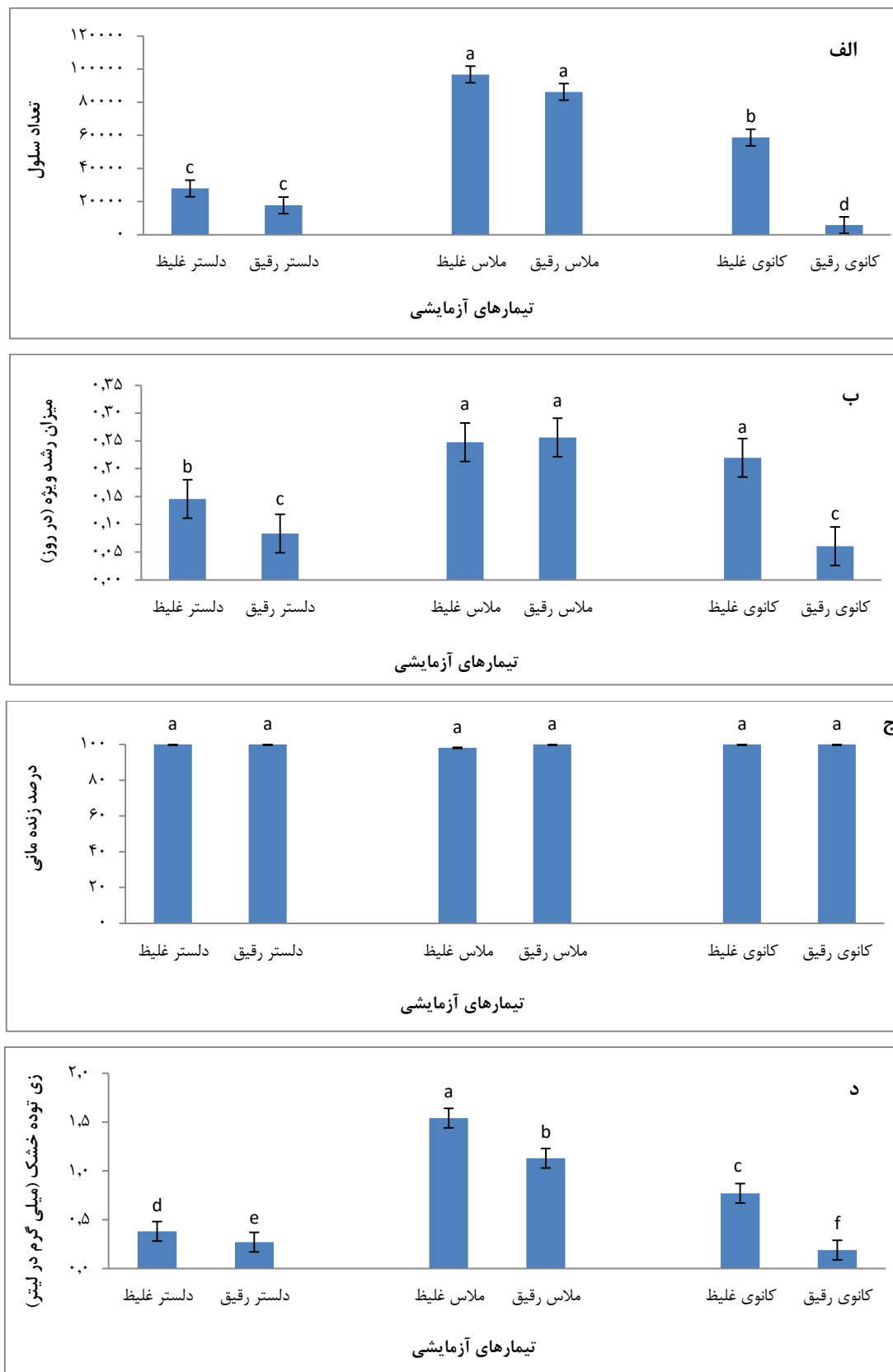
نتایج تیمارهای مختلف از پسابهای دلستر، ملاس و محیط کشت کانوی بر جلبک *T. tetrahele* در دوره پرورش در شکل ۱ ارائه شده است. نتایج نشان داد که بطور کلی استفاده از این دو نوع پساب با تولید مناسبی از جلبک همراه است. اما از نظر تراکم سلولهای جلبکی تفاوتی وجود دارد. بیشترین تراکم سلولهای جلبکی در تیمار ملاس غلیظ  $9/67 \times 10^4$  سلول در میلی لیتر در روز ۱۰ بدست آمد، در حالی که در ریز جلبک پرورش داده شده با کانوی با غلظت کم و زیاد و تیمار دلستر با غلظت کم و زیاد به ترتیب  $4/15 \times 10^4$ ،  $5/87 \times 10^4$ ،  $4/23 \times 10^4$  و  $2/79 \times 10^4$  سلول در میلی لیتر بود.

نشان داد که میزان زیتوده خشک *T. tetrathele* برای تیمار رقیق و غلیظ ملاس بترتیب ۱/۱۳ و ۱/۵۴ میلی 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).

کمترین درصد زنده مانی (۹۳/۱۸ درصد) را در بین تیمارها نشان داد (شکل ۲-ج). میانگین میزان زی توده خشک جلبک *T. tetrathele* پرورش یافته با محیط کشت‌های مختلف نیز در شکل ۳ ارائه شده است. نتایج



شکل ۱- میانگین تراکم سلول‌ها ( $\pm$  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.



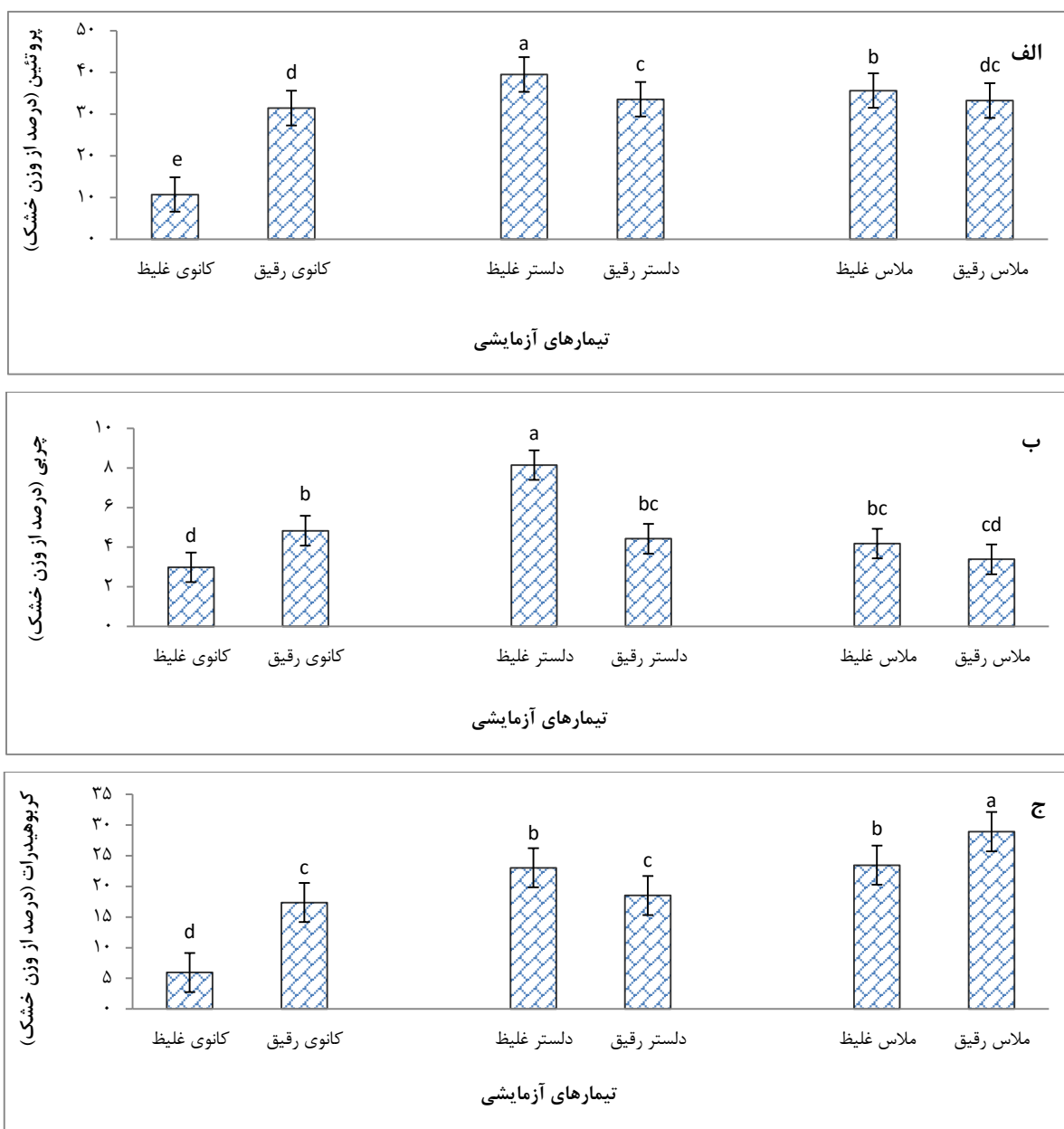
شکل ۲. میانگین ( $\pm$  خطای استاندارد) تعداد سلول (الف)، میزان رشد ویژه (ب)، درصد زنده مانی (ج) و زی توده خشک (د) جلبک *T. tetralele* در انتهای دوره‌ی پرورش، در تیمارهای مختلف آزمایشی. تیمارهای رقیق و غلیظ بترتیب دارای ۵ و ۱۰ میلی لیتر در لیتر از محیط کشت هستند. میانگین‌های دارای حداقل یک حروف مشابه از نظر آماری در سطح ۵ درصد اختلاف معنی داری ندارند ( $P > 0.05$ ).



### ۳.۴. ترکیب بیوشیمیایی

میزان پروتئین، چربی و کربوهیدرات جلبک *T. tetraele* پرورش یافته در محیط‌های کشت مختلف در شکل ۳ ارائه شده است. براساس نتایج بدست آمده بیشترین میزان پروتئین و چربی بترتیب ۳۹/۵۰ درصد 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) و کربوهیدرات (ج) جلبک *T. tetraele* 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 حرف مشابه از نظر آماری در سطح ۵ درصد اختلاف معنی داری ندارند ( $P > 0.05$ ).

#### ۴. بحث و نتیجه گیری نهایی

پساب غنی از نیتروژن و فسفر به همراه دی‌اکسیدکربن و انرژی خورشیدی، فراهم‌کننده شرایط مناسب برای رشد و تکثیر ریزجلبک‌ها است که سرانجام منتج به تولید زیتوده مفید جلبکی و کاهش غلظت نیتروژن و فسفر پساب خواهد شد (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 و ملاس، تولید زیتوده ریزجلبک *Scenedesmus acutus*، یک روند افزایشی را از ۴۶ 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 غلظت‌های 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 در صد 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 ریزجلبک‌ها تأثیر می‌گذارد. 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

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 نمیتوان 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 مناسب تری در مقایسه با پساب دلستر است. همچنین بیشترین میزان پروتئین (۳۹/۵۰ درصد) و چربی (۸/۱۴ درصد) در تیمار دلستر غلیظ و بیشترین میزان کربوهیدرات (۲۸/۹۲ درصد) با کشت ملاس رقیق حاصل شد.

### نتیجه گیری نهایی

می توان 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 گونه های 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 دکتر ابراهیم متقی نیز کمال تشکر را داریم.

(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<sub>2</sub> باشد.

در این مطالعه، 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 بدست آمد. Tanaka و همکاران در سال ۱۹۸۸ دریافتند که وقتی جلبکها تحت شرایط تنش نیتروژن قرار می گیرند میزان چربی آنها افزایش می یابد، اما گونه هایی مانند *T. suecica* با افزایش کربوهیدرات بیش از چربیها، به این شرایط پاسخ می دهند (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 به عنوان 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 می تواند با افزایش وزن خشک جلبک ارتباط داشته باشد. Becker and Venkataraman (۱۹۷۹) بیان داشتند که افزایش مقدار کربوهیدرات *Scenedesmus acutus* کشت داده شده با ملاس و CO<sub>2</sub> ممکن است به میزان تقسیم سلولی بیشتر نسبت داده شود. بنابراین رشد هتروتروفی منجر به انباشت کربوهیدرات می شود.

در این تحقیق اثر دو نوع پساب کارخانه ملاس و کارخانه دلستر به صورت رقیق و غلیظ به عنوان محیط

## 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 *Scenedesmus 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 obliquus*. *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, 23<sup>rd</sup> 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.

